



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ &
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ
ESCHERICHIA COLI ΚΑΙ ΤΟΥ PROTEUS MIRABILIS

ΣΤΑΜΑΤΙΑ ΜΠΟΤΣΑΡΗ
ΙΑΤΡΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ - ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

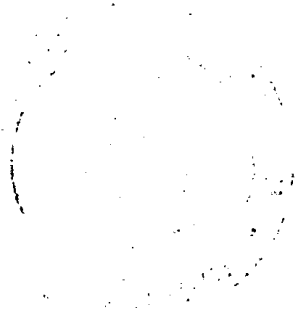
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000304420



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).



Ημερομηνία αίτησης της κ. Μπότσαρη Σταματίας: 21-6-1999

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 399^α/29-2-2000

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 1-2-2001

«Η Επίδραση του Καδμίου στην Ανάπτυξη της E.coli και του Proteus Mirabilis»

Ημερομηνία 1^η Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 631^α/18-3-2008

Επιβλέπων

Μαυρίδης Ανέστης Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία 2^η Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 640^α/17-6-2008

Επιβλέπων

Μαυρίδης Ανέστης Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γιαννάκης Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 642^α/8-7-2008

Ανωγειανάκης Γεώργιος

Καθηγητής Φυσιολογίας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου
Θεσσαλονίκης

Ευαγγέλου Άγγελος

Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαυρίδης Ανέστης

Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Φατούρος Μιχαήλ

Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη
Λειτουργική -Κλινική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γιαννάκης Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καρκαμπούνας Σπυρίδων

Λέκτορας Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-11-2008

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



... και ...

... και ...

Στη μνήμη του αδερφού μου

... και ...

... και ...

... και ...



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το κάδμιο (Cd) είναι ένα σχετικά σπάνιο μέταλλο και κατέχει την 67^η θέση σε ότι αφορά τη χημική αφθονία. Βρίσκεται στην φύση σε πολύ μικρές ποσότητες. Παρόλα αυτά, επειδή οι ανθρωπογενείς εκπομπές ξεπερνούν κατά πολύ τις εκπομπές του Cd από φυσικές πηγές, συχνά παρατηρούνται αυξήσεις των επιπέδων του από τα φυσιολογικά επίπεδα. Το Cd όπως και άλλα βαριά μέταλλα δεν έχει καμία βιοχημική ή διατροφική ιδιότητα και είναι πολύ τοξικό και στα φυτά και στα ζώα. Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, το φορτίο του ανθρώπινου σώματος σε Cd έχει αυξηθεί ως αποτέλεσμα των ανεξέλεγκτων βιομηχανικών εκπομπών στο παρελθόν. (USPHS 1997, WHO 1992, Alloway 1990).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθούν οι τοξικές και οι τυχόν ευεργετικές δράσεις του Cd στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* σε συγκεντρώσεις που απαντώνται φυσιολογικά στα ούρα του ανθρώπου και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή μικρότερες από τις φυσιολογικές. Επιπλέον ερευνήθηκαν οι επιδράσεις διαφόρων συγκεντρώσεων Cd στα βακτήρια *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* και σε συνδυασμό με το αντιβιοτικό cefuroxime.

Μεγάλο μέρος της διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μαυρίδη Ανέστη, προς τον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου για την καρποφόρο επίβλεψη και την επιστημονική του καθοδήγηση.

Επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων κ. Ευαγγέλου Άγγελο, για το αμέριστο ενδιαφέρον του και τις σημαντικές υποδείξεις του.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Ανωγειανάκη Γεώργιο για την άψογη συνεργασία και τις χρήσιμες υποδείξεις του.

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Φατούρο Μιχαήλ για την άψογη συνεργασία.

Θερμές ευχαριστίες στον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Χαραλαμπόπουλο Κωνσταντίνο για την άψογη συνεργασία και τις υποδείξεις του.

Θερμά ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Γιαννάκη Δημήτριο για την άψογη συνεργασία, το αμέριστο ενδιαφέρον του και τις χρήσιμες υποδείξεις του.

Ευχαριστώ θερμά τον Λέκτορα Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Καρκαμπούνα Σπυρίδωνα για την βοήθειά του και το συνεχές ενδιαφέρον του.

Ακόμη θέλω να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Καλφακάκου Βασιλική για τις σημαντικές υποδείξεις της και το αμέριστο ενδιαφέρον της.

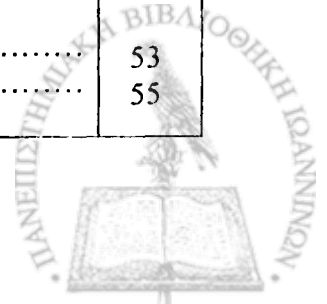
Θερμά ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κ. Ελένη Γκεσούλη, τη Λέκτορα Μικροβιολογίας κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται προς όλο το προσωπικό του Γενικού Χημείου του Κράτους παράρτημα Ιωαννίνων, καθώς μεγάλο τμήμα των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στα εργαστήριά του.

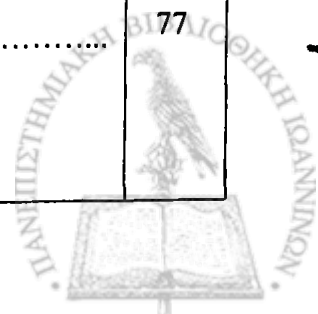


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ..
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	i-iii
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	iv-vi
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1:ΤΟ ΚΑΔΜΙΟ (Cd)	1
1.1 Ύπαρξη στην φύση, παραγωγή, χρήση και ανθρωπογενείς πηγές.....	1
1.2 Επίπεδα στο περιβάλλον, μόλυνση και συμπεριφορά	1
1.3 Τοξικότητα.....	4
2: Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΣΗΣ: ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	11
2.1 Λοιμώξεις από βακτήρια και η άμυνα του οργανισμού.....	11
2.2 Παθογόνες ιδιότητες των βακτηρίων.....	12
3: ΤΑ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ (<i>ESCHERICHIA COLI</i>, <i>PROTEUS SPP</i>) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ	16
3.1 Ανατομικά και λειτουργικά στοιχεία του ουροποιητικού συστήματος και οι λοιμώξεις του ουροποιητικού.....	16
3.2 Η μικροβιολογική εξέταση των ούρων και η τεχνική ουροκαλλιέργειας.....	19
3.3 Η αξιολόγηση ουροκαλλιέργειας.....	27
3.4 Η τυποποίηση των εντεροβακτηριακών.....	30
3.5 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.....	33
3.6 Φαρμακοκινητική των αντιβιοτικών.....	39
3.7 Αντοχή των εντεροβακτηριοειδών στα αντιβιοτικά.....	41
3.8 Η οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών. Γενικά χαρακτηριστικά, παθογένεια, λοιμογόνι παράγοντες, κλινικά σύνδρομα.....	43
3.9 Χαρακτηριστικά, δομή και ιδιότητες της <i>Escherichia coli</i> , του σημαντικότερου είδους του γένους <i>Escherichia</i>	45
3.10 Ο ρόλος της <i>Escherichia coli</i> στην εκδήλωση γαστρεντερίτιδας, σηψαιμίας, μηνιγγίτιδας και ουρολοίμωξης.....	46
3.11 Χαρακτηριστικά, δομή και ιδιότητες της φυλής <i>Proteae</i> και του γένους <i>Proteus</i>	50
3.12 Ο ρόλος του <i>Proteus mirabilis</i> στις ουρολοιμώξεις.....	52
4: Η ΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΒΑΡΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΗΝ <i>E. COLI</i> ΚΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	53
4.1 Η ύπαρξη τοξικών μετάλλων και Cd στα ούρα.....	53
4.2 Η τοξική επίδραση βαριών μετάλλων και του Cd στην <i>E.Coli</i>	55



4.3 Τα συστήματα ανθεκτικότητας των βακτηρίων και της <i>E. Coli</i> έναντι στην τοξικότητα των βαριών μετάλλων και του Cd.....	57
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	61
1. Απαιτούμενα υλικά.....	61
2. Θρεπτικά υποστρώματα.....	61
3. Μικροβιακά στελέχη.....	62
4. Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης.....	62
4.1 Θεωρία.....	62
4.2 Έννοιες εφαρμογής.....	64
4.3 Εισαγωγή δείγματος και σχηματισμός ατόμων στην ETAAS (GFAA).....	64
4.4 Πηγές φωτός για την FAAS και την ETAAS.....	66
5. Θολερότητα-νεφελομετρική μέθοδος.....	69
5.1 Γενικά.....	69
5.2 Παρεμποδιστικές ουσίες, δειγματοληψία και συντήρηση δείγματος.....	69
5.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός (θολερόμετρο, σωλήνες).....	70
5.4 Αντιδραστήρια.....	70
5.5 Περιγραφή διαδικασίας.....	71
5.6 Υπολογισμός.....	71
5.7 Έκφραση αποτελεσμάτων.....	71
6. Φωτόμετρα συστήματος και φωτομετρικά τεστ κιτ.....	72
6.1 Η φωτομετρία.....	72
6.2 Τα φωτόμετρα.....	73
6.3 Βασικές αρχές φωτομετρικών τεστ κιτ.....	73
6.4 Υποδείξεις στην πράξη.....	74
7. Μέτρηση συγκεντρώσεων Cd σε ούρα 24ωρου υγιών ατόμων.....	76
8. Παρασκευή διαλυμάτων διαδοχικών αραιώσεων του καδμίου (Cd).....	76
9. Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος με τα βακτήρια <i>E. Coli</i> και <i>P. Mirabilis</i>	76
10. Επώαση ανάγνωση και ενοφθαλμισμός.....	77
11. Έλεγχος ευαισθησίας των βακτηρίων <i>E. Coli</i> και <i>P. Mirabilis</i> στα αντιβιοτικά.....	77



III ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	79
1. Μετρήσεις Cd στα ούρα 24ωρου υγείων ατόμων.....	79
2. Οι επιδράσεις του Cd στην ανάπτυξη των βακτηρίων <i>Esheria coli</i> και <i>Proteus mirabilis</i>	80
3. Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου <i>Escherichia coli</i> και <i>Proteus mirabilis</i> στα αντιβιοτικά.....	95
4. Η επίδραση του καδμίου (Cd) και του cefuroxime (zinacef) στην ανάπτυξη της <i>Escherichia coli</i> και του <i>Proteus mirabilis</i>	96
IV ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	111
V ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117
VI ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	119
ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	119
ΑΓΓΛΙΚΗ.....	121
VII ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	123
VIII ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	131



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- AAS:** Atomic Absorption Spectrometry/ Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης
- Ag:** Silver/Αργυρος
- Al:** Aluminium/ Αλουμίνιο
- AMD:** Age-related Macular Degeneration/Εξαρτώμενος από την ηλικία Εκφυλισμός ωχρής κηλίδας
- ΑΝΣ:** Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα
- As:** Arsenic/ Αρσενικό
- ATCase:** Aspartate Transcarbamoylase/Ασπαρτική Τρανσκαρβαμυλάση
- ATPase:** Adenosine Triphosphatase/ΑΤΡαση
- Bi:** Bismuth /Βισμούθιο
- CA:** Cellular Carbonic Anhydrase/Κυτταρική Καρβονική Ανυδράση
- cAMP:** Cyclic Adenosine Monophosphate/ Κυκλική Μονοφωσφορική Αδενοσίνη
- CAN:** Columbia agar Nadic acid/ Columbia άγαρ με ναλιδικό οξύ
- CC16:** Human Clara Cell protein/Πρωτεΐνη των Ανθρώπινων Κυττάρων Clara,
- Cd:** Cadmium/ Κάδμιο
- CdU:** Cadmium in Urine/συγκέντρωση Cd στα ούρα
- CFA:** Colonization Factors Antigens/Αντιγόνα Παραγόντων σχηματισμού αποικιών
- CFU** Colony Forming Units /μονάδες παραγωγής αποικιών
- Co:** Cobalt/ Κοβάλτιο
- CO₂:** Carbon Dioxide/Διοξείδιο του Άνθρακα
- Cr:** Chromium/Χρώμιο
- Cu:** Copper/ Χαλκός
- DNA:** Deoxyribonucleic Acid/Δεσοξυριβονουκλεϊνικό Οξύ
- EDL:** Electrodeless Discharge Lamp /Λαμπτήρας Εκροής Χωρίς Ηλεκτρόδια
- EHEC:** Enterohaemorrhagic *E. Coli* /Έντεροαιμορραγικό στέλεχος *E. Coli*



- EIEC:** Enteroinvasive *E. Coli*/ Εντεροδιδεισδυτικό στέλεχος *E. Coli*
- EPEC:** Enteropathogenic *E. Coli*/ Εντεροπαθογόνο στέλεχος *E. Coli*
- ETAAS:** Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry/ Ηλεκτροθερμική Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης
- ETEC:** Enterotoxigenic *E. Coli* /Εντεροτοξινογόνο στέλεχος *E. Coli*
- FAAS:** flame Atomic Absorption Spectrometry/ Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης με φλόγα
- HCL:** Hollow Cathode Lamp/ Κοίλος Καθοδικός Λαμπτήρας
- Hg:** Mercury/ Υδράργυρος
- IgA:** Immunoglobulin A/Ανοσοσφαιρίνη Α
- IMViC:** Indol, Methyl red, Voges-Proskauer, Citrate/Ινδόλη, Ερυθρό του Μεθυλίου, δοκιμασία Voges-Proskauer, Κιτρικό Νάτριο
- IARC:** International Agency for Research on Cancer/Διεθνές Πρακτορείο για την Έρευνα στον Καρκίνο»
- γ-IFN:** γ-interferon/ γ-ιντερφερόνη
- IL-1:** interleukin-1/ιντερευκίνη-1
- ΚΝΣ:** Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- LT:** Labile Toxin/Θερμοευαίσθητη Τοξίνη
- MBC:** Minimum Bactericidal Concentration/ ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση
- MC:** MacConkey agar/ MacConkey άγαρ
- MDR:** Human Multidrug Resistance Proteins/ Ανθρώπινες Πρωτεΐνες Ανθεκτικότητας στην Πολυφαρμακία
- ΜΕΘ:** Μονάδα Εντατικής Θεραπείας
- Mg:** Magnesium/ Μαγνήσιο
- MIC:** Minimum Inhibitory Concentration /ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα
- MR:** methyl red/ερυθρό του μεθυλίου
- MTs:** Metallothioneins/ Μεταλλοθειονίνες
- NAG:** N-acetyl-beta-D-glucosaminidase/ N-ακετυλό-βήτα-D-γλυκοσαμινιδάση



NCCLS: National Committee for Clinical of Laboratory Standards/Εθνικό Συμβούλιο για Κλινικά και Εργαστηριακά δεδομένα

Ni: Nickel/ Νικέλιο

N.T.U.: Nephelometric Turbidity Units /Νεφελομετρικές Μονάδες Θολερότητας

Pb: Lead/Μόλυβδος

PTWI: Provisional Tolerable Weekly Intake/Προσωρινή Εβδομαδιαία Ανεκτική Λήψη

RBP: retinol-binding protein/πρωτεΐνη συνδεδεμένη με την ρετινόλη

SIRS: Systemic Inflammatory Reaction Syndrome / Σύνδρομο Συστηματικής Φλεγμονώδους Αντίδρασης

SOD: superoxide dismutase/δισμουτάση του υπεροξειδίου

Te: Tellurium/ Τελλούριο

Th: Thallium/ Θάλλιο

TSS: Toxic Shock syndrome / σύνδρομο του οξικού σοκ

TWCA1: *Thalassiosira weissflogii* cellular carbonic anhydrase/καρβονική ανυδράση του *Thalassiosira weissflogii*

U: Uranium/ Ουράνιο

VT: Verotoxin/Βεροτοξίνη

VTEC: Verotoxic *E. Coli*/Βεροτοξικό στέλεχος *E. Coli*

WHO: World Health Organization/ Διεθνή Οργάνωση Υγείας

Zn: Zinc/ Ψευδάργυρος



I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1: ΤΟ ΚΑΔΜΙΟ (Cd)

1.1 Ύπαρξη στην φύση, παραγωγή, χρήση και ανθρωπογενείς πηγές

Το κάδμιο (Cd) είναι ένα σχετικά σπάνιο μέταλλο και κατέχει την 67^η θέση σε ότι αφορά τη γημική αφθονία. Μπορεί να βρεθεί στον φλοιό της Γης σε συγκέντρωση 0,1 mg/kg (WHO 1992), κατά μέσο όρο, παρόλο που σε ορισμένα ιζηματογενή πετρώματα, σε μαύρους σχιστόλιθους, και σε θαλάσσια φωσφορικά άλατα μπορεί να βρεθούν υψηλότερες ποσότητες του μετάλλου (WHO 1992, Alloway 1990). Το Cd συνήθως βρίσκεται ενωμένο με θειούχα μεταλλεύματα του ψευδαργύρου (Zn), του χαλκού (Cu) και του μόλυβδου (Pb) και παράγεται σαν παραπροϊόν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας αυτών των μεταλλευμάτων. Η ηφαιστειακή δραστηριότητα είναι η κύρια φυσική πηγή της απελευθέρωσης του Cd στην ατμόσφαιρα. Επίσης το Cd απελευθερώνεται από εκπομπές μορίων του εδάφους από τον άνεμο, από πυρκαγιές δασών, από το αλάτι με τον μπουχό της θάλασσας και από βιογενείς διαδικασίες. Εκτιμάται ότι η συνολική ποσότητα του Cd που απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα από φυσικές πηγές είναι 1400 τόνοι τον χρόνο, ενώ η υπολογισμένη ποσότητα από ανθρωπογενείς πηγές είναι 7600 τόνοι τον χρόνο (Nriagu, 1990).

Στο παρελθόν η κύρια χρήση του στοιχειακού Cd ήταν η ηλεκτροχημική επιμετάλλωση άλλων μετάλλων, όπως ο χάλυβας, σήμερα όμως η χρήση αυτή του καδμίου υποχωρεί. Το Cd στις μέρες μας χρησιμοποιείται κυρίως ως ηλεκτρόδιο στις επαναφορτιζόμενες μπαταρίες νικελίου-καδμίου (37%) αλλά ακόμα και για επιμετάλλωση (25%). Επίσης χρησιμοποιείται στην ιοντική του μορφή (CdS και CdSe) σαν χρωστική για τη βαφή γυάλινων και πλαστικών (22%). Οι χρωστικές του CdS έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λαμπρών κίτρινων χρωμάτων για 150 χρόνια και προς το παρόν δεν υπάρχουν κατάλληλα υποκατάστατα. Ακόμα το Cd χρησιμοποιείται σαν σταθεροποιητής στο χλωριούχο πολυβινύλιο (12%) και σαν συστατικό διαφόρων κραμάτων μετάλλων (4%). Οι ανθρωπογενείς εκπομπές του Cd καταγράφονται στους πίνακες 11 - 13 (Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου, 1990, USPHS 1997, WHO 1992).

1.2 Επίπεδα στο περιβάλλον, μόλυνση και συμπεριφορά

Το Cd είναι ένα μέταλλο το οποίο βρίσκεται στην φύση σε πολύ μικρές ποσότητες (πίνακας 14). Παρόλα αυτά, επειδή οι ανθρωπογενείς εκπομπές ξεπερνούν κατά πολύ τις εκπομπές του Cd από φυσικές πηγές, συχνά παρατηρούνται αυξήσεις των επιπέδων του από τα φυσιολογικά επίπεδα (πίνακας 15).

Το Cd είναι πιο κινητικό σε υδατικό περιβάλλον από τα περισσότερα από τα άλλα μέταλλα. Επίσης είναι βιοσυσσωρευτικό και μένει σταθερό στο περιβάλλον με χρόνο ημιζωής ($t^{1/2}$) 10- 30 χρόνια (USPHS 1997). Βρίσκεται στην επιφάνεια και στο νερό του εδάφους είτε με τη μορφή του +2 ένυδρου ιόντος, είτε με αυτή του ιοντικού συμπλόκου με άλλες ανόργανες και οργανικές ουσίες. Ενώ οι διαλυτές μορφές του μπορούν να μετακινηθούν προς στο νερό, το Cd στα αδιάλυτα σύμπλοκα ή αυτό που βρίσκεται στα ιζήματα σχεδόν δεν μετακινείται. Παρομοίως, το Cd στο έδαφος μπορεί να υπάρχει σε διαλυτή μορφή στο νερό του εδάφους ή σε αδιάλυτα σύμπλοκα με ανόργανα και οργανικά συστατικά του εδάφους (USPHS 1997, WHO 1993).



Πίνακας Ι1. Εκπομπές καδμίου στην ατμόσφαιρα από ανθρωπογενείς πηγές παγκοσμίως (WHO 1992, Nriagu, 1990)

Πηγή	Εκπομπές (χιλιάδες τόνους /χρόνο)
Μη-σιδηρούχος παραγωγή μετάλλων (Zn, Cd, Cu, Pb, Ni)	5,43
Παραγωγή ενέργειας (καύση άνθρακα και πετρελαίου)	0,79
Αποτέφρωση αποβλήτων (απορρίμματα δήμων και ακαθαρσίες υπονόμων)	0,75
Μέθοδοι παρασκευών βιομηχανικών προϊόντων (χάλυβας, σίδηρος, φωσφορικά λιπάσματα, τσιμέντο)	0,60
ΣΥΝΟΛΟ	7,57

Πίνακας Ι2. Πηγές εισαγωγής καδμίου μέσα σε υδατικά οικοσυστήματα παγκοσμίως (WHO 1992, Nriagu, 1990)

Πηγή	Εκπομπές (χιλιάδες τόνους /χρόνο)
Βιομηχανικά προϊόντα (μέταλλα, μπαταρίες, βαφές, πλαστικά)	2,4
Διαρροή από την ατμόσφαιρα	2,2
Εξόρυξη και λιώσιμο μετάλλων	2,0
Οικιακά ακάθαρτα νερά	1,7
Εκροές ακαθαρσιών υπονόμων	0,69
Σταθμοί ηλεκτρικής ενέργειας	0,12
ΣΥΝΟΛΟ	9,11

Πίνακας Ι3. Πηγές εισαγωγής καδμίου στο έδαφος παγκοσμίως (WHO 1992, Nriagu, 1990)

Πηγή	Εκπομπές (χιλιάδες τόνους /χρόνο)
Στάχτες άνθρακα	7,2
Διαρροή από την ατμόσφαιρα	5,3
Απορρίμματα από αστικές περιοχές	4,2
Γεωργικά και ζωικά απόβλητα	2,2
Πεταμένα βιομηχανικά προϊόντα	1,2



Πίνακας 14. Συγκεντρώσεις καδμίου που βρίσκονται στο νερό, στο ίζημα και στο έδαφος.

Περιβαλλοντικό στρώμα	Συγκέντρωση	Βιβλιογραφική αναφορά
Γλυκό νερό, νερό του εδάφους, πόσιμο νερό	<1 µg/l	USPHS 1997, WHO 1992
Θαλασσινό νερό (ανοιχτού ωκεανού)	0,02-0,12 µg/l	Sadiq 1992, Bryan and Langston 1992
Θαλασσινό νερό (παραλιακό)	0,01-0,17 µg/l	Bryan and Langston 1992
Θαλασσινό ίζημα	<1 mg/kg	Sadiq 1992, Salomons and Forstner 1984
Ίζημα εκβολής ποταμού	0,2 mg/kg	Bryan and Langston 1992
Ίζημα ποταμού	1 mg/kg	Salomons and Forstner 1984
Έδαφος	0,01-2,0 mg/kg	USPHS 1997, Alloway 1990

Πίνακας 15. Συγκεντρώσεις καδμίου που σχετίζονται με τοποθεσίες ανθρωπογενούς μόλυνσης και αποβλήτων

Περιγραφή τοποθεσίας	Συγκέντρωση	Βιβλιογραφική αναφορά
Θαλασσινό νερό, Restrongue Creek, Ηνωμένο Βασίλειο (εκτίθεται σε όξινα ύδατα προερχόμενα από ορυχείο από δραστηριότητες εξόρυξης σήμερα και στο παρελθόν)	50 µg/l	Bryan and Langston 1992
Ίζημα, Donana National Park, Ισπανία. (τοποθεσία μολυσμένη από απόβλητα ορυχείο)	2,4-38,6 mg/kg	Pain et al. 1998
Έδαφη και ιζήματα, Ταϊβάν, κοντά σε εργοστάσιο σταθεροποιητών πλαστικών	0,22-1,486 mg/kg (έδαφος) 134-4.700 mg/kg (ίζημα)	Chen 1991
Έδαφος, λιώσιμο Zn-Pb, Upper Silesia, Πολωνία	0,3-102 mg/kg	Dudka et al. 1995a
Έδαφος, περιοχή εξόρυξης Cu-Ni Sudbury, Ontario	0,1-10 mg/kg	Dudka et al. 1995b
Έδαφος κήπου, Shipham, Ηνωμένο Βασίλειο (τοποθεσία εξόρυξης Zn-Pb στο παρελθόν)	360 mg/kg (η μέγιστη ποσότητα)	Alloway 1990
SMW fly ash (αποτεφρωτήρες στο Ηνωμένο Βασίλειο)	21-646 mg/kg	Mitchell et al. 1992



Η γεωργική χρήση φωσφορικών λιπασμάτων ή οι ακαθαρσίες υπονόμων που περιέχουν Cd, μπορεί να αυξήσουν δραματικά την συγκέντρωση του στα εδάφη. Επίσης, το Cd μπορεί να βρεθεί στα δημητριακά, στο ρύζι και στα λαχανικά, και υπάρχει ένας καθαρός συσχετισμός μεταξύ της συγκέντρωσης του Cd στο έδαφος και στα φυτά που αναπτύσσονται στο έδαφος αυτό (Elinder and Jarup 1996, Cabrera et al. 1994, WHO 1992).

Όταν βρίσκεται σε μορφή που μπορεί να ληφθεί από βιολογικούς οργανισμούς, τότε είναι γνωστό ότι οι οργανισμοί και του νερού και του εδάφους βιοσυσσωρεύουν το κάδμιο. Σύμφωνα με μελέτες η συσσώρευση σε υδρόβια ζώα γίνεται σε συγκεντρώσεις κατά εκατό και χίλιες φορές μεγαλύτερες από ότι είναι οι συγκεντρώσεις στο νερό (USPHS 1997). Σε ότι αφορά τη συσσώρευση του μετάλλου στο νερό μια πρόσφατη μελέτη επισημαίνει ότι διάφορα μικρόβια όπως τα βακτήρια γαλακτικού οξέος, *Bifidobacterium longum* 46, *Lactobacillus fermentum* ME3 και *Bifidobacterium lactis* Bb12, έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν βαριά μέταλλα όπως το Cd και τον Pb από το νερό, πολύ πιο οικονομικά από ότι συμβαίνει με κοινές μεθόδους όπως η καθίζηση, η κροκίδωση, η ανταλλαγή ιόντων και η διήθηση με μεμβράνη (Halttunen, Salminen, and Tahvonon, 2007).

Συγκέντρωση Cd έχει βρεθεί σύμφωνα με δημοσιεύσεις σε χόρτα και σε καλλιέργειες τροφίμων καθώς και σε σκώληκες εδάφους, σε πουλερικά, σε βοοειδή, σε άλογα και στα αγρίμια (WHO 1992). Η ιδιότητα του βιομαγνητισμού δεν έχει αποδειχτεί για το Cd. Εντούτοις, η προσρόφηση Cd από το έδαφος, από τις καλλιέργειες τροφίμων, μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη Cd σε υψηλά επίπεδα στα μισχάρια και τα πουλερικά (ειδικά στο ήπαρ και στα νεφρά). Η συσσώρευση αυτή του Cd στην τροφική αλυσίδα έχει σημαντικές επιπτώσεις για την έκθεση στον άνθρωπο, ανεξάρτητα αν υπάρχει ή όχι σημαντικός βιομαγνητισμός (USPHS 1997). Τα άτομα που καπνίζουν εκτίθενται στο Cd, που απορροφούν τα φύλλα του καπνού από το έδαφος και το νερό άρδευσης και απελευθερώνεται στο ρεύμα καπνού όταν καίγεται το τσιγάρο. Η ημερήσια πρόσληψη Cd με τις τροφές φτάνει τα 50 μg και με το κάπνισμα τα 2-4 μg για ένα πακέτο τσιγάρα. Πρέπει να τονιστεί ότι το Cd που προσλαμβάνεται με την τροφή παραμένει μόνο κατά 5% στο σώμα, ενώ με την αναπνοή κατά 40% (Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου, 1990).

1.3 Τοξικότητα

Το Cd, όπως και άλλα βαριά μέταλλα όπως το αλουμίνιο (Al), ο υδράργυρος (Hg), και ο Pb, δεν έχει καμία βιοχημική ή διατροφική ιδιότητα και είναι πολύ τοξικό και στα φυτά και στα ζώα (Gadd, 1990, Nriagu, 1990, USPHS 1997, WHO 1992, Alloway 1990). Ο χρόνος ημιζωής του εκτιμάται ότι είναι περισσότερο από 15 χρόνια στον άνθρωπο. Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, το φορτίο του σώματος σε Cd του γενικού πληθυσμού των πιο προηγμένων βιομηχανικά χωρών έχει αυξηθεί ως αποτέλεσμα των ανεξέλεγκτων βιομηχανικών εκπομπών στο παρελθόν. Παρόλο που τα επίπεδα των εκπομπών έχουν μειωθεί σημαντικά και ενδέχεται να τεθεί και ένα όριο σε ότι αφορά την έκθεση των ανθρώπων στο Cd στο κοντινό μέλλον, υπάρχουν πληθυσμοί που εκτίθενται υπερβολικά στο μέταλλο αυτό στην βιομηχανία και σε ορισμένες μολυσμένες περιοχές (Roels et al. 1993, Mueller et al. 1992, Bernard, 2004).

Η τοξική δράση του Cd εκδηλώνεται με πολλούς τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η αντικατάσταση του Zn ο οποίος είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο σε διάφορα βιολογικά συστήματα (Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου, 1990). Η



θανατηφόρος δόση είναι περίπου 1 gr. Οι άνθρωποι προστατεύονται απέναντι στη χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα Cd από την πλούσια σε θείο πρωτεΐνη, την μεταλλοθειονίνη, που ρυθμίζει το μεταβολισμό του ψευδαργύρου. Η μεταλλοθειονίνη μπορεί να συμπλοκοποιήσει όλο σχεδόν το προσλαμβανόμενο Cd^{2+} , επειδή έχει πολλές σουλφυδρυλικές ομάδες, και το σύμπλοκο στη συνέχεια αποβάλλεται με την ουρία (Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου, 1990). Τα δύο κύρια όργανα αποθήκευσης του Cd είναι ο νεφρός και το ήπαρ τα οποία και περιέχουν περίπου το 50% του ολικού σωματικού φορτίου (Bernard, 2004).

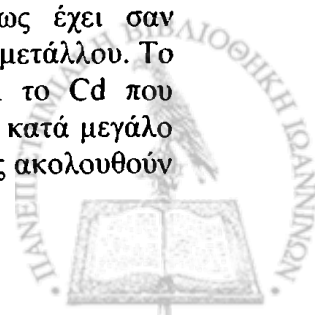
- Το Cd μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους νεφρούς μετά από παρατεταμένη έκθεση σε συνθήκες βιομηχανίας ή στο μολυσμένο περιβάλλον. Η ολική ποσότητα του Cd που συσσωρεύεται στους νεφρούς μπορεί να υπολογιστεί in vivo με ενεργοποίηση νετρονίων ή με φθορισμό ακτινών X, αλλά αυτή η τεχνική δεν μετράει απαραίτητα το κλάσμα που είναι βιολογικά ενεργό. Η βλάβη στους νεφρούς που επάγεται από το Cd επηρεάζει κυρίως την κυτταρική και τη λειτουργική ακεραιότητα από τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια, όπου είναι τα σημεία στα οποία κυρίως συσσωρεύεται το μέταλλο (Lauwerys, 1994, Bernard, 2004).

Μια μεγάλη σειρά βιολογικών δεικτών της νεφροτοξικότητας από το Cd έχει ερευνηθεί σε άτομα που εκτέθηκαν στο Cd στην βιομηχανία ή στο περιβάλλον. Οι δείκτες που έχουν μελετηθεί οι οποίοι συνήθως υπολογίζονται στα ούρα, περιλαμβάνουν αντιγόνα από τον νεφρό ή ένζυμα, πρωτεΐνες πλάσματος που δείχνουν την διαπερατότητα του φιλτραρίσματος του αγγειώδους σπειράματος ή την ικανότητα επαναρρόφησης πρωτεϊνών από τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια και διάφορα μικρά μόρια που υπό κανονικές συνθήκες επανααρροφώνται από τα σωληνάρια όπως το ασβέστιο και τα αμινοξέα (Bernard, 1996, Wu, et al. 2001). Παρόλο που αυτοί οι δείκτες έχουν εξασφαλίσει σημαντική γνώση σχετικά με τους μηχανισμούς της τοξικότητας του Cd και των κρίσιμων ορίων της έκθεσης, λίγοι από αυτούς έχουν αποδειχτεί επαρκώς ευαίσθητοι και αξιόπιστοι για χρήση σε δοκιμασίες ρουτίνας. Μεταξύ αυτών, ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών μοριακού βάρους μικρότερου των 40 kDa στα ούρα αναγνωρίζεται σήμερα ως η πιο χρήσιμη προσέγγιση για την πρόωμη ανίχνευση της νεφροπάθειας από το Cd. Επειδή σε υγιή άτομα η επαναρρόφηση αυτών των μικρών πρωτεϊνών είναι σχεδόν πλήρης (περισσότερη από 99,9%), μια μικρή ελάττωση στη ικανότητα επαναρρόφησης προκαλεί μια μεγάλη αύξηση στην έκκριση μικροπρωτεϊνών στα ούρα όπως της β_2 -μικροσφαιρίνης ή της «πρωτεΐνης της συνδεδεμένης με την ρετινόλη» (RBP) των οποίων οι πυκνότητες σε πιο εξελιγμένες περιπτώσεις νεφροπάθειας από το Cd μπορεί και να φτάσουν σε επίπεδα 1000 φορές πάνω από τα κανονικά. Η μέθοδος προσδιορισμού της β_2 -μικροσφαιρίνης στα ούρα, η οποία εφαρμόστηκε πριν από 30 χρόνια είναι ακόμα αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο. Η μέθοδος αυτή είναι ευαίσθητη και στο εμπόριο διατίθενται τα αντιδραστήρια, αν εφαρμοστεί με χρήση εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων. Το μόνο μειονέκτημα είναι ότι η β_2 -μικροσφαιρίνη είναι ασταθής σε όξινα ούρα (pH<5,6), οπότε θα πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά το pH των ούρων. Στην πράξη, αν στον ασθενή δεν έχει δοθεί δικαρβονικό πριν την συλλογή των ούρων, μια απώλεια της β_2 -μικροσφαιρίνης είναι αναπόφευκτη σε ποσοστό 10 ως 30 % των δειγμάτων των ούρων (Bernard et al, 1987, Bernard, 1996b). Το μειονέκτημα αυτό παρεκάμθει με τον προσδιορισμό της RBP στα ούρα από τις αρχές της δεκαετίας του '80. Πρόκειται για μια εξέταση που είναι εξίσου ευαίσθητη με αυτή της β_2 -μικροσφαιρίνης. Η RBP πλεονεκτεί στο ότι είναι πολύ πιο σταθερή σε όξινα ούρα, και επομένως δεν χρειάζεται να λαμβάνεται υπόψη ο έλεγχος του pH (Bernard, et al 1982). Άλλη μια πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους η οποία είναι πολύ σταθερή στα ούρα είναι η α_1 -μικροσφαιρίνη αλλά σύμφωνα με ορισμένες



μελέτες αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητη ως δείκτης της σωληναριακής δυσλειτουργίας και είναι πιθανόν να είναι επίσης λιγότερο ειδική λόγω του μεγαλύτερου μοριακού της βάρους (Bernard, 1996b). Η «πρωτεΐνη των ανθρώπινων κυττάρων Clara» (CC16) ή πρωτεΐνη I μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η σωληναριακή δυσλειτουργία, αλλά η έκκρισή της από τον προστάτη μειώνει την ειδικότητά της και την ευαισθησία της στους άνδρες. Αντίθετα στις γυναίκες η CC16 δείχνει μια μοναδική ευαισθησία στην έκθεση στο Cd, επιτρέποντας την ανίχνευση λεπτών ανωμαλιών στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (Bernard et al, 1994). Έχει επίσης αναφερθεί ότι άλλος ένας βιολογικός δείκτης για την πρόωμη ανίχνευση νεφρικών τοξικών επιδράσεων από το Cd, στα ούρα εκτός από τους προαναφερμένους είναι και η N-ακετυλό-βήτα-D-γλυκοσαμινιδάση (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase ή NAG). Η NAG παρουσιάζει μια σταθερότητα σε αλλαγές του pH, και η ανίχνευσή της στα ούρα είναι απλή, χαμηλού κόστους και αξιόπιστη. Επίσης είναι μια από τις πιο κατάλληλες εξετάσεις για ανίχνευση νεφρικών τοξικών επιδράσεων από το Cd, σε επίπεδα κάτω από τα 10 micrograms/g.κρεατινίνης (Kawada, 1995).

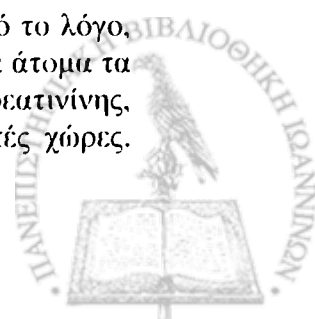
Όλοι οι βιολογικοί δείκτες νεφροτοξικότητας από το Cd βασίζονται στον βαθμό ανταπόκρισης των νεφρών κατά την προοδευτική συσσώρευση του Cd. Επειδή ο άμεσος υπολογισμός του Cd που είναι αποθηκευμένο στους νεφρούς με μια τεχνική όπως η ενεργοποίηση νετρονίων σπάνια είναι αληθοφανής, οι περισσότερες έρευνες χρησιμοποιούν τις συγκεντρώσεις του Cd στα ούρα ή στο αίμα διότι αυτές αντανακλούν τις συγκεντρώσεις του φορτίου του Cd στο σώμα. Εξαιτίας των εσωτερικών διαφορών σε ότι αφορά στην ευαισθησία τους ή στην εμπλοκή τους σε συγκεκριμένα σημεία των νεφρών, οι βιολογικοί δείκτες της νεφροτοξικότητας γίνονται παθολογικοί λόγω των διαφορετικών επιπέδων της έκθεσης στο Cd ή της περιεκτικότητάς του στο σώμα. Αυτή η διαφορετική ανταπόκριση αντανακλάται από τις ποσότητες των ουδών του Cd στα ούρα οι οποίες μπορεί να κυμαίνονται από λιγότερο από 2 μg/g κρεατινίνης για την έναρξη πρώιμων βιοχημικών μεταβολών, μέχρι και 10 μg/g κρεατινίνης για την ανάπτυξη της κλασσικής σωληναριακής πρωτεϊνουρίας. Από τις πολλές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες, επήλθε μια ομοφωνία σύμφωνα με την οποία η επίδραση του Cd στους νεφρούς είναι κρίσιμη για τα ασφαλή επίπεδα Cd και φαίνεται από την αυξημένη έκκριση στα ούρα πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους όπως η β₂-μικροσφαιρίνη και η RBP. Αυτός είναι ο μόνος δείκτης με τον οποίο μπορεί να προβλεφθεί η σταδιακή μείωση της λειτουργίας των νεφρών όσο αυξάνεται η ηλικία. Δοσοεξαρτώμενες σχέσεις για την ανάπτυξη αυτής της σωληναριακής πρωτεϊνουρίας αποδείχτηκαν σε διάφορες μελέτες πληθυσμών που ήταν εκτεθειμένοι επαγγελματικά και περιβαλλοντικά. Υπάρχουν δύο σημαντικά σημεία που πρέπει να προσεχθούν όταν προσδιορίζονται οι ποσότητες των ουδών της τοξικότητας από το Cd από αυτές τις δοσοεξαρτώμενες σχέσεις. Πρώτον, ένας αξιόπιστος προσδιορισμός των ποσοτήτων των ουδών είναι δυνατόν μόνο όταν πραγματοποιείται σε άτομα τα οποία είναι ήδη εκτεθειμένα στο Cd ή όταν εξετάζονται αμέσως μετά την απομάκρυνσή τους από την έκθεση στο Cd. Όπως φαίνεται στο σχήμα 11, η απομάκρυνση από τους χώρους έκθεσης στο Cd συνδέεται με μια προοδευτική μείωση των επιπέδων Cd στο αίμα και στα ούρα, η οποία μετακινεί τις καμπύλες ανταπόκρισης στην συγκέντρωση προς τα χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης του Cd και επομένως έχει σαν αποτέλεσμα την υποτίμηση των ποσοτήτων των ουδών τοξικότητας του μετάλλου. Το δεύτερο σημαντικό ζήτημα που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι το Cd που βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος δεν είναι ελεύθερο αλλά είναι κατά μεγάλο ποσοστό συνδεδεμένο με πρωτεΐνες όπως οι μεταλλοθειονίνες, οι οποίες ακολουθούν



την ίδια οδό επαναρρόφησης από το σπείραμα και τα σωληνάρια των νεφρών με αυτή των πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες ανιχνεύονται όταν υπάρχει υπολειτουργία των σωληνάρων. Οπότε προφανώς, μια βλάβη της λειτουργίας των σωληνάρων η οποία δεν σχετίζεται με το Cd θα μπορούσε να ενισχύσει την έκκριση τόσο των πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέεται το Cd, όσο και της β_2 -μικροσφαιρίνης και της RBP οι οποίες λειτουργούν ως δείκτες. Αυτό μπορεί να προκαλέσει μη-αιτιολογημένες σχέσεις μεταξύ του Cd και των πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους στα ούρα, αντανακλώντας την εξάρτηση μεταξύ τους όσον αφορά την ικανότητα των σωληναρίων να επαναρροφούν πρωτεΐνες (Nordberg et al. 2002, Jin et al. 2002 Ikeda et al, 2003).

Στατιστικά σημαντικές σχέσεις δόσο-εξαρτώμενων ανταποκρίσεων παρατηρήθηκαν με την ύπαρξη Cd στο αίμα και στα ούρα μετά από έκθεση στο Cd, που ανταποκρίνονται αναμφίβολα σε αιτιατές σχέσεις. Σε εργαζόμενους που εκτέθηκαν στο Cd, οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν στο ότι οι ποσότητες των ουδών του Cd στα ούρα, που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο σωληναριακής πρωτεϊνουρίας, κυμαίνονται γύρω στο 10μg/g κρεατινίνης, όπως εκτιμάται, σύμφωνα με τα παθολογικά επίπεδα του Cd στον φλοιό του νεφρού (Bernard et al, 1992). Ορισμένες μελέτες που έχουν βασιστεί σε πληθυσμούς και ειδικά στη Ευρώπη ορίζουν πολύ πιο χαμηλές συγκεντρώσεις ουδών του Cd στα ούρα για τον κίνδυνο της σωληναριακής πρωτεϊνουρίας στον γενικό πληθυσμό (Buchet et al, 1990, Jarup et al, 2000). Σε μια άλλη μελέτη, οι νεφρικές επιδράσεις που σχετίζονται με τα χαμηλά επίπεδα του Cd στα ούρα βρέθηκαν να είναι αναστρέψιμες και όχι προβλέψιμες όσο οι νεφροί μεγαλώνουν σε ηλικία (Hotz et al, 1999).

Σχετικά με την επιτήρηση της δημόσιας υγείας η έμφαση θα πρέπει να δοθεί σε μέτρα πρωταρχικής πρόληψης, προκειμένου να διατηρηθούν τα επίπεδα του Cd στο περιβάλλον και στα τρόφιμα όσο το δυνατό σε χαμηλά επίπεδα. Η ικανότητα αυτών των μέτρων μπορεί να ελεγχθεί μετρώντας το μέταλλο στα ούρα ή στο αίμα πληθυσμών και ομάδων σε κίνδυνο. Συνήθως ένας περιοδικός έλεγχος για την σωληναριακή δυσλειτουργία εφαρμόζεται μόνο όταν υπερβολικά υψηλά επίπεδα Cd βρίσκονται στα ούρα ή στο αίμα. Για τους λόγους αυτούς, προκειμένου να επιτευχθεί η πιο χαμηλή σε κόστος μελέτη, οι δοκιμασίες υπολογισμού σωληναριακής πρωτεϊνουρίας πάντα εφαρμόζονται σε συνδυασμό με πρόγραμμα βιοπαρακολούθησης το οποίο προσδιορίζει το Cd στα ούρα και στο αίμα. Αυτός ο συνδυασμός είναι επίσης σημαντικός για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αφού η συνεχής αύξηση έκκρισης στα ούρα της β_2 -μικροσφαιρίνης ή της RBP, εφόσον αποκλεισθούν άλλες αιτίες, μπορεί να αποδοθεί μόνο στο Cd όταν σχετίζεται με την αύξησή του στο σώμα. Σε άτομα που δεν έχουν εκτεθεί στο Cd επαγγελματικά ή περιβαλλοντικά, οι συγκεντρώσεις του Cd στα ούρα είναι κανονικά κάτω από 2 μg/g κρεατινίνης. Τα επίπεδα του Cd στα ούρα που κυμαίνονται από 2 έως και 5 μg/g κρεατινίνης είναι σημάδι αύξησης του φορτίου του στο σώμα που φανερώνει επαγγελματική ή περιβαλλοντική έκθεση. Αυτά τα επίπεδα του Cd μπορεί, κατ'εξίρεση να βρεθούν σε άτομα που καπνίζουν υπερβολικά. Σε αυτή τη περίπτωση περιοδικός υπολογισμός σωληναριακής δυσλειτουργίας συνήθως δεν συνιστάται. Όταν το Cd στα ούρα φτάσει σε τιμές μεταξύ 5 και 10 μg/g κρεατινίνης, ο κίνδυνος της ανάπτυξης σωληναριακής δυσλειτουργίας είναι σπάνιος, εκτός ίσως αν αυτό αφορά ειδικά ευπρόσβλητα άτομα ή άτομα που έχουν εκτεθεί στο παρελθόν και προοδευτικά μειώνουν το φορτίο του σώματος σε Cd (σχήμα 11). Για αυτό το λόγο, μια εξέταση για σωληναριακή πρωτεϊνουρία συνιστάται κανονικά σε όλα τα άτομα τα οποία συνεχώς παρουσιάζουν ποσότητα Cd στα ούρα πάνω από 5 μg/g κρεατινίνης, επίπεδα τα οποία αποτελούν όριο έκθεσης στις περισσότερες βιομηχανικές χώρες.

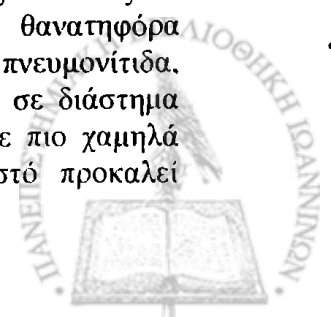


Όταν η συγκέντρωση του Cd στα ούρα υπερβεί τα 10 $\mu\text{g/g}$ κρεατινίνης, ο κίνδυνος εκδήλωσης σωληναριακής πρωτεϊνουρίας είναι ορατός. Ο κίνδυνος εμφάνισης σωληναριακής πρωτεϊνουρίας κατά 10% αυξάνεται σχεδόν με γραμμικό τρόπο όταν η «συγκέντρωση Cd στα ούρα» (CdU), είναι λίγο πάνω από 10 $\mu\text{g/g}$ κρεατινίνης και έως περισσότερο από 20% όταν οι συγκεντρώσεις CdU υπερβούν τα 20 $\mu\text{g/g}$ κρεατινίνης. Σε ότι αφορά την πρόγνωση της σωληναριακής πρωτεϊνουρίας που οφείλεται στο Cd, μόνο μια αύξηση των επιπέδων που παραμένει για χρονικά διαστήματα μηνών και χρόνων μπορεί να είναι ένδειξη μη αναστρέψιμων βλαβερών μεταβολών οι οποίες πιθανόν επηρεάζουν την λειτουργία του νεφρού. Από τη στιγμή που παρατηρείται μια αύξηση Cd, η σωληναριακή πρωτεϊνουρία εξαρτάται κυρίως από τα παθολογικά επίπεδα Cd. Έτσι, τέσσερα στάδια μπορεί να διακριθούν μεταξύ της αρχόμενης σωληναριακής πάθησης και της φανερής νεφροπάθειας που υποδηλώνεται από μια μειωμένη λειτουργία του νεφρού, τα οποία αναφέρονται στον πίνακα 16 (Bernard, 2004).

Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε η σχέση μεταξύ της λήψης Cd και των δεικτών τοξικότητας και συγκεκριμένα συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα από την β_2 μικροσφαιρίνη με αυτά της λεγόμενης Προσωρινής Εβδομαδιαίας Ανεκτικής Λήψης (Provisional Tolerable Weekly Intake ή PTWI) που καθορίστηκε από τη Διεθνή Οργάνωση Υγείας (World Health Organization ή WHO). Η μελέτη περιέλαβε 27.537 ανθρώπους και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε μια αυξανόμενη πυκνότητα της β_2 - μικροσφαιρίνης στην παρατηρούσα αύξηση της λήψης Cd πάνω από 302 $\text{mg}/\text{μέρα}$, που αντιστοιχεί στο σωματικό βάρος 3.02 $\text{mg}/\text{μέρα}$ σύμφωνα με την PTWI. Επίσης το Cd στο αίμα και τα ούρα συσχετιζόνταν θετικά με την λήψη Cd και την ηλικία (Omarova and Phillipsa, 2007).

Έχουν αναφερθεί και άλλες τοξικές επιδράσεις του Cd, εκτός από αυτές στους νεφρούς. Μελέτες δείχνουν ότι η ανεπάρκεια Ca, η οστεοπόρωση ή η οστεομαλακία (ελάττωση της σκλήρυνσης των οστών) μπορεί να αναπτυχθούν σε ορισμένους εργαζόμενους μετά από επαγγελματική έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα σε υψηλά επίπεδα Cd. Συχνά παρατηρείται μια σταδιακή διαταραχή στον μεταβολισμό της βιταμίνης D του νεφρού και μια αυξημένη έκκριση ασβεστίου στα ούρα. Έτσι, οι επιπτώσεις στα οστά μπορεί να οφείλονται στον μεταβολισμό της βιταμίνης D και του Ca στα νεφρά (USPHS 1997, Goyer 1994, WHO 1992). Σε ένα χωριό στις όχθες του ποταμού Jinzu, στην Ιαπωνία το 1947 παρατηρήθηκε χρόνια δηλητηρίαση από Cd. Μια σκελετική πάθηση που παρατηρήθηκε οφειλόταν στο Cd και ονομάστηκε ως ασθένεια "Itai-Itai" εξαιτίας των ισχυρών πόνων που προκαλούσε. Η αρρώστια αυτή εκδηλώθηκε με σοβαρές παθήσεις στα νεφρά και στο ήπαρ, υψηλή πίεση αίματος και τελικά εμφανίστηκαν σοβαρές αλλοιώσεις στο σχήμα του σκελετού, με κατάγματα των οστών και με μείωση της αντίστασης του οργανισμού στις μολυσματικές παθήσεις. Αρκετές περιπτώσεις της ασθένειας αυτής ήταν θανατηφόρες. Πολύ αργότερα το 1961 διαπιστώθηκε ότι η αιτία ήταν το Cd, το οποίο υπήρχε στα απόβλητα ενός μεταλλείου. Τα απόβλητα ρίχνονταν στα νερά του ποταμού, τα οποία χρησιμοποιούνταν στην άδρευση των ορυζώνων (Alloway 1996, Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου, 1990).

Η εισπνοή υψηλών επιπέδων καπνού ή σκόνης με οξείδια του Cd είναι πολύ ερεθιστική στους ιστούς του αναπνευστικού συστήματος και οξείες εκθέσεις σε υψηλά επίπεδα μπορεί να αποβούν θανατηφόρες. Στα τυπικά μη-θανατηφόρα συμπτώματα, μπορεί να περιληφθούν η σοβαρή τραχειοβρογχίτιδα, η πνευμονίτιδα, και το πνευμονικό οίδημα, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν μέσα σε διάστημα ωρών μετά την έκθεση (USPHS 1997, Goyer 1996, WHO 1992). Σε πιο χαμηλά επίπεδα, παρατηρείται φλεγμονή του πνεύμονα η οποία ως γνωστό προκαλεί



εμφύσημα και δύσπνοια (USPHS 1997, Goyer 1996, WHO 1992). Μελέτες σε ζώα έχουν επιβεβαιώσει ότι η έκθεση σε εισπνοή Cd έχει σαν αποτέλεσμα βλάβη του αναπνευστικού συστήματος (USPHS 1997, WHO 1992).

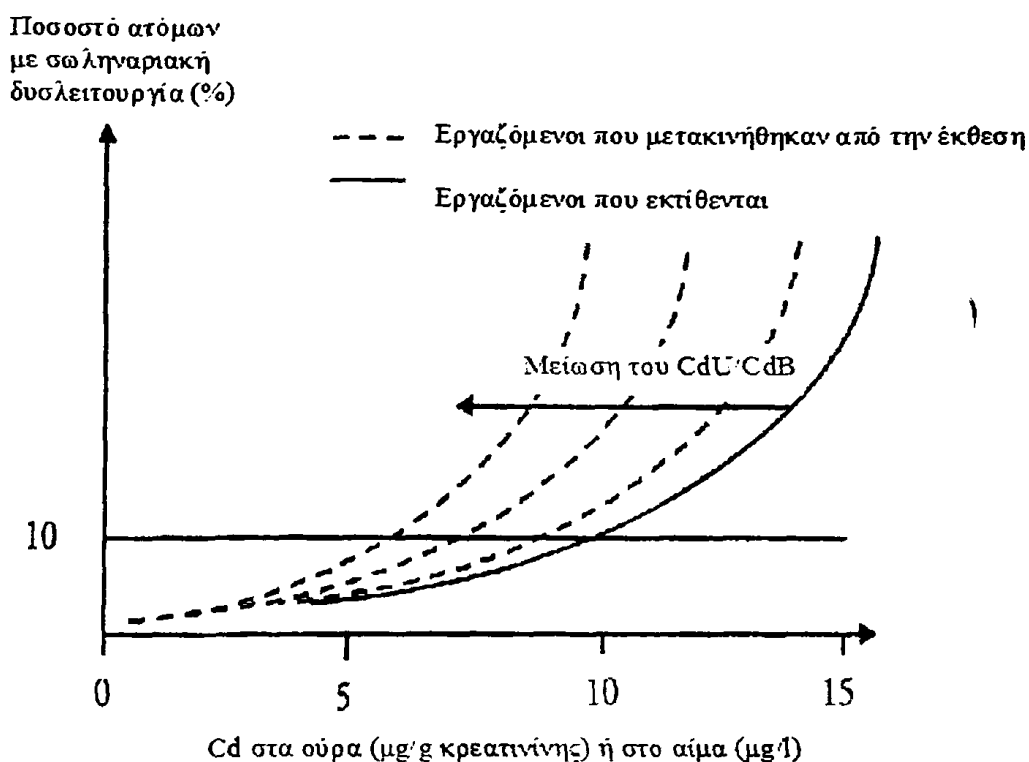
Από επιδημιολογικές μελέτες καταφάνηκε μια σχέση μεταξύ της επαγγελματικής (αναπνευστικής) έκθεσης στο Cd και στον καρκίνο του πνεύμονα και του προστάτη. Σε συσχέτιση των συμπερασμάτων αυτών με άλλες μελέτες που έγιναν σε ζώα απεδείχθη σε σημαντικό βαθμό το δυναμικό καρκινογένεσης του καδμίου (IARC 1998, Goyer 1996). Το Cd και ορισμένες ενώσεις καδμίου έχουν καταχωρηθεί από το «Διεθνές Πρακτορείο για την Έρευνα στον Καρκίνο» "International Agency for Research on Cancer" (IARC), σαν καρκινογόνα (IARC 1998). Το Υπουργείο Υγείας των ΗΠΑ και οι Υπηρεσίες Υγείας (Human Services) στην 8^η Αναφορά τους σχετικά με τα Καρκινογόνα, καταχωρεί το κάδμιο και ορισμένες ενώσεις Cd ως «Λογικά Προβλέψιμα ότι είναι Καρκινογόνα στον Άνθρωπο» (Reasonably Anticipated to be Human Carcinogens) (USPHS 1997).

Εκτός από τις τοξικές του επιδράσεις, έχει αναφερθεί ότι το Cd μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της υπέρτασης και ασθενειών της καρδιάς (USPHS 1997, Goyer 1996, Elinder and Jarup, 1996). Επίσης είναι γνωστό ότι η παρατεταμένη λήψη Cd από το στόμα έχει σαν αποτέλεσμα τον σοβαρό ερεθισμό του επιθηλίου του γαστρεντερικού συστήματος, καθώς και την εμφάνιση ναυτίας, εμέτου, σιαλόρροιας, στομαχικού πόνου και διάρροιας (USPHS, 1997).

Όσον αφορά την τοξικότητα στα φυτά, έχουν αναφερθεί επιδράσεις που προκαλούν ελάττωση στην ανάπτυξη των φυτών και στην δυνατότητά τους να παράγουν καρπούς. Σύμφωνα με τον Alloway (1990) παρατηρήθηκε ελάττωση στην ανάπτυξη και σημάδια τοξικότητας στα φύλλα μαρουλιού, λάχανου, καρότου, ρεπανιού (λόγω της ποσότητας Cd περίπου 20 mg/kg στα υψηλά μέρη του φυτού). Άλλες μελέτες έχουν δείξει μείωση στην ταχύτητα της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής (WHO 1992).

Σε ότι αφορά την τοξικότητα του Cd στους υδρόβιους οργανισμούς, έχουν βρεθεί πολλά στοιχεία. Για παράδειγμα, ορισμένα είδη φυτοπλαγκτόν είναι πολύ ευαίσθητα στο κάδμιο, και παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπως 1 μg/l (Bryan and Langston 1992). Δηλητηριώδεις επιδράσεις έχουν επίσης βρεθεί και στις πεταλίδες, όπου υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των υψηλών επιπέδων Cd και της μειωμένης ικανότητας στην χρησιμοποίηση γλυκόζης. Ελάττωση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και στον αριθμό πληθυσμού έχει παρατηρηθεί στα κωπήποδα και στα ισόποδα σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπως 5 μg/l. Έκθεση σε παρόμοια επίπεδα έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγές στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος σε ορισμένα ψάρια καθώς και μειωμένη ανάπτυξη σε νεαρά ψάρια και σε ασπόνδυλα (Bryan and Langston 1992, Thuvander 1989). Επίσης παρατηρήθηκε τοξικότητα των συγκεντρώσεων του Cd στο χαμηλό ίζημα του Κόλπο του Σαν Φρανσίσκο. Στην περιοχή αυτή η ανάπτυξη ορισμένων ειδών αχιβάδας ελαττώθηκε επειδή οι συγκεντρώσεις του Cd αυξήθηκαν από 0,1 έως 0,4 mg/kg (Bryan and Langston 1992).





Σχήμα II. Διάγραμμα που απεικονίζει τη μετατόπιση στις ποσότητες των ουδών του Cd στα ούρα όταν οι δοσοεξαρτώμενες σχέσεις προκύπτουν από δεδομένα που ελήφθησαν από άτομα που εκτίθενται συνεχώς ή από άτομα που απομακρύνθηκαν από τους χώρους της έκθεσης και οι οποίοι προοδευτικά χάνουν το Cd στο οποίο είχαν εκτεθεί (Bernard, 2004)

Πίνακας 16. Ερμηνεία των αυξανόμενων τιμών της β₂-μικροσφαιρίνης (β₂-m) και της πρωτεΐνης συνδεδεμένης με την ρετινόλη (RBP) (Bernard, 2004).

Β ₂ -m ή RBP στα ούρα (μg/g κρεατινίνης)	Σημασία
< 300	Κανονική τιμή
300-1000	Αρχόμενη σωληναριακή πάθηση από Cd (πιθανόν λόγω μερικής αναστρεψιμότητας μετά από την απομάκρυνση της έκθεσης αν το Cd στα ούρα δεν είναι υπερβολικά υψηλό, δηλαδή κάτω από 20 μg/g κρεατινίνης)
1000-10.000	Μη αναστρέψιμη σωληναριακή πρωτεϊνουρία η οποία μπορεί να επιταχύνει τη μείωση της λειτουργίας των νεφρών όσο αυξάνεται η ηλικία. Σε αυτό το στάδιο η λειτουργία των νεφρών είναι κανονική ή ελαφρά εξασθενημένη
>10.000	Φανερή νεφροπάθεια από το Cd που συνήθως σχετίζεται με μειωμένη λειτουργία του νεφρού

2: Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ: ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

2.1 Λοιμώξεις από βακτήρια και η άμυνα του οργανισμού

Τα βακτήρια προκαλούν λοιμώξεις, νόσους και άλλες ασθένειες από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι με τους οποίους τα βακτήρια προκαλούν νόσους. Η φαρυγγίτιδα και η κολπίτιδα αποτελούν παραδείγματα λοιμώξεων που απαντώνται στις επιθηλιακές επιφάνειες. Εκτός από αυτές τις επιφανειακές λοιμώξεις, τα βακτήρια προκαλούν νοσήματα με την εισβολή σε κάποιο σημείο το οποίο συνήθως θεωρείται στείρο από μικρόβια, όπως η ουροδόχος κύστη και το αίμα. Όταν για παράδειγμα ο *Streptococcus pneumoniae* αίτιο κατεξοχήν της πνευμονίας, εισέρχεται στο αίμα, διασπείρεται σε όλο το σώμα και εισβάλλει και σε άλλα όργανα όπως το ΚΝΣ και η καρδιά, προκαλώντας μηνιγγίτιδα και ενδοκαρδίτιδα αντίστοιχα. Η αλλαντίαση, ο τέτανος και η χολέρα αποτελούν λοιμώξεις με κύρια συμπτώματα από τη δράση μιας τοξίνης. Ένας πολλαπλασιαζόμενος πληθυσμός βακτηρίων παράγει εξωκυττάρια πρωτεΐνες ή εξωτοξίνες οι οποίες προκαλούν άμεσα τη νόσο, με επιπτώσεις στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, στο μυοσκελετικό ή στο γαστρεντερικό. Άλλα νοσήματα έχουν ανοσολογική βάση. Για παράδειγμα το σύνδρομο Guillain-Barré, μια προοδευτική αλλά και αντιστρεπτή πολυνευροπάθεια, μπορεί να αναπτυχθεί μετά από μια γαστρεντερίτιδα που προκλήθηκε από *Campylobacter*, ένα σπειροειδές Gram (-) βακτηρίδιο, μικροαερόφιλο και με ιδιαίτερες θρεπτικές απαιτήσεις. Σε αυτή την περίπτωση η ανοσολογική ανταπόκριση απέναντι στον μικροοργανισμό ξεκινά σαν μια φλεγμονώδης αντίδραση η οποία επηρεάζει το νευρείλημα και τον νευρικό άξονα προκαλώντας πολυνευροπάθεια. Ο οξύς ρευματικός πυρετός έχει επίσης ανοσολογική βάση. Για παράδειγμα, μια φαρυγγίτιδα που σε άλλη περίπτωση θα ήταν μια απλή λοίμωξη μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα επικίνδυνη για την υγεία του ασθενούς επηρεάζοντας ωτικές λειτουργίες. Τα αντισώματα που παράγονται απέναντι στην επιφανειακή πρωτεΐνη-M του στρεπτόκοκκου ομάδας Α, δημιουργούν μια αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος με συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς υποδοχείς, οι σημαντικότεροι από τους οποίους βρίσκονται στην καρδιά και κυρίως στις καρδιακές βαλβίδες. Η φλεγμονώδης αντίδραση που ξεκινά από αυτή τη διαδικασία οδηγεί σε εναπόθεση ινώδους ιστού και καταστροφή των βαλβίδων. Άλλη σοβαρή επίπτωση λοίμωξης από β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο της ομάδας Α, είναι η οξεία σπειραματονεφρίτιδα (Χαρβάλου, 2007).

Οι κύριοι μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού έναντι των μικροοργανισμών μπορούν να διαιρεθούν σε μη ειδικούς μηχανισμούς και σε ενεργητικούς μηχανισμούς, από τους οποίους οι δεύτεροι στηρίζονται στην ανοσολογική απόκριση. Οι μη ειδικοί μηχανισμοί άμυνας ταξινομούνται σε ανατομικούς και φυσιολογικούς. Οι ανατομικοί μηχανισμοί είναι το δέρμα, που αποτελεί φραγμό των λοιμώξεων και το βλεφαριδωτό επιθήλιο του αναπνευστικού συστήματος που είναι υπεύθυνο για τη μετακίνηση της βλέννης η οποία παράγεται από τα κυπελοειδή κύτταρα έξω από τους πνεύμονες. Οι φυσιολογικοί μηχανισμοί άμυνας βρίσκονται στο στομάχι, το όξινο περιβάλλον του οποίου καταστρέφει πολλούς μικροοργανισμούς και στην ουροδόχο κύστη όπου η ώθηση με την πίεση των ούρων κατά την ούρηση συνήθως εμποδίζει τα βακτήρια να αναπτυχθούν και να δημιουργήσουν λοίμωξη. Επίσης οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί αποτελούν ένα σύστημα άμυνας για τον ανθρώπινο οργανισμό στο δέρμα και στους βλενογόννους. Το ενεργό σύστημα άμυνας βασίζεται στην ανοσολογική απάντηση. Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι πολύπλοκο και πολύ



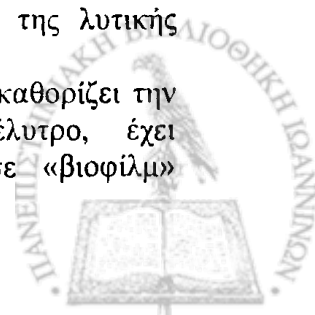
σημαντικό για την ανάπτυξη και την επιβίωση των ανώτερων οργανισμών. Βασίζεται στην ικανότητα των ανώτερων ζώων να διαφοροποιούν τα δικά τους στοιχεία από τα ξένα, και έτσι να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν τους διάφορους εισβολείς (ξένα μόρια, αντιγόνα) μεταξύ των οποίων και μικροοργανισμούς. Τα κύτταρα που διεγείρουν την αρχή της διαδικασίας της ανοσοποιητικής απόκρισης είναι τα φαγοκύτταρα και τα μακροφάγα των ιστών, τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τους μικροοργανισμούς και να τους καταστρέφουν. Το πρώτο βήμα είναι η είσοδος του μικροοργανισμού μέσα στο φαγόσωμα. Ο μικροοργανισμός στη συνέχεια συγχωνεύεται με άλλο κυτταροπλασματικό κυστίδιο, το λυσόσωμα που περιέχει ρίζες οξυγόνου, όξινες υδρολάσες, υπεροξειδάσες και λυσοζύμη, υπεύθυνα για την καταστροφή των μικροοργανισμών. Τα τελικά προϊόντα της αποδόμησης αποβάλλονται στην συνέχεια από το κύτταρο (Χαρβάλου, 2007).

Όταν ένας μικροοργανισμός εισέλθει σε ένα στείρο σημείο του σώματος, όπως οι κυψελίδες, τα μακροφάγα θα τον δεσμεύσουν και θα τον καταστρέψουν. Αν ο αριθμός των μικροοργανισμών που έχει εισέλθει στην περιοχή είναι μεγάλος, τα τοπικά μακροφάγα μπορεί να καταληφθούν. Τα μακροφάγα πρέπει να διαδώσουν το σήμα για τη δέσμευσή τους γρήγορα στα άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως για παράδειγμα τα Τ-λεμφοκύτταρα. Έτσι ένας αριθμός διαφορετικών τύπων κυττάρων όπως τα «Τ-κύτταρα βοηθοί» (T-helper: Th-1 και Th-2), τα Β-κύτταρα και τα πλασματοκύτταρα πρωτεϊνικά σήματα από κυτοκίνες και χημειοκίνες όπως ο «Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων» (Tumor Necrosis Factor) η γ-ιντερφερόνη (γ-IFN) και η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και αντισώματα όπως οι ανοσοσφαιρίνες IgM, IgG και IgA, αποτελούν στοιχεία ανοσολογική απάντησης. Σαν αποτέλεσμα αυτής της απάντησης άλλα μακροφάγα και ουδετερόφιλα εισέρχονται στην περιοχή της λοίμωξης, οι φαγοκυτταρικές και καταστρεπτικές τους ιδιότητες ενισχύονται, η λοίμωξη ελέγχεται και τελικά αποτρέπεται (Χαρβάλου, 2007).

2.2 Παθογόνες ιδιότητες των βακτηρίων

Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των βακτηρίων είναι η μεγάλη ποικιλία των παθογόνων ιδιοτήτων τους. Ακόμα και κάποια ιδιαίτερα βακτήρια όπως ο *S. aureus* έχουν ένα μεγάλο «σύστημα αμυντικού εξοπλισμού», το οποίο περιλαμβάνει πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος, εξωκυττάρια ένζυμα και τοξίνες. Η πρωτεΐνη A της κυτταρικής του μεμβράνης με το τελικό της άκρο, προσκολλάται στο Fc τμήμα των IgG και προφυλάσσει το μικροοργανισμό από τη φαγοκυττάρωση. Η *P. aeruginosa* εκτός από ένζυμα και αντοχές στα αντιβιοτικά έχει ένα σύστημα κυτταρικής επικοινωνίας (quorum sensing) που την καθιστά ιδιαίτερα επικίνδυνη για τους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και τους ασθενείς με κυστική ίνωση. Ο μηχανισμός αυτός, επιτρέπει στην ψευδομονάδα να χρησιμοποιήσει όλα τα παθογόνα στοιχεία της, όταν ο αριθμός των μικροοργανισμών είναι αρκετός ώστε να μπορεί να ανταγωνισθεί το αμυντικό σύστημα του ξενιστή (σχήμα 12). Οι κυριότεροι παθογόνοι παράγοντες των μικροβίων είναι οι τοξίνες, ο λιποπολυσακχαρίτης (των Gram-) ή ενδοτοξίνη, το έλυτρο ή κάψουλα (capsule), οι αντεσίνες, οι αιμολυσίνες, οι κυτταρολυσίνες, η πρωτεΐνη M του σταφυλόκοκκου, τα εξωκυττάρια ένζυμα, η κυτταρική επικοινωνία και η αποφυγή της φαγοκυττάρωσης μέσω της λυτικής τοξίνης του φαγοσώματος (Χαρβάλου, 2007).

Πολλά βακτήρια διαθέτουν ένα εξωκυττάριο περίβλημα, το οποίο καθορίζει την ικανότητά τους να επιβιώνουν μέσα στον ξενιστή. Το έλυτρο, έχει αντιφαγοκυτταρικές ιδιότητες. Πολλά βακτήρια αναπτύσσονται σε «βιοφίλμ»



(biofilms) κολλημένα πάνω σε κάποια αδρανή ή ζωική επιφάνεια. Για παράδειγμα, οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι της επιδερμίδας δημιουργούν «βιοφίλμ» στους κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες με μακρόχρονη χρήση, και πολλαπλασιάζονται, καλυμμένοι σε ένα εξωκυττάριο στρώμα, το λεγόμενο γλυκοκάλυκα που παράγεται από τον ίδιο τον μικροοργανισμό και από όπου μπορούν να εισέρχονται στο αίμα. Συχνά είναι δύσκολο να εκριζωθούν αυτά τα βακτήρια, αφού η διείσδυση των αντιβιοτικών στο γλυκοκάλυκα είναι μικρή. Ο ασθενής με συνεχή πυρετό, θετική καλλιέργεια του φλεβοκαθετήρα και θετική αιμοκαλλιέργεια, παρά τη λήψη κατάλληλων αντιβιοτικών, έχει άμεση ανάγκη από απομάκρυνση του φλεβοκαθετήρα. Ένα σημαντικό βήμα πολλών βακτηρίων για να ξεκινήσει η λοίμωξη είναι η ικανότητά τους να προσκολλώνται σε μια επιφάνεια. Σε λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, μικροοργανισμοί όπως η *Escherichia coli*, προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων της ουροδόχου κύστης μέσω ειδικών προσκολλητικών μορίων. Τα προσκολλώμενα στην κύστη βακτήρια πλεονεκτούν έναντι εκείνων που δεν έχουν την ικανότητα προσκόλλησης. Η *Escherichia coli*, με τις αντεσίνες, επίσης προσκολλάται στις μικρολάχνες των εντεροκυττάρων για να προκαλέσει διάρροια (σχήμα 13). Επίσης και άλλα μικρόβια έχουν πρωτεΐνες για την προσκόλληση σε επιθήλια ή άλλα κύτταρα (Χαρβάλου, 2007).

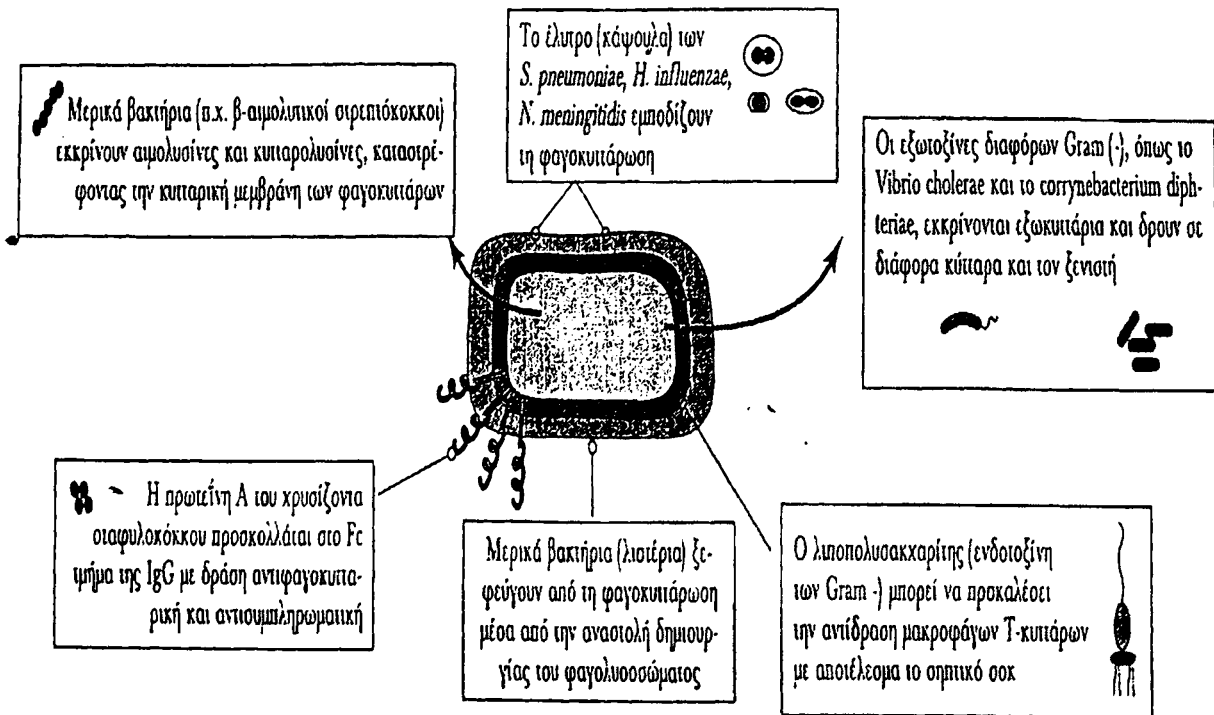
Η έκκριση των εξωκυττάρων πρωτεϊνών είναι ένα σημαντικό παθογενετικό χαρακτηριστικό των βακτηρίων. Ο *Staphylococcus aureus* εκκρίνει το ένζυμο υαλουρονιδάση. Μία εκδορά του δέρματος μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την είσοδο του μικροοργανισμού στην επιφανειακή στοιβάδα του δέρματος. Η υαλουρονιδάση υδρολύει το στρώμα του υαλουρονικού οξέος μεταξύ των κυττάρων, επιτρέποντας στα βακτήρια να διεισδύσουν σε βαθύτερες στοιβάδες του δέρματος. Πολλά βακτήρια όπως οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι παράγουν εξωκυττάρια πρωτεΐνες που ονομάζονται αιμολυσίνες, με σημαντικότερη δράση στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι ικανές να διαρρηγνύουν τις μεμβράνες των κυττάρων-ξενιστών, μέσω της ενζυματικής ή απορρυπαντικής τους δράσης, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο με λύση του κυττάρου. Η αιμολυτική αυτή δράση εκδηλώνεται ως λύση γύρω από τις αποικίες των βακτηρίων που έχουν αναπτυχθεί σε αιματούχο άγαρ. Σημαντική για τον οργανισμό είναι η ικανότητα της αιμολυσίνης να διαρρηγνύει την κυτταροπλασματική μεμβράνη των φαγοκυττάρων ανατρέποντας έτσι τη λειτουργία τους. Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα gram-αρνητικό βακτηρίδιο που μπορεί να προκαλέσει διεισδυτικού τύπου λοίμωξη. Ο μικροοργανισμός αυτός παράγει μια αιμολυσίνη, η οποία καταστρέφει τη μεμβράνη του φαγοσώματος. Επίσης η *Listeria monocytogenes* ακόμη και όταν έχει φαγοκυτταρωθεί, μπορεί εν συνεχεία να δραπετεύσει προς το κυτταρόπλασμα όπου δε μπορεί πλέον να καταστραφεί. Μερικά βακτήρια εκκρίνουν πρωτεΐνες, τις εξωτοξίνες, οι οποίες αποτελούνται συνήθως από δύο κλάσματα το Α και το Β. Το κλάσμα Α είναι το ενεργό τμήμα της τοξίνης, ενώ το κλάσμα Β είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση της τοξίνης σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας ενός κυττάρου. Το *Vibrio cholerae* αποτελεί ένα σημαντικό αίτιο διάρροιας σε υποανάπτυκτες χώρες. Ο μικροοργανισμός μεταδίδεται μέσω της περιττωματικής-στοματικής οδού από μολυσμένο νερό. Η εξωτοξίνη που παράγεται από το *Vibrio cholerae* δεσμεύεται μέσω του κλάσματος Β στους υποδοχείς των κυττάρων του εντέρου. Η είσοδος μέσα στο κύτταρο του κλάσματος Α έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), που οδηγεί σε αυξημένη απώλεια νερού και αλάτων. Τελικό αποτέλεσμα είναι μια υπερβολικά υδαρή και απειλητική για τη ζωή μορφή διάρροιας. Η αλλαντίαση είναι μια ακόμη ασθένεια που οφείλεται



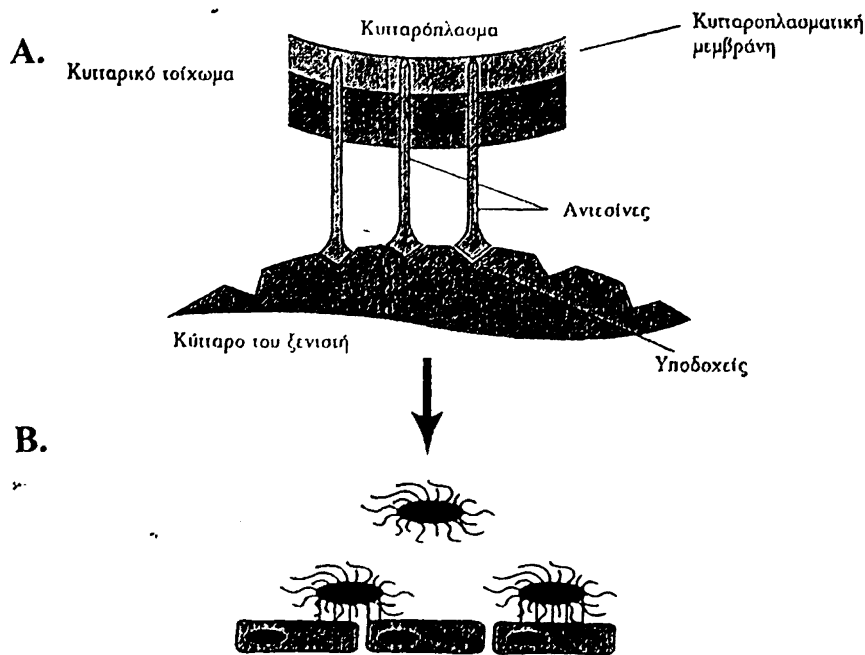
σε μια εξωτοξίνη. Το *Clostridium botulinum* παράγει σπόρια τα οποία και επιβιώνουν ακόμη και μετά από μαγείρεμα. Στην περίπτωση που μολυσμένο φαγητό φυλάσσεται για μεγάλο χρονικό διάστημα, βλαστάνουν τα σπόρια και το βακτήριο εκκρίνει μια νευροτοξίνη που είναι υπεύθυνη για τις κλινικές εκδηλώσεις της αλλαντίασης. Βακτήρια όπως η *Escherichia coli* και η *Neisseria meningitides* μπορούν να προκαλέσουν ενδοτοξινικό σοκ. Στην εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών βακτηρίων υπάρχει μια λιποπολυσακχαριδική ενδοτοξίνη, η οποία ενεργοποιεί την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος. Όταν καταστρέφονται τα βακτηριακά κύτταρα, απελευθερώνεται ο λιποπολυσακχαρίτης ορός στην αιματική κυκλοφορία. Το ενεργό τμήμα του πολυσακχαρίτη, το «ενδοτοξικό» που αποκαλύφθηκε εκτός του βακτηριακού κυττάρου είναι υπεύθυνο για την παρακάτω αντίδραση. Ως αποτέλεσμα, το «επιθετικό μεμβρανικό σύμπλοκο» απελευθερώνει την ενδοτοξίνη, η οποία δεσμεύεται από μια ειδική πρωτεΐνη οξείας φάσης που παράγεται στο ήπαρ. Το σύμπλοκο αυτό στη συνέχεια παραλαμβάνεται από τα μακροφάγα. Όταν με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούνται μεγάλοι αριθμοί μακροφάγων, οι κυτταροτοξίνες ελευθερώνονται ανεξέλεγκτα και τότε προκαλείται το ενδοτοξινικό ή σηπτικό σοκ. Το σύνδρομο του τοξικού σοκ (TSS toxic shock syndrome), προκαλείται από τοξίνες όπως οι πυρογόνες τοξίνες των στρεπτοκόκκων ομάδας A και οι εντεροτοξίνες του *S. aureus*. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως υπεραντιγόνα, δηλαδή, προκαλούν την αλληλεπίδραση των μακροφάγων με τα T-κύτταρα με ένα μη ειδικό τρόπο. Αυτό καταλήγει σε μαζική απελευθέρωση κυτταροτοξινών, με συνέπεια την εμφάνιση του συνδρόμου τοξικού σοκ, με πυρετό, υπόταση και ανεπάρκεια πολλαπλών οργανικών συστημάτων (Χαρβάλου, 2007).

Όσον αφορά τις ανοσο-εξαρτώμενες ασθένειες που σχετίζονται με τη λοίμωξη καταρχήν μπορεί να αναφερθεί η ρευματική καρδιακή νόσος. Η νόσος αυτή απαντάται σχετικά σπάνια στις ανεπτυγμένες χώρες. Ωστόσο, η σημασία της είναι μεγάλη γιατί οι επιπτώσεις της στην καρδιακή λειτουργία είναι τεράστιες έως και καταστρεπτικές. Υπεύθυνος μικροοργανισμός είναι ο στρεπτόκοκκος της ομάδας A, *Streptococcus pyogenes*, που προκαλεί μια συνήθη λοίμωξη, τη φαρυγγίτιδα. Η επαναλαμβανόμενη όμως χωρίς θεραπεία φαρυγγίτιδας οδηγεί σε ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης. Τα αντισώματα που παράγονται έναντι της πρωτεΐνης M του κυτταρικού τοιχώματος των στρεπτόκοκκων δημιουργούν διασταυρούμενη αντίδραση με τα αντιγόνα του αγγειακού ενδοθηλίου του ξενιστή. Οι καρδιακές βαλβίδες είναι το σημαντικότερο ανατομικό σημείο που επηρεάζεται, καθώς ο μεγάλος δείκτης ροής και οι στρόβιλοι του αίματος γύρω από τις βαλβίδες, οδηγούν σε εναπόθεση πρωτεϊνών του συμπληρώματος με επακόλουθη φλεγμονώδη αντίδραση, που μπορεί να προκαλέσουν δομική καταστροφή της βαλβίδας. Η επούλωση όμως στη συνέχεια οδηγεί σε μη φυσιολογική αύξηση του πάχους της. Οποιαδήποτε επακόλουθη καταστροφή του ενδοθηλίου λόγω στροβίλων θα οδηγήσει σε εναπόθεση αιμοπεταλίων και δημιουργία θρόμβων. Επιπλέον οι στοματικοί στρεπτόκοκκοι όπως ο *Streptococcus salivarius*, που εισέρχονται στο αίμα όπως συμβαίνει μετά από μια οδοντιατρική παρέμβαση, μπορεί να εγκατασταθούν στις βαλβίδες και να προκαλέσουν βαθμιαία μια μολυσματική ενδοκαρδίτιδα, με την αντίστοιχη ανοσολογική απάντηση. Ο μηχανισμός της λοίμωξης και η ανοσολογική απάντηση του οργανισμού με τη βοήθεια της μοριακής βιολογίας και ανοσολογίας έχει διερευνηθεί και συνεχίζει να διερευνάται σε βάθος. Τέλος το σύνδρομο Guillaín Barré, μια πολυνευροπάθεια, αποτελεί ανοσολογική απάντηση μετά από λοίμωξη με *Campylobacter*. Παρότι είναι αναστρέψιμο ο ασθενής νοσεί για περισσότερο από έξι μήνες (Χαρβάλου, 2007).





Σχήμα 12 Μερικές από τις παθογόνες ιδιότητες των βακτηρίων (Χαρβάλου, 2007).



Σχήμα 13. Η προσκόλληση στη δημιουργία της λοίμωξης από Gram (-). (A) Βακτήρια προσκολλώνται στην επιφάνεια των κυττάρων με ειδικές πρωτεΐνες, τις αντεσίνες. (B) Τα προσκολλημένα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη αφού δεν αποβάλλονται εύκολα κατά την ούρηση (Χαρβάλου, 2007).



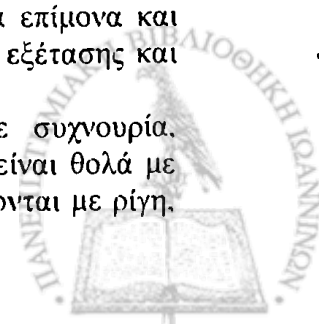
3: ΤΑ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ (*ESCHERICHIA COLI*, *PROTEUS SPP*) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ

3.1 Ανατομικά και λειτουργικά στοιχεία του ουροποιητικού συστήματος και οι λοιμώξεις του ουροποιητικού

Το ουροποιητικό σύστημα είναι ανοιχτό στο περιβάλλον. Ανατομικά αποτελείται από τους νεφρούς, τις νεφρικές πυέλους, τους ουρητήρες (άνω τμήμα) από την κύστη και την ουρήθρα (κάτω τμήμα). Παρά την επαφή του με το εξωτερικό περιβάλλον και εκτός από το τελικό τμήμα της ουρήθρας, σε φυσιολογική κατάσταση, είναι στείρο. Λοίμωξη μικροβιακή παρατηρείται με την είσοδο και εγκατάσταση μικροβίων στο ουροποιητικό. Οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος είναι αρκετά συχνές και ταξινομούνται με διάφορα κριτήρια. Αυτά είναι καταρχήν, η αιτία πρόκλησής τους, οπότε διακρίνονται σε πρωτογενείς (από μη καθορισμένη πηγή μόλυνσης) και σε δευτερογενείς (μετά από ιατρικές επεμβάσεις όπως για παράδειγμα ο καθετηριασμός). Ένα δεύτερο κριτήριο είναι το τμήμα του ουροποιητικού που προσβάλλεται, οπότε διακρίνονται σε ανιούσες (από το κατώτερο ουροποιητικό) οι οποίες προσβάλλουν κυρίως τις γυναίκες λόγω ανατομικής θέσης της ουρήθρας, οφείλονται κυρίως στη χλωρίδα του κόλπου και του περινέου και εμφανίζονται μετά από οποιαδήποτε απόφραξη που εμποδίζει τη ροή των ούρων και κατιούσες (από το ανώτερο ουροποιητικό), οι οποίες είναι σχετικά σπανιότερες και είναι αποτέλεσμα λοιμώξεων των νεφρών, σηψαιμίας, βακτηραιμίας (Σχήματα 14 και 15). Επιπλέον κριτήριο είναι το είδος του παθογόνου μικροοργανισμού που προκαλεί τη λοίμωξη οπότε διακρίνονται για παράδειγμα σε βακτηριακές ή μυκητιακές λοιμώξεις (πίνακας 17). Τέλος ισχύει και το κριτήριο της εμφάνισης ή όχι συμπτωμάτων οπότε διακρίνονται σε συμπτωματικές και ασυμπτωματικές (Αρσένη 1998, Bergsten, Wult and Svanborg, 2005, Cohn and Schaeffer, 2004, Doleans, Issabre and Freney, 2003, Dulczak and Kirk, 2005,).

Ειδικά σε ότι αφορά τα νεογνά οι κλινικές εκδηλώσεις της ουρολοίμωξης εμφανίζονται με υποθρεψία, προβλήματα στη σίτιση, διάρροια, εμέτους, πυρετό και υπεχολερυθριναιμία. Το ηλικίας 1-2 μηνών βρέφος με ουρολοίμωξη συνήθως δεν παρουσιάζει φαινόμενα από το ουροποιητικό σύστημα αλλά εκδηλώσεις όπως προβλήματα σίτισης, υποθρεψία, διάρροια και ανεξήγητο πυρετό. Σε αυτή την ομάδα ηλικιών, επίσης η ουρολοίμωξη μπορεί να υποδύεται την εικόνα νοσήματος του γαστρεντερικού σωλήνα και να εκδηλώνεται ως «κωλικός», ευερεθιστότητα και περίοδοι κραυγών πόνου. Κατά τον πρώτο μήνα της ζωής παρατηρείται μεγαλύτερη συχνότητα ουρολοίμωξεων στα αγόρια, αλλά από τον δεύτερο μήνα και μετά και στην ώριμη ηλικία, το νόσημα είναι συχνότερο στο γυναικείο φύλο. Τα παιδιά 2-6 ετών μπορεί να παρουσιάζουν γαστρεντερικά συμπτώματα, αλλά σε αυτή την ομάδα ηλικιών αρχίζουν να εμφανίζονται και τα κλασικά σημεία της ουρολοίμωξης, όπως η έπειξη, η δυσουρία, η συχνότητα και ο κοιλιακός πόνος. Τα περισσότερα από τα παιδιά 6-18 ετών θα παρουσιάσουν έπειξη, συχνουρία, δυσουρία και κοιλιακό ή λαγονοσφυϊκό πόνο. Τα 1-2% των κοριτσιών σχολικής ηλικίας παρουσιάζουν ουρολοίμωξεις. Σε όλα τέλος τα παιδιά ο ανεξήγητος πυρετός και τα επίμονα και επίσης ανεξήγητα κοιλιακά συμπτώματα, αποτελούν ενδείξεις γενικής εξέτασης και καλλιέργειας των ούρων (Nelson, 1996).

Οι λοιμώξεις του κατώτερου ουροποιητικού εκδηλώνονται με συχνουρία, δυσουρία, αίσθημα καύσους κατά την ούρηση τα δε ούρα μπορεί να είναι θολά με δυσάρεστη οσμή. Οι λοιμώξεις του ανώτερου ουροποιητικού εκδηλώνονται με ρίγη,



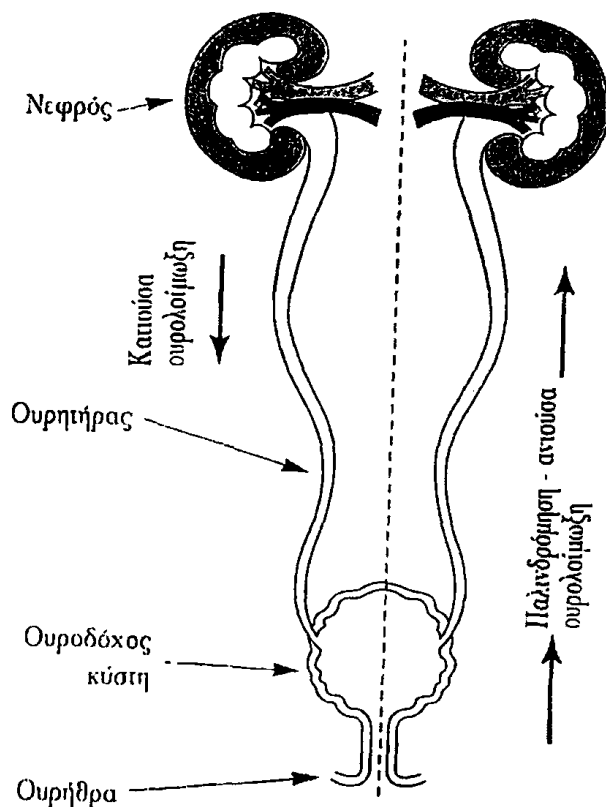
πυρετό και πόνο στην οσφυϊκή μοίρα. Στο ίζημα ανευρίσκονται πυοσφαίρια, ερυθρά αιμοσφαίρια και κύλινδροι. Οι λοιμώξεις του ανώτερου ουροποιητικού (νεφρών και ουρητήρων) διακρίνονται στις οξείες και χρόνιες πυελονεφρίτιδες. Η οξεία πυελονεφρίτιδα αρχίζει από την μυελώδη μοίρα και επεκτείνεται από τα σωληνάρια προς το φλοιό με τη δημιουργία μικροαποστημάτων. Ο μυελός του νεφρού είναι περισσότερο ευάλωτος στις βακτηριακές λοιμώξεις κι αυτό λόγω πολλών παραγόντων, όπως η υψηλή πυκνότητα της αμμωνίας που αναστέλλει τη δράση του συμπληρώματος, η υψηλή ωσμωτικότητα του μυελού που επιδρά ανασταλτικά στη φαγοκυττάρωση ή η μειωμένη αιμάτωση σε σύγκριση με αυτή του φλοιού. Η επίμονη όμως και υποτροπιάζουσα βακτηριακή λοίμωξη του νεφρικού παρεγχύματος έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ουλώδους συνδετικού ιστού, με εστιακή διήθηση του παρεγχύματος από στοιχεία χρόνιας φλεγμονής. Η εικόνα αυτή χαρακτηρίζει τη χρόνια πυελονεφρίτιδα με τελικό αποτέλεσμα τη νεφρική ανεπάρκεια. Το οξύ ουρηθρικό σύνδρομο είναι μια κλινική εικόνα που χαρακτηρίζεται από συχνουρία και δυσουρία, διάρκειας περίπου 10 ημερών, και με 10^2 - 10^4 βακτήρια/ml ούρων. Φαίνεται ότι το σύνδρομο εντοπίζεται στην κύστη και ίσως και στην ουρήθρα. Η ίδια κλινική εικόνα χωρίς όμως βακτηριουρία παρουσιάζεται λόγω σπασμού των λείων μυϊκών ινών της ουρήθρας και ιδιαιτέρως αυτών που νευρώνονται από το α-σκέλος του συμπαθητικού (Bergsten, Wult and Svanborg, 2005, Cohn and Schaeffer, 2004, Doleans, Issabre Freney, 2003, Dulczak, Kirk, 2005).

Οι παράγοντες που προδιαθέτουν την εγκατάσταση της ουρολοίμωξης είναι καταρχήν το φύλο και η ηλικία, διότι στο πρώτο τρίμηνο της ζωής οι ουρολοιμώξεις είναι πιο συχνές στα αγόρια λόγω των συγγενών ανωμαλιών (στένωση ουρήθρας και ουρητήρων) οι οποίες είναι τριπλάσιες από ότι στις γυναίκες σε όλες τις άλλες χρονικές περιόδους. Επίσης σε ότι αφορά τον ίδιο παράγοντα, πρέπει να αναφερθεί ότι η γυναικεία ουρήθρα είναι κοντύτερη από την ανδρική και πλησιέστερα προς το περίνεο από όπου μπορεί να προέλθει η μόλυνση και τέλος ότι οι ουρολοιμώξεις είναι ιδιαίτερα συχνές στην διάρκεια της εγκυμοσύνης, πιθανόν λόγω απώλειας του τόνου των ουρητήρων, και κυρίως στο 2^ο ήμισυ της εγκυμοσύνης. Ένας δεύτερος παράγοντας είναι η κυστεουρητική παλινδρόμηση που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της ούρησης και οφείλεται σε συγγενείς ανωμαλίες ή σε επανειλημμένες ουρολοιμώξεις και μπορεί να οδηγηθεί σε πυελονεφρίτιδα (Bergsten, Wult and Svanborg, 2005, Cohn and Schaeffer, 2004, Doleans, Issabre Freney, 2003, Dulczak and Kirk, 2005).

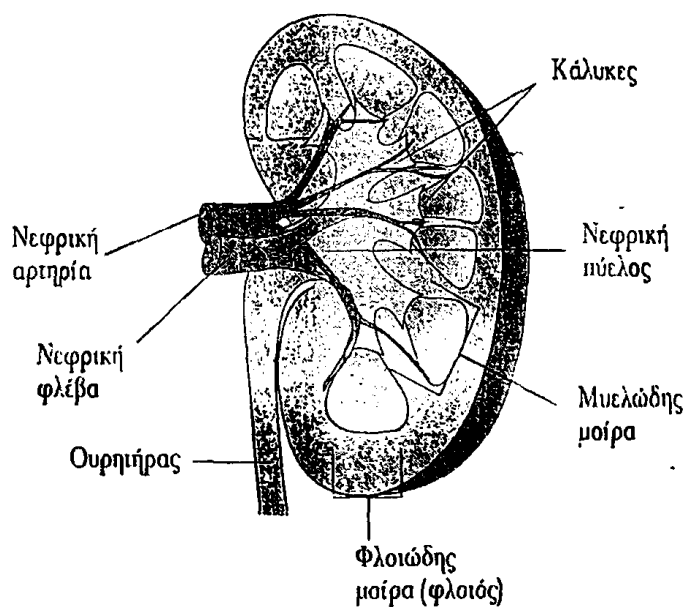
Ο καθετηριασμός της ουροδόχου κύστης αποτελεί άλλον ένα παράγοντα, διότι η στάση των ούρων κατά τον καθετηριασμό, μπορεί να δημιουργήσει ουρολοίμωξη κυρίως στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Επίσης παρατηρείται παροδική βακτηριουρία σε ένα υψηλό ποσοστό καθετηριασμένων ασθενών. Ένας επιπλέον παράγοντας είναι η απόφραξη που μπορεί να προκληθεί από συγγενείς ανωμαλίες, λίθους ή υπερτροφία του προστάτη, η οποία οδηγεί σε κατακράτηση ούρων και προδιαθέτει για ουρολοίμωξη. Επίσης η νευρογενής δυσλειτουργία της κύστης λόγω νευροπάθειας του αυτόνομου νευρικού συστήματος (ΑΝΣ) ή των νευροτομίων του νωτιαίου μυελού, είναι άλλος ένας παράγοντας αφού μπορεί να οδηγήσει σε κατακράτηση ούρων, γεγονός που ευνοεί την εγκατάσταση μικροβίων. Οι ανωμαλίες αυτές μπορεί να είναι συγγενείς αλλά μπορεί να είναι και επίκτητες (σκλήρυνση κατά πλάκας, τραυματισμοί του νωτιαίου μυελού). Τέλος χρόνια νοσήματα όπως ο διαβήτης και η δρεπανοκυτταρική αναιμία αποτελούν έναν επιπλέον παράγοντα. Ο διαβήτης προκαλεί νευροπάθεια του ΑΝΣ, με αποτέλεσμα τη νευρογενή δυσλειτουργία της κύστης και η δρεπανοκυτταρική αναιμία προδιαθέτει σε πυελονεφρίτιδα, λόγω μικροεμβολών που γίνονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια στα αγγεία των νεφρών



(Bergsten, Wult and Svanborg, 2005, Cohn and Schaeffer, 2004, Doleans, Issabre Freney, 2003, Dulczak and Kirk, 2005).



Σχήμα 14. Το ουροποιητικό σύστημα. Τα βακτήρια προκαλούν ανιούσες ουρολοιμώξεις όταν εισέρχονται από την ουρήθρα, ή κατιούσες όταν η λοίμωξη επεκτείνεται από τους νεφρούς προς την κύστη (Bergsten, Wult and Svanborg, 2005).



Σχήμα 15. Η ανατομία του νεφρού (Bergsten, Wult and Svanborg, 2005).



Πίνακας 17. Παθογόνοι μικροοργανισμοί που απομονώνονται στο ουροποιητικό σύστημα (Cohn and Schaeffer, 2004)

A) Με τη μεγαλύτερη συχνότητα

E. coli

Εντερόκοκκοι

Proteus spp

Klebsiella spp

Staphylococcus aureus

Staphylococcus saprophyticus

Candida spp

Streptococcus agalactiae (group B streptococci)

Pseudomonas

Streptococcus pyogenes (group A streptococci)

B) Με μικρότερη συχνότητα

Gardnerella vaginalis

Ureaplasma urealyticum

Mycoplasma hominis

Mobiluncus

Leptospira

Mycobacterium spp

Chlamydia trachomatis (άνδρες)

Γ) Σχετιζόμενοι με νόσους πολλών συστημάτων

Salmonella spp

Schistosoma haematobium sp

Cryptococcus neoformans

Trichosporon beigelli

Trichomonas vaginalis

Aspergillus sp

Penicillium

Adenovirus

Herpes simplex virus

3.2 Η μικροβιολογική εξέταση των ούρων και η τεχνική ουροκαλλιέργειας.

Η ποιότητα της μικροβιολογικής εξέτασης των ούρων εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από την τήρηση των κανόνων σωστής λήψης και αποστολής των ούρων στο εργαστήριο. Καταρχήν προτιμώνται τα πρώτα πρωινά ούρα που είναι πυκνά, η λήψη γίνεται από το μέσο ρεύμα της ούρησης και τέλος η προετοιμασία είναι διαφορετική για τις περιπτώσεις ανδρών, γυναικών και βρεφών. Τα ούρα επιμολύνονται εύκολα κατά την έξοδό τους από την ουρήθρα και το περίνεο. Επιπλέον αποτελούν αρκετά καλό θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη πολλών βακτηρίων. Κατά συνέπεια απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στη διάκριση επιμόλυνσης - λοίμωξης. Η αποφυγή διαγνωστικού σφάλματος, λόγω επιμόλυνσης, στηρίζεται αφενός στη σωστή λήψη και αποστολή

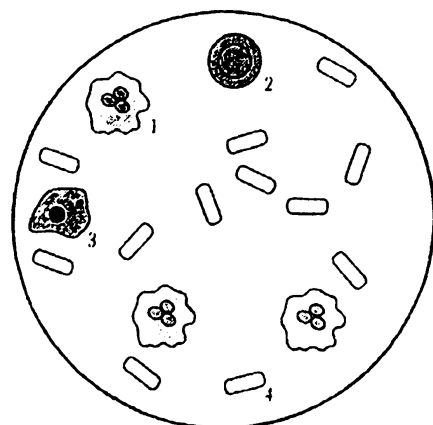


των ούρων στο εργαστήριο και αφετέρου στη σωστή αξιολόγηση της μικροβιακής εξέτασης των ούρων. Κατά την λήψη των ούρων, όσον αφορά τις γυναίκες απαιτείται καλό πλύσιμο των χεριών με σαπούνι και νερό, ξέβγαλμα και σκούπισμα με πετσέτα, επίσης με το ένα χέρι να απομακρύνονται τα μικρά και τα μεγάλα χείλη και να γίνεται πλύσιμο του αιδοίου μια φορά με άφθονο νερό με κατεύθυνση από πάνω προς τα κάτω και τέλος να απορρίπτονται τα πρώτα 20 περίπου ml της ούρησης και να συλλέγονται σε αποστειρωμένο δοχείο με πώμα, τα επόμενα 10-20 ml. Σε ότι αφορά τους άνδρες θα πρέπει επίσης να γίνεται πλύσιμο των χεριών όπως και στις γυναίκες, ακόμα θα πρέπει το πέος να πλένεται με σαπούνι και να ξεβγάζεται με νερό και τέλος η λήψη των ούρων να γίνεται κατά το μέσο της ούρησης σε στείρο δοχείο με πώμα. Όσον αφορά τα βρέφη και τα μικρά παιδιά η λήψη των ούρων γίνεται σε πλαστικούς αποστειρωμένους σάκους τους οποίους κολλάμε στην περιοχή, αφού έχει προηγηθεί καλό πλύσιμο. Οι σάκοι δεν πρέπει να παραμένουν κολλημένοι περισσότερο από 30 λεπτά. Αν χρειαστεί μετά τα 30 λεπτά, τοποθετούμε άλλο σάκο αφού προηγουμένως πλυθεί το περίνεο και η συλλογή μπορεί να γίνει εναλλακτικά. Επίσης η συλλογή μπορεί να γίνει και από υπερηβική παρακέντηση της κύστης, με εισαγωγή βελόνας μετά από αντισηψία της περιοχής. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη για παιδιά στα οποία είναι δύσκολο να ληφθεί δείγμα από το μέσο ρεύμα της ούρησης ή σε ασθενείς με ιδιαίτερο πρόβλημα. Τέλος στα άτομα με μόνιμο καθετήρα παίρνουμε ούρα από το σωλήνα του καθετήρα και όχι από το σάκο, αφού πρώτα απολυμαίνουμε την περιοχή (Dulczak and Kirk, 2005).

Μετά την λήψη των ούρων ακολουθεί η εργαστηριακή εξέταση των δειγμάτων. Τα ούρα περιέχουν φυσιολογικά λιγότερο από 10 κύτταρα ανά ml. Η αύξηση των κυττάρων συνδέεται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως λοίμωξη ουροφόρων οδών με κοινά βακτήρια (πολυμορφοπύρρηνα), φυματίωση ουροποιητικού (λεμφοκύτταρα), ουρηθρίτιδα, κολπίτιδα, λευκόρροια, διάμεση νεφρίτιδα, νεφρική ανεπάρκεια, καρκίνος, οξεία αφυδάτωση και πυρετός (στα παιδιά). Στις λοιμώξεις τα ούρα περιέχουν βακτήρια (μικροβιουρία), πυοσφαίρια (πυουρία) και σε κάποιες περιπτώσεις περιέχουν και αίμα (αιματοουρία). Η αιματοουρία με παρουσία ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων δεν δηλώνει αναγκαστικά ουρολοίμωξη, άλλα είναι δυνατόν να οφείλεται και σε άλλες παθολογικές ή μη παθολογικές καταστάσεις, όπως μεταξύ άλλων η έμμηνος ρύση, το τραύμα ή ο καρκίνος του νεφρού. Η εξέταση των ούρων στη συνήθη ρουτίνα περιλαμβάνει μέτρηση του pH με ταινίες, μικροσκοπική εξέταση χωρίς φυγοκέντρηση, μικροσκοπική εξέταση μετά από φυγοκέντρηση, χρώση κατά Gram για την ποσοτική εκτίμηση κυττάρων αίματος ή βακτηρίων και ποσοτική και ποιοτική καλλιέργεια (Dulczak and Kirk, 2005).

Το pH των ούρων κυμαίνεται από 4,6-8. Όξινα ούρα εμφανίζονται στις ουρολοιμώξεις από *E.coli*. Αλκαλικά ούρα εμφανίζονται στις ουρολοιμώξεις από *Proteus*. Το pH είναι σημαντικό γιατί άλλα φάρμακα δρουν καλύτερα σε όξινο και άλλα σε αλκαλικό pH. Η μέτρηση του pH όπως και του ειδικού βάρους γίνεται με ταινίες ή ειδικά όργανα. Αν στην μικροσκοπική εξέταση χωρίς φυγοκέντρηση βρεθούν βακτήρια σε φρέσκα ούρα, υπάρχει ουρολοίμωξη και συνήθως συνοδεύεται από πυουρία. Η μικροσκοπική εξέταση μετά από φυγοκέντρηση μπορεί να αποκαλύψει διάφορα έμμορφα στοιχεία όπως λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια επιθηλιακά κύτταρα και βακτήρια (σχήμα 16). Επίσης το άμεσο παρασκεύασμα μπορεί να αποκαλύψει κύτταρα του ουροποιητικού συστήματος διαφόρων εντοπίσεων και να καθοδηγήσει τη διάγνωση προς κυστίτιδα, ουρηθρίτιδα ή λοίμωξη του ανώτερου ουροποιητικού συστήματος. Τέλος η ύπαρξη άλλων μικροοργανισμών όπως μυκήτων ή παρασίτων επίσης, μπορεί να αποκαλυφθεί (σχήμα 17). Η χρώση κατά Gram για την ποσοτική εκτίμηση κυττάρων αίματος ή βακτηρίων, γίνεται σε

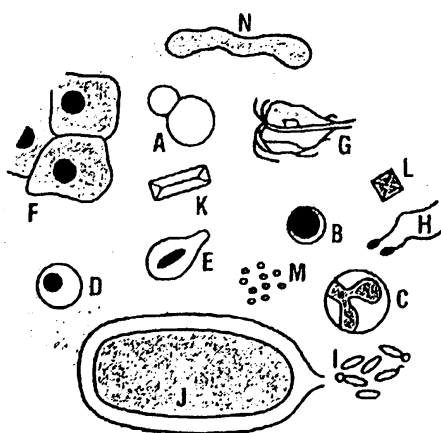
μεγέθυνση x 1000, σε μη φυγοκεντρημένα ούρα: 1 μικρόβιο ανά οπτικό πεδίο αντιστοιχεί σε 10 βακτηρία ανά ml. 1 πολυμορφοπύρηνο ανά οπτικό πεδίο αντιστοιχεί σε 10 πολυμορφοπύρηνα ανά ml. Η απομόνωση και η ταυτοποίηση του υπεύθυνου μικροοργανισμού γίνεται με την τεχνική της ουροκαλλιέργειας ποσοτικής και ποιοτικής (Dulczak and Kirk, 2005).



Φύλλο αναφοράς

- 1. Λευκά αιμοσφαίρια +++
- 2. Ερυθρά αιμοσφαίρια +
- 3. Επιθηλιακά κύτταρα -
- 4. Βακτήρια ++

Σχήμα Ι6 Η μικροσκοπική εξέταση ούρων (Bergsten, Wult and Svanborg, 2005).



Σχήμα Ι7 Η μικροσκόπηση του ιζήματος των ούρων μπορεί να αποκαλύψει διάφορα κύτταρα και έμμορφα ή άμορφα συστατικά όπως ερυθρά αιμοσφαίρια (A), μονοκύτταρα (B), λευκά αιμοσφαίρια (πυοσφαίρια) (C), στρογγυλά κύτταρα της πύελου (D), κύτταρα ουροδόχου κύστεως (E), επιθηλιακά κύτταρα (F), τριχομονάδες (G), σπερματοζωάρια (H), μύκητες (I), κρυστάλλους φωσφορικού, οξαλικού και ουρικού οξέος (K, L, M) και αυγά βιλχαρζίας (J) (Bergsten, Wult and Svanborg, 2005).

Σύμφωνα με την αρχή της ουροκαλλιέργειας κάθε μικρόβιο όταν βρει ευνοϊκές συνθήκες για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του πάνω σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό, θα σχηματίσει μια αποικία ορατή με γυμνό μάτι. Επομένως καλλιεργώντας μια γνωστή ποσότητα ούρων πάνω σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό και κάνοντας επώαση, τα μικρόβια που μπορεί να υπάρχουν θα αναπτυχθούν και θα σχηματίσουν τις αποικίες τους. Την άλλη μέρα βλέπουμε τις αποικίες, τις μετρούμε και μπορούμε έτσι να υπολογίσουμε πόσα μικρόβια υπήρχαν στην ποσότητα των

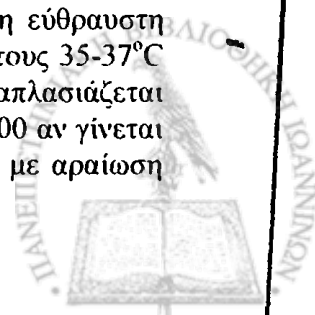


ούρων που καλλιεργήσαμε και επομένως πόσα υπήρχαν κατά κυβικό εκατοστόμετρο. Στην πραγματικότητα ο αριθμός αυτός των αποικιών δεν αντιστοιχεί ακριβώς στον αριθμό των μικροβίων, γιατί μπορεί αυτά να βρίσκονται σε συμπλέγματα και κροκίδες. Έτσι, σήμερα αντί «αριθμό μικροβίων» (bacterial count) ορίζονται οι «μονάδες που παράγουν αποικίες» (Colony Forming Units ή CFU) (Αρσένη, 1998).

Όσον αφορά τα θρεπτικά υλικά το προτιμότερο για την ουροκαλλιέργεια είναι το άγαρ MacConkey (MC) No 2 που επιτρέπει την ανάπτυξη και του εντεροκόκκου, εκτός από τα συνηθισμένα Gram αρνητικά βακτήρια, όπως είναι τα εντεροβακτήρια. Επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθούν και άλλα θρεπτικά υλικά όπως το CAN (Columbia άγαρ με ναλιδικό οξύ). Επίσης το αιματούχο άγαρ με αίμα προβάτου 5% είναι απαραίτητο, όταν δεν χρησιμοποιείται το No2 MC, για την ανάπτυξη του εντεροκόκκου, των στρεπτοκόκκων και άλλων Gram θετικών βακτηρίων όπως οι σταφυλόκοκκοι σε περιπτώσεις κυστίτιδας. Επίσης χρησιμοποιείται το άγαρ Tayer Martin σε περίπτωση αναζήτησης ναϊσσεριών και το άγαρ CLED με κυστίνη λακτόζη και φτωχό σε ηλεκτρολύτες, σε περίπτωση ουρηθρικού συνδρόμου (Αρσένη, 1998).

Πριν από τη σπορά τα τρυβλία των θρεπτικών υλικών ετοιμάζονται με εξαγωγή από το ψυγείο και παραμονή λίγης ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εισάγονται στον κλίβανο για να πάρουν τη αντίστοιχη θερμοκρασία 37 °C και να στεγνώσει η επιφάνειά τους. Τοποθετούνται αναστραμμένα με την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού προς τα κάτω, ακουμπισμένα λοξά στα καπάκια (σχήμα 18). Όταν ο αριθμός των ουροκαλλιεργειών είναι μεγάλος όπως συμβαίνει καθημερινά σε εργαστήρια, αλλά και δυσχερειών στον κλιβανισμό, για λόγους οικονομίας χρησιμοποιείται το ήμισυ της επιφάνειας του θρεπτικού υλικού. Η διαδικασία γίνεται με αφαίρεση λωρίδας του υλικού από το μέσο του (σχήμα 18). Το αυλάκι που σχηματίζεται στη μέση του τρυβλίου αναστέλλει την εξάπλωση του πρωτέα από το ένα δείγμα στο άλλο. Στις χώρες που χρησιμοποιούνται έτοιμα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό, προσφέρονται στο εμπόριο και τρυβλία ουροκαλλιεργειών με άγαρ MacConkey στο μισό και αιματούχο άγαρ στο άλλο μισό (Αρσένη, 1998).

Η σπορά μπορεί να γίνει είτε κατευθείαν με διαμετρημένο κρικοφόρο στυλεό αυτούσιων ούρων είτε μετά από αραιώση. Με οποιονδήποτε τρόπο και αν γίνει το δείγμα πριν από τη σπορά πρέπει να αναδευτεί καλά με κλειστό το καπάκι. Αν το δείγμα είναι σε σωληνάριο, μετά την ανάδευση θα πρέπει να μεταγγισθεί σε ευρύτερο δοχείο προκειμένου να γίνει η σπορά με κρίκο, αφού η ισχυρή επιφανειακή τάση της μικρής επιφάνειας των ούρων στο σωληνάριο θα επηρεάσει το ποσό και τον όγκο των ούρων στον κρίκο. Οι δύο διαμετρημένοι κρίκοι συγκρατούν, ο μεγάλος ούρα 0,01 ml και ο μικρός ούρα 0,001 ml. Ο μεγάλος χρησιμοποιείται για δείγματα ούρων με μικρό αριθμό μικροβίων και ο μικρός για δείγματα ούρων με μεγάλο αριθμό. Οι στυλεοί αυτοί προσφέρονται στο εμπόριο και είναι είτε μεταλλικοί από πλατίνα πολλών χρήσεων είτε πλαστικοί μίας χρήσεως. Σύμφωνα με την τεχνική η οποία είναι απλή, αρχικά ο κρικοφόρος στυλεός πυρακτώνεται και αφού αφεθεί να κρυώσει τοποθετείται κάθετα στα ούρα, εξέρχεται και το ποσό των ούρων που συγκρατεί τοποθετείται στο μέσο της επιφάνειας του τρυβλίου και στη συνέχεια σύρεται διαμετρικά από τη μία άκρη στην άλλη. Χωρίς να πυρακτωθεί ο στυλεός το ενοφθάλμισμα επιστρώνεται σε όλη την επιφάνεια σχηματίζοντας γραμμές κάθετες προς την αρχικά επιστρωθείσα διάμετρο και μετά σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με προσεκτικές και ήρεμες κινήσεις, έτσι ώστε να μην τραυματιστεί η εύθραυστη επιφάνεια του αγαρούχου θρεπτικού υλικού. Τα τρυβλία επωάζονται στους 35-37°C για 24 ώρες και μετρούνται οι αποικίες. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται επί 100 αν η σπορά γίνεται με τον μεγάλο κρίκο των 0,01 ml και επί 1000 αν γίνεται με τον μικρό κρίκο των 0,001 ml (σχήμα 19). Στη διαδικασία σποράς με αραιώση



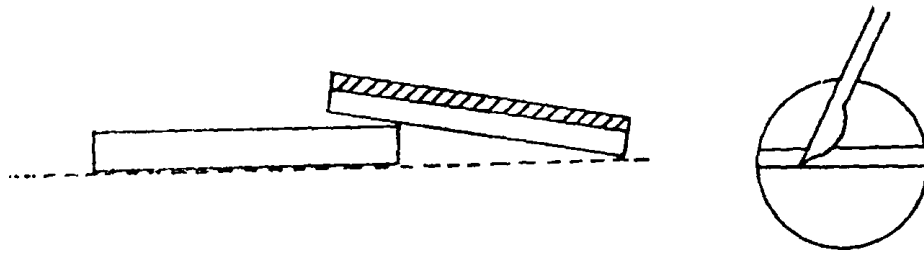
ούρων, σε ένα αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωληνάριο τοποθετούνται 4 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού (NaCl 8,5%) και προστίθεται 1 ml από τα ούρα αφού αναδευτούν καλά. Με τον τρόπο αυτό έχει γίνει αραιώση των ούρων 1:5 και επομένως σε ποσότητα 0,01 ml της αραιώσης αυτής, έχουμε αραιώση 1:500. Στη συνέχεια με μια πιπέτα των 0,1 ml μεταφέρονται στην επιφάνεια του καθενός από τα τρυβλία από 0,01 ml αραιωμένα ούρα με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια. Με ένα αποστειρωμένο γυάλινο ραβδάκι τα ούρα που ενοφθαλμίστηκαν στρώνονται σε όλη ή στη μισή επιφάνεια των τρυβλίων ομαλά και προσεκτικά ώστε να μην τραυματιστεί το άγαρ του θρεπτικού υλικού. Τα τρυβλία στη συνέχεια σκεπάζονται και επωάζονται στον κλίβανο των 37 °C μέχρι την επόμενη ημέρα το πρωί (σχήμα 110) (Αρσένη, 1998).

Το επόμενο στάδιο της διαδικασίας είναι η ανάγνωση, η μέτρηση και ο υπολογισμός του αριθμού των αποικιών. Σε περίπτωση που δεν υπάρχουν μικρόβια στην ποσότητα των ούρων που καλλιεργήθηκαν, δεν θα βρεθούν αποικίες στα τρυβλία και το δείγμα χαρακτηρίζεται «στείρο». Αν υπάρχουν αποικίες θα γίνει καταμέτρηση με τη βοήθεια μαρκαδόρου και υπολογισμός του αριθμού τους κατά ml. Αν οι αποικίες είναι ενός είδους, τότε η καταμέτρηση γίνεται από το τρυβλίο με το άγαρ. Σε περίπτωση ανάπτυξης πρωτέα ο οποίος έχει εξαπλωθεί σε όλη την επιφάνεια, η μέτρηση γίνεται από το τρυβλίο με το MacConkey (σχήματα 111A, 111B, 112 B). Αν δεν υπάρχουν αποικίες στο άγαρ και υπάρχουν στο MacConkey όπως συμβαίνει με τον εντερόκοκκο που δύσκολα ή καθόλου δεν αναπτύσσεται σε 24 ώρες στο άγαρ, η μέτρηση θα γίνει από το MacConkey. Αν αναπτυχθούν δύο ειδών αποικίες, αυτές θα μετρηθούν χωριστά για το κάθε είδος, από το MacConkey, για παράδειγμα αποικίες κόκκινες και άχρωμες ή αποικίες κόκκινες και μεγάλες (κολοβακτηριοειδών) και μικρές συμπαγείς κόκκινες-ιώδεις (εντεροκόκκου) (σχήματα 111A, 112A). Αν αναπτυχθούν τρία ή περισσότερα είδη αποικιών, τότε αυτές δεν μετρούνται γιατί το δείγμα θεωρείται σχεδόν πάντα ακατάλληλο. Θα ζητηθεί επανάληψη (σχήμα 111B). Αν υπάρχει μεγάλη διαφορά στο είδος και στον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα δύο θρεπτικά υλικά (εκτός από την περίπτωση του εντερόκοκκου) θα ζητηθεί επανάληψη γιατί υπάρχει η περίπτωση κάποιου τεχνικού λάθους που μπορεί να έγινε κατά την εκτέλεση της καλλιέργειας. Ο υπολογισμός γίνεται σε αριθμό μικροβίων κατά κυβικό εκατοστόμετρο (CFU/ml). Γνωρίζοντας το ποσό των ούρων που καλλιεργήθηκαν και τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν ο υπολογισμός είναι απλός. Με την μέθοδο που περιγράφηκε ο αριθμός των αποικιών πολλαπλασιάζεται επί 500. Η μέτρηση αποικιών δεν είναι απαραίτητη αν αναπτυχθεί σταφυλόκοκκος σε καθαρό καλλιέργημα. Θεωρείται θετικό ανεξάρτητα από τον αριθμό των αποικιών και προχωρούμε στην ταυτοποίηση του είδους. Η ίδια διαδικασία γίνεται αν αναπτυχθεί μύκητας, σε καθαρό καλλιέργημα (Αρσένη, 1998).

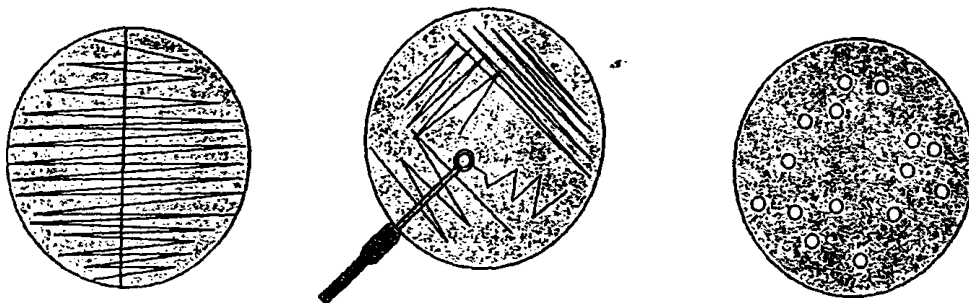
A.

B.





Σχήμα 18. Ετοιμασία τρυβλίων με θρεπτικό υλικό για καλλιέργεια. (A) Στέγνωμα της επιφάνειας του υλικού στον κλίβανο 37°C . (B) Αφαίρεση λωρίδας άγαρ από το μέσο του τρυβλίου για τη καλλιέργεια δύο δειγμάτων ούρων σε τριβλίο (προφύλαξη από τον ερπυσμό του πρωτέα) (Αρσένη, 1998).

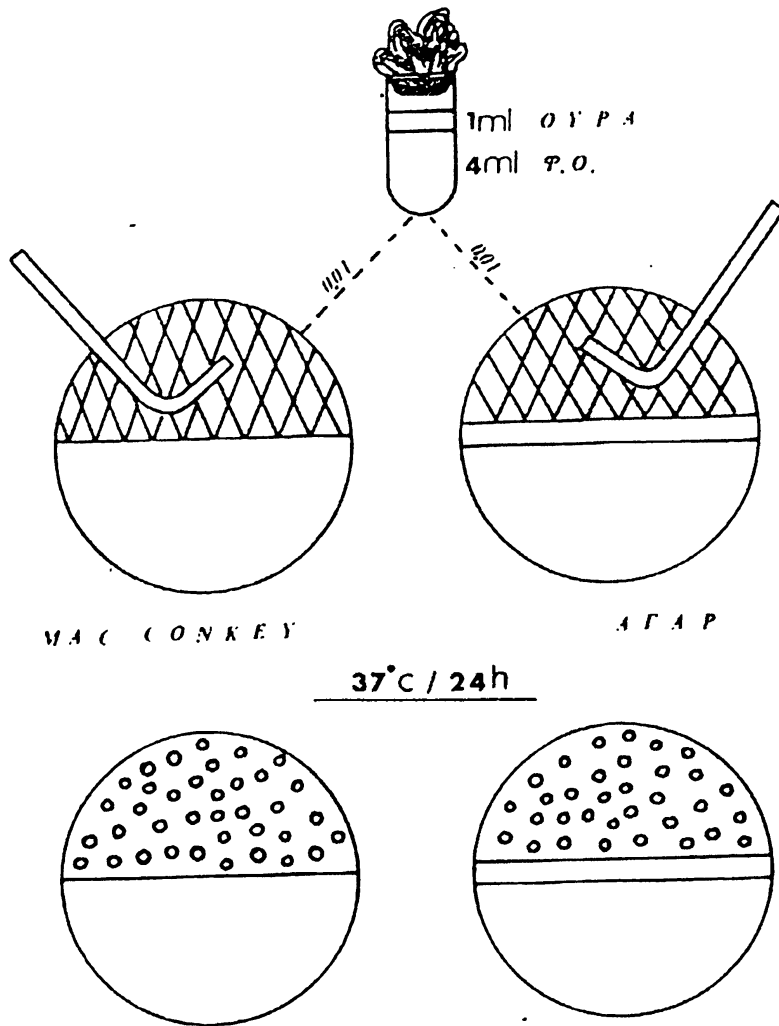


Ποοίηια δείγμαιος σιρώνε-
ται ομοιόμορφα για την α-
ρίθμηση των μικροβίων

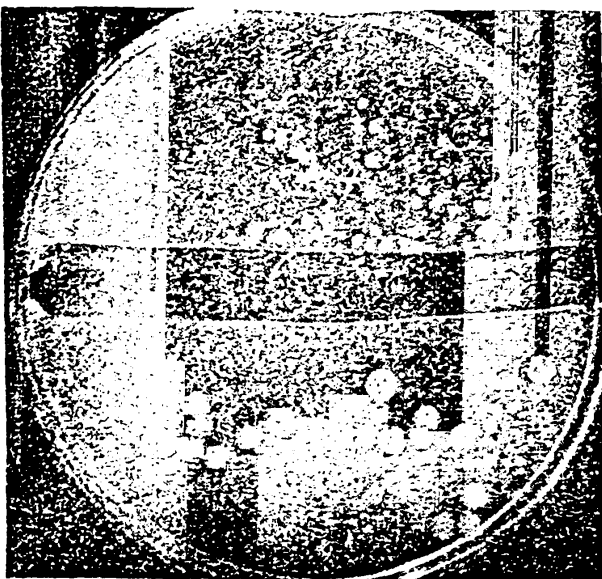
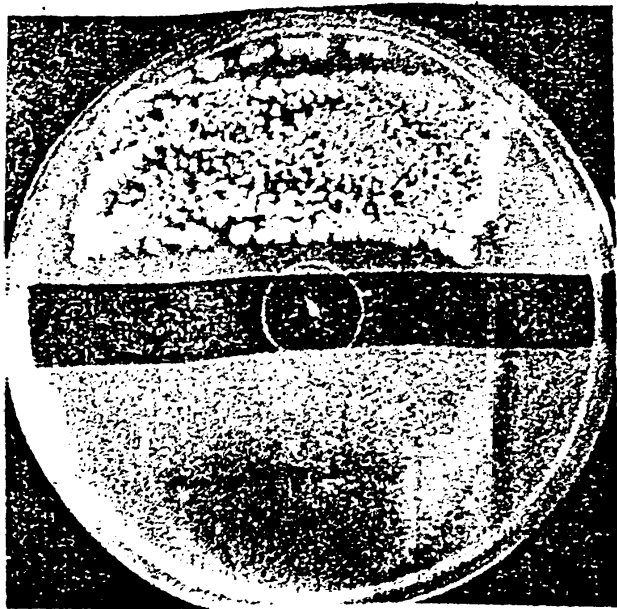
Απομόνωση μικροβίων.
Επίαση στους 37°C
για 18-24 ώρες

Καιαμέτρηση αποικιών
και αναγωγή του αριθμού των
βακτηρίων σε ένα ml ούρων

Σχήμα 19. Αρίθμηση και απομόνωση μικροοργανισμών. Η καλλιέργεια ούρων (Bergsten, Wult and Svanborg, 2005).



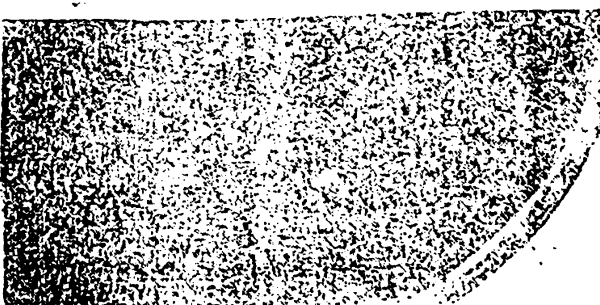
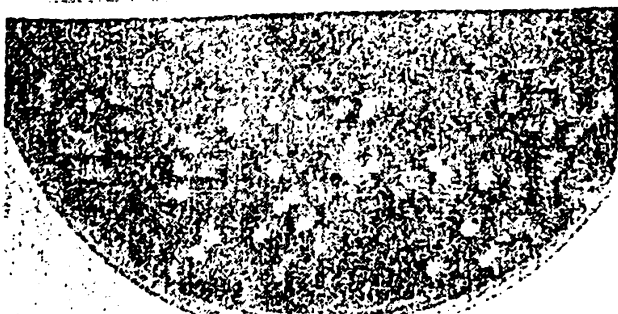
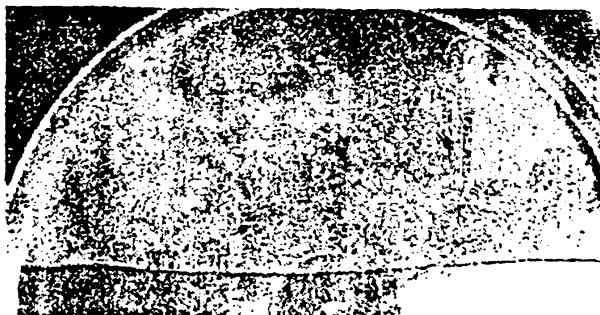
Σχήμα I 10. Τεχνική ουροκαλλιέργειας με αραιώση. 1. Τα ούρα αραιώνονται 1:5. Ούρα 1 ml και αποστειρωμένος φυσιολογικός ορός (Φ. Ο.) 4 ml 2. Μεταφέρονται ανά 0,01ml (με πιπέτα των 0,1 ml) στο MacConkey και στο άγαρ. 3. Με αποστειρωμένο (ή απλά πυρακτωμένο και κρυωμένο) ραβδί επιστρώνεται το ενοφθάλμισμα σε όλη τη μισή επιφάνεια του τρυβλίου. 4. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C μέχρι την άλλη μέρα. 5. Μετρούνται οι αποικίες και γίνεται ο υπολογισμός των μικροβίων κατά ml ούρων (με πολλαπλασιασμό επί 500) (Αρσένη, 1998).



Σχήμα I 11. (A.) Θετική ουροκαλλιέργεια με άνω των 10^5 /ml μικρόβια (πάνω). Στείρα ουροκαλλιέργεια (κάτω). (B.) Ακατάλληλο δείγμα με τρία είδη μικροβίων. Ζητιέται επανάληψη (πάνω) Αρνητική ουροκαλλιέργεια με 7.500 μικρόβια κατά ml (κάτω) (Αρσένη, 1998).

A.

B.



Σχήμα I 12. (A.) Κλεμψιέλλα σε θετική ουροκαλλιέργεια σε άγαρ (πάνω) Κλεμψιέλλα σε ακατάλληλο δείγμα (μικτή καλλιέργεια) σε MacConkey (κάτω) (B.) Πρωτέας σε άγαρ με ερπυσμό (πάνω). Εντερόκοκκος σε MacConkey No (Αρσένη, 1998).

3.3 Η αξιολόγηση της ουροκαλλιέργειας

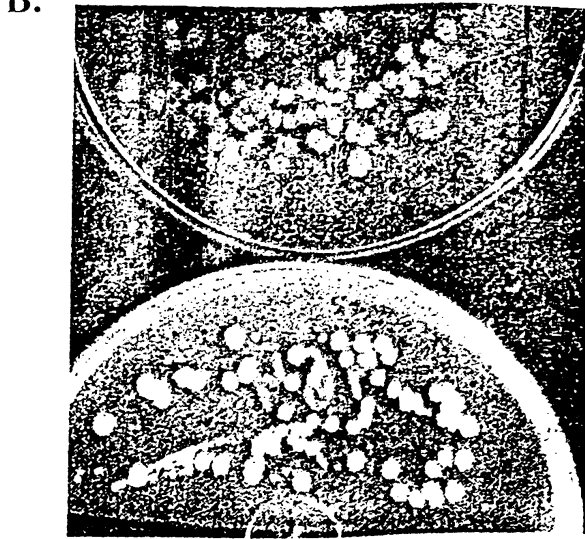
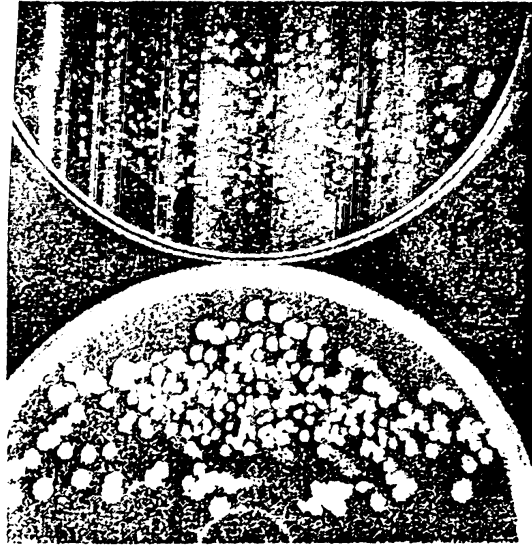
Η αξιολόγηση της ουροκαλλιέργειας είναι το δυσκολότερο μέρος στην εξέταση και γίνεται από τον μικροβιολόγο με βάση τον αριθμό των μικροβίων, τα στοιχεία από τον άρρωστο και την οικολογία και παθογένεια του μικροβίου που αναπτύχθηκε. Αν αναπτύχθηκε ένα είδος μικροβίου η αξιολόγηση γίνεται σύμφωνα με τα στοιχεία που αναγράφονται στον πίνακα 18. Σαν «θετική» χαρακτηρίζεται η ουροκαλλιέργεια αν ο αριθμός είναι πάνω από 10^5 , σαν «πιθανά αξιολογήσιμη» στους μεγάλους και «θετική» στα παιδιά αν ο αριθμός είναι μεταξύ 10.000 ως 100.000, σαν «αρνητική» (ή υποχώρηση μικροβιουρίας) αν είναι μεταξύ 1000 και 10.000 και σαν σαφώς «αρνητική» αν είναι κάτω των 1000, δηλαδή 1-2 αποικίες. «Στείρα» θα χαρακτηριστεί η καλλιέργεια αν δεν αναπτυχθεί κανένα μικρόβιο, αν και η απουσία αποικιών στην ποσότητα των ούρων που καλλιεργήθηκαν δεν αποκλείει την παρουσία μερικών μικροβίων σε μεγαλύτερες ποσότητες ούρων (σχήματα I 13A, I 13B, I 14A, I 15B) (Αρσένη, 1998).

Όσον αφορά την μικτή καλλιέργεια αν αναπτύχθηκαν δύο είδη μικροβίων και από αυτά το ένα σε μεγάλο βαθμό (πάνω από 10.000) και από το άλλο μερικές μόνο αποικίες, τότε αξιολογείται το πρώτο και αγνοείται το άλλο (σχήμα I 14A). Αν και τα δύο μικρόβια είναι σε μεγάλο αριθμό, τότε μετρούνται και τα δύο χωριστά και αν οι αριθμοί και των δύο είναι στα 100.000 τότε θα αξιολογηθούν και τα δύο, κυρίως με κλινικά στοιχεία από τον άρρωστο αλλά και με οικολογικά στοιχεία των μικροβίων αυτών. Αν και τα δύο μικρόβια είναι σε μικρό αριθμό, το καθένα χωριστά δηλαδή κάτω των 100.000 (ή μέχρι 10.000 προκειμένου για παιδιά), το καλλιέργημα θα χαρακτηριστεί σαν αρνητικό. Αν οι αριθμοί είναι αρκετά υψηλοί θα ζητηθούν στοιχεία από τον άρρωστο πριν από την τελική αξιολόγηση και σε δυσκολία θα ζητηθεί επανάληψη (σχήμα I 15A). Αν αναπτύχθηκαν τρία είδη μικροβίων το καλλιέργημα εξ αρχής θα πρέπει να θεωρηθεί σαν «ακατάλληλο δείγμα» και να γίνει επανάληψη. Κάθε προσπάθεια αξιολόγησης, όσο και αν τα στοιχεία του αρρώστου κλίνουν για αξιολόγηση του ενός από τα μικρόβια, θα πρέπει να αποκλειστεί (σχήματα I 15A, I 15B) (Αρσένη, 1998).

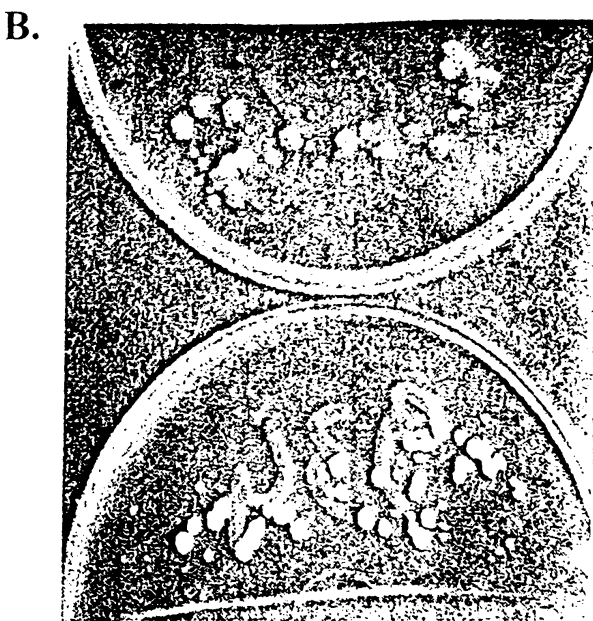
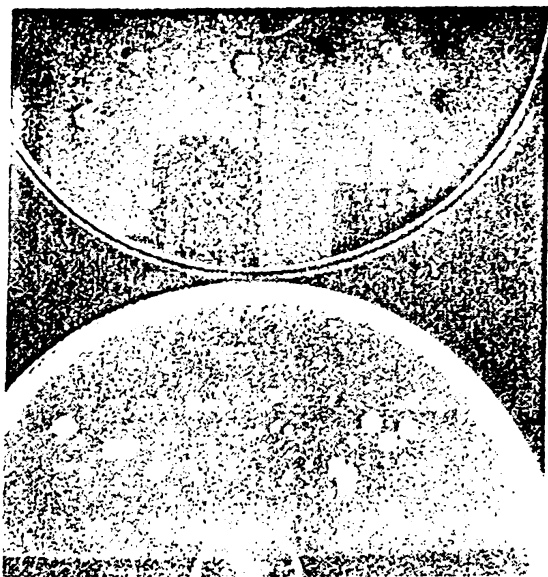
Πίνακας 18. Αξιολόγηση ουροκαλλιέργειας από τον αριθμό των μικροβίων (Αρσένη, 1998)

Αριθμός μικροβίων κατά ml (CFU/ml)	Χαρακτηρισμός	Διάγνωση
100.000 και άνω = 10^5	Θετική	Ουρολοίμωξη πάντα
10.000 – 100.000 = 10^4 - 10^5	Θετική	Σε παιδιά με ουρολοίμωξη Σε ενήλικες υποχώρηση λοίμωξης ή επιμόλυνση
1.000 – 10.000 = 10^3 - 10^4	Αρνητική	Επιμόλυνση ή υποχώρηση μικροβιουρίας
1.000 και κάτω = 10^3	Αρνητική	Επιμόλυνση πάντα
Κανένα μικρόβιο = 0	Στείρα	Δεν υπάρχει οξεία πυελονεφρίτιδα ή ουρολοίμωξη

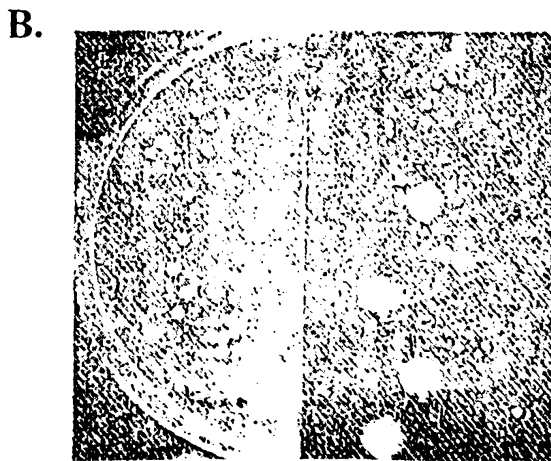




Σχήμα I 13. (A.) Θετική ουροκαλλιέργεια. Αριθμός αποικιών πάνω από 10^5 /ml (B.) αρνητική ουροκαλλιέργεια (σε παιδί). Αριθμός αποικιών 45.000/ ml. Στο άγαρ δύο είδη αποικιών. Σε ενήλικα θα χαρακτηρισθεί σαν αρνητική (Αρσένη, 1998).



Σχήμα I 14. (A.) Αρνητική ουροκαλλιέργεια. Αριθμός αποικιών 10.000/ ml (B.) Αρνητική ουροκαλλιέργεια ακατάλληλο δείγμα (Αρσένη, 1998).



Σχήμα I 15. (A.) Δύο ουροκαλλιέργειες με μεγάλο αριθμό μικροβίων σε ακατάλληλο δείγμα με τρία είδη μικροβίων (B.) Μικτή ουροκαλλιέργεια. Ακατάλληλο δείγμα (Αρσένη, 1998).



Κάποια στοιχεία από τον άρρωστο που μπορεί να βοηθήσουν στην αξιολόγηση των δύσκολων περιπτώσεων είναι αν πρόκειται για πυελονεφρίτιδα ή λοίμωξη των κατωτέρων οδών, αν έχει προηγηθεί εγχείρηση ή όχι, αν ο άρρωστος έχει μόνιμο καθετήρα. Αν πρόκειται για πυελονεφρίτιδα, στοιχεία όπως, αν είναι η πρώτη προσβολή, αν έχουν προηγηθεί άλλες καλλιέργειες, αν έχει γίνει πυελογραφία και αν υπάρχουν συγγενείς ανατομικές βλάβες ή έντονη παλινδρόμηση, αν έχει γίνει ακτινογραφικός έλεγχος και αν υπάρχουν μόνιμες ουλές βοηθούν στην αξιολόγηση. Επιπλέον αν πρόκειται για άλλη πιο σπάνια νόσο του ουροποιητικού (νεφρασβέσωση, νεοπλάσματα, επικοινωνίες με γειτονικά όργανα), αν έχει υποβληθεί σε χημειοθεραπεία, αν και πότε σταμάτησε και το είδος του αντιβιοτικού που λάμβανε, αν υπάρχει ανοσολογικό έλλειμμα, αν λαμβάνει κορτιζόνη ή άλλα ανασοκατασταλτικά και τέλος αν πάσχει από βαριά γενική ή αιματολογική νόσο είναι χρήσιμα στοιχεία. Κατά περίπτωση μπορεί να ζητηθούν και άλλα στοιχεία. Αφού τα στοιχεία αυτά παρθούν θα μπορεί να δοθεί μια εξήγηση και να αξιοποιηθούν ουροκαλλιέργειες που θα χαρακτηριστούν αλλιώς σαν «επιμόλυνση» ή αντίθετα, να αποφευχθούν οι υπερδιαγνώσεις ουρολοιμώξεων που είναι και το συνηθέστερο (Αρσένη, 1998).

Μια κατάταξη των μικροβίων που βρίσκονται στις ουροκαλλιέργειες ανάλογα με την οικολογική τους εστία καταγράφεται στον πίνακα 19. Τα μικρόβια της 2^{ης} στήλης θα πρέπει να αξιολογούνται με περισσότερη περίσκεψη από ότι αυτά της πρώτης στήλης. Είναι μικρόβια της μόνιμης ή παροδικής χλωρίδας της ουρογεννητικής περιοχής. Βρίσκονται συχνότερα σε αρρώστους με μετεγχειρητική λοίμωξη των ουροφόρων οδών και κυρίως σε αρρώστους με καθετήρα. Πολλές φορές ο μεγάλος αριθμός τους στα ούρα οφείλεται στην ανάπτυξή τους στα εσωτερικά τοιχώματα του καθετήρα και όχι στην κύστη. Για τα μικρόβια αυτά είναι απαραίτητη η συνεννόηση με τον κλινικό γιατρό για στοιχεία από τον άρρωστο. Τα μικρόβια της τρίτης στήλης δεν θα πρέπει να αξιολογηθούν, εκτός από τον λευκό σταφυλόκοκκο που μπορεί να βρεθεί σε αρρώστους ανοσοκατασταλμένους, σαν αίτιο ουρολοιμώξεως (Αρσένη, 1998).

Πίνακας 19. Μικρόβια που αναπτύσσονται στις ουροκαλλιέργειες και η πιθανή προέλευσή τους (Αρσένη, 1998).

Ουροπαθογόνα από το νεφρό και από το ουροαποχετευτικό τμήμα	Ουροπαθογόνα από το περίνεο, τον κόλπο, τον καθετήρα	Ουροπαθογόνα από την ουρήθρα
<i>Echerichia coli</i> <i>Klebsiella-Enterobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterococcus</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Citrobacter</i> <i>Coryneform JK</i> <i>D₂ bacilli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella-Enterobacter</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candidae</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>Micrococci</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Corynebacteria</i>



3.4 Η τυποποίηση των εντεροβακτηριακών

Τα εντεροβακτηριακά αποτελούν μια κατηγορία μικροοργανισμών πολύ διαδεδομένων στη φύση. Ο κύριος εκπρόσωπός τους είναι η *Escherichia coli*, ένα μικρόβιο της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου, που ευκαιριακά προκαλεί λοιμώξεις. Είναι το πιο συνηθισμένο μικρόβιο στις ουρολοιμώξεις, απομονώνεται συχνά σε λοιμώξεις των χοληφόρων οδών και ευκαιριακά σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και σε περιγεννητικές λοιμώξεις του νεογνού. Ο ορότυπος *Escherichia coli* O157: H7, είναι παθογόνος και προκαλεί το ουραιμικό-αιμολυτικό σύνδρομο που είναι θανατηφόρο. Η *Salmonella* είναι γνωστή για την παθογόνο της δράση και τυποποιείται και αυτή με τις βιοχημικές δοκιμασίες που την χαρακτηρίζουν (API 20E), αλλά η διάγνωση ολοκληρώνεται με την ορολογική τυποποίηση βάσει των αντιγόνων της μεμβράνης, της κάψουλας (ελύτρου) και της φλαζέλλας. Η διάκριση των εντεροβακτηριακών σε λακτόζη θετικά και λακτόζη αρνητικά γίνεται άμεσα στο τρυβλίο με το εκλεκτικό-διαφοροποιητικό υλικό (πίνακας II0). Ακολουθεί η δοκιμασία της οξειδάσης: τα εντεροβακτηριακά είναι οξειδάση αρνητικά. Το πιο συνηθισμένο εμπορευματοποιημένο σύστημα που περιέχει τις βιοχημικές δοκιμασίες ταυτοποίησης των εντεροβακτηριακών είναι το API της BioMérieux. Σε αυτό περιλαμβάνονται οι δοκιμασίες δεκαρβοξυλασών των αμινοξέων, το τεστ της ινδόλης και της ουρεάσης και η χρήση των υδατανθράκων. Οι βιοχημικές δοκιμασίες δηλαδή, ο έλεγχος προϊόντων μεταβολισμού, ζύμωση σακχάρων, αποτελούν τον κλασικό τρόπο ταυτοποίησης των εντεροβακτηριακών. Σε κάποιες περιπτώσεις αρκούν μερικά βιοχημικά τεστ και άλλοτε είναι απαραίτητη μια σειρά βιοχημικών δοκιμών για την πλήρη τυποποίηση. Ωστόσο όμως είναι χρονοβόρο και πολύπλοκο να παρασκευάζονται υλικά και υποστρώματα στο εργαστήριο για την τυποποίηση. Για τον σκοπό αυτό υπάρχουν «ταχείες μέθοδοι», εμπορευματοποιημένες. Μερικές από αυτές είναι όντως ταχείες και επιτυγχάνεται η τυποποίηση σε λιγότερο χρόνο από ότι με τις κλασικές μεθόδους. Όμως ακόμη κι αν η τυποποίηση ολοκληρώνεται στον ίδιο χρόνο με τις κλασικές μεθόδους, υπάρχει ένα όφελος: ο χρόνος προετοιμασίας είναι συνήθως ελάχιστος, ενώ η ερμηνεία του αποτελέσματος είναι τυποποιημένη και πολύ πιο εύκολη (Χαρβάλου, 2007).

Ένα τέτοιο Kit είναι το Enterotube II (Roche Diagnostics), ένας σωλήνας με 12 τμήματα που κάθε ένα από αυτά περιέχουν συνήθη υποστρώματα με άγαρ. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται με μια απομονωμένη αποικία πολύ γρήγορα. Τα μέσα αυτά δείχνουν μετά από επώαση 18 – 24 ωρών εάν ο οργανισμός: 1) ζυμώνει τα σάκχαρα, glucose, lactose, adonitol, arabinose, sorbitol, dulcitol, 2) Παράγει H₂S, +/ή ινδόλη (acetylmethylcarbinol), 3) διασπά την ουρία, 4) προκαλεί την απαμίνωση της φαινυλαλανίνης, 5) προκαλεί την αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης ή και της ορνιθίνης, 6) έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιεί τα κιτρικά ως μόνη πηγή ενέργειας (Χαρβάλου, 2007).

Το API system (API, BioMérieux, Lyon, France), είναι ένα άλλο kit για την ταχεία τυποποίηση των εντεροβακτηριακών (και άλλων βακτηρίων με την ίδια υποδομή και άλλα αντιδραστήρια). Το API 20E αποτελείται από ένα strip, με μια σειρά από 20 μικροσωληνάρια (πηγάδια) στα οποία περιέχονται αφυδατωμένα υλικά και ο ενοφθαλμισμός γίνεται με εναιώρημα του μικροβίου σε χλωριούχο διάλυμα. Τα τεστ που περιλαμβάνονται στο strip απαντούν στα ακόλουθα: 1) ζύμωση της glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melolose και amygdalin 2)

παραγωγή ινδόλης και υδροθείου 3) διάσπαση της ουρίας 4) απαμίνωση των tryptophan, lysine, ornithine, arginine. 5) παραγωγή πηκτάσης (relatinoase), 6) παραγωγή ακετυλομεθυλοκαρβινόλης από την γλυκόζη (VP), 7) διάσπαση του ONPG, o-nitrophenyl-b-D-galactoryranoside δηλώνει την ύπαρξη β-γαλακτοσιδάσης (Χαρβάλου, 2007).

Πίνακας I 10. Λακτόζη θετικά και λακτόζη αρνητικά εντεροβακτηριακά (Χαρβάλου, 2007).

• Λακτόζη θετικά εντεροβακτηριακά	Λακτόζη αρνητικά εντεροβακτηριακά
<i>Echerichia coli</i> <i>Klebsiella spp</i> <i>Enterobacter spp</i> <i>Citrobacter spp</i>	<i>Salmonella spp</i> <i>Shigella spp</i> <i>Serratia spp</i> <i>Proteus spp</i> <i>Yersinia spp</i>

Ένας άλλος τύπος kit είναι το Minitek system (Becton & Dickinson Microbiology system, USA). Πρόκειται για ένα σύστημα που αποτελείται από μια πλαστική θήκη με δώδεκα πηγάδια σε καθένα από τα οποία τοποθετείται ένας δίσκος με αφυδατωμένο υπόστρωμα. Η επανυδάτωση γίνεται καθώς ενοφθαλμίζεται το ελαιώδη του μικροβίου σε διάλυμα NaCl. Υπάρχουν 35 είδη δίσκων για τα εντεροβακτηριακά και η διαφορά με τα άλλα τέστ είναι ότι ο εργαστηριακός μπορεί να χρησιμοποιήσει δίσκους σύμφωνα με την κρίση του (Χαρβάλου, 2007).

Και τα τρία kits χρησιμοποιούν σύστημα κωδικοποίησης των αποτελεσμάτων σε έναν κωδικό αριθμό για κάθε τυποποιημένο στέλεχος και η ανάγνωση γίνεται σε ένα μεγάλο βιβλίο που περιέχει όλες τις δυνατές παραλλαγές αποτελεσμάτων βιοχημικών δοκιμασιών που μπορεί να υπάρχουν σε κάθε είδος. Αυτές οι παραλλαγές (variations) ενός είδους μπορεί να χρησιμεύσουν και σε επιδημιολογικές μελέτες όπως ακριβώς γίνεται με την φαγοτυπία του *Staphylococcus aureus* (Χαρβάλου, 2007).

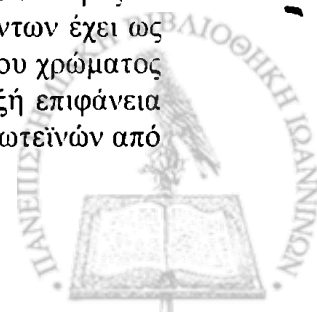
Άλλη καινοτομία είναι η αυτοματοποίηση του συστήματος τυποποίησης και ταυτόχρονα του αντιβιογράμματος, κατά την οποία γίνεται η ανάγνωση και η αξιολόγηση του αποτελέσματος μαζί (VITEK). Τα υποστρώματα τίθενται μέσα σε πλαστικούς μικροθαλάμους (πηγάδια) που περιέχουν πάνελ βιοχημικών αντιδραστηρίων ή αντιβιοτικών σε αραιώσεις. Κατά τακτά διαστήματα γίνεται σάρωση (scanning) για αλλαγή στο χρώμα, στο pH ή τη θόλωση παρουσία αντιβιοτικού. Στο τέλος του προκαθορισμένου χρόνου γίνεται ανάγνωση, αξιολόγηση και εκτύπωση του αποτελέσματος. Σε ορισμένα τέτοια συστήματα η πλήρης τυποποίηση ολοκληρώνεται σε 6 ώρες (Χαρβάλου, 2007).

Μερικά από τα χαρακτηριστικά των εντεροβακτηριακών που χρησιμοποιούνται στα τυποποιημένα συστήματα είναι αυτά που χρησιμοποίησε η κλασική μικροβιολογία για πολλά χρόνια σε σωλίνες και με υλικά παρασκευασμένα στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Ένας τέτοιος συνδυασμός βιοχημικών δοκιμασιών είναι η γνωστή IMViC ή και ο ενοφθαλμισμός σε άγαρ Kligler. Η IMViC περιλαμβάνει τέσσερις βιοχημικές δοκιμασίες που δίνουν αποτελέσματα χαρακτηριστικά για τα εντεροβακτηριακά. Η πρώτη είναι η δοκιμασία παραγωγής ινδόλης. Η ινδόλη είναι προϊόν βακτηριακής διάσπασης της τρυπτοφάνης με το ένζυμο τρυπτοφάνάση. Χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό πλούσιο σε τρυπτοφάνη στο οποίο η παραγόμενη ινδόλη ανιχνεύεται από τα έγχρωμα σύμπλοκα που σχηματίζει με ορισμένες αλδεύδες. Στη δοκιμασία παραγωγής ινδόλης, κομμάτι διηθητικού χαρτιού



εμποτίζεται με παραδιμεθυλαμινοκινναμαλδεϋδη ή με παραδιμεθυλαμινοβενζαλδεϋδη (αντιδραστήριο Kovacs). Ακολούθως αποικίες του εξεταζόμενου μικροοργανισμού, οι οποίες λαμβάνονται με ξύλινο στυλέο, αφήνονται δια τριβής στην επιφάνεια του διηθητικού χαρτιού. Εάν ο μικροοργανισμός παράγει ινδόλη, στην επιφάνεια του διηθητικού χαρτιού αναπτύσσεται είτε μπλε πράσινο χρώμα (όταν χρησιμοποιείται η παραδιμεθυλαμινοκινναμαλδεϋδη) είτε ζωηρό ροζ-κόκκινο χρώμα όταν χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Kovacs. Η δεύτερη είναι η δοκιμασία *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG). Το ένζυμο β -γαλακτοσιδάση υδρολύει τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Οι μονοσακχαρίτες αυτοί καταβολίζονται στη συνέχεια με ζύμωση. Τα ταχέως ζυμούντα τη λακτόζη βακτηρίδια, τα οποία σχηματίζουν αποικίες ροζ χρώματος στο MacConkey άγαρ, διαθέτουν επιπλέον και μια περμεάση, η οποία διευκολύνοντας την είσοδο της λακτόζης στο κυτταρόπλασμα, επιταχύνει τη ζύμωση αυτής. Αντίθετα η παραγωγή μόνο β -γαλακτοσιδάσης από τα βακτηρίδια έχει ως αποτέλεσμα η ζύμωση της λακτόζης να πραγματοποιείται εντός 2-10 ημερών (βραδέως ζυμούντα). Τέλος τα μη ζυμούντα τη λακτόζη βακτηρίδια δεν έχουν κανένα από τα δύο ένζυμα. Η δοκιμασία ONPG είναι μια ταχεία (<4 ώρες) δοκιμασία με την οποία ελέγχεται η παρουσία β -γαλακτοσιδάσης. Το ένζυμο διασπά το υπόστρωμα ONPG (άχρωμο) σε γαλακτόζη και *o*-νιτροφαινόλη η οποία έχει κίτρινο χρώμα. Αντίθετα η μη εμφάνιση χρώματος σημαίνει αρνητική δοκιμασία. Η τρίτη περιλαμβάνει τις δοκιμασίες Methyl red και Voges-Proskauer οι οποίες εκτελούνται από το ίδιο μικροβιακό εναιώρημα, το οποίο διαιρείται σε δύο μέρη. Με τη δοκιμασία MR ελέγχεται το pH των τελικών μεταβολικών παραγώγων της ζύμωσης της γλυκόζης. Με τη γλυκολυτική οδό (διάσπαση της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ) μερικά Εντεροβακτηριοειδή παράγουν όξινα μεταβολικά παράγωγα (pH<4.4), με αποτέλεσμα ο δείκτης MR να παίρνει κόκκινο χρώμα, ενώ άλλα παράγουν ακετοΐνη (pH>6.0), με αποτέλεσμα ο δείκτης MR να παίρνει κίτρινο χρώμα. Η δοκιμασία VP ελέγχει την παραγωγή ακετοΐνης. Τα αντιδραστήρια α -ναφθόλη και KOH προστίθενται στο μικροβιακό εναιώρημα με αποτέλεσμα να παίρνει ερυθρό χρώμα λόγω οξειδωσης της ακετοΐνης σε διακετύλιο. Το ένα ζεύγος σωληνάρων περιλαμβάνει μια θετική δοκιμασία MR (κόκκινο) και μια αρνητική VP (άχρωμο), ενώ το άλλο ζεύγος μια θετική VP (κόκκινος δακτύλιος) και μια αρνητική MR (κίτρινο). Η τέταρτη είναι η δοκιμασία της χρησιμοποίησης κιτρικών αλάτων. Μερικά Εντεροβακτηριοειδή χρησιμοποιούν τα κιτρικά άλατα ως μοναδική πηγή άνθρακα. Στην κεκλιμένη επιφάνεια του άγαρ, το οποίο περιέχει κιτρικό νάτριο, άλατα αμμωνίου και δείκτη μπλε της βρωμοθυμόλης, ενοφθαλμίζεται αποικία του εξεταζόμενου μικροοργανισμού και το σωληνάριο επωάζεται στους 35°C, για 18-24 ώρες. Εάν ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί το κιτρικό νάτριο, παράγει αλκαλικά τελικά μεταβολικά παράγωγα με αποτέλεσμα ο δείκτης να λαμβάνει μπλε χρώμα. Στην αρνητική δοκιμασία ο δείκτης διατηρεί το αρχικό πράσινο χρώμα (Χαρβάλου, 2007).

Το Triple Sugar Iron (TSI άγαρ - ανάπτυξη στο Kligler), το οποίο περιέχει γλυκόζη και λακτόζη (σε αναλογία 1:10), σουκρόζη, εναμμώνιο κιτρικό σίδηρο και δείκτη (ερυθρό της φαινόλης), ελέγχει τη ζύμωση των προαναφερόμενων σακχάρων, την παραγωγή H₂S και την παραγωγή αερίου. Το υλικό ενοφθαλμίζεται με τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό τόσο στη λοξή επιφάνεια όσο και στη στήλη του με τη βοήθεια ευθύ μικροβιολογικού κρίκου και επωάζεται, στους 35 °C, για 18-24 ώρες. Η ζύμωση μόνο της γλυκόζης και η παραγωγή όξινων μεταβολικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα ολόκληρο το υλικό να χρωματίζεται κίτρινο λόγω αλλαγής του χρώματος του δείκτη (από κόκκινο σε κίτρινο). Με την πάροδο του χρόνου, η λοξή επιφάνεια του υλικού αποκτά και πάλι ροζ χρώμα λόγω της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών από



το μικροοργανισμό και της παραγωγής αλκαλικών τελικών μεταβολικών προϊόντων. Η αλλαγή του χρώματος του υλικού δεν συμβαίνει όμως όταν ο μικροοργανισμός ζυμώνει τα σάκχαρα λακτόζη και /ή σουκρόζη, διότι η οξίνιση του υλικού, από τη ζύμωση των αυξημένων συγκεντρώσεων των δύο σακχάρων, εξουδετερώνει την αλκαλοποίηση από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Το παραγόμενο H_2S ανιχνεύεται από το μαύρου χρώματος σύμπλοκο (θειούχος σίδηρος) που σχηματίζει με τον εναμμόνιο κιτρικό σίδηρο, ενώ η παραγωγή αερίου συμπεραίνεται από την εμφάνιση φυσαλίδων, την αποκόλληση και τον τεμαχισμό του υλικού (Χαρβάλου, 2007).

Μια πιο πρόσφατη μελέτη περιγράφει λεπτομερώς μια τεχνική για την ανίχνευση συγκεκριμένων ειδών βακτηρίων σε ούρα ανθρώπων, που γίνεται με την «συσκευή ηλεκτροχημικού αισθητήρα μικροϊνών» (microfabricated electrochemical sensor array). Η συσκευή αυτή αποτελείται από 16 αισθητήρες που περιλαμβάνουν ηλεκτρόδια από χρυσό, που το καθένα φέρει ανιχνευτές από «βιβλιοθήκη» (library of probes) που είναι ειδικοί για κάθε σχετικό βακτηριακό παθογόνο στα ούρα. Η «βιβλιοθήκη» περιλαμβάνει ανιχνευτές για τα είδη *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella spp*. Η ανίχνευση 2.600 βακτηρίων ουρολοίμωξης σε καλλιέργεια από ενοφθαλμισμό και επίσης σε κλινικά δείγματα ούρων, έγινε μέσα σε σαράντα πέντε λεπτά από την έναρξη της επεξεργασίας των δειγμάτων, με αυτή την τεχνική (Liao et al, 2006).

3.5 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Παρότι σε πολλές περιπτώσεις η χορήγηση αντιβιοτικών γίνεται εμπειρικά, μια από τις σημαντικές λειτουργίες του μικροβιολογικού εργαστηρίου είναι ο έλεγχος ευαισθησίας των κλινικών στελεχών. Ο πρώτος λόγος είναι για να δοθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό στον ασθενή χωρίς κίνδυνο αποτυχίας της θεραπείας και ο δεύτερος είναι για να υπάρχει καταγραφή των δεδομένων σε μονάδες νοσοκομείων και στην κοινότητα, για την καλύτερη χρήση των αντιβιοτικών. Ένα παράδειγμα εμπειρικής χορήγησης είναι η χρήση φλουκλοξασιλίνης σε σταφυλοκοκκική βακτηριαμία από MSSA (Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*) σε μονάδα, ενώ σε αναμενόμενο MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) η θεραπεία μπορεί να ξεκινήσει με βανκομυκίνη και να αλλάξει όταν βγει το αποτέλεσμα της καλλιέργειας και το αντιβιογράμμα (Jehl et al, 2000, Χαρβάλου, 2007).

Η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (Minimum Inhibitory Concentration ή MIC) είναι το βασικό τεστ για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας σε ένα αντιβιοτικό. Κατά τη μέθοδο αυτή ένα εναιώρημα μικροβίου ενοφθαλμίζεται σε σωλίνες με διαφορετικές συγκεντρώσεις του εν λόγω αντιβιοτικού. Η υψηλότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού είναι συνήθως 32 mg/l. Κάτω από 32 mg/l και μάλιστα πολύ πιο κάτω είναι συγκεντρώσεις που τα αντιβιοτικά είναι αποτελεσματικά στο αίμα, στους ιστούς στα υγρά και δεν παρουσιάζουν τοξικότητα. Μετά από επώαση στους 37 °C για 18 ώρες οι σωλίνες ελέγχονται για θόλωση, δηλαδή για ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Η ελάχιστη πυκνότητα του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει ορατή ανάπτυξη του μικροβίου ονομάζεται ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα. Η MIC γίνεται πλέον σε μικροπλάκες, κι έτσι οι ποσότητες εναιωρήματος και υλικών είναι πολύ μικρότερες από τις αραιώσεις σε σωλίνες (Jehl et al, 2000, Χαρβάλου, 2007).

Μια άλλη εξέταση που συμπληρώνει την MIC είναι η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (Minimum Bactericidal Concentration ή MBC). Από τους σωλίνες της MICs και ειδικά από αυτούς που δεν έχουν θολερότητα ενοφθαλμίζεται σε άγαρ μια

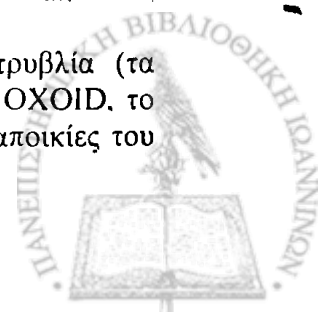


ποσότητα, 10-100μl. Κάθε ανάπτυξη σημαίνει ότι τα βακτήρια δεν έχουν σκοτωθεί. Η ελάχιστη πυκνότητα από το σωλήνα από όπου δεν υπάρχει ανάπτυξη στα τρυβλία είναι η MBC. Όταν η MBC είναι μεγαλύτερη κατά δύο αραιώσεις από την MIC, τότε υπάρχει «ανοχή» του μικροβίου στο αντιβιοτικό. Αυτή είναι μια πολύ σημαντική θέση για την θεραπευτική αντιμετώπιση επικίνδυνων μικροοργανισμών όπως για παράδειγμα στη βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα από στρεπτοκόκκους ή εντεροκόκκους με ανοχή στην πενικιλίνη ή αμοξυκιλλίνη. Σε αυτή την περίπτωση, η θεραπεία πρέπει να συμπεριλαμβάνει δύο αντιβιοτικά μαζί με συνεργιστική δράση για παράδειγμα αμοξυκιλλίνη και γενταμυκίνη. Η εξήγηση είναι ότι οι β-λακτάμες καταστρέφουν το τοίχωμα των στρεπτοκόκκων και εντεροκόκκων έτσι ώστε οι αμινογλυκοσίδες να μπορούν να περάσουν προς το κυτταρόπλασμα και να φθάσουν στον ενδοκυττάριο μικροβιακό στόχο, κάτι που δεν θα ήταν δυνατόν αν το τοίχωμα ήταν άθικτο. Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού όπου δεν παρατηρείται βακτηριακή ανάπτυξη καθορίζει την MBC (Jehl et al. 2000, Χαρβάλου, 2007).

Στα εργαστήρια ρουτίνας τα τεστ που προαναφέρθηκαν δεν είναι εύχρηστα. Το αντιβιογράμμα είναι η εξέταση για τον έλεγχο ευαισθησίας σε αντιβιοτικά. Είναι η τελευταία φάση που συμπληρώνει την εξέταση μιας θετικής καλλιέργειας. Το μικρόβιο δηλαδή που έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί πρέπει να ελεγχθεί ως προς την ευαισθησία του στα αντιβιοτικά. Η εκλογή των αντιβιοτικών για το αντιβιογράμμα γίνεται ανάλογα με την εντόπιση της λοίμωξης και το είδος του μικροβίου. Τα αντιβιοτικά πρώτης εκλογής για ένα μικρόβιο, συμπίπτουν συνήθως κατά κανόνα και με τα αντιβιοτικά που θα χρησιμοποιηθούν στην τυφλή χημειοθεραπεία. Μια μεγάλη δυσκολία στην εκλογή των αντιβιοτικών είναι η ύπαρξη πολλών αντιβιοτικών σε μερικές ομάδες, κυρίως ημισυνθετικών αντιβιοτικών. Υπάρχουν 5 ημισυνθετικές πενικιλίνες πενικιλινασοάντοχες όπως για παράδειγμα η μεθικιλίνη και η οξακιλλίνη. Το ίδιο ισχύει και με τις κεφαλοσπορίνες. Ήδη υπάρχουν 10 κεφαλοσπορίνες με μικρές φαρμακολογικές διαφορές μεταξύ τους. Ο μικροβιολόγος θα επιλέξει μια ή δύο το πολύ από κάθε ομάδα (Jehl et al, 2000, Χαρβάλου, 2007).

Το αντιβιογράμμα δείχνει αν ένα μικρόβιο είναι ευαίσθητο έναντι των αντιβιοτικών και σε ποιά ακριβώς αντιβιοτικά. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι στο αντιβιογράμμα, δεν μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία μιας τυποποιημένης πυκνότητας αντιβιοτικού, και για αυτό δεν αναπτύσσεται γύρω από το δίσκο του αντιβιοτικού, σε μια ακτίνα ίση ή μικρότερη από αυτή που δημιουργεί ευαίσθητο στέλεχος αναφοράς, ή από αυτή που ορίζεται σε διεθνώς αποδεκτούς πίνακες (National Committee for Clinical of Laboratory Standards ή NCCLS). Στον άνθρωπο, σύμφωνα με την ερμηνεία του αντιβιογράμματος, η λήψη αυτού του αντιβιοτικού σε κατάλληλο θεραπευτικό σχήμα, θα φέρει το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Εκτός από το κλασσικό αντιβιογράμμα στη συνήθη πράξη υπάρχουν εμπορευματοποιημένα συστήματα για τον έλεγχο ευαισθησίας. Το ATB της BioMérieux για παράδειγμα, για κάθε ομάδα μικροοργανισμών αποτελεί ένα βασικό συμπλήρωμα των διαγνωστικών της μικροβιολογίας. Το ATB περιλαμβάνει τα κατάλληλα αντιβιοτικά για να καλύψει όλους τους μικροοργανισμούς, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις την αντιβιοθεραπεία ενός συστήματος (για παράδειγμα ουροποιητικό, ATB U). Στο ATB της BioMérieux δεν χρησιμοποιείται η μέθοδος σε άγαρ, αλλά λυοφιλοποιημένα αντιβιοτικά όπου το εναιώρημα του μικροβίου ενοφθαλμίζεται και επωάζεται για 24 h (Jehl et al, 2000, Χαρβάλου, 2007).

Το αντιβιογράμμα πραγματοποιείται σε στερεό υλικό άγαρ σε τρυβλία (τα αποδεκτά υλικά για το αντιβιογράμμα είναι, το DST άγαρ της εταιρίας OXOID, το άγαρ Muller Hinton και το Sensitivity άγαρ της BioMérieux). Μερικές αποικίες του



προς εξέταση μικροβίου (και του πρότυπου, αν υπάρχει) αραιώνονται σε φυσιολογικό ορό ή απεσταγμένο νερό ώστε το εναιώρημα να είναι ίσο με 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Από αυτό το εναιώρημα του μικροβίου τα τρυβλία ενοφθαλμίζονται με βαμβακοφόρο στυλεό σε όλη την επιφάνεια και στη συνέχεια τοποθετούνται οι δίσκοι των αντιβιοτικών. Οι δίσκοι ευαισθησίας των αντιβιοτικών είναι χάρτινοι, προσροφητικοί, μικρής διαμέτρου διαποτισμένοι με μικρή ποσότητα αντιβιοτικού προτυποποιημένη. Οι δίσκοι ευαισθησίας περιέχουν πρότυπη συγκέντρωση αντιβιοτικών σύμφωνα με τα διεθνή δεδομένα. Φυλάσσονται ως επί το πλείστον στο ψυγείο, από το οποίο είναι απαραίτητο να βγουν τουλάχιστο 30 λεπτά πριν τη χρήση, προκειμένου να έχουν τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η κλίμακα MacFarland αποτελεί πρότυπη κλίμακα «θολερότητας» που αντιστοιχεί σε αριθμό μικροβίων. Η κλίμακα αυτή αντιπροσωπεύει μέτρο θόλωσης που προκαλείται από συγκεκριμένες συγκεντρώσεις μικροβίων σε εναιώρημα. Παλαιότερα η κλίμακα παρασκευαζόταν με διάφορες αναλογίες σουλφουρικού οξέος 1% και χλωριούχου βαρίου. Το πιο συνηθισμένο στη μικροβιολογία standard (δεδομένο) της κλίμακας είναι το 0,5. Το 0,5 MacFarland standard αντιστοιχεί σε $1,5 \times 10^8$ CFU/ml κοινά μικρόβια. Η σύγκριση του εναιωρήματος γινόταν τοποθετώντας το σωληνάριο με το εναιώρημα δίπλα στο σωληνάριο της MacFarland και εμπρός από λευκό χαρτόνι με μαύρες γραμμές. Η σύγκριση γινόταν σύμφωνα με την οπτική σύγκριση στις μαύρες γραμμές. Σήμερα, η οπτική σύγκριση γίνεται με νεφελομετρία ή σπεκτροφωτομετρία. Πιο συχνά χρησιμοποιούνται νεφελόμετρα επιτραπέζια που είναι ρυθμισμένα συνήθως στο 0,5 της κλίμακας και αποτελούν αξιόπιστη και φθηνή λύση. Τα πρότυπα στελέχη είναι μικροβιακά στελέχη που καλλιεργούνται και διατηρούνται σε οργανωμένα μικροβιολογικά κέντρα αναφοράς, όπως για παράδειγμα το PASTEUR, και άλλα στην Αγγλία ή Αμερική (NCCLS). Από τα κέντρα τα προμηθεύονται και τα διαγνωστικά εργαστήρια. Τα πρότυπα στελέχη έχουν γνωστούς χαρακτήρες όπως και ευαισθησίες. Για αυτό και στελέχη τέτοιων μικροβίων χρησιμοποιούνται και σαν μάρτυρες στις βιοχημικές δοκιμασίες για την ταυτοποίηση των μικροβίων. Στη συνήθη πράξη η σύγκριση γίνεται με τους πίνακες όπως ορίζουν τα διεθνή πρότυπα, αλλά το εργαστήριο οφείλει να διατηρεί στελέχη αναφοράς. Πρότυπα μικρόβια είναι από τα συνηθισμένα ευαίσθητα στελέχη που προτείνει το NCCLS: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Τα μικρόβια αυτά διατηρούνται πάνω σε κεκλιμένο άγαρ και ανακαλλιεργούνται μια φορά τον μήνα. Κάθε φορά που θα γίνεται test ευαισθησίας για ένα μικρόβιο, παράλληλα θα γίνεται test ευαισθησίας και στο μικρόβιο-μάρτυρα με την ίδια αραιώση και με τους ίδιους δίσκους. Τα στελέχη αναφοράς είναι ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά και οι ζώνες αναστολής που σχηματίζονται γύρω από κάθε δίσκο δείχνουν την έκταση που πρέπει να έχει το μικρόβιο για να χαρακτηριστεί ως ευαίσθητο. Εκτός από τον βαμβακοφόρο στυλεό, άλλος τρόπος επιστρώσεως στο τρυβλίο με το εναιώρημα, είναι η διαβροχή του τρυβλίου, οπότε μετά από ορισμένες κυκλικές κινήσεις, το άγαρ επιστρώνεται ομοιόμορφα σε όλη του την επιφάνεια, και μετά απομακρύνεται η περίσσεια του εναιωρήματος. Το τρυβλίο μετά την επίστρωση, για μερικά λεπτά στεγνώνει στον επωαστικό κλίβανο (37°C) και κατόπιν τοποθετούνται οι δίσκοι των αντιβιοτικών. Η τοποθέτηση των δίσκων στην επιφάνεια του άγαρ γίνεται με λαβίδα και σε απόσταση 1 εκατοστού μεταξύ τους και από την περιφέρεια του τρυβλίου. Άλλος τρόπος τοποθέτησης των δίσκων ευαισθησίας στο τρυβλίο, είναι με ειδική συσκευή (dispenser), η οποία φέρει 6-8 υποδοχές στις οποίες τοποθετούνται σωληνάρια που περιέχουν τους δίσκους και με μια κίνηση, οι δίσκοι πέφτουν στην επιφάνεια του άγαρ του τρυβλίου. Τα αντιβιοτικά είναι ευαίσθητα στις αλλαγές της θερμοκρασίας. Η συσκευασία αυτή σε πλαστικά

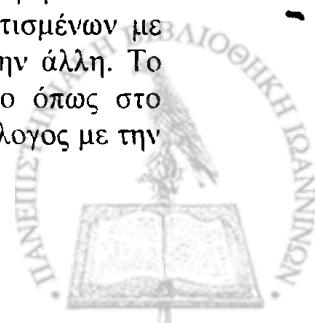


σωληνάρια, με τους δίσκους, πληρεί τις προϋποθέσεις, ώστε οι δίσκοι να διατηρούνται και να μην αλλοιώνονται (πώμα με προσροφητική ουσία για την υγρασία) και ημερομηνία λήξεως. Ο μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο αναδεικνύεται μετά 18 ώρες επώασης η ευαισθησία του μικροβίου στα αντιβιοτικά είναι ο εξής: Με τη διαβροχή των δίσκων (διηθητικό χαρτί) διαχέεται το αντιβιοτικό στην επιφάνεια του άγαρ, ενώ παράλληλα αναπτύσσεται το μικρόβιο που ενοφθαλμίστηκε. Αν το μικρόβιο είναι ευαίσθητο σε ένα αντιβιοτικό, δεν αναπτύσσεται γύρω από τον αντίστοιχο δίσκο, αλλά δημιουργεί μια κυκλική ζώνη αναστολής ανάπτυξης του μικροβίου, η έκταση της οποίας είναι ανάλογη με την ευαισθησία του μικροβίου έναντι του αντιβιοτικού. Αντίθετα, αν το μικρόβιο είναι ανθεκτικό σε κάποιο αντιβιοτικό, τότε δεν δημιουργείται κυκλική ζώνη, αλλά το μικρόβιο αναπτύσσεται μέχρις επαφής γύρω από τον δίσκο του αντιβιοτικού ή δημιουργείται ζώνη μικρότερη από αυτή που δίνουν τα διεθνή πρότυπα ως ζώνη ευαισθησίας (Jehl et al. 2000, Χαρβάλου, 2007).

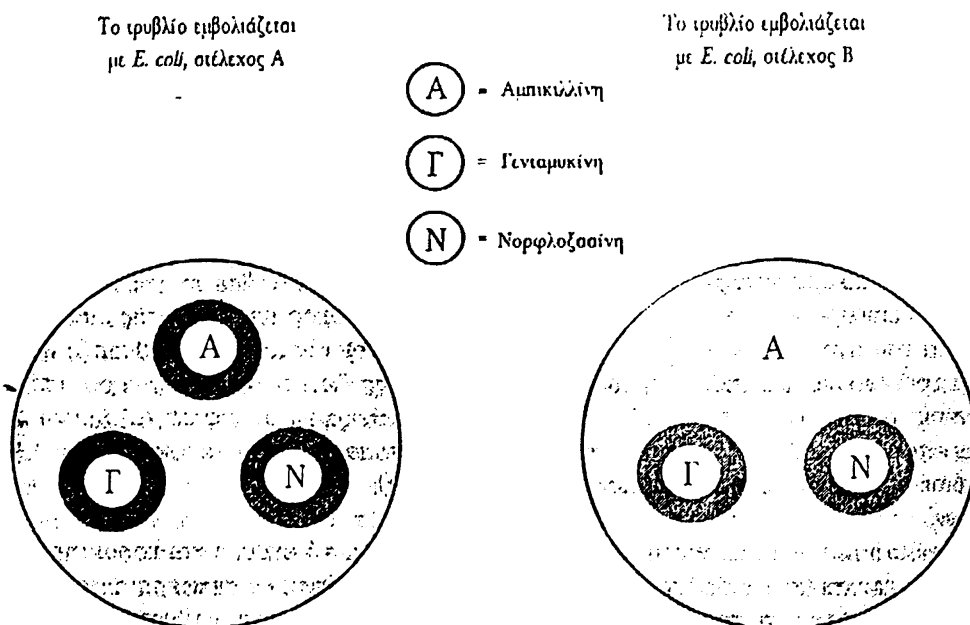
Ο καθορισμός επομένως της ευαισθησίας του μικροβίου γίνεται: από την ύπαρξη και το μέγεθος της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο και σύγκριση αυτής με τα διεθνή πρότυπα (πρότυπο στέλεχος αναφοράς ή NCCLS standards). Στη γραπτή έκθεση αναφέρεται το είδος του μικροβίου και όλα τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν. Δίπλα στο κάθε αντιβιοτικό αναγράφεται ο χαρακτηρισμός του που θα γίνει ως εξής: Ως «ευαίσθητο» (S, sensitive), χαρακτηρίζεται το μικρόβιο, όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής είναι μεγαλύτερη από αυτή του προτύπου, ως «μετρίως ευαίσθητο» (IM, intermediate), όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής του εξεταστέου, είναι ίση ή μικρότερη κατά 2 χιλιοστά από αυτής του προτύπου και ως «ανθεκτικό» (R resistant), όταν λείπει η ζώνη αναστολής ή είναι πολύ μικρή συγκριτικά πάντα με αυτήν που δείχνει το πρότυπο, στο ίδιο πάντα αντιβιοτικό (σχήματα I 16, I 17) (Jehl et al, 2000, Χαρβάλου, 2007).

Η εκτέλεση ενός αντιβιογράμματος στη πράξη γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο: Από καθαρό καλλιέργημα του υπό εξέταση κοινού μικροβίου σε άγαρ επιλέγονται 4-5 αποικίες με κρίκο και εναιωρούνται σε 4-5 ml ζωμό, κατάλληλο για την ανάπτυξη του μικροβίου. Το εναιώρημα επωάζεται στους 37 °C μερικές ώρες ώστε να αρχίσει ο πολλαπλασιασμός του και να θολώσει ο ζωμός. Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται η κλίμακα MacFarland για το σταντάρισμα του εναιωρήματος των αποικιών απευθείας χωρίς να χρειαστεί να επωασθεί το καλλιέργημα. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι το Muller-Hinton άγαρ, σε τρυβλίο (συνήθως για κοινά μικρόβια). Βυθίζεται ένας βαμβακοφόρος στυλεός στο μικροβιακό εναιώρημα, αποστραγγίζεται στο τοίχωμα του σωληναρίου και απλώνεται το καλλιέργημα στην επιφάνεια του τρυβλίου με το θρεπτικό υλικό το οποίο έχει στεγνώσει στον κλίβανο για 20'-30', στους 37 °C. Για πιο σωστή διαδικασία πρέπει να περιχυθεί η επιφάνεια του υλικού με το μικροβιακό εναιώρημα και μετά να απορροφηθεί η περίσσεια με μια πιπέτα Pasteur. Αφού στρωθεί το μικρόβιο πάνω στο θρεπτικό υλικό, αναμένεται να απορροφηθεί τελείως ώστε να στεγνώσει ορατά η επιφάνεια του υλικού. Με τη βοήθεια μιας λαβίδας ή ειδικού διαμοιραστή (dispenser) τοποθετούνται οι δίσκοι των αντιβιοτικών στην επιφάνεια, σε απόσταση τουλάχιστον 2 cm τον ένα από τον άλλο και πιέζονται ώστε να μείνουν οι δίσκοι κολλημένοι στην επιφάνεια του υλικού. Τέλος το τρυβλίο εισέρχεται στον κλίβανο (Jehl et al, 2000, Χαρβάλου, 2007).

Πρόοδο στον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά αποτέλεσε το λεγόμενο "E-test", το οποίο στηρίζεται στη χρήση χάρτινων λωρίδων (strips) εμποτισμένων με λογαριθμικά αυξανόμενη πυκνότητα αντιβιοτικού από τη μία άκρη στην άλλη. Το strip τοποθετείται επάνω σε ενοφθαλμισμένο τρυβλίο με το μικρόβιο όπως στο αντιβιογράμμα. Ο βαθμός διάχυσης του αντιβιοτικού στο άγαρ είναι ανάλογος με την

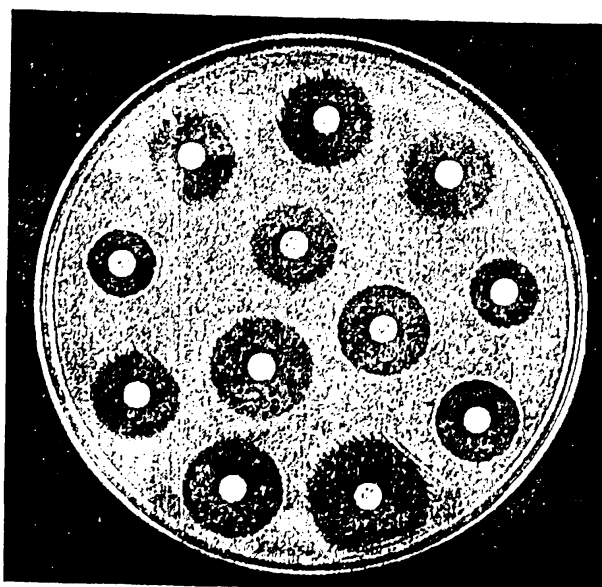


ποσότητα που υπάρχει στο συγκεκριμένο σημείο της λωρίδας και αυτό θα καθορίσει τη ζώνη αναστολής. Η MIC καθορίζεται από τη ζώνη αναστολής που «αγγίζει» το strip σε ένα σημείο. Τα σημεία του strip είναι σημειωμένα για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού που εμποτίζει τη λωρίδα (σχήμα I 18).

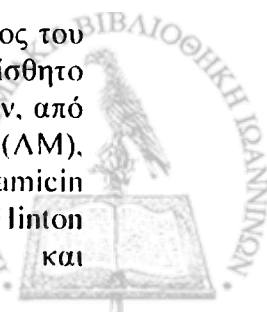


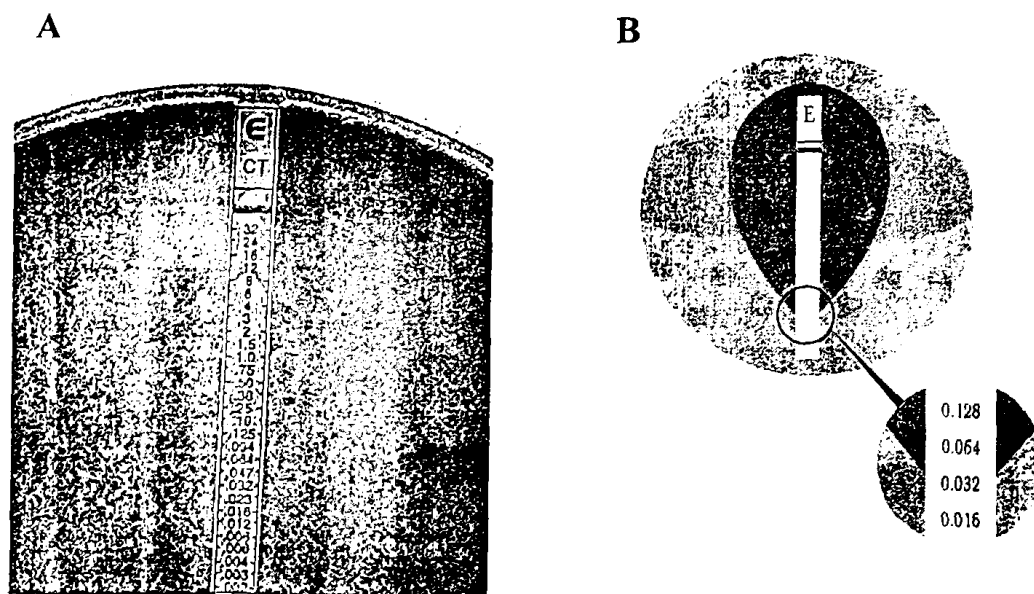
Τα τρυβλία διαβάζονται 24 ώρες μετά στους 37°C

Σχήμα I 16. Η ανάγνωση του αποτελέσματος ερμηνεύει τη ζώνη αναστολής και σε σύγκριση με τα πρότυπα αποδίδεται σε E (ευαίσθητο), ΕΔ (ενδιάμεσης ευαισθησίας) και A ανθεκτικό στέλεχος. Στο στέλεχος B γύρω από το δίσκο αμπικυλίνης δεν εμφανίζεται ζώνη αναστολής, το στέλεχος είναι ανθεκτικό. Και τα δύο στελέχη είναι ευαίσθητα στη γενταμίνη και νορφλοξασίνη (Χαρβάλου, 2007).



Σχήμα I 17. Μέθοδος διάχυσης των αντιβιοτικών σε Muller-Hinton άγαρ – Έλεγχος του προτύπου στελέχους *Escherichia coli* ATCC 25922. Το πρότυπο στέλεχος είναι ευαίσθητο σε όλα τα ελεγχόμενα αντιβιοτικά. Οι κυκλικά διατασσόμενοι δίσκοι αντιβιοτικών, από την κορυφή και προς τα δεξιά, είναι mezlocilin (MZ), amikacin (AN), ampicillin (AM), cefazolin (CZ), cefotaxime (CTX), cefuroxime (CXM), cephalothin (CF), gentamicin (GM) και tobramycin (NN). Οι τρεις δίσκοι αντιβιοτικών στο κέντρο του Muller-Hinton άγαρ είναι trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), cefoxitin (FOX) και ticarcillin/clavulanic acid (TIM) (Χαρβάλου, 2007).





Σχήμα I 18. (Α) Έλεγχος ευαισθησίας στην κεφοταξίμη πνευμονιόκοκκου με το "E-test". Η MIC της cefotaxime (CT) είναι μεταξύ 1,5 µg/ml και 2 µg/ml. Στις περιπτώσεις αυτές αναφέρεται η μεγαλύτερη από τις δύο συγκεντρώσεις. Στο παράδειγμα που απεικονίζεται το εξεταζόμενο στέλεχος είναι ανθεκτικό στην cefotaxime (MIC: 2 µg/ml). (Β) Το "E-test" σχηματικά. Μετά την επίστρωση σε τάπητα τοποθετείται η λωρίδα με τη διαβάθμιση του αντιβιοτικού. Μετά από επώαση 24 ωρών στους 37°C γίνεται η ανάγνωση της MIC ανάλογα της ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Χαρβάλου, 2007).

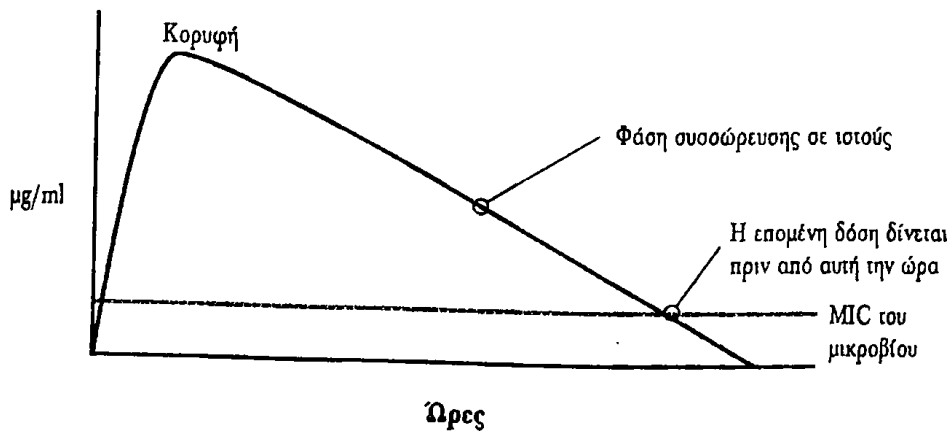
Τα αντιβιοτικά που συνήθως χρησιμοποιούνται για το αντιβιογράμμα των εντεροβακτηριοειδών είναι: 1) Οι πενικιλίνες (αμπικιλίνη, πιπερακιλλίνη). 2) Συνδυασμοί πενικιλινών-αναστολέων (αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό, τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό, πιπερακιλλίνη-ταζοβακτάμη). 3) Οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς (κεφαλοθίνη), δεύτερης γενιάς (κεφαμανδόλη, κεφουροξίμη, κεφοξιτίνη), τρίτης γενιάς (κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη) και τέταρτης γενιάς (κεφεπίμη, κεφπιρόμη). 4) Οι μονοβακτάμες (αζτρεονάμη). 5) Οι καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη). 6) Οι αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, τομπραμυκίνη, αμικασίνη, νετιλμικίνη). 7) Οι κινολόνες (ναλιδιξικό οξύ, νορφλοξακίνη, σιπροφλοξασίνη). 8) Άλλες ομάδες αντιμικροβιακών (τετρακυκλίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφοναμίδες, χλωραμφαινικόλη, νιτροφουραντοΐνη).

Τα αντιβιοτικά ναλιδιξό οξύ, νορφλοξακίνη και νιτροφουραντοΐνη ελέγχονται ή αναφέρονται όταν το στέλεχος προέρχεται από λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος. Η επιλογή των αντιβιοτικών που θα ελεγχθούν γίνεται κατά περίπτωση με γνώμονα: α) το είδος της λοίμωξης β) το είδος του μικροοργανισμού και γ) τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες του αντιβιοτικού (Bradford, 2001).

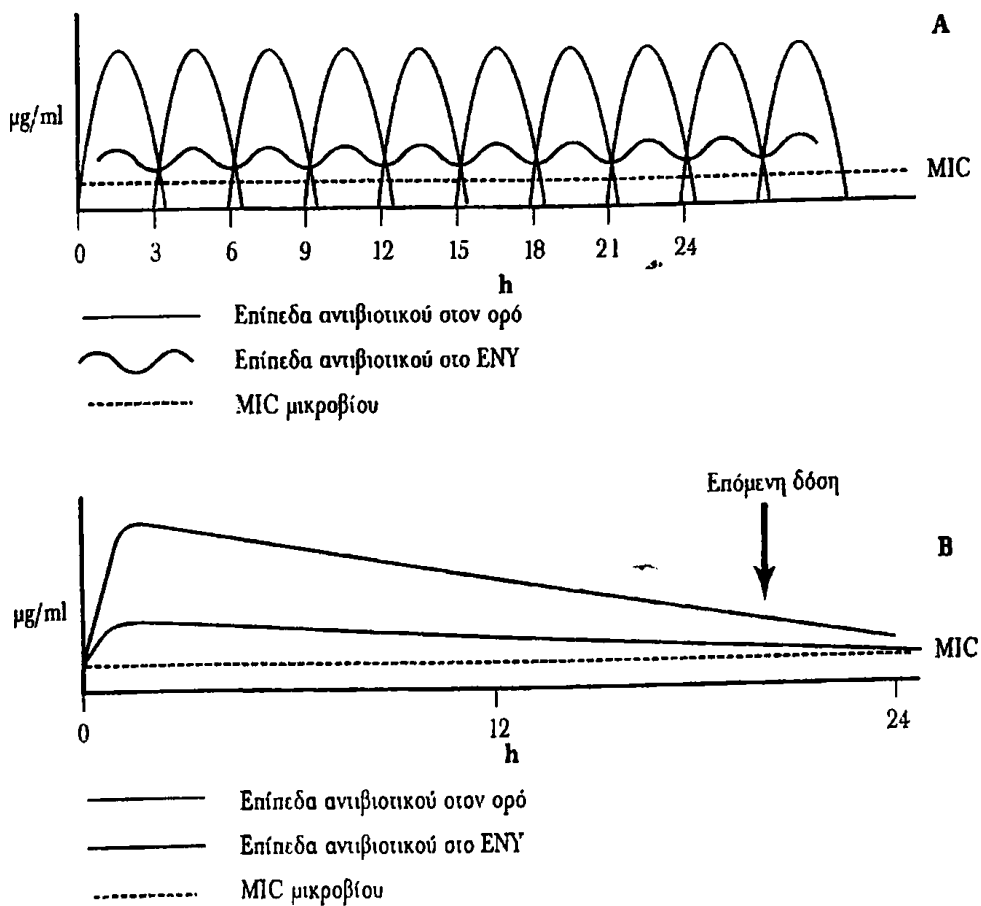
3.6 Φαρμακοκινητική των αντιβιοτικών

Ένα αντιβιοτικό για να είναι αποτελεσματικό στην καταπολέμηση μιας λοίμωξης πρέπει να κυκλοφορεί στο αίμα για αρκετό χρονικό διάστημα και σε επαρκή συγκέντρωση. Η απαραίτητη συγκέντρωση είναι μερικές φορές μεγαλύτερη από την MIC. Τα περισσότερα αντιβιοτικά έχουν ημιζωή 1-2 ώρες και αφού κατανεμηθούν σε διάφορους ιστούς αποβάλλονται από το ήπαρ ή τους νεφρούς. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο αίμα δεν πρέπει κατά τη διάρκεια της θεραπείας να πέφτει σε επίπεδα χαμηλότερα από την MIC και στις περισσότερες περιπτώσεις η επόμενη δόση πρέπει να δίνεται πριν από αυτό το χρονικό σημείο (σχήμα I 19). Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβάνουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις καρμπαπενέμες. Αυτά τα αντιβιοτικά μπλοκάρουν τις ελεύθερες θέσεις των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών. Όταν είναι σε παραπάνω από την MIC συγκέντρωση το αντιβιοτικό, οι θέσεις δέσμευσης των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών κορέννται συνεχώς από αυτό. Σε αντίθετη περίπτωση τα ενεργά σημεία των πρωτεϊνών αυτών είναι ελεύθερα και τα βακτήρια μπορεί να επιβιώνουν. Ο χρόνος ημι-ζωής διαφέρει από περίπου μια ώρα για τη βενζυλ-πενικιλίνη έως 8 ώρες για την κεφτριαξόνη. Αν ένα από αυτά τα αντιβιοτικά χρησιμεύει για τη θεραπεία μηνιγγιτιδας από πνευμονιόκοκκο (ευαίσθητο στην πενικιλίνη) το σχήμα για την βενζυλ-πενικιλίνη είναι 1,2 g ανά τρίωρο ενώ είναι 2 g ανά 12ωρο για την κεφτριαξόνη (σχήμα I 20). Ο τρόπος δράσης των αμινογλυκοσιδών είναι διαφορετικός από των β-λακταμικών. Οι αμινογλυκοσίδες αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση και έτσι πρέπει να περάσουν στο κυτταρόπλασμα για να δράσουν. Οι αμινογλυκοσίδες εισέρχονται στο κύτταρο των gram αρνητικών αερόβιων μικροοργανισμών αφού πρώτα προσκολληθούν στην μεμβράνη. Ο αερόβιος μεταβολισμός αυτών των βακτηρίων απαιτεί ένα τελικό ηλεκτρόνιο της αλυσίδας μεταφοράς που εδράζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αυτή η διεργασία δημιουργεί μια ηλεκτροχημική διαβάθμιση διαμέσου της μεμβράνης. Αυτή η διαβάθμιση χρησιμεύει στην αντλία πρωτονίων για την παραγωγή ATP. Οι αμινογλυκοσίδες προφανώς εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα παρασιτώντας σε αυτή την αντλία πρωτονίων, ενώ το μικροβιακό κύτταρο δεν έχει άλλη επιλογή. Αν υπάρχει αρκετή ποσότητα αμινογλυκοσίδης έξω από το κύτταρο τότε το μικρόβιο οδηγείται στο θάνατο. Σε όξινο περιβάλλον ή σε αναερόβιες συνθήκες, τα ιόντα του υδρογόνου έξω από το κύτταρο δεν επιτρέπουν σε αυτό να αντλήσει έξω τα δικά του ιόντα. Έτσι, η ηλεκτροχημική διαβάθμιση ελαττώνεται με αποτέλεσμα η είσοδος του αντιβιοτικού να ελαττώνεται σταδιακά. Όταν τα εντεροβακτηριακά βρίσκονται σε αναερόβιες συνθήκες ο μεταβολισμός τους γίνεται ζυμωτικός και έτσι δεν υπάρχει η ηλεκτροχημική διαβάθμιση για να μπου οι αμινογλυκοσίδες. Η χορήγηση αμινογλυκοσιδών σήμερα στηρίζεται στη μία δόση ημερησίως (once day, pulse dose). Το σχήμα αυτό υπερτερεί της χορήγησης σε τρεις δόσεις ημερησίως μιας και τα ευαίσθητα μικρόβια κατά την 1^η ώρα λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο αίμα καταστρέφονται, ενώ η μείωση των επιπέδων του φαρμάκου δεν έχει μεγάλη σημασία μιας και τα επιβιώσαντα μικρόβια μέχρι την επόμενη δόση δεν δρουν, ευρισκόμενα υπό την επήρεια του μετά-αντιβιοτικού φαινομένου (post antibiotic effect) (σχήμα I 21) (Χαρβάλου, 2007).



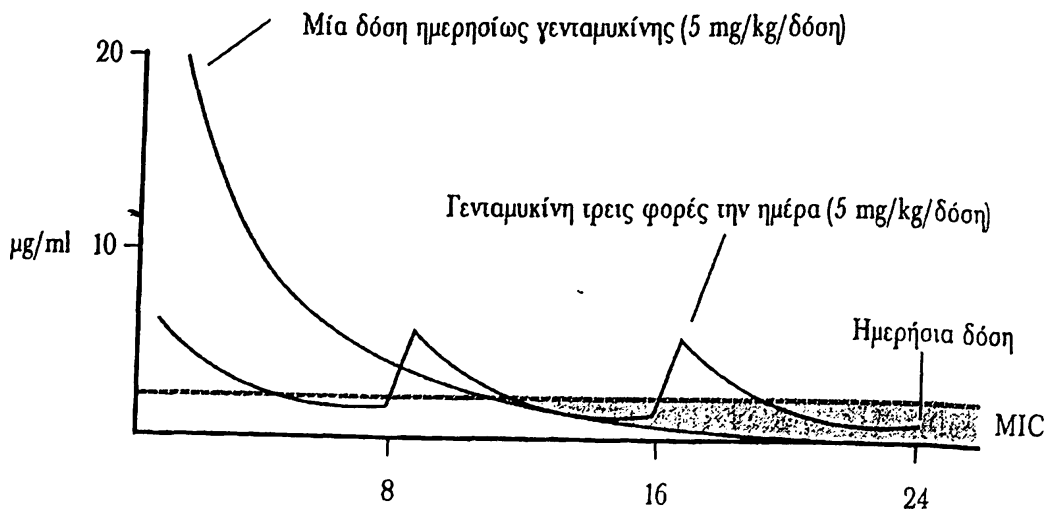


Σχήμα I 19. Η επόμενη δόση πρέπει να δοθεί πριν το επίπεδο του αντιβιοτικού φθάσει να είναι ίσο με την MIC, στο αίμα (Χαρβάλου, 2007).



Σχήμα I 20. Τα επίπεδα στο αίμα αποτελούν επίσης ένα καθοριστικό παράγοντα για τη δοσολογία του αντιβιοτικού: το παράδειγμα της βενζυλπενικιλίνης με χρόνο ημιζωής στο αίμα 3 ώρες (A) και η φαρμακοκινητική της κεφτριαξόνης (B) (Χαρβάλου, 2007).





Σχήμα I 21. Η χορήγηση άπαξ ημερησίως δόσης της γενταμικίνης υπερτερεί της 3/24ωρο (Χαρβάλου, 2007).

3.7 Αντοχή των εντεροβακτηριοειδών στα αντιβιοτικά

Στο νοσοκομειακό περιβάλλον και ιδιαίτερα στις ΜΕΘ, όπου γίνεται έκθεση σε διαφορετικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, υπάρχει η τάση για συνεχή αύξηση των μικροβιακών στελεχών που εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Τα στελέχη αυτά εξαπλώνονται στη συνέχεια όχι μόνο μέσα στις νοσηλευτικές μονάδες του ίδιου νοσοκομείου αλλά και σε άλλα νοσοκομεία ή μονάδες περίθαλψης όπου μεταφέρονται οι ασθενείς. Η απάντηση στο πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής βρίσκεται στην αύξηση των μέτρων ελέγχου των νοσοκομειακών λοιμώξεων, στη διαφύλαξη των διαθέσιμων αντιβιοτικών, στη χρησιμοποίησή τους με σωστό τρόπο και στην ανάπτυξη προγραμμάτων επιτήρησης όχι μόνο για τους ανθεκτικούς μικροοργανισμούς αλλά και για τον έλεγχο της χρήσης των αντιβιοτικών. Η χρήση βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών, η χορήγησή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις και για το μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα, αποτελούν σημαντικά μέτρα τόσο για την αποφυγή εμφάνισης μεταλλαγμένων ανθεκτικών στελεχών όσο και για την αποτροπή της διαταραχής της φυσιολογικής χλωρίδας των διαφόρων βλεννογόνων. Η χρήση επίσης αντιβιοτικών με διπλό στόχο δράσης, όπως είναι οι κινολόνες, φαίνεται ότι σε πολλές περιπτώσεις μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο βακτηριακό κύτταρο. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται για τις περιπτώσεις όπου ήδη



επικρατούν κλώνοι ανθεκτικών βακτηρίων. Τα στελέχη αυτά φαίνεται ότι μπορούν ευκολότερα να προσλάβουν και γονίδια αντοχής για άλλες ομάδες αντιβιοτικών. Η χρήση συνδυασμού δύο αντιβιοτικών που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες, όπως οι πενικιλίνες και οι αμινογλυκοσίδες, θεωρητικά φαίνεται να μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών, αν και στην πράξη δεν έχει επιβεβαιωθεί η υπόθεση αυτή. Η αντιμικροβιακή αντοχή αφορά μεγάλο αριθμό παθογόνων βακτηρίων που απομονώνονται στο νοσοκομειακό περιβάλλον, όπως μεταξύ άλλων τα Gram-αρνητικά βακτήρια, που παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs). (Χαλεβελάκης, Λεγάκης και Περόγαμβρος, 1994, Quintiliani Jr and Quintiliani, 1997, Yao and Moellering, 1997, Livermore, Trevor and Shannon, 2001).

Η εμφάνιση εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν ESBLs αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα αντιμικροβιακής αντοχής που ακολούθησε την κατάχρηση των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς και της αζιτρονάμης. Επιδημίες από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν β-λακταμάσες φάνηκε ότι μπορούν να ελεγχθούν με αυστηρά μέτρα ελέγχου διασποράς των νοσοκομειακών λοιμώξεων και δραστηκή μείωση στη χρήση των οξυμίνo-β-λακταμικών αντιβιοτικών όπως για παράδειγμα την κεφταζιντίμη. Στις ΜΕΘ, η «πολιτική περιοδικής χρήσης των αντιβιοτικών» (antibiotic cycling policy), ώστε να αποφευχθεί το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την επιλογή αντιμικροβιακής αντοχής, φαίνεται να αποτελεί μια στρατηγική που επιπρόσθετα βοηθάει στο έλεγχο των πολυανθεκτικών gram-αρνητικών βακτηρίων που παράγουν β-λακταμάσες. Τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται σε μεγάλα πλασμίδια και τα στελέχη που τις παράγουν εμφανίζουν διασταυρούμενη αντοχή σε πολλές διαφορετικές ομάδες αντιβιοτικών, ενώ παραμένουν συνήθως ευαίσθητα μόνο στους συνδυασμούς β-λακταμικών με αναστολείς β-λακταμασών (π.χ. πιπερασιλλίνη/ταζομπακτάμη) και κυρίως στις καρβαπενέμες. Η αυξημένη θνητότητα και η αύξηση της πίεσης για χρήση καρβαπενεμών και αναστολέων των β-λακταμασών αποτελούν σημαντικά προβλήματα από την επικράτηση ESBL-θετικών στελεχών. Η μείωση της κατανάλωσης κεφταζιντίμης και άλλων κεφαλοσπορινών μπορεί να οδηγεί σε σημαντική μείωση των στελεχών που παράγουν ESBLs. Η αύξηση όμως της κατανάλωσης των καρβαπενεμών οδηγεί στην εμφάνιση καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter* spp. Τα στελέχη αυτά συνήθως είναι πολυανθεκτικά και πολλές φορές δεν υπάρχει αντιβιοτικό ικανό για να αντιμετωπίσει λοιμώξεις από τέτοια βακτήρια.

Φαινότυποι πενικιλινασών, παρατηρούνται σε όλα τα είδη εντεροβακτηριακών και οφείλονται στην παραγωγή πλασμιδιακών πενικιλινασών των τύπων TEM, SHV, OXA, και PSE. Πρόκειται για τους συχνότερους φαινότυπους αντοχής. Περιλαμβάνουν αντοχή σε όλες τις πενικιλίνες με εξαίρεση την πιπερακυλλίνη. Τα στελέχη είναι κατά κανόνα ευαίσθητα στο συνδυασμό πιπερακυλλίνης-ταζοβακτάμης. Συνήθως παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας στις κεφαλοσπορίνες α' γενιάς. Η ευαισθησία στις νεότερες κεφαλοσπορίνες δεν επηρεάζεται.

Φαινότυποι μεταλλο-β-λακταμασών (αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβανομένων και των καρβαπενεμών), παρατηρήθηκαν πρόσφατα σε σποραδικά στελέχη *Escherichia coli*. Οι φαινότυποι αυτοί οφείλονται στη παραγωγή ενζύμων με φάσμα που περιλαμβάνει όλες τις κλινικά διαθέσιμες β-λακτάμες.

Η επίκτητη αντοχή στις κλινικά σημαντικές αμινογλυκοσίδες είναι συχνή μεταξύ των εντεροβακτηριοειδών. Η αντοχή αυτή οφείλεται κυρίως στη παραγωγή αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικών ενζύμων (ATE). Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί περισσότερα από 50 διαφορετικά τέτοια ένζυμα.



Η ανοχή εντεροβακτηριακών στις κινολόνες οφείλεται σε χρωμοσωματικές μεταλλαγές στα γονίδια των τοποϊσομερασών. Για την ανάπτυξη ανοχής στο ναλιδιξικό οξύ απαιτείται συνήθως μία σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο *gyrA*. Τα στελέχη αυτά είτε είναι ευαίσθητα ή εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στις φθοριομένες κινολόνες (σιπροφλοξασίνη, νορφλοξασίνη, οφλοξασίνη κ.λ.π.). Πρόσθετες μεταλλαγές στο γονίδιο *gyrA* ή σε άλλα γονίδια όπως το *parC* οδηγούν σε ανοχή στις φθοριομένες κινολόνες. Στα εντεροβακτηριοειδή, οι διάφοροι μηχανισμοί μείωσης της διαπερατότητας έχουν δευτερεύουσα σημασία όσον αφορά την ανοχή στις κινολόνες.

. Τέλος οι πρόσφατες καταγραφές δείχνουν σημαντικές συχνότητες ανοχής σε αντιβιοτικά όπως τριμεθοπρίμη, σουλφοναμίδες, τετρακυκλίνες και γλωραμφαινικόλη παρά το γεγονός ότι η χρήση τους στα νοσοκομεία είναι περιορισμένη (Gorbach, Bartlett and Blacklow, 1998, Bradford, 2001, Bush, 2001, Livermore, Trevor and Shannon, 2001, Gniadkowsky, 2001).

3.8 Η οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών. Γενικά χαρακτηριστικά, παθογένεια, λοιμογόνοι παράγοντες, κλινικά σύνδρομα

Τα εντεροβακτηριακά είναι η μεγαλύτερη οικογένεια Gram αρνητικών βακτηριδίων μεσαίου μεγέθους (0,3-1 x 1-6 μm). Είναι μη σπορογόνα βακτηρίδια, κινητά ή ακίνητα με περίτριχες βλεφαρίδες. Αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά υλικά και διασπών τη D-γλυκόζη ενζυματικώς, με παραγωγή οξέος και αερίου. Ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη, είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, παράγουν καταλάση και όχι οξειδάση. Επίσης βάσει της διάσπασης του δισακχαρίτη λακτόζη, ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες α) τα εντεροβακτηριακά που ζυμώνουν τη λακτόζη και περιλαμβάνουν τα γένη *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* β) τα εντεροβακτηριακά που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη και περιλαμβάνουν τα γένη *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*. Σε αντίθεση με τους Gram-θετικούς κόκκους, αναπτύσσονται παρουσία χολής ή χολικών αλάτων στο MacConkey άγαρ No3 που χρησιμοποιείται για την απομόνωσή τους από κλινικά υλικά στα οποία υπάρχουν και Gram-θετικοί κόκκοι (Farmer, 1999, Prescott, Harley and Klein, 1993, Αρσένη, 1994, Καλοτάς, 2003).

Τα εντεροβακτηριακά είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση. Αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροβιολογικής χλωρίδας του εντέρου και σπανιότερα βρίσκονται στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων. Αφού αποβάλλονται με τα κόπρανα υπάρχουν ελεύθερα στη βλάστηση, στο έδαφος και στο νερό (Παπαπαναγιώτου, 1994, Καλότας, 2003). Ορισμένα είδη έχουν περιορισμένο οικολογικό περιβάλλον και σχετίζονται πάντα με νόσο του ανθρώπου όπως για παράδειγμα η *Salmonella typhi* ενώ άλλα αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του οργανισμού και ενέχονται σε ευκαιριακές λοιμώξεις (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003). Η οικογένεια των εντεροβακτηριακών, όπως προαναφέρθηκε, περιλαμβάνει και είδη παθογόνα ή δυνητικώς παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα και επιπλέον μερικά είναι σαπρόφυτα ή παθογόνα για τα φυτά. Στην οικογένεια αυτή υπάγονται 14 γένη που είναι τα εξής; 1. *Escherichia*, 2. *Shigella*, 3. *Salmonella* 4. *Citrobacter*, 5. *Klebsiella*, 6. *Enterobacter*, 7. *Erwinia*, 8. *Serratia* 9. *Hafnia*, 10. *Edwardsiella*, 11. *Proteus* 12. *Providencia* 13. *Morganella* 14. *Yersinia*. (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλάινα, 2004).

Για την ανάπτυξη νόσου απαιτείται ή ένα έντονα λοιμογόνο εντεροβακτηριακό που προκαλεί νόσο ακόμα και σε φυσιολογικά άτομα ή έλλειμμα των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή ή να επισυμβαίνει συνδυασμός των δύο αυτών



καταστάσεων. Το αρχικό βήμα για την πρόκληση νόσου είναι η προσκόλληση και ο αποικισμός από τα εντεροβακτηριακά του γαστρεντερικού συστήματος, του ρινοφάρυγγα, του οροφάρυγγα ή του ουροποιητικού. Τα μικρόβια πρέπει να επιβιώσουν στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και στη συνέχεια στο αλκαλικό περιβάλλον του λεπτού εντέρου με την υψηλή συγκέντρωση χολικών αλάτων (διαλύουν το βακτηριακό τοίχωμα), από τα διασπαστικά ένζυμα, την IgA ανοσοσφαιρίνη και τα φαγοκύτταρα. Η προσκόλληση των μικροβίων γίνεται μέσω ινιδίων σε ειδικούς υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων ή στην προσκολλημένη σε αυτά βλέννη. Οι αμυντικοί μηχανισμοί στους υγιείς ανθρώπους περιορίζουν τα μικρόβια που επιβιώνουν συμβιωτικά (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003). Για την πρόκληση νόσου σε υγιή άτομα πρέπει τα μικρόβια να έχουν επιπλέον λοιμογόνους παράγοντες για να προστατεύονται από τους αμυντικούς μηχανισμούς όπως το έλτρο. Το έλτρο με τα υδρόφιλα αντιγόνα απωθεί την υδρόφοβη επιφάνεια των φαγοκυττάρων, αποκρύπτει τα αντιγόνα του κυτταρικού τοιχώματος εμποδίζοντας την ένωση με τα αντισώματα ενώ συχνά δεν είναι ανοσογόνο ή δεν ενεργοποιεί το συμπλήρωμα. Σε άτομα με βλάβη των φυσικών φραγμών ή με ανοσοκαταστολή τα εντεροβακτηριακά της φυσιολογικής χλωρίδας βρίσκουν πρόσβαση σε θέσεις φυσικά στείες και απουσία ανοσιακής αντίδρασης πολλαπλασιάζονται προκαλώντας νόσο. Στους λοιμογόνους παράγοντες περιλαμβάνονται ο λιποπολυσακχαρίτης (ενδοτοξίνη) που προκαλεί πολλές από τις συστηματικές εκδηλώσεις της λοίμωξης από εντεροβακτηριακά όπως πυρετός, ενεργοποίηση του συμπληρώματος, θρομβοπενία, λευκοπενία που ακολουθείται από λευκοκυττάρωση, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, μειωμένη καρδιακή παροχή και αιμάτωση των οργάνων, shock και θάνατο. Επιπλέον τα εντεροβακτηριακά μπορούν κατά περίπτωση να εκφράζουν ή όχι αντιγόνα του ελύτρου και των βλεφαρίδων (μεταβολή φάσης) και να προστατεύονται από τα αντισώματα. ορισμένα είδη μπορούν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιάζονται ενδοκυτταρικά, διαθέτουν αιμολυσίνες και σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες, μπορούν να ανθίστανται στην βακτηριοκτόνο δράση του ορού εμποδίζοντας το σύμπλεγμα MAC να εισέλθει στην κυτταρική μεμβράνη και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε πληθώρα αντιβιοτικών. Τέλος η ιστική βλάβη είναι αποτέλεσμα της μικροβιακής δράσης αλλά συχνά επιτείνεται από την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού (φλεγμονώδης αντίδραση) που ξεπερνά τα αναγκαία όρια για τον περιορισμό του μικροβίου (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003).

Το 95% των λοιμώξεων από εντεροβακτηριακά προκαλείται μόνο από 20-25 είδη. Στελέχη εντεροβακτηριακών σχετίζονται με ουρολοιμώξεις, γαστρεντερίτιδες, λοιμώξεις τραυμάτων, αποστήματα, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία και νοσοκομειακές λοιμώξεις. Στα εντεροβακτηριακά οφείλονται σχεδόν το 50% των σηψαιμιών, το περισσότερο του 70% των ουρολοιμώξεων και σημαντικό ποσοστό των λοιμώξεων του γαστρεντερικού. Από τα κλινικά σημαντικά απομονωθέντα μικρόβια τα εντεροβακτηριακά είναι το 80% των Gram αρνητικών βακτηριδίων και το 50% του συνόλου των μικροβίων. Οι συχνότερες λοιμώξεις εκτός του γαστρεντερικού είναι: λοιμώξεις του ουροποιητικού (κυρίως κυστίτιδα), του αναπνευστικού, του ΚΝΣ, των τραυμάτων, καθώς και η βακτηριαίμια. Αυτές κυρίως προκαλούνται από τα : *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *S. marcescens*, *K. oxytoca*. Λοίμωξη γαστρεντερικού αποδεδειγμένα προκαλούν 4 γένη εντεροβακτηριακών: η *Escherichia*, η *Salmonella*, η *Shigella*, η *Yersinia*. Άλλα γένη εντεροβακτηριακών που περιστασιακά έχουν ενοχοποιηθεί, πιθανά μέσω παραγωγής εντεροτοξινών είναι: τα *Citrobacter*, η *Edwardsiella*, η *Hafnia*, η *Morganella*, ο *Proteus*, η *Klebsiella*, το *Enterobacter*, η *Serratia* (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003).



3.9 Χαρακτηριστικά, δομή και ιδιότητες της *Escherichia coli*, του σημαντικότερου είδους του γένους *Escherichia*

Στο γένος *Escherichia* ανήκουν 5 είδη: η *E.coli*, η *E. blattae*, η *E. fergusonii*, η *E. hermanni* και η *E. vulneris*. Το γένος *Escherichia* πήρε το όνομά του από τον Theodor Escherich, ο οποίος απομόνωσε πρώτος την *E.coli* το 1884. Το σημαντικότερο είδος που απομονώνεται από τον άνθρωπο και χαρακτηρίζει το γένος είναι η *Escherichia coli* το γνωστό Κολοβακτηρίδιο του οποίου η δομή, οι βιοχημικές ιδιότητες και η γενετική έχουν μελετηθεί σε βάθος και επομένως είναι ο πιο γνωστός οργανισμός. Η *E.coli* ευρίσκεται φυσιολογικά στην μικροβιακή χλωρίδα του εντερικού σωλήνα των ανθρώπων και των ζώων, της οποίας αποτελεί σημαντικό μέρος. Είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο, κινητό, διασπά την λακτόζη και αναπτύσσεται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υλικά με κυκλικές, κυρτές και λείες αποικίες. Μερικά στελέχη παρουσιάζουν β-αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ. Από τη διάσπαση της λακτόζης αναγνωρίζεται εύκολα κατά την ανάπτυξη στα θρεπτικά υλικά που περιέχουν λακτόζη και δείκτη όπως για παράδειγμα στο υλικό άγαρ MacConkey, το οποίο περιέχει λακτόζη και ως δείκτη ουδέτερο ερυθρό. Οι αποικίες του κολοβακτηριδίου έχουν δείκτη ουδέτερο ερυθρό (Levi and Primo, 1989, Neidhardt, et al, 1988, Neidhardt, Ingraham and Schaechter, 1990, Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλάινα, 2004, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003).

Προκειμένου να αναγνωρισθεί και να ταυτοποιηθεί το κολοβακτηρίδιο από τα άλλα Gram αρνητικά βακτηρίδια αυτής της οικογένειας, όπως από τα γένη *Klebsiella*, *Enterobacter* και *Citrobacter* χρησιμοποιούνται διάφορες βιοχημικές δοκιμασίες από τις οποίες οι σπουδαιότερες είναι: 1) Η δοκιμασία παραγωγής ινδόλης, όπου ελέγχεται η ύπαρξη στο μικρόβιο ενός συστήματος ένζυμων γνωστό ως «τρυπροφάνση», το οποίο διασπά την τρυπτοφάνη σε ινδόλη, πυροσταφυλικό οξύ και αμμωνία. Η δοκιμασία εκτελείται με την καλλιέργεια του μικροβίου σε 37°C για 24-48 ώρες σε υγρό υλικό (πεπτονόχο νερό πλούσιο σε τρυπτοφάνη) και με προσθήκη αντιδραστήριου το οποίο περιέχει p-διμεθυλοαμινοβενζαλδεΐδη (p-dimethylaminobenzaldehyde). Με τη θετική αντίδραση στην οποία παράγεται ινδόλη σχηματίζεται κόκκινη χροιά. 2) Η δοκιμασία ακετυλομεθυλοκαρβινόλης (ακετοΐνης) η οποία είναι γνωστή και ως δοκιμασία Voges-Proskauer (VP) και γίνεται για να διαπιστωθεί η ικανότητα ορισμένων μικροβίων να παράγουν ακετυλομεθυλοκαρβινόλη από τη διάσπαση της γλυκόλης. Εκτελείται με καλλιέργεια του μικροβίου σε θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει πεπτόνη και γλυκόζη. Η ακετυλομεθυλοκαρβινόλη, ενδιάμεσο προϊόν κατά τον σχηματισμό βουτανεδιόλης από το πυροσταφυλικό οξύ, σχηματίζεται κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Μετά την ανάπτυξη των μικροβίων, με την προσθήκη αλκάλειου στην καλλιέργεια, η ακετόνη οξειδώνεται σε διακετύλιο και σχηματίζεται κόκκινη χροιά. 3) Η δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου (methyl red, MR), η οποία εκτελείται σε καλλιέργεια του μικροβίου σε υλικό το οποίο περιέχει πεπτόνη και γλυκόζη. Μετά την ανάπτυξη των μικροβίων προστίθεται δείκτης του ερυθρού του μεθυλίου. Το ερυθρό του μεθυλίου είναι κίτρινο σε pH > 4,5 και κόκκινο σε χαμηλότερο pH. Θετική αντίδραση (κόκκινο χρώμα) φανερώνει μεγάλη παραγωγή οξέων κατά την ανάπτυξη του μικροβίου. 4) Η ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει ως μόνη πηγή άνθρακα το κιτρικό νάτριο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τα θρεπτικά υλικά Simmons ή Koser. Στα μικρόβια, η διάσπαση των κιτρικών οφείλεται στην παρουσία ενζυμικού συστήματος το οποίο ονομάζεται κιτριτάση (Citritase) ή κιτρική δεμολάση (Citrate demolase). Οι τέσσερις αυτές δοκιμασίες γράφονται διεθνώς ως IMViC (Indol,



Methyl red, Voges-Proskauer, Citrate) και μαζί με άλλες όπως η δοκιμασία διάσπασης της ουρίας, η παραγωγή υδρόθειου (H₂S), η ρευστοποίηση της πηκτής, η διάσπαση διαφόρων σακχάρων, διακρίνεται η *E.coli* από άλλα είδη της οικογένειας των εντεροβακτηριακών (πίνακας I 11) (Παπαπαναγιώτου, 1994).

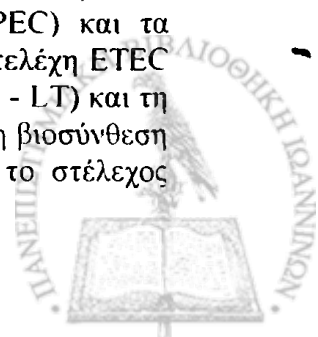
Η ορολογική τυποποίηση των διαφόρων στελεχών της *E.coli* στηρίζεται στην ύπαρξη των επιφανειακών αντιγόνων του περιβλήματος (K), των σωματικών αντιγόνων (O) και των αντιγόνων των βλεφαρίδων (H) (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα, 2004, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003). Τα αντιγόνα K, 80 περίπου σε αριθμό τα οποία χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς (π.χ. O55, O111, K1 κ.λ.π.), αποτελούνται από όξινους πολυσακχαρίτες, εκτός από λίγα τα οποία είναι πρωτεϊνικά και ο προσδιορισμός τους γίνεται με ανοσοηλεκτροφορητικές μεθόδους. Επίσης τα K αντιγόνα διευκολύνουν την προσκόλληση του κολοβακτηριδίου στα επιθηλιακά κύτταρα της ουροδόχου κύστεως με αποτέλεσμα την πρόκληση λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Τα αντιγόνα O, 171 σε αριθμό είναι ο ειδικός πολυσακχαρίτης του λιποσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων και προσδιορίζονται με συγκολλητινοαντιδράσεις με τη χρήση ειδικών αντι-O ορών. Τα αντιγόνα H (βλεφαριδικά), 56 σε αριθμό, αποτελούνται από πρωτεΐνη. Ο προσδιορισμός τους γίνεται επίσης με τη χρήση συγκολλητικών ορών (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα, 2004).

Ιδιαίτερη όμως σημασία για την παθογόνο δράση έχουν οι λιποπολυσακχαρίτες (ενδοτοξίνες). Το λιπιδικό τμήμα του λιποπολυσακχαρίτη, το λιπίδιο A, αποτελεί και το τοξικό τμήμα του. Ωστόσο όλο το σύμπλεγμα του μορίου θεωρείται βιολογικά ενεργό. Προκαλεί πυρετό, λευκοκυττάρωση, ενεργοποίηση του συμπληρώματος, θρομβοκυτταροπενία, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, καταπληξία (shock) και θάνατο. Οι παραπάνω δραστηριότητες επιτελούνται με έμμεση δράση στα φαγοκύτταρα, τα οποία όταν διεγερθούν παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TNFα, IL-1, IL-6), ρίζες οξυγόνου με υψηλή δραστηριότητα, καθώς επίσης προιόντα του μεταβολικού δρόμου του αραχιδονικού οξέως. Ορισμένες από τις παραπάνω ουσίες βοηθούν επίσης στον αποικισμό ή στη μετάθεση της λοίμωξης από το γαστρεντερικό σύστημα σε άλλα συστήματα ή όργανα. Ως παράδειγμα αναφέρεται ότι η Ιντερλευκίνη-2 (IL-2) ενισχύει την μετάθεση (translocation) βακτηριδίων από το γαστρεντερικό σωλήνα στην κυκλοφορία.

3.10 Ο ρόλος της *Escherichia coli* στην εκδήλωση γαστρεντερίτιδας, σηψαιμίας, μηνιγγίτιδας και ουρολοίμωξης

Το κολοβακτηρίδιο που ευρίσκεται ως φυσιολογική χλωρίδα στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου, μπορεί να εγκατασταθεί και σε άλλους ιστούς και να καταστεί παθογόνο. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις των ουροφόρων και χοληφόρων οδών, των μηνίγγων, του περιτοναίου, τραυμάτων ή και μικροβιαμία ιδιαίτερα σε βρέφη και ηλικιωμένους ή σε εξασθενημένα άτομα. Οι κυριότερες λοιμώξεις αναφέρονται στον πίνακα I 12 (Κούρτη, Λεγάκης, Παπαπαρασκευάς 2005).

Τα στελέχη της *E.coli* που είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση γαστρεντερίτιδας περιλαμβάνουν 4 ομάδες: τα εντεροτοξινογόνα στελέχη (ETEC), τα εντεροδιεισδυτικά στελέχη (EIEC), τα εντεροπαθογόνα στελέχη (EPEC) και τα εντεροαιμορραγικά στελέχη (EHEC) ή Βερο-τοξινογόνα (VTEC). Τα στελέχη ETEC παράγουν μία ή και δύο εντεροτοξίνες: τη θερμοευαίσθητη (Labile toxin - LT) και τη θερμοανθεκτική (Heat-stable-toxin - ST). Η γενετική πληροφορία για τη βιοσύνθεση των τοξινών εδράζεται σε πλασμίδια και παγκόσμια κατανομή έχει το στέλεχος



O6:H16. Η θερμοευαίσθητη τοξίνη (LT), που καταστρέφεται στους 100°C, έχει μοριακό βάρος 80000 daltons και αποτελείται από πεπτίδια. Διακρίνονται 2 υποομάδες της εξωτοξίνης, Α και Β. Η Β προσκολλάται στη γαγγλιοσίδη GmI των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου και διευκολύνει την είσοδο της υποομάδος Α στο κύτταρο, όπου ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Έτσι αυξάνεται η συγκέντρωση της cAMP (κυκλικής 3,5-μονοφωσφορικής αδενοσίνης) με αποτέλεσμα την έντονη απέκκριση ύδατος και χλωρίου και την αναστολή της επαναπορρόφησης του νατρίου. Κατά τον τρόπο αυτό προκαλείται υπερκινητικότητα του εντέρου και διάρροια. Η LT τοξίνη είναι αντιγονική και παρόμοια προς την εντεροτοξίνη του Δονακίου της χολέρας. Η θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη (ST) έχει μοριακό βάρος 8000, είναι ανθεκτική σε 100°C και ελάχιστα αντιγονική. Η εξωτοξίνη ST, ενεργοποιεί την γουανυλική κυκλάση της μεμβράνης των κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου και προκαλεί κατά τον τρόπο αυτό έκκριση υγρού στο έντερο. Η δράση της ST εντεροτοξίνης είναι ταχύτερη από της LT εντεροτοξίνης και προκαλεί ταχύτατα διαρροϊκό σύνδρομο. Για να προκληθεί νόσος από τα στελέχη ETEC πρέπει καταρχήν να υπάρξει ινιδιακή προσκόλληση των στελεχών στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου η οποία επιτυγχάνεται με τα ινίδια (μανοζο-ανθεκτικές

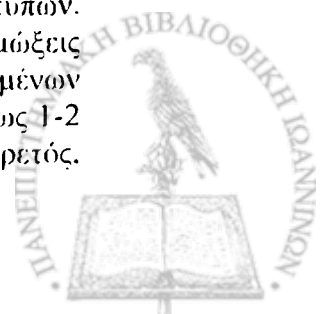
Πίνακας I 11. Ιδιότητες του γένους Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter (Παπαπαναγιώτου, 1994).

Γένος	Δοκιμασία IMViC				Κίνηση	H ₂ S	Ρευστοποίηση πηκτής
	Ινδόλη	MR	VP	ανάπτυξη σε κιτρικά			
Escherichia	+	+	-	-	+	-	-
Klebsiella	-	-	+	+	-	-	-
Enterobacter	-	-	+	+	+	-	+
Citrobacter	-	+	-	+	+	+	-

Πίνακας I 12. Κυριότερες λοιμώξεις που προκαλούνται από το κολοβακτηρίδιο (Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005)

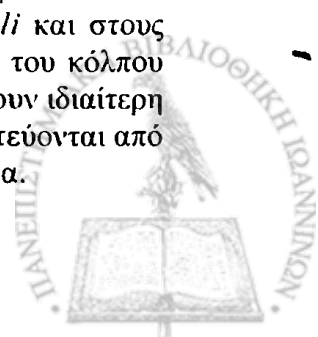
- Ουρολοιμώξεις
- Μηνιγγίτιδα
- Γαστρεντερίτιδα
- Σηψαιμία

βλεφαρίδες) των ETEC, τα CFA (Colonization Factors Antigens), που είναι ουσίες πρωτεϊνικές, αντιγονικές και διαφορετικές μεταξύ των διαφόρων ETEC οροτύπων. Τα ETEC στελέχη προκαλούν τη «διάρροια των ταξιδιωτών». Οι λοιμώξεις εμφανίζονται με τη μορφή μικρών επιδημιών μετά από κατανάλωση μολυσμένων τροφών ή νερού και διαρκούν 3 μέρες περίπου. Ο χρόνος επώασης είναι συνήθως 1-2 ημέρες. Εκτός από τη διάρροια μπορεί να παρατηρηθούν ναυτία, έμετοι, πυρετός.



ρίγη και πόνοι στις αρθρώσεις. Η θεραπεία είναι ενυδάτωση και διόρθωση των ηλεκτρολυτικών διαταραχών. Τα στελέχη ETEC είναι συνήθως ευαίσθητα στα αντιβιοτικά. Τα στελέχη EIEC, δεν παράγουν τοξίνες, έχουν την ικανότητα να διεισδύουν και να καταστρέφουν τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου και προκαλούν κολίτιδα. Η παθογόνος δράση τους καθορίζεται από χρωμοσωματικούς και πλασμιδιακούς γόνους. Προκαλούν κλινικό σύνδρομο παρόμοιο με αυτό που προκαλούν οι σιγκέλλες το οποίο παρατηρείται σε ενήλικες και βρέφη. Οι διαρροϊκές κενώσεις περιέχουν αίμα και πύο και επίσης συνυπάρχουν πυρετός, πτώση της αρτηριακής πίεσης και κοιλιακοί πόνοι. Οι λοιμώξεις από στελέχη EIEC είναι κατά κανόνα τροφιμογενείς. Τα στελέχη EIEC δίδουν θετική τη δοκιμασία που συνίσταται στην πρόκληση κερατοεπιπεφυκίτιδας σε ινδόχοιρο μετά ενστάλαξη εναιωρήματος της *E.coli* στον οφθαλμό. Ο μηχανισμός της παθογόνου δράσης των στελεχών EPEC συνδέεται με την προσκολλητικότητα. Προσκολλώνται στις ψηκτροειδείς παρυφές του επιθηλίου του λεπτού εντέρου με φίμπριες και με άλλους τρόπους. Οι παράγοντες προσκόλλησης κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε πλασμίδια. Προκαλούν γαστρεντερίτιδα σε βρέφη και σπάνια στους ενήλικες. Τα συμπτώματα κυμαίνονται από σοβαρή διάρροια με πυρετό και μεγάλη αφυδάτωση μέχρι απλή παροδική διάρροια. Η μετάδοση γίνεται με όλους τους δυνατούς τρόπους άμεσης και έμμεσης επαφής με τα κόπρανα του παιδιού που πάσχει. Εμφανίζεται σε βρέφη που νοσηλεύονται σε νοσοκομεία ή που κοινοβιούν σε ιδρύματα με μορφή επιδημιών ή σποραδικών κρουσμάτων. Η θεραπεία γίνεται με ενυδάτωση και ηλεκτρολυτική ρύθμιση. Αντιβιοτικά συνήθως δεν χορηγούνται. Μπορούν, όμως να δοθούν για να μειωθούν οι πιθανότητες διασποράς των μικροβίων στο περιβάλλον του μικρού ασθενούς. Τα στελέχη EHEC ή VTEC προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Η δράση τους αποδίδεται σε παραγωγή τοξίνης (βερο-τοξίνης VT). Η γενετική πληροφορία για τη βιοσύνθεση της τοξίνης μεταφέρεται από βακτηριοφάγο. Η VT τοξίνη έχει δράση παρόμοια με την τοξίνη Shiga (SLT), που παράγεται από στελέχη της *Shigella dysenteriae* τύπου I. Βερο-τοξινογόνος ορότυπος είναι ο O157:H7, που έχει την ικανότητα να προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα (ικανότητα που ελέγχεται από πλασμιδιακούς γόνους) (Levi and Primo, 1989, Neidhardt, et al, 1988, Neidhardt, Ingraham and Schaechter, 1990, Nataro and Kaper, 1998, Glandt, 1999, Καλότας, 2003).

Η *E.coli* είναι το συχνότερο αίτιο (45%) των σηψαιμιών που προκαλούνται από εντεροβακτηριακά. Η αρχική λοίμωξη αφορά συνήθως το ουροποιητικό ή το γαστρεντερικό σύστημα. Η παρουσία του μικροβίου στην κυκλοφορία προκαλεί κλινικά από σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS) έως βαριά σήψη και σηπτικό shock Το SIRS καθορίζεται κλινικά από την παρουσία 2 εκ των 4 καταστάσεων: 1) θερμοκρασία στόματος $>38^{\circ}\text{C}$ ή $<36^{\circ}\text{C}$ 2) ταχύπνοια >20 αναπνοές/μίν, 3) ταχυκαρδία >90 σφίξεις/μίν 4) λευκοκυττάρωση $>12000/\mu\text{L}$ ή λευκοπενία $<4000/\text{MI}$ ή $>10\%$ ραβδοπύρηνα. Η βαριά σήψη είναι SIRS μικροβιακής αιτιολογίας με σημεία δυσλειτουργίας οργάνων, μείωση της αιμάτωσής τους, υπόταση, μεταβολική οξέωση, ολιγουρία, και διανοητικές διαταραχές. Στο σηπτικό Shock η κατάσταση αυτή δεν αντிரροπείται με την χορήγηση υγρών και άλλης υποστηρικτικής αγωγής. Η θνησιμότητα στη σηψαιμία επηρεάζεται από την υποκείμενη νόσο. Επίσης το 40% των περιπτώσεων μηνιγγίτιδας που προκαλούνται στα νεογνά τις πρώτες εβδομάδες της ζωής τους οφείλεται στην *E.coli* και στους στρεπτόκοκκους της ομάδας B. Η λοίμωξη προκαλείται από αποικισμό του κόλπου της μητέρας και επιμόλυνση του αμνιακού υγρού. Τα νεογνά παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στις λοιμώξεις από κολοβακτηρίδιο και επιπλέον δεν προστατεύονται από τα ειδικά αντισώματα της μητέρας, τα οποία δεν διέρχονται τον πλακούντα.



Η *Escherichia coli* είναι το συχνότερο αίτιο ουρολοιμώξεων και προκαλεί το 90% των εξωνοσοκομειακών και το 50% των νοσοκομειακών ουρολοιμώξεων. Προκαλούνται από στελέχη του μικροβίου που βρίσκονται στο γαστρεντερικό, διότι ο μεγάλος αριθμός κολοβακτηριδίων που υπάρχουν στο παχύ έντερο ευνοεί την επιμόλυνση του περινέου και της ουρήθρας, είναι ανιούσες, αφορούν συχνά υγιή άτομα, είναι συχνότερες στις γυναίκες παρά στους άνδρες λόγω της ανατομικής κατασκευής της γυναικείας ουρήθρας που επιτρέπει ευχερέστερα την είσοδο των μικροβίων, προσβάλλουν επίσης ηλικιωμένα άτομα, και εκδηλώνονται ως θυρηθρίτιδα που μπορεί να εξελιχθεί σε αληθή πυελονεφρίτιδα. (Valiquette, 2001, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003, Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005). Σε ότι αφορά ειδικά τις γυναίκες έχει διαπιστωθεί ότι το ένα τρίτο από αυτές θα προσβληθεί από ουρολοίμωξη μία φορά στη ζωή τους, ότι μπορεί και τα οιστρογόνα να παίζουν ρόλο στην προδιάθεση για ουρολοίμωξη και ότι η επάλειψη με κρέμα οιστραδιόλης τοπικά στον κόλπο είναι μια σημαντική βοήθεια για την αποφυγή ουρολοίμωξης στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση (Valiquette L 2001). Τα ουροπαθογόνα στελέχη *Escherichia coli* ανήκουν σε συγκεκριμένους ορότυπους O, K, H (συχνά O4,O6,O15,O75) και μοιράζονται κοινές «ουροπαθογόνες» ιδιότητες. Σχεδόν όλα τα στελέχη *Escherichia coli* που προκαλούν πυελονεφρίτιδα σε ανατομικά υγιές ουροποιητικό σύστημα φέρουν ινίδια προσκόλλησης (P ινίδια ή gal-gal pilus) με τα οποία προσκολλώνται στην διγαλακτοσίδη (gal-gal) των γλυκοσφιγγολιπιδίων του ουροεπιθηλίου. Με τα ινίδια αυτά τα *Escherichia coli* προσκολλώνται στο αντιγόνο Π των ερυθρών. Πιθανά τα άτομα με Π αντιγόνο αρνητικά έχουν μειωμένο κίνδυνο εκδήλωσης πυελονεφρίτιδας. Επιπλέον τα στελέχη αυτά συχνά παράγουν αιμολυσίνες, ανθίστανται στην βακτηριοκτόνο δράση του ορού και φέρουν αεροβακτίνες (πρωτεΐνες που δεσμεύουν τον σίδηρο). Σε άτομα με δομικές ή λειτουργικές ανωμαλίες του ουροποιητικού οι ουρολοιμώξεις γενικά προκαλούνται από στελέχη χωρίς τις παραπάνω ουροπαθογόνες ιδιότητες (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003, Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005).

Η διάγνωση των λοιμώξεων που προαναφέρθηκαν από το κολοβακτηρίδιο γίνεται με καλλιέργεια των κοπράνων, των ούρων, του πύου και άλλων παθολογικών υλικών. Τα υλικά αυτά καλλιεργούνται σε αιματούχο και MacConkey άγαρ. Η τυποποίηση του κολοβακτηριδίου γίνεται με την εκτέλεση των δοκιμασιών IMViC (πίνακας 18) και άλλων βιοχημικών δοκιμασιών. Για την καλλιέργεια των ούρων συλλέγεται δείγμα σε αποστειρωμένο ουροδοχείο, κατά προτίμηση από την πρώτη πρωινή ούρηση και κατά το μέσον αυτής. Η συλλογή των ούρων γίνεται μετά από καθαρισμό των εξωτερικών γεννητικών οργάνων για να αποφευχθούν επιμολύνσεις από μικρόβια τα οποία ευρίσκονται στην περιοχή αυτή. Η συλλογή των ούρων με καθετηριασμό της ουροδόχου κύστεως δεν συνίσταται και αυτό για να αποφευχθεί η μόλυνση της κύστεως από μικρόβια εισαγόμενα στον καθετήρα. Το δείγμα των ούρων πρέπει να καλλιεργείται αμέσως μετά τη συλλογή του ή να διατηρείται στο ψυγείο μέχρι την καλλιέργεια. Ο αριθμός των μικροβίων στα ούρα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 100.000 ανά ml ούρων για να θεωρηθούν αίτιο της ουρολοίμωξης στους ενήλικες. Στα παιδιά αριθμός μικροβίων μεγαλύτερος των 10.000 ανά ml αποτελεί ένδειξη ουρολοίμωξης. Για τη διαπίστωση του αριθμού των μικροβίων ανά ml ούρων γίνονται ποσοτικές καλλιέργειες. Ορισμένο ποσό αραιωμένων ούρων καλλιεργείται και από τον αριθμό των αναπτυσσομένων αποικιών υπολογίζεται ο αριθμός των μικροβίων ανά ml ούρων. Για τη διάγνωση της γαστρεντερίτιδας από κολοβακτηρίδιο γίνονται καλλιέργειες των κοπράνων και στις αναπτυσσόμενες αποικίες οροσυγκολλητικές δοκιμασίες με γνωστούς αντιορούς για τη διαπίστωση



του ορότυπου του κολοβακτηριδίου ή και μελέτη για τη διαπίστωση παραγωγής εντεροτοξίνης (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλάινα, 2004).

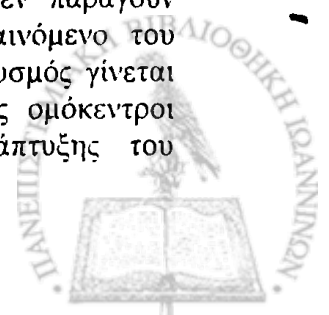
Για τη θεραπεία των λοιμώξεων από *E.coli* χρησιμοποιούνται διάφορα χημειοθεραπευτικά και αντιβιοτικά. Σουλφοναμίδες, αμπικιλίνη, τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες, χλωραμφενικόλη, κεφαλοσπορίνες, τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη *in vitro*, έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι της *E.coli* (Δημόπουλος, 1991, Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλάινα, 2004, Lockhart et al. 2007). Επειδή αρκετά στελέχη *E.coli* είναι ανθεκτικά έναντι ενός ή περισσότερων αντιβιοτικών είναι απαραίτητο να γίνεται προσδιορισμός της ευαισθησίας του απομονωθέντος στελέχους έναντι των αντιβιοτικών και με βάση το αποτέλεσμα να ρυθμίζεται η θεραπεία. Η ανθεκτικότητα της *E.coli* στα αντιβιοτικά οφείλεται στην ύπαρξη πλασμιδίων ανθεκτικότητας τα οποία είναι δυνατόν να μεταφέρονται από μικρόβιο σε μικρόβιο με σύζευξη ή μεταγωγή. Ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη της *E.coli* ανευρίσκονται ιδιαιτέρως στα νοσοκομεία ως αίτια ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλάινα, 2004). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης έρευνας που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς από τη Μαδαγασκάρη, υπάρχει σημαντική αύξηση της ανθεκτικότητας της *E.coli* στην κεφτριαξόνη (ceftriaxone) και στην γενταμικίνη (gentamicin) μεταξύ του 2006 και του 2007 λόγω της αύξησης των στελεχών που φέρουν μια β- λακταμάση με ευρύ φάσμα (Randrianirina et al. 2007). Για τη θεραπεία της εντερίτιδας από *E.coli* χρειάζεται επίσης έγκαιρη αποκατάσταση της απώλειας υγρών και ηλεκτρολυτών, ιδιαιτέρως στις βαριές λοιμώξεις για την πρόληψη του θανάτου του ασθενούς (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλάινα, 2004).

3.11 Χαρακτηριστικά, δομή και ιδιότητες της φυλής *Proteeae* και του γένους *Proteus*

Η φυλή *Proteeae* περιλαμβάνει 3 γένη: *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*. Το βασικό και διαχωριστικό χαρακτηριστικό της φυλής είναι η θετική δοκιμασία απαμίνωσης της φαινυλαλανίνης. Επιπρόσθετα τα γένη *Proteus*, *Morganella* και το είδος *P. rettgeri* δίνουν έντονα θετική την δοκιμασία διάσπασης ουρίας (παραγωγή ουρεάσης) (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003).

Το γένος *Proteus* περιλαμβάνει 4 είδη και 4 γενετικά διαφορετικά είδη που ακόμη δεν έχουν ονομαστεί και φέρονται ως *P. vulgaris biogroup 3*. Τα 4 είδη *Proteus* είναι *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri* και *P. myxofaciens* (δεν είναι παθογόνο για τον άνθρωπο). Τα στελέχη *P. vulgaris* διαχωρίζονταν σε biogroup 1 (τώρα είναι το είδος *P. penneri*), biogroup 2 (είναι ο *P. vulgaris*) και biogroup 3. Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, μεγέθους 1-3 x 0,6 μm, ίσια, μικρά με πολυμορφισμό ανάλογα την φάση ανάπτυξής τους (νηματοειδείς μορφές στον ερπυσμό), κινητά, αερόβια, δυνητικά αναερόβια. Το πιο χαρακτηριστικό μορφολογικό στοιχείο είναι οι μακριές βλεφαρίδες. Διάφοροι παράγοντες προάγουν την λοιμογόνο δύναμη τους όπως: τα ινίδια, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, το έλυτρο, η ουρεάση, οι αιμολυσίνες, κ. α. Με βάση το σωματικό αντιγόνο O και τα αντιγόνα H των βλεφαρίδων διακρίνονται πολλοί ορότυποι (Αρσένη 1994, Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003).

Αναπτύσσονται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υλικά. Στο άγαρ δεν παράγουν μεμονωμένες αποικίες αλλά εμφανίζουν, όπως αναφέρθηκε το φαινόμενο του ερπυσμού, ιδιαίτερα όταν η επιφάνεια του υλικού είναι υγρή. Ο ερπυσμός γίνεται κατά κύματα τα οποία διακρίνονται στην επιφάνεια του υλικού ως ομόκεντροι κύκλοι που διαχωρίζονται από ζώνες λεπτής και παχιάς ανάπτυξης του



καλλιεργήματος. Ο ερπυσμός παρεμποδίζει την απομόνωση άλλων μικροβίων που μπορεί να συνυπάρχουν. κυρίως κατά τις καλλιέργειες κοπράνων, επειδή δεν σχηματίζονται μεμονωμένες αποικίες αλλά καταλαμβάνεται όλη η επιφάνεια του θρεπτικού υλικού από την ανάπτυξη του *Proteus*. Ορισμένα καλλιεργήματα του *Proteus* παρουσιάζουν χαρακτηριστική οσμή αμμωνίας που προέρχεται από τη διάσπαση της ουρίας (Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003).

Είναι μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου ανθρώπων-ζώων και ανευρίσκονται στο περιβάλλον (νερό, έδαφος, λύματα). Εκτός από ουρολοιμώξεις που τις προκαλούν λόγω της παρουσίας τους στο έντερο και στην έντονη κινητικότητα τους, σπάνια προκαλούν άλλες λοιμώξεις σε υγιή άτομα. Εντούτοις είναι συχνά ευκαιριακά παθογόνα σε ασθενείς εξασθενημένους ιδίως σε αυτούς που λαμβάνουν ευρέως φάσματος αντιβιοτική αγωγή (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003). Το είδος *P. mirabilis* είναι το συχνότερα παθογόνο μικρόβιο του γένους *Proteus* και αποτελεί συχνό αίτιο ουρολοιμώξεων. Οι περισσότερες νοσοκομειακές λοιμώξεις οφείλονται στα είδη *P. vulgaris* και *P. vulgaris* biogroup 3, Απομονώνονται σε λοιμώξεις τραυμάτων (εγκαύματα, εγχειρητικά) από το αναπνευστικό σύστημα, από το ουροποιητικό, χρόνιες λοιμώξεις του μέσου ωτός και της μαστοειδούς με πρόκληση κώφωσης και επέκταση στο ΚΝΣ, μετατραυματικές λοιμώξεις οφθαλμών, οστεομυελίτιδα και σε σηψαιμίες. Οι λοιμώξεις είναι συχνότερες σε ανασοκατασταλμένους, ιδίως σε αυτούς που λαμβάνουν ευρέως φάσματος αντιβιοτικά. Το είδος *P. renneri* απομονώνεται σπάνια από τα κλινικά δείγματα και έχει σχετιστεί με ουρολοιμώξεις, λοιμώξεις τραυμάτων και σπανιότερα με σηψαιμία (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003).

Για την εργαστηριακή διάγνωση συλλέγονται ούρα, υλικό τραύματος, υλικό αποστήματος, αίμα και άλλα κατά περίπτωση υλικά. Απαιτείται προσοχή να μην επιμολυνθεί το δείγμα από *Proteus* της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Αναπτύσσεται στο αιματούχο άγαρ και στο MacConkey άγαρ (αερόβια, 37°C, 24 ώρες). Στο αιματούχο άγαρ το χαρακτηριστικό είναι ο ερπυσμός με τους σχηματισμούς που έχουν είδη περιγραφή. Χαρακτηριστικό των περισσότερων στελεχών *Proteus* είναι η οσμή σοκολατένιου κέικ. Στελέχη του *P. vulgaris* μπορεί να είναι αιμολυτικά. Η χολή και το ταυροχολικό Na αναστέλλουν τον ερπυσμό του *Proteus* και έτσι σε υλικά όπως το MacConkey άγαρ, SS άγαρ, DCA, XLD άγαρ, σχηματίζονται μεμονωμένες αποικίες. Στο MacConkey άγαρ οι αποικίες είναι διαφανείς, άχρωμες (δεν ζυμώνει τη λακτόζη), στο SS άγαρ είναι μαύρες όπως της *Salmonella*, στο XLD είναι άχρωμες ή κίτρινες και στο Kligler άγαρ η επιφάνεια είναι αλκαλική με όξινο, μαύρο πυθμένα (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003).

Ο διαχωρισμός από άλλα εντεροβακτηριακά και η ταυτοποίηση στο επίπεδο του είδους στηρίζεται: 1) στη μορφολογία (χρώση κατά Gram) και στη ανάπτυξη στο κοινό αιματούχο άγαρ (ερπυσμός, οσμή) - MacConkey άγαρ (άχρωμες αποικίες) 2) στη θετική δοκιμασία φαινυλαλανίνης και 3) σε βιοχημικές δοκιμασίες. Τα μέλη του γένους *Proteus*, διασπούν τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου, ανάγουν τα νιτρικά, παράγουν καταλάση και δίνουν αρνητική τη δοκιμή οξειδάσης. Έχουν μερικές βιοχημικές ιδιότητες κοινές αλλά και πολλές διαφορετικές (πίνακας I 13) (Αρσένη 1994).



3.12 Ο ρόλος του *Proteus mirabilis* στις ουρολοιμώξεις

Ο *Proteus mirabilis* βρίσκεται στα κόπρανα των ανθρώπων και των ζώων, στο έδαφος, στο χώμα των τάφων, στα υγρά των υπονόμων. Είναι το συχνότερο παθογόνο μικρόβιου του γένους και αποτελεί συχνό αίτιο ουρολοιμώξεων (10% μετά το *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*) και ειδικότερα της πυελονεφρίτιδας. Προσβάλλει νεαρά αρσενικά και σπανιότερα νεαρά θηλυκά άτομα, ηλικιωμένους, ασθενείς με δομικές ανωμαλίες στην διάπλαση των ουροφόρων οδών, νοσηλευόμενους, καθετηριασμένους, ασθενείς με απόφραξη, που υποβάλλονται σε ιατρικούς χειρισμούς στο ουροποιητικό (Αρσένη 1994, Coker et al, 2000, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003, Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005). Οι ουρολοιμώξεις είναι συχνότερες στις γυναίκες, λόγω των αιτιών που προαναφέρθηκαν (Valiquette, 2001) και αποδίδονται στον αποικισμό της ουρήθρας από *Proteus* του εντέρου και στην έντονη κινητικότητα του μικροβίου όταν εισέρχεται στο ουροποιητικό. Η ικανότητα του *Proteus mirabilis* να προκαλεί ουρολοιμώξεις οφείλεται σε ορισμένες ιδιότητες, όπως η ικανότητά του να παράγει υδροξείδιο του αμμωνίου (NH_4OH) από τη διάσπαση της ουρίας. Το NH_4OH αυξάνοντας το pH των ούρων δρα τοξικά στα κύτταρα του νεφρικού παρεγχύματος με συνέπεια τα νεκρά κύτταρα να αποτελούν πυρήνες για να σχηματισθούν λίθοι οι οποίοι με τη σειρά τους όταν σχηματισθούν ευνοούν τη μετάπτωση της λοίμωξης στη χρονιότητα λόγω κατακράτησης ούρων. Άλλη μία ικανότητα του *Proteus mirabilis* στην πρόκληση ουρολοιμώξεων αφορά τα ινιδιά του, τα οποία συμβάλλουν στην προσκολλητικότητα των κυττάρων στο βλεννογόνο του ουροποιητικού συστήματος και ίσως στην επέκταση της λοίμωξης. Είναι δυνατόν σε απόφραξη, η λοίμωξη από *Proteus*, να συνδυάζεται με *Klebsiella* ή *Escherichia coli* (Coker et al, 2000, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003, Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005).

Όσον αφορά τη θεραπεία τα περισσότερα στελέχη *P. mirabilis*, έχουν ενδογενή ανοχή στην κολιστίνη, στις τετρακυκλίνες και στη νιτροφουραντοϊνη γεγονός που είναι χρήσιμο για την ταυτοποίηση. Ο *P. vulgaris* παρουσιάζει την ίδια ανοχή και επιπλέον είναι ανθεκτικός και στην αμπικιλίνη. Σχεδόν όλα τα στελέχη *P. mirabilis* είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη και στις κεφαλοσπορίνες ενώ ο *P. vulgaris* είναι συχνότατα ανθεκτικός σε αυτά και στις αμινογλυκοσίδες. Συχνά χορηγούνται κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς ή κινολόνες αλλά η αγωγή πρέπει να στηρίζεται στο αντιβιογράμμα (Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003, Lockhart et al. 2007).

Πίνακας Ι 13. Διαχωριστικές ιδιότητες των ειδών του γένους *Proteus* (Αρσένη, 1994)

Ιδιότητες	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. myxofaciens</i>	<i>P. penneri</i>
Ινδόλη	+	-	-	-
Ορνιθίνη	-	+	-	-
Μαλτόζη	+	-	+	+
Παραγωγή βλένης	-	-	+	-



4: Η ΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΗΝ *E. COLI* ΚΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

4.1 Η ύπαρξη τοξικών μετάλλων και Cd στα ούρα

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί κατά το παρελθόν πολλά τοξικά μέταλλα μεταξύ των οποίων και το Cd έχουν ανιχνευτεί στα ούρα ανθρώπων που κατοικούν σε περιοχές οι οποίες εκτίθενται στα μέταλλα αυτά.

Πράγματι μια πρώτη μελέτη που μπορεί να αναφερθεί έγινε αρκετά χρόνια πριν σε 132 άτομα στη Σουηδία συμπεριλαμβανομένων και 50 μονοωικών ζευγαριών διδύμων, στα οποία μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις Cd και Zn στα ούρα με διαδικασίες φασματοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η συγκέντρωση του Cd αυξήθηκε όσο αυξάνονταν η ηλικία και ήταν υψηλότερη σε καπνιστές από αυτή που παρατηρήθηκε σε μη καπνιστές (Elinder, et al., 1978).

Μια άλλη μελέτη, έγινε σε ενήλικους και σε παιδιά από περιφερειακές περιοχές του Aachen και του Erkelenz στη Βρέμη, στην βόρεια Γερμανία, το 2005. Ο πληθυσμός και στις δύο περιοχές είναι περισσότερος από 500 κατοίκους ανά km² και βρίσκεται σε περιοχές εξόρυξης άνθρακα και μετάλλων, αυτοκινητοβιομηχανιών και παραγωγής τροφίμων.

Κατά την μελέτη των ατόμων ελήφθησαν υπόψη: η ηλικία, το γένος, η περιοχή κατοικίας, το κάπνισμα και η φαρμακευτική αγωγή πριν από την λήψη δειγμάτων ούρων. Επίσης τα παιδιά χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: αυτά με ηλικία 2-6 χρόνων αυτά με ηλικία 7-11 χρόνων και αυτά με ηλικία 12-17 χρόνων. Η ηλικία των ενηλίκων ήταν 18-65 χρόνων, 40 άντρες και 43 γυναίκες 17 εκ των οποίων ήταν καπνιστές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα παιδιά ηλικίας 2-6 χρόνων είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd καθώς και άλλων τοξικών μετάλλων όπως ο μόλυβδος (Pb), το θάλλιο (Th), και το ουράνιο (U) από ότι τα άλλα παιδιά.

Επίσης οι συγκεντρώσεις του Cd στην ομάδα με ηλικία 7-11 ήταν χαμηλότερες και από αυτές των παιδιών ηλικίας 2-6 και από αυτές των ενηλίκων ηλικίας 18 χρόνων και πάνω, λόγω του μεγαλύτερου αριθμού καπνιστών στους ενήλικες. Τέλος όσον αφορά τους ενήλικες οι συγκεντρώσεις Cd των καπνιστών ήταν μεγαλύτερες από αυτές των μη-καπνιστών (Hietland and Köster, 2006). Μια άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε άτομα ηλικίας 18 έως και 58 χρόνων και σε παιδιά ηλικίας 8 έως και 10 χρόνων που κατοικούσαν σε 4 επιλεγμένες περιοχές της Τσεχίας για 2 χρόνια. Συγκεκριμένα δύο από αυτές τις περιοχές, η Plzeň και η Ústí nad Labem, είναι βιομηχανικές και δύο, η Benešov και η Žďár nad Sázavou, είναι γεωργικές και ψυχαγωγικές. Επίσης ελήφθη υπόψη, η ηλικία, το γένος, η περιοχή κατοικίας και το κάπνισμα πριν από την λήψη δειγμάτων ούρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν καταρχήν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του Cd μεταξύ καπνιστών και μη-καπνιστών, ότι τα επίπεδα του Cd ήταν υψηλότερα στις γυναίκες από ότι στους άντρες και τέλος ότι τα επίπεδα αυτά μαζί με αυτά του Hg αυξάνονταν με την ηλικία (Batáiova et al., 2006).

Σε μια επιπλέον έρευνα τα επίπεδα του Cd στα ούρα, μετρήθηκαν σε 53 εθελοντές ηλικίας άνω των 60 ετών που έπασχαν από «εξαρτώμενο από την ηλικία εκφυλισμό ωχρής κηλίδας» (age-related macular degeneration AMD) και από 53 συνομήλικους που δεν έπασχαν από AMD. Στην μελέτη ελήφθη υπόψη επίσης και το γένος, το κάπνισμα και το οικογενειακό ιστορικό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα επίπεδα του Cd στα ούρα ήταν ανεβασμένα στους καπνιστές με AMD. Ο συσχετισμός μεταξύ



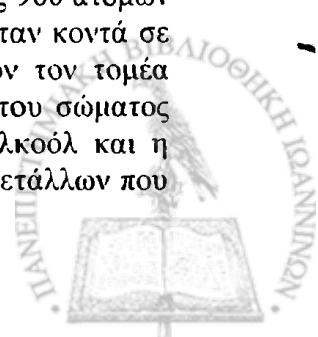
του Cd στα ούρα και των καπνιστών που έπασχαν από AMD δείχνει ότι το Cd μπορεί να μεσολαβεί μερικώς στη επίδραση του καπνίσματος στην AMD, πιθανόν μέσω της βλάβης του ιστού της ωχρής κηλίδας που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες λόγω του Cd (Erie et al. 2007).

Σε μια άλλη μελέτη συγκρίθηκαν οι συγκεντρώσεις μετάλλων μεταξύ των οποίων και το Cd και ο άργυρος (Ag) στα ούρα 38 γυναικών που έπασχαν από ινομυαλγία (fibromyalgia), με αυτές 41 γυναικών που δεν έπασχαν από τη νόσο, λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία και τον γεωγραφικό τόπο διαμονής. Τα αποτελέσματα έδειξαν καταρχήν ότι οι συγκεντρώσεις του Ag στα ούρα ήταν μεγαλύτερες στους ασθενείς με ινομυαλγία σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις αυτών που δεν έπασχαν. Επίσης βρέθηκε σε ότι αφορά τα άλλα μέταλλα μεταξύ των οποίων και το Cd, ότι οι συγκεντρώσεις στα ούρα για τους ασθενείς με ινομυαλγία ήταν οι ίδιες ή ελάχιστα χαμηλότερες από αυτές των υγιών ατόμων. Το συμπέρασμα της μελέτης αυτής ήταν ότι η συκέντρωση μετάλλων στους ανθρώπινους ιστούς και στα υγρά του σώματος δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ινομυαλγίας (Rosborg et al., 2007).

Μια επιπλέον έρευνα πραγματοποιήθηκε σε εργαζόμενους που εκτέθηκαν σε καυσαέρια από ντίζελ δουλεύοντας στην εταιρία "State Road Transport Corporation" στην Maharashtra στην Ινδία. Σε αυτούς αναλύθηκαν τα επίπεδα μετάλλων στα ούρα μεταξύ των οποίων και το Cd μετά τη συμπλήρωση του ωραρίου εργασίας τους. Οι εργαζόμενοι επίσης χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες ανάλογα με την ηλικία τους: η πρώτη ήταν από 20-35 ετών, η δεύτερη από 36-45 ετών και η τρίτη από 46-58 ετών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν υπήρχε μεταβολή των επιπέδων των μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου και του Cd στα ούρα όσο αυξάνονταν η ηλικία και η έκθεση στα καυσαέρια, παρόλο που υπήρχε αύξηση οξειδωτικού στρες. Συνεπώς η επαγγελματική έκθεση σε καυσαέρια ντίζελ δεν μπορεί να συσχετιστεί με την ύπαρξη μετάλλων στα ούρα ατόμων που υφίστανται την έκθεση στα καυσαέρια αυτά (Dewi, Biswas and Biswas, 2007).

Σε μια άλλη έρευνα, 200 άτομα στην εφηβεία επιλέχθηκαν για μελέτη των επιπέδων Cd στα ούρα, σε κάθε μια από τις παρακάτω 8 περιοχές του Βελγίου: στο Antwerp, στο Ghent, στις βιομηχανικές περιοχές των λιμανιών του Antwerp και του Ghent (κυρίως πετροχημικής και μεταλλουργικής βιομηχανίας αντίστοιχα), στην βιομηχανική ζώνη γύρω από το κανάλι του Albert (χημική βιομηχανία), στην βιομηχανική ζώνη του Olen (μη-σιδηρούχος βιομηχανία), στο άμεσο περιβάλλον των κλιβάνων των αποβλήτων από τα σπίτια, σε μια αγροτική περιοχή με έντονη καλλιέργεια φρούτων και σε μια αγροτική περιοχή χωρίς αυτοκινητόδρομους και ελεύθερη από εκπομπές αερίων και από βιομηχανίες, με πληθυσμό λιγότερο από 250 κατοίκους ανά km². Το σημαντικότερο μέρος των αποτελεσμάτων έδειξε ότι α) δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη έκθεση των παραγόντων μόλυνσης (Cd και Pb) μεταξύ του εσωτερικού των πόλεων των διπλανών λιμανιών και των κλιβάνων και β) ότι οι περιοχές με την καλλιέργεια φρούτων είχαν γενικά μικρή έκθεση σε όλους τους προαναφερόμενους παράγοντες μόλυνσης (Schroijen et al., 2008).

Τέλος άλλη μια μελέτη πραγματοποιήθηκε στην νοτιοδυτική Ισπανία και συγκεκριμένα στην περιοχή επιρροής από το ορυχείο στο Aznalcollar όπου εκτιμήθηκαν τα επίπεδα μετάλλων όπως το As και ο Hg στα ούρα και το Cd στο αίμα 601 κατοίκων της περιοχής αυτής και οι μετρήσεις συγκρίθηκαν με αυτές 960 ατόμων από την κοινότητα της Ανδαλουσίας στην νότια Ισπανία η οποία δεν ήταν κοντά σε ορυχείο. Στην μελέτη αυτή η οποία έγινε για πρώτη φορά σε αυτόν τον τομέα έρευνας στην Ισπανία, ελήφθησαν υπόψη το φύλο, η ηλικία, η μάζα του σώματος καθώς και διάφορες συνήθειες όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και η διατροφή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων που



μελετήθηκαν ήταν στατιστικά υψηλότερες στον πληθυσμό της επηρεαζόμενης περιοχής (ορυχείο στο Aznarcóllar) από ότι σε αυτόν από την Ανδαλουσία, παρόλο που οι τιμές ήταν χαμηλότερες ή ίδιες με αυτές που αναφέρθηκαν για τον γενικό πληθυσμό και κατώτερες από τα όρια των αναφορών της επαγγελματικής έκθεσης στα μέταλλα. Επομένως δεν υπήρχαν αποδείξεις ότι η έκθεση στο ορυχείο είχε κάποια επιρροή στην υγεία των κατοίκων της περιοχής αυτής (Gil, et al. 2006).

4.2 Η τοξική επίδραση βαρέων μετάλλων και του Cd στην *E.Coli*

Τα δισθενή ιόντα όπως το κοβάλτιο (Co), ο ψευδάργυρος Zn, και το νικέλιο (Ni), σε μικρές συγκεντρώσεις (nanomolar), είναι απαραίτητα διατροφικά στοιχεία για τα βακτήρια. Παρόλα αυτά σε συγκεντρώσεις micro- ή millimolar το Co, ο Zn, το Ni και τα λεγόμενα «κακά ιόντα» (bad ions), όπως το Cd, είναι τοξικά. Αυτά τα κατιόντα μεταφέρονται μέσα στο κύτταρο με «συστήματα πρόσληψης δισθενών κατιόντων» (divalent cation uptake systems) που είναι εξειδικευμένα για κάθε κατιόν. όπως για παράδειγμα το σύστημα μεταφοράς μαγνησίου (Mg). Σε περίπτωση εκδήλωσης στρες από βαριά μέταλλα, η πρόσληψη των τοξικών ιόντων δεν είναι δυνατόν να μειωθεί απλά με μειορύθμιση της διαδικασίας μεταφοράς (Nies, 1992).

Το Cd έχει βρεθεί επίσης ότι εκτός από τα βακτήρια, είναι έντονα τοξικό και στα φύκια και στους μύκητες. Οι μηχανισμοί της τοξικότητας του Cd αλλά και της ανθεκτικότητας σε αυτή ποικίλουν ανάλογα με τον οργανισμό. Η μορφή του μετάλλου και το περιβάλλον που μελετάται παίζουν σημαντικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο το μέταλλο ασκεί την επίδρασή του και το πως ανταποκρίνεται ο οργανισμός. Γενικά τα φύκια και τα κυανοβακτήρια είναι οι πιο ευαίσθητοι οργανισμοί ενώ τα βακτήρια και οι μύκητες φαίνεται ότι είναι οι πιο ανθεκτικοί στην τοξικότητα του Cd. Το Cd είναι τοξικό σε αυτούς τους οργανισμούς προκαλώντας σοβαρή αναστολή σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως η ανάπτυξη, η φωτοσύνθεση και η καθήλωση του αζώτου σε συγκεντρώσεις κάτω των 2 µg/l (ppm). Επίσης προκαλεί εμφανείς μορφολογικές εκτροπές σε αυτούς τους οργανισμούς οι οποίες πιθανόν να σχετίζονται με δυσμενείς επιδράσεις στην κυτταρική διαίρεση. Το γεγονός αυτό πιθανόν να γίνεται άμεσα ή έμμεσα σαν αποτέλεσμα των επιδράσεων του Cd στην πρωτεϊνολογία και σε οργανίδια του κυττάρου όπως τα μιτοχόνδρια και οι γλωροπλάστες (Trevors, Stratton and Gadd, 1986).

Άλλη μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο στέλεχος *Escherichia coli* K-12 έδειξε ότι η τοξικότητα του Cd ενισχύθηκε από σαλικυλικό άλας και από άλλα σχετικά σκευάσματα. Αυτές οι συνεργικές επιδράσεις παρατηρήθηκαν σε pH 7.4 με άλλα ασθενή οξέα όπως το ακετυλο-σαλικυλικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ και το κινναμωνικό οξύ και με μη-όξινα ανάλογα του σαλικυλικού και της σαλικυλικής αλκοόλης αλλά δεν παρατηρήθηκαν με οξικό και με p-υδροξυ-βενζοϊκό. Επομένως η συνέργεια με το Cd καθορίζεται από τη δομή των σκευασμάτων και όχι απλά από την οξύτητά τους. Επίσης προέκυψε το συμπέρασμα ότι η αυξημένη πρόσληψη του Cd μπορεί να είναι υπεύθυνη για την ενίσχυση της τοξικότητας του μετάλλου από το σαλικυλικό άλας και τη σαλικυλική αλκοόλη (Rosner and Aumercier, 1990).

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι όταν το στέλεχος *Escherichia coli* K12 εκτεθεί σε μικρές συγκεντρώσεις μονοχλωροφαινόλης (monochlorophenol), πενταχλωροφαινόλης (pentachlorophenol) και γλωριούχου καδμίου (cadmium chloride), παρατηρείται αύξηση ορισμένων πρωτεϊνών του στρες και επιπλέον μείωση της ταχύτητας της σύνθεσης άλλων πρωτεϊνών όπως της OmpF και της aspartate transcarbamoylase (ATCase) (Faber, Egli and Harder W, 1993).



Μια επιπλέον μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο στέλεχος της *Escherichia coli* K12, έδειξε την επίδραση του γονιδίου *recA* στην τοξικότητα από το Cd. Συγκεκριμένα στα στελέχη αυτά της *Escherichia coli* το γονίδιο αυτό ήταν μεταλλαγμένο και όταν έγινε η έκθεση στο Cd παρατηρήθηκε απώλεια της βιωσιμότητας του βακτηρίου κατά 1000 φορές. Στη συνέχεια 16-20 ώρες μετά την αρχική έκθεση στο μέταλλο το βακτήριο άρχισε και πάλι να αναπτύσσεται. Τα αποτελέσματα συνεπώς έδειξαν την σημασία του γονιδίου *recA* στην βιωσιμότητα των βακτηριακών κυττάρων κατά την έκθεση στα μέταλλα και επίσης προέκυψε η υπόθεση ότι το Cd προκαλεί βλάβη στο DNA (Shapiro and Keasling, 1996).

Τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης έδειξαν ότι η τοξικότητα του Cd, του Ni και του Co στην *E.coli* οφείλεται στην ενδοκυττάρια παραγωγή υπεροξειδίου. Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η *E.coli* περιέχει δύο ομόλογες «δισμουτάσες του υπεροξειδίου» (super oxide dismutases), ένζυμα τα οποία περιέχουν μαγγάνιο και σίδηρο και ονομάζονται Mn-SOD και Fe-SOD αντίστοιχα. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν το βακτήριο από το οξειδωτικό στρες μέσω της διάσπασης της χημικής ρίζας του υπεροξειδίου (Geslin et al, 2001).

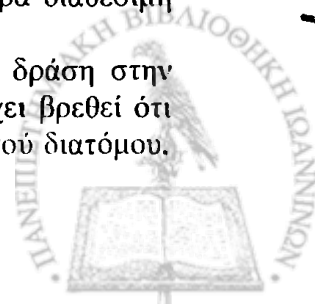
Σε μια επιπλέον μελέτη ερευνήθηκαν οι δυναμικές ανταποκρίσεις μεταγραφής ευρέους φάσματος γονιδίων που επάγονται από το Cd στην *Escherichia coli*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκθεση στο Cd προκάλεσε παύση στην βιοσύνθεση των πρωτεϊνών και μεταβολή στον αναερόβιο μεταβολισμό και στην παραγωγή μικρότερης ενέργειας. Παρατηρείται η επαγωγή ενός πολύπλοκου δικτύου ρυθμιστικών συστημάτων που παίζουν ρόλο στην επισκευή του DNA, στο θερμικό σοκ, στο οξειδωτικό στρες, στο ψυχρό σοκ, στο οσμωτικό στρες, στον ταξισμό και στην παραγωγή όξινων και αντιβιοτικών υδρολασών όπως και στην λειτουργία συστημάτων εκροής για βαριά μέταλλα όπου έχει βρεθεί ότι διευκολύνουν την ανθεκτικότητα στο Cd (Wang and Crowley, 2005).

Επίσης σε μια άλλη μελέτη που έγινε στην *Escherichia coli* έγινε σύγκριση ανάμεσα στην ικανότητα πρόσδεσης μετάλλων όπως το Cd και ο Zn και στην αντιοξειδωτική ικανότητα των μεταλλοθειονίνων (MTs). Παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε προστατευτική ικανότητα των κυτταροπλασματικών MTs στην βλαπτική επίδραση του Cd και του Zn στο «φυσικού τύπου» στέλεχος της *Escherichia coli*, παρόλο που αυτές οι MTs μπορούν να δεσμευτούν αποτελεσματικά με το Cd και τον Zn. Προκειμένου να ελεγχθεί η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, οι MTs εκφράστηκαν στο κυτταρόπλασμα ενός μεταλλαγμένου στελέχους του βακτηρίου (QC1726) στο οποίο υπήρχε έλλειψη στα γονίδια *sodA* και *sodB* που κωδικοποιούν τις δισμουτάσες του υπεροξειδίου. Τα αποτελέσματα παραδόξως έδειξαν ότι οι MTs άσκησαν τοξικότητα όταν το βακτηριακό στέλεχος μολύνθηκε από το Cd και τον Zn. (Achar-Jori et al., 2007).

Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται το οξειδωτικό στρες στην *Escherichia coli* από το Cd, μελετώντας την γλουταθειονίνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η παρεμβολή του Cd στην αλυσίδα αναπνοής είναι η αιτία του οξειδωτικού στρες που επάγεται από το μέταλλο. Η αύξηση των αντιδραστικών μορφών οξυγόνου δεν οφείλεται στην έλλειψη γλουταθειονίνης, παρόλο που το πεπτιδίο αυτό είναι πολύ σημαντικό για την απαλλαγή από την τοξικότητα του Cd (Pacheco et al, 2008).

Σε ότι αφορά το βακτήριο *Proteus mirabilis* δεν υπάρχει μέχρι τώρα διαθέσιμη ερευνητική μελέτη σχετικά με την τοξικότητα του Cd.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι παρόλο που το Cd ασκεί τοξική δράση στην *Escherichia coli* με διάφορους μηχανισμούς, το βαρύ αυτό μέταλλο έχει βρεθεί ότι ασκεί ευεργετική δράση στην ανάπτυξη ενός θαλάσσιου φυτοπλακτονικού διατόμου.



του *Thalassiosira weissflogii*. Συγκεκριμένα σε μια έρευνα προστεθήκαν 45 pM (picomolar) Cd σε αξενικές καλλιέργειες του *Thalassiosira weissflogii* οι οποίες ήταν εκτεθειμένες σε χαμηλές συγκεντρώσεις Zn όπως συμβαίνει σε συνθήκες θαλάσσιου περιβάλλοντος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη του Cd, υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας ανάπτυξης του *Thalassiosira weissflogii*, η οποία έγινε μέσω τη αύξησης της δραστηριότητας της κυτταρικής «καρβονικής ανυδράσης» (cellular carbonic anhydrase ή CA). κυρίως υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης του CO₂. Η δραστηριότητα της CA πραγματοποιείται μέσω της πρωτεϊνικής έκφρασης της CA η οποία είναι συγκεκριμένη για το Cd και όπως χαρακτηριστικά αναφέρεται, αυτή η CA μπορεί να αντικαταστήσει το αντίστοιχο ένζυμο για τον Zn που είναι η καρβονική ανυδράση του *Thalassiosira weissflogii* (*Thalassiosira weissflogii* cellular anhydrase ή TWCA1), σε συνθήκες όπου η συγκέντρωση του Zn είναι χαμηλή (Lane and Morel, 2000).

4.3 Τα συστήματα ανθεκτικότητας των βακτηρίων και της *E. coli* απέναντι στην τοξικότητα των βαριών μετάλλων και του Cd

Υπάρχουν πολύ συγκεκριμένα συστήματα ανθεκτικότητας των βακτηρίων για μέταλλα όπως ο άργυρος (Ag) το αρσενικό (As), το βισμούθιο (Bi), το Cd, το Co, το χρώμιο (Cr), ο Cu, ο Hg, ο Pb, το τελλούριο (Te) και ο Zn. Αυτά είναι: Α) Το σύστημα ανθεκτικότητας στα μέταλλα που καθορίζεται από πλασμίδια και είναι πολύ εξειδικευμένο, όπως συμβαίνει στην ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ή στο μεταβολισμό των σακχάρων και των αμινοξέων. Πολλά από τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά βρίσκονται στα ίδια πλασμίδια με αυτά της ανθεκτικότητας στα μέταλλα. Εντούτοις, δεν υπάρχει ένας γενικός μηχανισμός για όλα τα ιόντα βαρέων μετάλλων. Β) Το σύστημα ανθεκτικότητας που περιλαμβάνει τα συστήματα που βρίσκονται σε πλασμίδια σε όλα τα βακτήρια που έχουν μελετηθεί από την *Escherichia coli* μέχρι και τον *Streptomyces*. Γ) Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που γενικά είναι συστήματα με αντλίες εκροής, στα οποία συμβαίνει απομάκρυνση των τοξικών ιόντων που εισέρχονται στο κύτταρο με συστήματα μεταφοράς που εξελίχθηκαν από την μεταφορά κατιόντων και ανιόντων θρεπτικών συστατικών. Δ) Ο μηχανισμός της ενζυμικής αποτοξίνωσης, που περιλαμβάνει χημεία οξειδωσης και αναγωγής και μετατρέπει τα πιο τοξικά είδη μετάλλων σε λιγότερο τοξικά ή σε λιγότερο διαθέσιμα. Οι αντλίες εκροής που είναι οι κυριότερες ομάδες των πλασμιδιακών συστημάτων ανθεκτικότητας μπορεί να είναι είτε ΑΤΡασες, είτε χημειοσωμωτικές. Σε γενικές γραμμές ειδικά η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στο Cd πραγματοποιείται από ένα σύστημα εκροής στο οποίο το μέταλλο μεταφέρεται έξω από το κύτταρο με αντλίες αντιμεταφοράς Cd²⁺-H⁺. Επίσης άλλα συστήματα ανθεκτικότητας στο Cd αλλά και στο Cu που σχετίζονται με πλασμίδια, περιλαμβάνουν μόρια του είδους των μεταλλοθειονίνων (Olafson, Abel and Sim, 1979, Foster, 1983, Silver, Misra and Laddaga, 1989, Gadd, 1990, Nies, 1992, Silver and Ji, 1994, Nies and Silver, 1995, Phung, 1996, Rosen, 2002).

Παραδείγματα από ΑΤΡασες, είναι η ΑΤΡαση του Cd στα Gram-θετικά βακτήρια, οι αντλίες CopA που είναι ΑΤΡαση τύπου-P στην *Escherichia coli*, η οποία της παρέχει ανθεκτικότητα στο χαλκό και η επίσης τύπου-P ΑΤΡαση, ZntA στην *Escherichia coli* η οποία εξασφαλίζει ανθεκτικότητα στο Cd, στον ψευδάργυρο και στον μόλυβδο. Ένα σύστημα τεσσάρων πρωτεϊνών παρέχει ανθεκτικότητα στην *Escherichia coli* και στην *Pseudomonas syringae* από την βλαπτική επίδραση του Cd. Το σύστημα των πρωτεϊνών αποτελείται από μια πρωτεΐνη στη εσωτερική μεμβράνη την PcoD, μια πρωτεΐνη στη εξωτερική μεμβράνη την PcoB, δύο



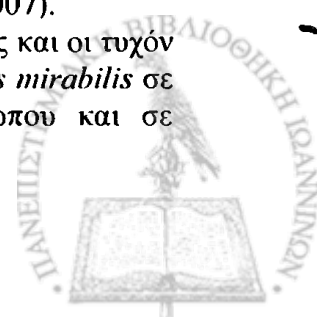
περιπλασμικές πρωτεΐνες που συνδέονται με τον Cu την PcoA και την PcoC. Το σύστημα αυτό κατευθύνεται από δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες την PcoS και την PcoR που είναι ομόλογες με άλλες βακτηριακές ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Γονίδια ανθεκτικότητας της *Escherichia coli* στον χαλκό είναι το *pcoABCD* και το *pcoRS* όπως επίσης και το γονίδιο *merB* το οποίο βρίσκεται σπάνια στην *Escherichia coli* και το γονίδιο *merC* που συνήθως συναντάται στο βακτήριο. Τα γονίδια αυτά παρέχουν ανθεκτικότητα στον υδράργυρο όπως και το οπερόνιο *ars* της *E. Coli*, που της παρέχει με αυτόν τον τρόπο ανθεκτικότητα στο αρσενικό (Silver and Phung, 1996). Επίσης υπάρχει και το σύστημα ανθεκτικότητας που περιλαμβάνει ΑΤΡασες εκροής για το αρσενικό (As) στα gram-αρνητικά βακτήρια το οποίο είναι διαφορετικό από αυτό της τύπου-P ΑΤΡασης. Ακόμα κάποια συστήματα ανθεκτικότητας για το Cd, τον Zn, και το Co όπως το *Czc* δεν περιλαμβάνουν ΑΤΡασες στις πολυπεπτιδικές τους αλληλουχίες. Επομένως δεν λειτουργούν όλα τα συστήματα ανθεκτικότητας εκροής τοξικών ιόντων με ΑΤΡασες. Η ΑΤΡαση *cadA* που προκύπτει από πλασμίδια του βακτηρίου *S. aureus* είναι μια ΑΤΡαση των μεμβρανών που αποτελείται από 727 αμινοξέα και απαλλάσσει τα κύτταρα από το Cd μέσω αντλιών, με την ίδια ταχύτητα με αυτή που συσσωρεύεται. Αυτό το πολυπεπτίδιο σχετίζεται σε ότι αφορά την αλληλουχία με άλλες ΑΤΡασες που απομακρύνουν κατιόντα, όπως είναι οι ΑΤΡασες του K^+ στην *Escherichia coli* και στον *Streptococcus faecalis*. Παράδειγμα χημειοσωμωτικών αντλιών εκροής είναι το σύστημα ανθεκτικότητας για το αρσενικό της *Escherichia coli*. Οι μηχανισμοί δεν είναι ακριβώς οι ίδιοι σε όλα τα είδη βακτηρίων (Silver, Misra and Laddaga, 1989, Nies and Silver, 1995, Silver, 1998, Rosen, 2002).

Ερευνητές προσδιόρισαν την ταυτότητα και τις ιδιότητες για πρώτη φορά μιας πρωτεΐνης εκροής ιόντων μετάλλων που ονομάζεται *Czr* και *Czc*, από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus thermophilus*. Το αντίστοιχο γονίδιο εκφράστηκε στην *E. coli* και είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ανθεκτικότητα στα ιόντα Zn και Cd και σε μικρότερο βαθμό στο Co (Spada, Pembroke and Wall, 2002).

Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε ο ρόλος των «ανθρώπινων πρωτεϊνών ανθεκτικότητας στην πολυφαρμακία» (Human Multidrug Resistance Proteins ή MDR proteins) και αξιολογήθηκε η ανθεκτικότητα της *Escherichia coli* στην επίδραση του Cd. Για αυτό το σκοπό οι ανθρώπινες MDR πρωτεΐνες MDR1, και οι βακτηριακές MDR πρωτεΐνες *LmrA* και *OmrA*, που η επαγωγή τους γίνεται από τα γονίδια *Lactococcus lactis lmrA*, και *Oenococcus oeni omrA*, εκφράστηκαν σε μεταλλαγμένο στέλεχος της *Escherichia coli*. Το στέλεχος αυτό ονομάζεται «*Escherichia coli tolC*», και έχει αποδειχτεί ότι έχει υπερευαισθησία στη τοξικότητα του Cd. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τόσο η ανθρώπινη (MDR1) όσο και οι βακτηριακές MDR πρωτεΐνες (*LmrA* και *OmrA*), παρείχαν ανθεκτικότητα στην *Escherichia coli* από την τοξική επίδραση του Cd μέχρι και στη συγκέντρωση 0,4 mM (Achard-Joris, et al. 2005).

Επίσης σημαντικό ρόλο στην προστασία της *E.coli* από το οξειδωτικό στρες, που αποτελεί μηχανισμό με τον οποίο το Cd ασκεί την τοξική του δράση, παίζουν και οι «δισμουτάσες του υπεροξειδίου» (super oxide dismutases). Τα ένζυμα αυτά όπως προαναφέρθηκε, ονομάζονται Mn-SOD και Fe-SOD, περιέχουν Mn και Fe αντίστοιχα και ασκούν την προστατευτική τους επίδραση μέσω της διάσπασης της χημικής ρίζας του υπεροξειδίου (Geslin et al. 2001, Achard-Jori et al., 2007).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν γενικά να μελετηθούν οι τοξικές και οι τυχόν ευεργετικές δράσεις του Cd στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* σε συγκεντρώσεις που βρίσκονται φυσιολογικά στα ούρα του ανθρώπου και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή μικρότερες από τις φυσιολογικές.



B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απαιτούμενα υλικά

1. Σιφόνια, γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα και χωρητικότητας από 0.1 ml έως 11 ml.
2. Γυάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 10ml.
3. Πώματα από υδροφόρο βαμβάκι για γυάλινους σωλήνες.
4. Γυάλινα σωληνάκια Dur.
5. Αποστειρωμένες μεταλλικές λαβίδες.
6. Μεταλλικά στατό για γυάλινους σωλήνες.
7. Αναδευτήρας τύπου Vortex.
8. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (ependof 10 – 100 μl και 100 – 1000 μl)
9. Πλαστικά ρύγγη μιας χρήσεως αποστειρωμένα, κίτρινα 10 – 100 μl και μπλε 100 – 1000 μl για τις παραπάνω πιπέτες.
10. Επωαστικός θάλαμος
11. Υδατόλουτρο – αναδευτήρας.
12. Μεταλλικές λαβίδες.

2. Θρεπτικά υποστρώματα

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο ζωμός Mueller Hinton Broth (MHB, CM0405, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England), και το άγαρ Mueller Hinton Agar (MHA, CM0337, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England).

- Ο θρεπτικός ζωμός MHB είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

-Beef, dehydrated infusion from 300

-Casein hydrolysate 17,5

-Starch 1,5

Για την παρασκευή του MHB αναμιχθήκαν 21 gr έτοιμης σκόνης (CM0405, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) σε 1 lt απιονισμένου νερού μέχρι πλήρους διάλυσης. Ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min. Το pH του ζωμού ήταν 7,3±0.1 στους 25°C.

- Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MHA είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

-Beef, dehydrated infusion from 300

-Casein hydrolysate 17,5

-Starch 1,5

-Agar 17,0

Για την παρασκευή του υποστρώματος προσθέσαμε 38gr έτοιμης σκόνης (CM0337, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) σε 1 lt απιονισμένου νερού, θερμάναμε μέχρι βρασμού και πλήρους διάλυσης και ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min (pH=7,3±0.1), παραμονή σε υδατόλουτρο μέχρι πτώσεως της θερμοκρασίας στους 55°C και διανομή σε τρυβλία πετρί διαμέτρου 10 cm.



3. Μικροβιακά στελέχη

Εξετάσθηκαν 2 κλινικά στελέχη βακτηρίων:

- *Escherichia coli*
- *Proteus mirabilis*

Η απομόνωση των στελεχών πραγματοποιήθηκε από κλινικά δείγματα ούρων.

Για την ταυτοποίηση των στελεχών και τον έλεγχο ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek II (BioMerieux, France), η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ Bauer – Kirby (Αρσένη 1994, Lorian 2005, CLSI 2006, Koneman 2006) και η μέθοδος προσδιορισμού της MIC με τη χρήση ταινιών που φέρουν διαβάθμιση πυκνότητας, E – test (De La Maza 2001, Lorian 2005, Koneman 2006).

4. Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης

4.1 Θεωρία

Η Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης (AAS) χρησιμοποιείται εδώ και πολύ καιρό και περιλαμβάνει δύο τεχνικές. Την AAS (FAAS) με φλόγα και την ηλεκτροθερμική AAS (ETAAS ή GFAA). Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε και η FAAS και η ETAAS. Η ατομική απορρόφηση συμβαίνει όταν ένα άτομο που βρίσκεται στην χαμηλότερη ενέργεια σε ότι αφορά τα ηλεκτρόνια, απορροφά ενέργεια με την μορφή ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος και έχει ανέβει ενεργειακά σε υψηλότερο επίπεδο. Η ποσότητα της ενέργειας του φωτός που απορροφάται σε αυτό το μήκος κύματος αυξάνεται καθώς ο αριθμός των ατόμων (του δείγματος που ερευνάται) αυξάνεται. Στην διαδικασία της ατομικής απορρόφησης, το φως και το συντονισμένο μήκος κύματος μίας αρχικής έντασης (I_i) επικεντρώνεται στην φλόγα της συσκευής που αποτελείται από άτομα σε κατάσταση ηρεμίας. Το αρχικό φως μειώνεται με ποσότητα που βρίσκεται σε αναλογία με την συγκέντρωση του ατόμου στην φλόγα. Το φως κατευθύνεται σε έναν ανιχνευτή όπου αυτή η μειωμένη ένταση (I) υπολογίζεται. Η ποσότητα του απορροφούμενου φωτός υπολογίζεται με την σύγκριση του I με το I_i . Κάποιοι κοινοί ορισμοί στην AAS έχουν ως εξής:

Η μεταβίβαση (transmittance) είναι ο αναλογία της τελικής έντασης (I) προς την αρχική ένταση (I_i),

$$T = I / I_i$$

Το ποσοστό της μεταβίβασης (%T) είναι,

$$\%T = 100 \times I / I_i$$

Το ποσοστό της απορρόφησης (%A) είναι το ποσοστό του αρχικού φωτός που απορροφάται στην φλόγα και είναι

$$\%A = 100 - \%T$$



Η απορρόφηση (A) είναι

$$A = \log(I_0/I)$$

Η απορρόφηση μπορεί να οριστεί επίσης και με το νόμο του Beer ως,

$$A = abc$$

Όπου το «a» είναι ένας συντελεστής απορρόφησης, μια σταθερά χαρακτηριστική του είδους που γίνεται η απορρόφηση, το «b» είναι το μήκος της τροχιάς της φλόγας (τυπικά 1cm) και το «c» είναι η συγκέντρωση του είδους που γίνεται η απορρόφηση. Αυτή η εξίσωση δείχνει ότι η απορρόφηση είναι ανάλογη με την συγκέντρωση. Οπότε από τη στιγμή που η σχέση του νόμου του Beer είναι αληθινή, η σχέση της απορρόφησης και της συγκέντρωσης είναι γραμμική (Pulido et al, 1966).

Πολλές διαδικασίες γίνονται όταν ένα δείγμα εισάγεται στο σύστημα της AAS. Στις πιο κοινές εφαρμογές εισάγεται ένα διάλυμα. Το δείγμα πρώτα γίνεται νεφελώδες στην φλόγα για την FAAS (ή στην πλατφόρμα στην ETAAS), όπου από τη διαδικασία αυτή παράγεται ένα αεροζόλ,



(M^+ = κατιόν μετάλλου A^- = ανιόν)

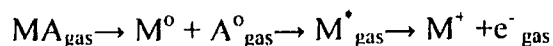
Τη στιγμή που το δείγμα βρίσκεται στην συσκευή γίνονται διάφορες διαδικασίες. Στην περίπτωση της ETAAS το διάλυμα μετατρέπεται κατευθείαν στην στερεά φάση. Το δείγμα σε μορφή αεροζόλ, αναμειγνύεται με καύσιμο και οξειδωτικά αέρια. Το αεροζόλ περνάει μέσα στην φλόγα και εξατμίζεται, παράγοντας ένα μικροσκοπικό στερεό συγκεκριμένο για το δείγμα:



Καθώς εφαρμόζεται συνεχώς περισσότερη θερμότητα το στερεό υγροποιείται και τελικά εξατμίζεται:



Λόγω των σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών το άτομο που αναλύεται είναι συχνά δεσμευμένο με άλλα άτομα ή με ιόντα στην μοριακή τους μορφή που δεν έχουν την ατομική απορρόφηση που ενδιαφέρει. Το μόριο θα διασπαστεί στα άτομά του τα οποία έχουν γνωστά και υπολογίσιμα φάσματα καθώς περισσότερη θερμότητα προστίθεται όπως φαίνεται από την εξίσωση:



Όπου * δείχνει το άτομο που βρίσκεται σε κατάσταση υψηλής ενέργειας. Οι τρεις εξισώσεις που περιγράφονται παραπάνω αντιπροσωπεύουν τη συνολική διαδικασία του σχηματισμού ατόμων, την διέγερση και κάποιο ιονισμό. Επειδή η θερμική ενέργεια από την φλόγα είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των ουσιών που γίνεται η απορρόφηση, η θερμοκρασία της φλόγας είναι πολύ σημαντική. Οι περιορισμοί της



θερμοκρασίας αυτής, είναι υπεύθυνοι για πολλούς από τους περιορισμούς της AAS. Χαμηλότερες θερμοκρασίες έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας που δεν είναι ικανή για τον πλήρη σχηματισμό ατόμων (Pulido et al. 1966)..

Το μείγμα αερίου-ακετυλενίου (2100° - 2400° C) και το μείγμα N_2O -ακετυλενίου (2600° - 2800° C) είναι τα δύο μείγματα οξειδωσης που χρησιμοποιούνται πιο συχνά. Η απορρόφηση εξαρτάται από τον αριθμό των ατόμων στην φάση ηρεμίας που σχηματίζονται. Η ποσότητα του φωτός που απορροφάται καθορίζεται από τον αριθμό των ατόμων στην φάση ηρεμίας που παράγονται από την φλόγα. Αν ένα συστατικό επηρεάσει οποιαδήποτε από αυτές τις διαδικασίες που έχουν ήδη περιγραφεί το αποτέλεσμα από την επιρροή αυτή θα είναι πολύ εσφαλμένο (Pulido et al. 1966)..

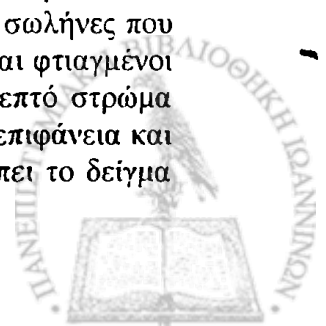
Ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα της τεχνικής αυτής είναι ο σχηματισμός ατόμων. Η τεχνική της AAS με φλόγα FAAS χρονολογείται από τη δεκαετία του 1960. Ένα δείγμα διαλύματος εισάγεται στην φλόγα με την χρήση συσκευής όπου το δείγμα γίνεται νεφελώδες (nebulizer). Οι συσκευές ηλεκτροθερμικής AAS (ETAAS), έχουν εξελιχθεί πιο πρόσφατα, τη δεκαετία του 1970, και αποτελούνται από ένα σωλήνα από γραφίτη ο οποίος θερμαίνεται με την κατάλληλη θερμοκρασία για τον σχηματισμό ατόμων του δείγματος με την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού κυκλώματος μέσα από τον σωλήνα (Pulido et al, 1966).

4.2 Έννοιες εφαρμογής

Οι συσκευές όπου το δείγμα γίνεται νεφελώδες (nebulizers) χρησιμοποιούνται για να μετατρέψουν το δείγμα που βρίσκεται σε υγρή μορφή σε αεροζόλ το οποίο μπορεί να μεταφερθεί στην φλόγα. Καυστήρες (burners) από ανοξείδωτο ατσάλι χρησιμοποιούνται συνήθως. Παρόλα αυτά θα πρέπει να υπάρχει προσοχή όταν χρησιμοποιούνται ουσίες με μεγάλη τοξικότητα γιατί το ανοξείδωτο ατσάλι είναι επιρρεπές στην διάβρωση. Καυστήρες που αναμειγνύονται και παράγουν μια οπτικά διαφανή φλόγα χρησιμοποιούνται αποκλειστικά στην FAAS. Ο βασικός σχεδιασμός είναι η συσκευή όπου το δείγμα γίνεται νεφελώδες (nebulizer) και παράγεται αεροζόλ. Το δείγμα εισέρχεται σε ένα χώρο όπου αναμειγνύεται με ακετυλένιο και επιπλέον οξειδωτικό (αέριο ή N_2O). Στην FAAS, μόνο ένα μικρό ποσοστό (2-5%) από το δείγμα φτάνει στην φλόγα. Αυτό είναι ένα σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής FAAS και αποτελεί έναν από τους λόγους της ανάπτυξης και της χρήσης της τεχνικής ETAAS. Στην FAAS μια συνεχόμενη ροή αεροζόλ φτάνει στην φλόγα όπου ένα σταθερό σήμα που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του δείγματος που αναλύεται υπολογίζεται. Η ταχύτητα της ροής είναι 5-10 ml/min και η κατανάλωση του δείγματος είναι μεταξύ 1-2 ml/δείγματος που αναλύεται. Το δείγμα που εισάγεται στην φλόγα μένει στο φως για ελάχιστο χρονικό διάστημα καθώς κινείται προς τα πάνω μέσα στην φλόγα (Pulido et al. 1966).

4.3 Εισαγωγή δείγματος και σχηματισμός ατόμων στην ETAAS (GFAA)

Τα αποβαλλόμενα δείγματα και ο χρόνος παραμονής του ατόμου στην κατάσταση ηρεμίας στην φλόγα έχουν μικρή διάρκεια σε ότι αφορά την FAAS. Συσκευές που θερμαίνονται με ηλεκτρισμό όπως οι κλίβανοι από γραφίτη στην τεχνική ETAAS, είναι συνηθισμένοι εναλλακτικά χωρίς τη χρήση φλόγας στην AAS. Οι σωλήνες που χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό ατόμων στην τεχνική ETAAS είναι φτιαγμένοι από πολυκρυστάλλινο ηλεκτρογραφίτη και είναι καλυμμένοι με ένα λεπτό στρώμα πυρολυτικού γραφίτη. Το πυρολυτικό κάλυμμα παρέχει μια πιο έντονη επιφάνεια και μειώνει την τάση σχηματισμού καρβιδίου. Το κάλυμμα επίσης αποτρέπει το δείγμα



να ποτίσει την επιφάνεια πριν στεγνώσει. Οι σωλήνες θερμαίνονται συνεχώς σε μια δεδομένη θερμοκρασία με το πέρασμα ηλεκτρικού ρεύματος μέσα από τον σωλήνα. Η επαφή γίνεται είτε μέσα από τα άκρα είτε από τις πλευρές του σωλήνα. Συνήθως το δείγμα τοποθετείται σε μια πλατφόρμα η οποία βρίσκεται πάνω στον σωλήνα από γραφίτη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην περεταίρω καθυστέρηση της διαδικασίας σχηματισμού ατόμων, πράγμα που είναι θετικό χαρακτηριστικό της τεχνικής (Pulido et al. 1966). Μια εικονική αναπαράσταση ενός σωλήνα γραφίτη με την πλατφόρμα φαίνεται στο σχήμα Η 1.

- Το δείγμα τοποθετείται με πιπέττα μέσα σε μια ρηχή κοιλότητα στο κάτω μέρος της πλατφόρμας (σχήμα Η 1). Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της πλατφόρμας είναι η καθυστέρηση της διαδικασίας σχηματισμού ατόμων. Η θερμοκρασία του τοιχώματος του σωλήνα αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό όταν δεν χρησιμοποιείται πλατφόρμα. Το δείγμα έρχεται σε επαφή με το τοίχωμα του σωλήνα και θερμαίνεται αμέσως. Όταν το τοίχωμα του σωλήνα φτάσει την θερμοκρασία στην οποία παράγονται άτομα, τα άτομα εξατμίζονται και απελευθερώνονται από το πολύ θερμό τοίχωμα του σωλήνα σε μορφή αδρανούς αερίου. Η θερμοκρασία του αερίου φυσιολογικά κυμαίνεται κάτω από την θερμοκρασία του τοιχώματος του σωλήνα και είναι ψυχρή σε σχέση με την επιφάνεια. Αυτή η ξαφνική ψύξη αναστέλλει τον σχηματισμό ατόμων των εξατμιζόμενων μορίων και προκαλεί συμβολή του φωτός χωρίς φάσμα. Αντίθετα, όταν ένα δείγμα τοποθετείται στην πλατφόρμα, τότε υφίσταται την θερμοκρασία της πλατφόρμας και όχι την θερμοκρασία του τοιχώματος του σωλήνα. Η επίπεδη πλατφόρμα είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να θερμαίνεται αρχικά με θερμοκρασία ακτινοβολίας και όχι από μεταφορά θερμότητας από ενέργεια (όπως περιγράφηκε παραπάνω για την τεχνική που δεν περιλαμβάνει πλατφόρμα) και συνεπώς θερμαίνεται με πιο βραδύ ρυθμό. Όταν η πλατφόρμα φτάσει σε θερμοκρασία στην οποία τα άτομα έχουν εξατμιστεί, τα άτομα απελευθερώνονται μέσα σε «ατμόσφαιρα» κλιβάνου όπου η θερμοκρασία είναι παρόμοια (υψηλότερη ή ίση) με αυτή της πλατφόρμας. Αυτό διευκολύνει στον μεγαλύτερο έλεγχο της εξατμίσσης και του περιβάλλοντος που εκτίθεται το δείγμα στον σωλήνα και επιτρέπει στο σύστημα για το εξατμιζόμενο δείγμα να είναι πιο σταθερό (σε σταθερή κατάσταση). Ο σωλήνας στον οποίο σχηματίζονται τα άτομα βρίσκεται πάνω σε ειδικό χώρο όπου ψυχραίνεται με νερό και εκτίθεται σε αργό (ή άζωτο) για να προστατευτεί ο σωλήνας του γραφίτη. Η μείωση της θερμοκρασίας επιτρέπει στο σύστημα να «συνέλθει» από τις αλλαγές της θερμοκρασίας πιο γρήγορα μετά από ένα κύκλο έκθεσης σε υψηλή θερμοκρασία (Pulido et al, 1966)..

Ένα δείγμα που χρησιμοποιείται στην διαδικασία ETAAS, εκτίθεται σε ένα πρόγραμμα πολλών βημάτων αλλαγής της θερμοκρασίας σε έναν κύκλο υψηλής θερμοκρασίας. Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται σε τέτοιο σημείο ώστε να σχηματισθούν άτομα, υπολογίζεται η ατομική απορρόφηση. Ένα τυπικό σύστημα κλιβάνου από γραφίτη περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Την *ξηράνση* – Στην φάση αυτή εξατμίζεται ο διαλύτης και μένει ένα στερεό κατάλοιπο. Θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν χαμηλές θερμοκρασίες προκειμένου να αποφευχθεί το «πιτσίλισμα» του δείγματος με το οποίο θα προκύψουν λίγα αποτελέσματα.
2. Η *πυρόλυση ή ο σχηματισμός στάχτης* – Η διαδικασία χρησιμοποιείται για να απομακρυνθεί οτιδήποτε άλλο εκτός από το δείγμα που αναλύεται. Το οργανικό υλικό μετατρέπεται σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα και οι ανόργανες ενώσεις εξαερώνονται.
3. Ο *σχηματισμός ατόμων* – Ασκειείται η χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία με την οποία θα σχηματιστούν άτομα από το δείγμα που αναλύεται. Πολύ υψηλές



θερμοκρασίες θα πρέπει να αποφεύγονται γιατί το γεγονός αυτό θα ελάττωνε τον χρόνο παραμονής του δείγματος στον σωλήνα και θα προκαλούσε ελάττωση στην ευαισθησία. Επίσης θα μείωνε τον χρόνο ζωής του σωλήνα από γραφίτη. Η ροή του αερίου θα πρέπει να σταματήσει προκειμένου να αυξηθεί στο ανώτερο δυνατό σημείο ο χρόνος παραμονής του εξατμιζόμενου δείγματος στον κλίβανο.

4. Ο καθαρισμός – Στην φάση αυτή χρησιμοποιείται η μεγαλύτερη δυνατή θερμοκρασία προκειμένου να απομακρυνθεί όποιο δείγμα έχει απομείνει πριν ξεκινήσει η διαδικασία με το επόμενο δείγμα.

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του κύκλου υψηλών θερμοκρασιών ο σωλήνας του κλιβάνου είναι συνεχώς εκτεθειμένος σε ένα εσωτερικό αέριο όπως το αργό ή το άζωτο. Το αέριο προστατεύει την επιφάνεια στην οποία σχηματίζονται τα άτομα από οξείδωση, μεταφέρει τα άτομα του δείγματος που αναλύονται από την επιφάνεια στο κέντρο του σωλήνα όπου γίνεται ο σχηματισμός ατόμων και απομακρύνει όλες τις ουσίες σε αέρια μορφή κατά τη διάρκεια της διαδικασίας (Pulido et al, 1966).

4.4 Πηγές φωτός για την FAAS και την ETAAS

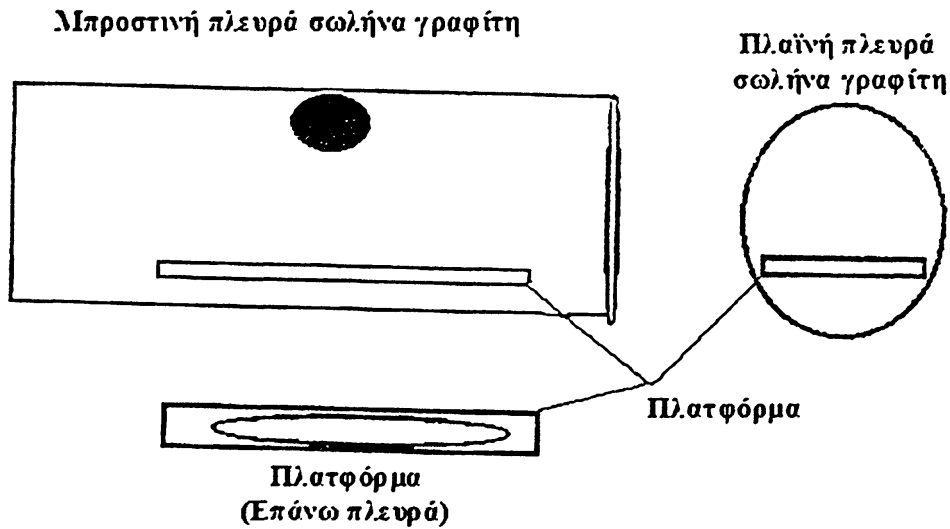
Τα άτομα απορροφούν φως σε διάφορα μήκη κύματος. Μια πηγή που εκπέμπει το συγκεκριμένο μήκος κύματος, χαρακτηριστικό ενός ατόμου θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της απορρόφησης με την υψηλότερη ευαισθησία. Πολλά από τα πλεονεκτήματα της AAS αποδίδονται στο ότι η απορρόφηση ενός στοιχείου γίνεται σε πολύ περιορισμένο εύρος φάσματος (0,0001-0,005nm). Οι κοίλοι καθοδικοί λαμπτήρες (HCL) και οι λαμπτήρες εκροής χωρίς ηλεκτρόδια (EDL) χρησιμοποιούνται ως πηγές φωτός. Η κάθοδος είναι ένας μεταλλικός κύλινδρος που παράγει ένα φάσμα. Η άνοδος και η κάθοδος είναι κλεισμένες σε γυαλί υπό χαμηλή πίεση αργού ή νέου. Στο τέλος του κυλίνδρου υπάρχει ένα παράθυρο διάφανο στην ακτινοβολία που εκπέμπεται (Σχήμα II 2) (Pulido et al, 1966).

Η διαδικασία εκπομπής αρχίζει καθώς ένα δυναμικό ρεύματος εφαρμόζεται μεταξύ της ανόδου και της καθόδου και κάποια από τα άτομα του αερίου ιονίζονται. Τα κατιόντα του αερίου επιταχύνονται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο για να προσκρούσουν με την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο που εκτοπίζει μεμονωμένα άτομα μετάλλου. Αυτά τα άτομα μετάλλου στη συνέχεια διεγείρονται σε μια φάση εκπομπής μέσω μιας κινητικής διαδικασίας επαφής με άλλα ιόντα του αερίου (Pulido et al, 1966).

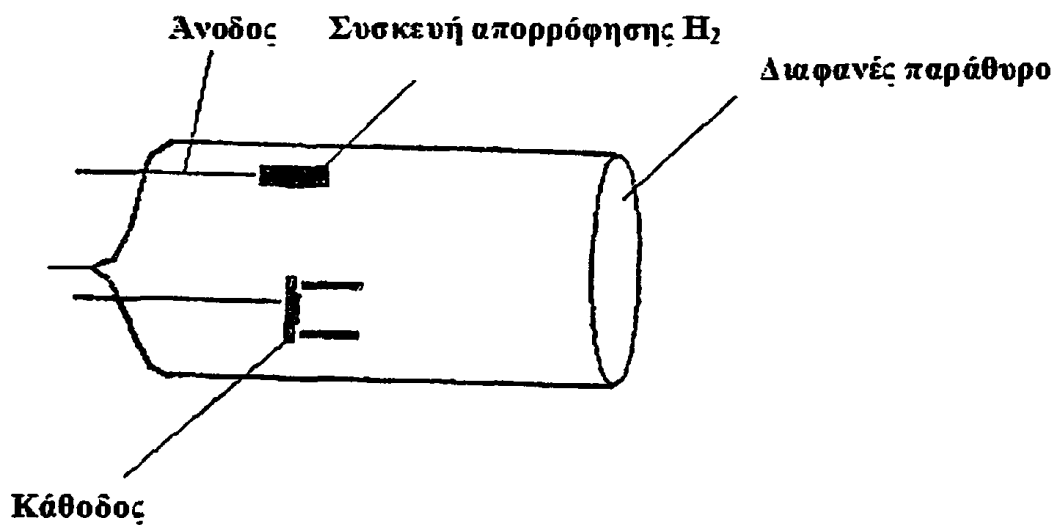
Οι HCL έχουν ένα καθορισμένο χρόνο ζωής. Άτομα αερίου που γεμίζουν το χώρο της λάμπας προσροφούνται πάνω στην επιφάνεια της λάμπας. Όταν το αέριο αυτό λιγοστεύει, η διαδικασία εκτοπισμού μεμονωμένων ατόμων του μετάλλου, διέγερσης και εκπομπής μειώνεται. Κατά τη διάρκεια εκτοπισμού μεμονωμένων ατόμων του μετάλλου, κάποια ποσότητα του μετάλλου μπορεί να διοχετευτεί αλλού. Οι λαμπτήρες για τα πτητικά μέταλλα όπως αυτές του αρσενικού ή του σεληνίου είναι επιρρεπείς σε αυτό το μηχανισμό. Στη πραγματικότητα οι HCL συνήθως δεν χρησιμοποιούνται για πτητικά μέταλλα. Η ικανότητα λειτουργίας των λαμπών μειώνεται όταν τα μέταλλα εγκλωβίζουν αέριο που βρίσκεται στον λαμπτήρα, πράγμα που επηρεάζει δυσμενώς και την ικανότητα λειτουργίας και τον χρόνο ζωής. Κάποια υλικά των HCL εκλύουν υδρογόνο το οποίο εκπέμπει κάποιο μήκος κύματος και επιμολύνει την γνησιότητα του φάσματος. Ορισμένες HCL χρησιμοποιούν μια συσκευή στην άνοδο για να αποτρέψουν αυτό το πρόβλημα, απορροφώντας το εκλυόμενο υδρογόνο (Pulido et al, 1966).



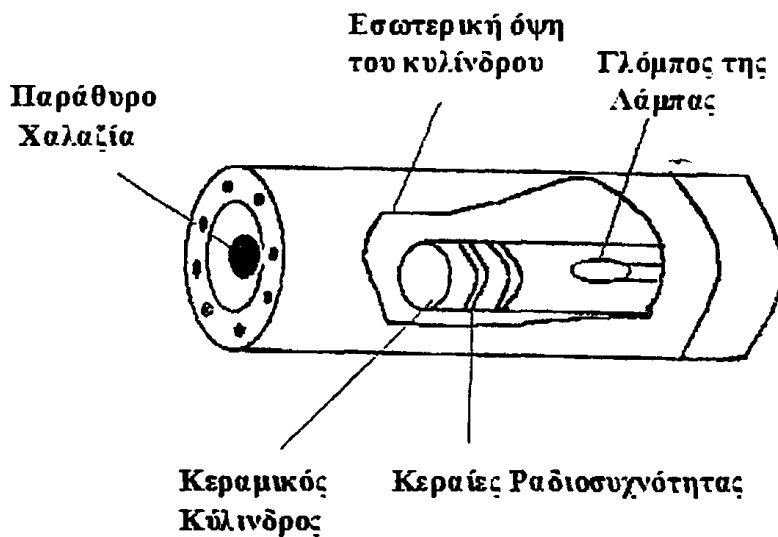
Το άλλο είδος της πηγής του φωτός είναι οι EDL, που χρησιμοποιείται καταρχήν για πτητικά στοιχεία όπου οι HCL έχουν μειωμένη ένταση και μικρό χρόνο ζωής. Μια μικρή ποσότητα μετάλλου (ή μεταλλικού άλατος) του στοιχείου για του οποίου η πηγή θα χρησιμοποιηθεί είναι κλεισμένο σε μια λάμπα χαλαζία. Ο λαμπτήρας είναι τοποθετημένος μέσα σε έναν κεραμικό κύλινδρο ο οποίος έχει μια κεραία από μια γεννήτρια συχνότητας ραδιοφώνου. Όταν συχνότητα ραδιοφώνου με ικανή ισχύ εφαρμόζεται (2450 MHz, 200W), η διπλή ενέργεια εξατμίζει και διεγείρει τα άτομα μέσα στον λαμπτήρα. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα άτομα να εκπέμπουν το χαρακτηριστικό φάσμα εκπομπής τους. Μια βοηθητική προμήθεια ενέργειας χρειάζεται για την λειτουργία μιας EDL. Γενικά μια EDL είναι πιο ισχυρή, και σε ορισμένες περιπτώσεις πιο ευαίσθητη από την HCL. Ο χρόνος ζωής της EDL είναι σχετικά μεγάλος, ειδικά όταν συγκρίνεται με αυτόν της HCL. Η EDL χρησιμοποιείται για το αντιμμώνιο, το αρσενικό, το κάδμιο, τον μόλυβδο, τον υδράργυρο, το σελήνιο και το θάλλιο (Pulido et al, 1966). Μια εικονική αναπαράσταση μίας EDL φαίνεται στο σχήμα II 3.



Σχήμα II 1. Διάγραμμα ενός σωλήνα γραφίτη με την πλατφόρμα για την ETAAS (Pulido et al, 1966).



Σχήμα Π 2. Σχήμα που απεικονίζει ένα κοίλο καθοδικό λαμπτήρα (HCL) (Pulido et al, 1966).



Σχήμα Π 3. Σχήμα που απεικονίζει ένα λαμπτήρα εκροής χωρίς ηλεκτρόδια (EDL) (Pulido et al, 1966).



5. Θολερότητα-νεφελομετρική μέθοδος

5.1 Γενικά

Θολερότητα είναι μια έκφραση της οπτικής ιδιότητας ενός δείγματος νερού να σκεδάζει και να απορροφά το φως που διέρχεται από αυτό και να μη μεταδίδει το φως σε ευθεία γραμμή. Συσχέτιση της θολερότητας με το περιεχόμενο του δείγματος σε βάρος εναιωρούμενων στερεών είναι δύσκολη διότι το διαφορετικό μέγεθος, σχήμα και σύσταση των στερεών επηρεάζουν το βαθμό σκέδασης του φωτός.

Πιο σύγχρονη μέθοδος για τον προσδιορισμό της θολερότητας είναι η νεφελομετρία, που ενδείκνυται για χαμηλές τιμές θολερότητας. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση της έντασης σκέδασμού του φωτός από το δείγμα σε σχέση με ένα πρότυπο αιώρημα αναφοράς. Το δείγμα και το πρότυπο διάλυμα πρέπει να βρίσκονται στις ίδιες συνθήκες. Όσο μεγαλύτερη είναι η σκέδαση του φωτός από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η θολερότητα. Η μέτρηση γίνεται με ειδικά όργανα γνωστά ως νεφελόμετρα ή θολερόμετρα και τα αποτελέσματα της μέτρησης εκφράζονται ως Νεφελομετρικές Μονάδες Θολερότητας ή Ν.Τ.Υ. (Nephelometric Turbidity Units). Για τη ρύθμιση του οργάνου χρησιμοποιείται πρότυπο αιώρημα φορμαζίνης, που παρασκευάζεται από πολυμερές της φορμαζίνης που αναπαράγει αρκετά πιστά τη θολερότητα των φυσικών νερών (Α.Ρ.Η.Α, Α.Υ.Υ.Α., Υ.Ρ.Υ.Υ., 1985, Κ. ΖΑΝΝΑΚΗ, 1983).

5.2 Παρεμποδιστικές ουσίες, δειγματοληψία και συντήρηση δείγματος

Η θολερότητα με αυτή τη μέθοδο, μπορεί να προσδιοριστεί σε οποιοδήποτε δείγμα που δεν περιέχει ευμεγέθη στερεά ή σωματίδια που καθιζάνουν γρήγορα. Επίσης, το δείγμα δεν πρέπει να περιέχει φυσαλίδες αερίων ή να είναι έγχρωμο. Το δείγμα πρέπει να αναλύεται όσο το δυνατόν συντομότερα. Αν αυτό δεν είναι δυνατόν, το δείγμα πρέπει να καταψύχεται ή να συντηρείται στους 4°C για να περιοριστεί η μικροβιακή αποσύνθεση των στερεών (Α.Ρ.Η.Α, Α.Υ.Υ.Α., Υ.Ρ.Υ.Υ., 1985, Κ. ΖΑΝΝΑΚΗ, 1983).

5.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός (θολερόμετρο, σωλήνες)

Το θολερόμετρο αποτελείται από μια πηγή φωτός, ένα ή δύο φωτοηλεκτρικούς ανιχνευτές και διάταξη άμεσης ανάγνωσης της έντασης του φωτός, στα 90 deg. Η ευαισθησία του οργάνου πρέπει να είναι τέτοια ώστε να ανιχνεύει διαφορές θολερότητας 0,02 μονάδων Ν. Τ. Υ., σε νερά με θολερότητα μικρότερη από 1 Ν.Τ.Υ. Το εύρος μέτρησης κυμαίνεται από 0-40 Ν.Τ.Υ.

Διαφορές στο σχεδιασμό των οργάνων δημιουργούν συνήθως διαφορετικές τιμές θολερότητας, γι αυτό στην επιλογή του οργάνου πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω:

α) Η πηγή φωτός από λάμπα βολφραμίου να λειτουργεί σε θερμοκρασία 2200-3000 °C

β) Η οπτική διαδρομή του φωτός από τη φωτεινή πηγή ως το φωτοκύτταρο, δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 10 cm.

γ) Το φωτοκύτταρο πρέπει να εστιάζεται στις 90° από την προσπίπτουσα ακτίνα και να μη διαφέρει περισσότερο από ±30° από τη διεύθυνση της ακτίνας που



σκεδάζεται. Το σύστημα των φίλτρων, αν χρησιμοποιείται, πρέπει να προκαλεί στο φωτόμετρο μέγιστη απόκκριση στην περιοχή, από 400-600 nm.

δ) Η μέγιστη τιμή θολερότητας του οργάνου να είναι 40 N.T.U.

Οι σωλήνες πρέπει να είναι καθαροί και πριν τη μέτρηση τους στο θολερόμετρο σκουπίζονται με χαρτί εμποτισμένο σε αιθυλική αλκοόλη. Κατά τη διάρκεια των διαφόρων χειρισμών οι σωλήνες πρέπει να πιάνονται μόνο από το πάνω μέρος τους (A.P.H.A. A.W.W.A., W.P.C.F, 1985. K. ZANNAKH, 1983).

5.4 Αντιδραστήρια

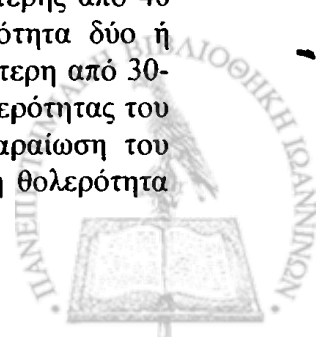
Σε ότι αφορά το νερό θολερότητας, χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό που διηθείται από φίλτρο, με διάμετρο πόρου 0,2 μm . Η φιάλη διήθησης ξεπλένεται δύο φορές με το διηθημένο νερό και απορρίπτονται τα πρώτα 200 mL διηθημένου νερού.

Όσον αφορά το μητρικό εναιώρημα φορμαζίνης, για το λεγόμενο διάλυμα 1, διαλύονται 1,00 g θειικής υδραζίνης, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{SO}_4$, σε απεσταγμένο νερό και αραιώνονται σε όγκο 100 mL σε ογκομετρική φιάλη (ΠΡΟΣΟΧΗ! Η θειική υδραζίνη είναι καρκινογόνα ουσία. Να αποφεύγεται η εισπνοή ατμών, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα). Για το λεγόμενο διάλυμα 2, διαλύονται 10,0 g εξαμεθυλενοτετραμίνης, $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$, σε απεσταγμένο νερό και αραιώνονται σε όγκο 100 mL σε ογκομετρική φιάλη. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, αναμιγνύονται 5,0 mL από το διάλυμα 1 και 5,0 mL από το διάλυμα 2. Το μίγμα αφήνεται για 24 ώρες, στους $25 \pm 3^\circ\text{C}$ και στη συνέχεια συμπληρώνεται μέχρι χαραγής με απεσταγμένο νερό. Η θολερότητα αυτού του εναιωρήματος, που είναι το μητρικό εναιώρημα, είναι 400 N.T.U. και από αυτό παρασκευάζονται τα πρότυπα εναιωρήματα. Το μητρικό εναιώρημα φορμαζίνης ανανεώνεται κάθε μήνα.

Σε ότι αφορά τα πρότυπα εναιωρήματα φορμαζίνης, αραιώνονται 10 mL του μητρικού εναιωρήματος (5.2) σε όγκο 100 mL με νερό χωρίς θολερότητα. Η θολερότητα αυτού του εναιωρήματος είναι 40 N.T.U. Το εναιώρημα αυτό ανανεώνεται κάθε εβδομάδα. Από το πρότυπο εναιώρημα των 40 N.T.U., παρασκευάζονται και άλλα πρότυπα εναιωρήματα με αραιώση. Τα διαλύματα αυτά ανανεώνονται κάθε εβδομάδα. Σήμερα τα περισσότερα θολερόμετρα που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι εφοδιασμένα με σειρά πρότυπων εναιωρημάτων φορμαζίνης, σε σφραγισμένους σωλήνες, οπότε δεν απαιτείται η παρασκευή τους (A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F, 1985, K. ZANNAKH, Αθήνα 1983).

5.5 Περιγραφή διαδικασίας

Μετρούνται στο θολερόμετρο πρότυπα εναιωρήματα που να καλύπτουν την περιοχή, η οποία ενδιαφέρει και ελέγχεται η αντιστοιχία των ενδείξεων του οργάνου με σειρά πρότυπων διαλυμάτων. Σε ότι αφορά την μέτρηση θολερότητας μικρότερης από 40 N.T.U. το δείγμα αναδεύεται ώστε να γίνει τέλεια διασπορά των αιωρούμενων στερεών και αφού εξαφανιστούν οι μικρές φυσαλίδες αέρα, μεταφέρεται ορισμένη ποσότητα δείγματος στον σωλήνα του θολερόμετρου. Διαβάζουμε κατευθείαν την ένδειξη που αντιστοιχεί στη κλίμακα του οργάνου ή με τη βοήθεια κατάλληλης καμπύλης αναφοράς. Σε ότι αφορά την μέτρηση θολερότητας μεγαλύτερης από 40 N.T.U. το δείγμα ανακινείται και αραιώνεται με νερό χωρίς θολερότητα δύο ή περισσότερες φορές ώστε η θολερότητα του διαλύματος να είναι μικρότερη από 30-40 N.T.U. Υπολογίζουμε τη θολερότητα του δείγματος από τη τιμή θολερότητας του διαλύματος επί τον συντελεστή αραιώσης. Αν για παράδειγμα, η αραιώση του δείγματος είναι 1:5 και το διάλυμα αυτό έχει θολερότητα 30 N.T.U., η θολερότητα



του δείγματος είναι 180 N.T.U. Ορισμένα θολερόμετρα είναι εφοδιασμένα με 5 χωριστές κλίμακες ανάγνωσης θολερότητας, π.χ. 0-0,2, 0-1,0, 0-10,0, 0-100 και 0-1000. Οι μεγαλύτερες περιοχές πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σαν ενδεικτικές των αραιώσεων που χρειάζονται, ώστε η θολερότητα να είναι κάτω από 40 μονάδες. Για συνεχείς μετρήσεις θολερότητας, με τιμές μεγαλύτερες των 40 N.T.U., η ρύθμιση του οργάνου πρέπει να γίνεται με το μητρικό διάλυμα των 400 N.T.U (Α.Ρ.Η.Α, Α.Υ.Υ.Α., Υ.Π.Υ.Υ., 1985, Κ. ΖΑΝΝΑΚΗ, Αθήνα 1983)

5.6 Υπολογισμός

Η τιμή που διαβάζεται στο όργανο πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή αραιώσης και η θολερότητα προκύπτει από τη σχέση :

$$N.T.U = \frac{A \times (B+C)}{C}$$

Όπου Α, θολερότητα του αραιωμένου δείγματος, σε N.T.U.

Β, όγκος του νερού διάλυσης, σε mL

С, όγκος του δείγματος, σε mL

(Α.Ρ.Η.Α, Α.Υ.Υ.Α., Υ.Π.Υ.Υ., 1985, Κ. ΖΑΝΝΑΚΗ, Αθήνα 1983)

5.7 Έκφραση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με προσέγγιση που δίνεται στον παρακάτω πίνακα:

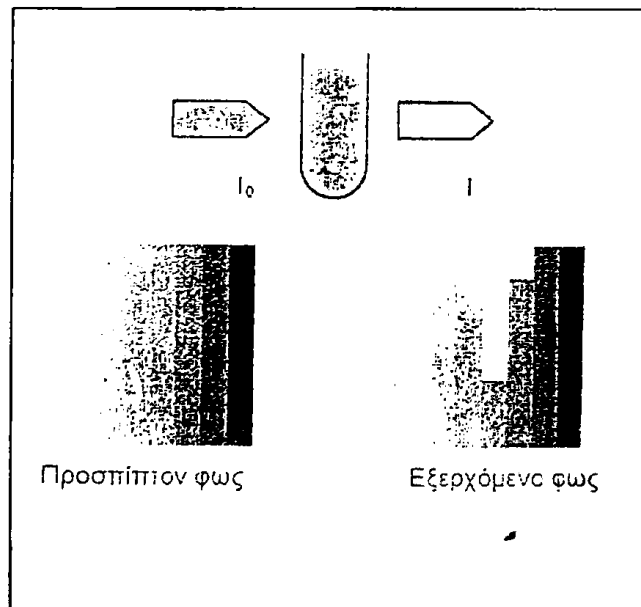
N.T.U	Προσέγγιση
0-1,0	0,05
1-10	0,1
10-40	1
40-100	5
100-400	10
400-1000	50
>1000	100



6. Φωτόμετρα συστήματος και φωτομετρικά τεστ κιτ

6.1 Η φωτομετρία

Όταν διοχετεύεται μέσω ενός έγχρωμου διαλύματος μια δέσμη φωτός τότε παρατηρείται μια ελάττωση της έντασής του. Διαπιστώνεται δηλαδή ότι ένα μέρος του φωτός απορροφάται από το διάλυμα. Ανάλογα με την ουσία η απορρόφηση γίνεται σε ορισμένο μήκος κύματος, όπως δείχνει η παρακάτω απεικόνιση.



Για την επιλογή του μήκους κύματος από το συνολικό φάσμα του λευκού φωτός μιας λάμπας βολφραμίου-αλογόνου χρησιμοποιούνται λεπτά φίλτρα παρεμβολής ή άλλου τύπου μονοχρωμάτορες. Ο χαρακτηρισμός της έντασης της απορρόφησης μπορεί να γίνει μέσω διαπερατότητας T είτε $T\%$

$$T = I/I_0$$

I_0 = Αρχική ένταση του φωτός

I = Ένταση του φωτός μετά την διέλευση

Εάν το φως διερχόμενο από ένα διάλυμα δεν απορροφάται, εμφανίζει μια Διαπερατότητα 100% ενώ όταν απορροφάται τελείως, η Διαπερατότητα είναι 0%. Ως μέτρο για την απορρόφηση του φωτός είναι η Απορρόφηση (A), η οποία βρίσκεται σε άμεση σχέση με τη συγκέντρωση της απορροφητικής ουσίας. Μεταξύ της Απορρόφησης και της Διαπερατότητας υπάρχει η ακόλουθη σχέση:

$$A = -\log T$$



Οι έρευνες του BOUGUER (1698-1758) και του LAMBERT (1728-1777) έδειξαν, ότι η απορρόφηση εξαρτάται από το πάχος της κυψελίδας. Η εξάρτηση της απορρόφησης από τη συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας ανακαλύφθηκε από τον BEER (1825-1863). Ο συνδυασμός των δύο αυτών σχέσεων οδήγησε στον νόμο "Lambert-Beer", που δίδεται με την ακόλουθη σχέση:

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

ϵ_{λ} = μοριακός (ειδικός) συντελεστής απορρόφησης σε l/mol.cm

d = πάχος της κυψελίδας σε cm

c = συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας σε mol/l

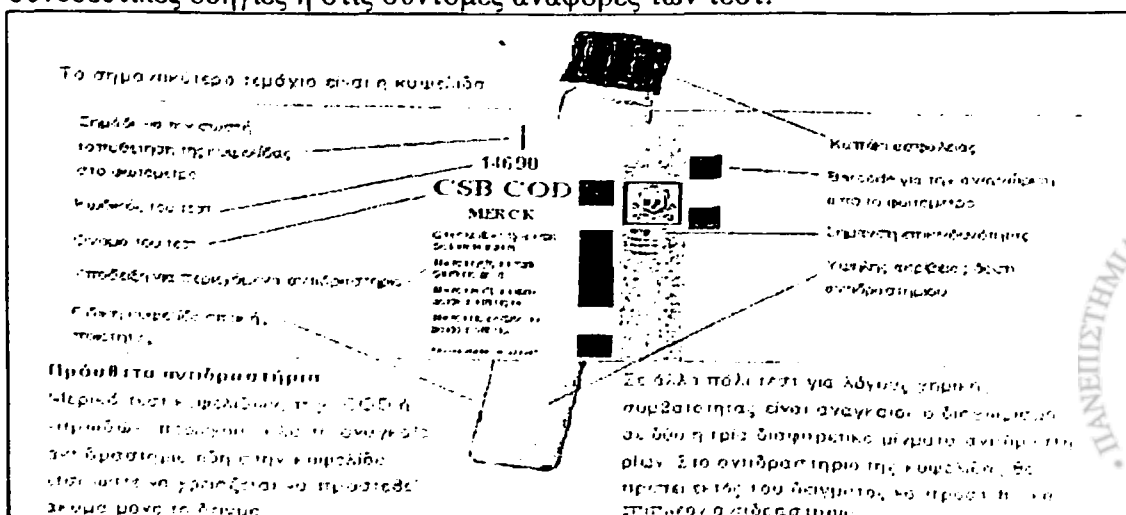
6.2 Τα φωτόμετρα

Τα φωτόμετρα του συστήματος Spectroquant® διαφέρουν από τη συνήθη φωτόμετρα στα ακόλουθα σημαντικά σημεία:

- Οι φωτομετρικές καμπύλες όλων των τεστ είναι αποθηκευμένες.
- Τα αποτελέσματα της μέτρησης προβάλλονται στην επιθυμητή μορφή αμέσως στην οθόνη
- Η επιλογή της μεθόδου γίνεται μέσω της λειτουργίας AutoSelect (του Barcode στις κυψελίδες ή του AutoSelector των τεστ κιτ αντιδραστηρίων).
- Τα φωτόμετρα διαθέτουν λειτουργίες AQA για την διασφάλιση της ποιότητας της μέτρησης
- Οι νέες μέθοδοι καταχωρούνται μόνιμα με τη εναπόθεση του MemoChip στο φωτόμετρο ή ακόμα καλύτερα και συνολικότερα από το site της Merck στο διαδίκτυο.

6.3 Βασικές αρχές φωτομετρικών τεστ κιτ

Το προς ανάλυση συστατικό του δείγματος δημιουργεί με την προσθήκη αντιδραστηρίων μέσω μιας χρωματικής αντίδρασης, μια έγχρωμη ουσία. Τα αντιδραστήρια είτε το μείγμα αντιδραστηρίων εκτός του ειδικού για τον προσδιορισμό της παραμέτρου αντιδραστηρίου περιλαμβάνουν ακόμη μια σειρά βοηθητικών ουσιών, οι οποίες είναι ουσιώδεις για την πορεία της αντίδρασης. Αυτές είναι ρυθμιστικές ουσίες για τη ρύθμιση της ιδανικής για την αντίδραση τιμής του pH και μέσα επικάλυψης, που συμπιέζουν ή ελαχιστοποιούν την επιρροή των ιόντων που παρεμποδίζουν την αντίδραση. Οι χρωματικές αντιδράσεις έχουν ως βάση τις περισσότερες φορές τροποποιημένες κλασικές και συχνά σύμφωνα με τις νόρμες μεθόδους ανάλυσης. Υποδείξεις για τις εκάστοτε μεθόδους αναφοράς δίδονται στις συνοδευτικές οδηγίες ή στις σύντομες αναφορές των τεστ.



Η αρχή των τεστ αντιδραστηρίων βασίζεται στο ότι τα αναγκαία για την χρωματική αντίδραση αντιδραστήρια είναι υπό μορφή υγρών συμπυκνωμάτων ή στερεών μειγμάτων. Για παράδειγμα σε 5 ml δείγματος προστίθενται λίγες σταγόνες του συμπυκνώματος αντιδραστηρίων. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η ακρίβεια προσδιορισμού αφού δεν απαιτείται κάποια μη αναγκαία αραιώση του δείγματος. Το συνηθισμένο στην κλασσική φωτομετρία γέμισμα ογκομετρικών φιαλών σε καθορισμένο όγκο εδώ δεν απαιτείται.

6.4 Υποδείξεις στην πράξη

Η Ένταση του χρωματισμού ενός διαλύματος μετρούμενου ως απορρόφηση, είναι ανάλογο μόνο σε ορισμένη περιοχή της συγκέντρωσης. Αυτή η περιοχή μέτρησης (περιοχή χρήσης) είναι για το κάθε τεστ κιτ ξεχωριστά αποθηκευμένη στο φωτόμετρο. Εκτός των ορίων της περιοχής μέτρησης θα πρέπει είτε να χρησιμοποιηθεί μια άλλη κυψελίδα ή μια άλλη μέθοδος. Το κατώτερο όριο μέτρησης προβάλλεται, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, μέσω της μη γραμμικότητας της φωτομετρικής καμπύλης ή μέσω του ορίου ανίχνευσης. Το όριο ανίχνευσης μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η ελάχιστη συγκέντρωση, η οποία με δεδομένη μια πιθανότητα (π.χ. 95%) διαφέρει από την μηδενική συγκέντρωση.

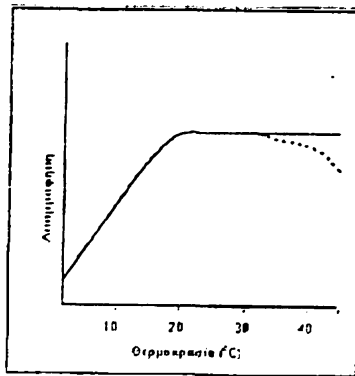
Το ανώτερο όριο μέτρησης χαρακτηρίζεται από την έλλειψη γραμμικής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης και της απορρόφησης. Το δείγμα θα πρέπει να αραιωθεί αντίστοιχα και κατά ιδανικό τρόπο η αναμενόμενη τιμή να είναι στο μέσο του πεδίου χρήσης (μέτρηση με το ελάχιστο λάθος). Στη φωτομετρία είναι σύνηθες οι μετρήσεις να γίνονται σε αντιπαραβολή με το λευκό προσδιορισμό των αντιδραστηρίων. Εδώ η διαδικασία γίνεται «τυφλά». Δηλαδή χωρίς την προσθήκη δείγματος. Αντί του δείγματος προστίθεται η ίδια ποσότητα απεσταγμένου ή απλώς απιονισμένου νερού. Στα φωτόμετρα του συστήματος Spectroquant® αυτή η τιμή του τυφλού των αντιδραστηρίων είναι αποθηκευμένη και δεν απαιτείται πλέον μια ξεχωριστή μέτρηση. Οποσδήποτε όμως η ακρίβεια του προσδιορισμού στα όρια της περιοχής μέτρησης μπορεί να αυξηθεί, εάν διενεργηθεί μια μέτρηση σε αντιπαραβολή με ένα ιδιοχειρως παρασκευασμένο τυφλό διάλυμα αντιδραστηρίων.

Υπάρχουν ακόμα περιπτώσεις όπου η ένταση του χρώματος του διαλύματος και έτσι και η απορρόφηση σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της παραμέτρου, μειώνεται. Αυτά τα παραδείγματα παραθέτονται στον πίνακα. Για τις μέχρι την 3 στήλη αναγραφόμενες συγκεντρώσεις (οριακές τιμές) η ένδειξη είναι σωστή. Πάνω από αυτές τις συγκεντρώσεις οι μετρήσεις που παίρνει κανείς είναι λάθος. Σε αυτή την περίπτωση είναι αναγκαίος ένας έλεγχος αξιοπιστίας με προέλεγχο με ταινίες ανάλυσης (Merckoquant® τεστ) ή αραιώση.

Κωδ. τεστ	Μέθοδος	Οριακή τιμή	Αλλαγή χρώματος
1.14752	Τεστ Αμμωνίου	25 mg/l	Τουρκουάζ αντί πράσινο
1.14558	ΚΤ Αμμωνίου	250 mg/l	Τουρκουάζ αντί πράσινο
1.14544	ΚΤ Αμμωνίου	100 mg/l	Τουρκουάζ αντί πράσινο
1.14559	ΚΤ Αμμωνίου	5000 mg/l	Τουρκουάζ αντί πράσινο
1.14828	Τεστ Χλωρίου	30 mg/l	Κιτρινωπού αντί κόκκινο
1.14557	ΚΤ Φθορίου	4 mg/l	Καφεκίτρινο αντί βιολετί
1.14553	ΚΤ Χαλκού	25 mg/l	Θαλασσί /τουρκουάζ αντί μπλε
1.14767	Τεστ Χαλκού	25 mg/l	Θαλασσί /τουρκουάζ αντί μπλε
1.14551	ΚΤ Φαινόλων	100 mg/l	Αδυνάτισμα του χρώματος
1.14831	Τεστ Αργύρου	5 mg/l	Καμιά αλλαγή (κροκάδωση)

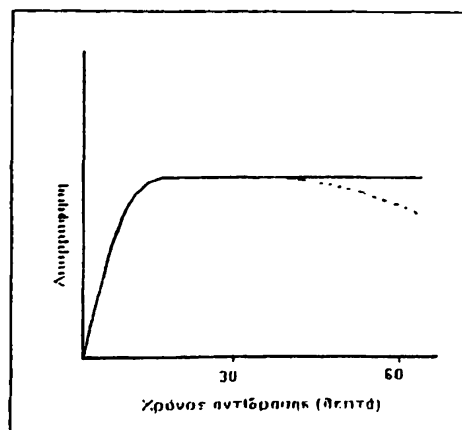
Η πορεία μιας χημικής αντίδρασης είναι ιδανική μόνο σε ένα ορισμένο πεδίο του pH. Τα αντιδραστήρια που υπάρχουν στο τεστ kit ρυθμίζουν επαρκώς το διάλυμα του δείγματος και εισάγουν το ιδανικό για την αντίδραση pH. Πολύ όξινα ($\text{pH} < 2$) και ισχυρά αλκαλικά ($\text{pH} > 12$) διαλύματα μπορεί να παρεμποδίσουν την ιδανική ρύθμιση του pH. Η ρυθμιστική ικανότητα των αντιδραστηρίων του τεστ υπό αυτές τις συνθήκες δεν επαρκεί. Η αναγκαία διόρθωση γίνεται με την προσθήκη σταγόνα-σταγόνα αραιού θειικού οξέος ($0,5 \text{ mol/l}$, μειώνει το pH) ή αραιού καυστικού νατρίου (1 mol/l , αυξάνει το pH). Μετά από κάθε σταγόνα που προστίθεται ελέγχεται η τιμή του pH με μια κατάλληλη ταινία μέτρησης του pH. Με την προσθήκη του οξέος ή της βάσης το διάλυμα του δείγματος αραιώνεται. Όταν προστεθούν μέχρι και 5 σταγόνες σε 10 ml δείγματος η αλλαγή του όγκου δεν θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, διότι το λάθος είναι μικρότερο από 2 %. Μεγαλύτερες όμως ποσότητες θα πρέπει να υπολογιστούν στον όγκο του δείγματος.

Η θερμοκρασία του δείγματος και των αντιδραστηρίων επηρεάζει λιγότερο ή περισσότερο την χρωματική αντίδραση και συνεπώς και το αποτέλεσμα. Το τυπικό διάγραμμα της θερμοκρασίας δίδεται στην παρακάτω απεικόνιση.



Εάν η θερμοκρασία του δείγματος είναι πάνω από τους $15 \text{ }^\circ\text{C}$ τότε θα πρέπει να υπολογίζει κανείς σε χαμηλότερες τιμές από τις αναμενόμενες. Θερμοκρασίες υψηλότερες των $30 \text{ }^\circ\text{C}$ επηρεάζουν συνήθως την σταθερότητα της σχηματιθείσας ένωσης. Η ιδανική περιοχή της θερμοκρασίας για την κάθε φορά χρωματική αντίδραση δίδεται στις συνοδευτικές οδηγίες της συσκευασίας Spectroquant®. Προσοχή! Μετά από θερμική χώνευση, για τον προσδιορισμό του COD ή του ολικού αζώτου, φωσφόρου ή μετάλλων, θα πρέπει να κρατηθεί ο απαραίτητος χρόνος ψύξης στη θερμοκρασία.

Οι περισσότερες χρωματικές αντιδράσεις απαιτούν κάποιο χρόνο μέχρι τον σχηματισμό της μέγιστης έντασης του χρώματος. Η καμπύλη στην διπλανή απεικόνιση δείχνει σχηματικά μια τυπική πορεία του χρόνου. Η συμπεριφορά λιγότερο σταθερών απέναντι στο χρόνο χρωματισμών απεικονίζεται με τη διακεκομμένη γραμμή όπως φαίνεται στη παρακάτω απεικόνιση



Ο χρόνος αντίδρασης που δίδεται στις διαδικασίες ανάλυσης αφορά τη χρονική περίοδο μεταξύ της προσθήκης του τελευταίου αντιδραστήριου και της μέτρησης. Στις συνοδευτικές οδηγίες δίδονται επιπλέον τα χρονικά περιθώρια για κάθε τεστ, μέσα στα οποία η τιμή μέτρησης δεν αλλάζει. Το μέγιστο χρονικό περιθώριο είναι τα 60 λεπτά, το οποίο δεν πρέπει να παραβιάζεται ούτε στην περίπτωση σταθερών χρωματισμών.

7. Μέτρηση συγκεντρώσεων Cd σε ούρα 24ωρου υγιών ατόμων

Έγινε προσδιορισμός των συγκεντρώσεων Cd με φασματογραφία ατομικής απορρόφησης φλόγας στα ούρα 24ώρου υγιών ατόμων της περιοχής της Ηπείρου με στόχο να επιλεγούν οι συγκεντρώσεις Cd που θα χρησιμοποιηθούν στην περαιτέρω μελέτη.

Επελέγησαν 60 υγιή άτομα ηλικίας από 35 έως 45 ετών από τους οποίους 30 ήταν άντρες και 30 ήταν γυναίκες και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες από 30 άτομα η κάθε μια (15 άντρες και 15 γυναίκες) μία καπνιστών έως 20 σιγαρέτα ημερησίως και μία μη καπνιστών.

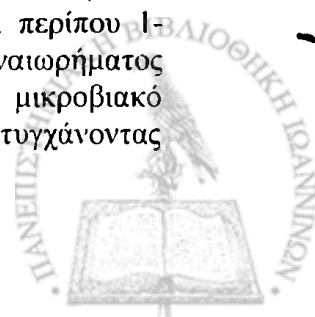
Στα παραπάνω δείγματα έγινε γενική εξέταση ούρων για να διαπιστωθεί ότι τα ούρα είχαν φυσιολογική σύσταση.

8. Παρασκευή διαλυμάτων διαδοχικών αραιώσεων του καδμίου (Cd)

Χρησιμοποιήθηκε σειρά 6 αποστειρωμένων σωληνάρων (13x100mm) με πώμα, σε καθένα από τα οποία προστέθηκαν άσηπτα θρεπτικός ζωμός Mueller Hinton Broth (CM0405, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England), και συγκεκριμένες συγκεντρώσεις Cd, τελικού όγκου 10 ml. Οι συγκεντρώσεις Cd που χρησιμοποιήθηκαν (0,5-1,0-1,5-0,25-0,16 μg/l ή ppb), παρασκευάστηκαν από το μητρικό διάλυμα εργασίας Cd 100 μg/l (ppb) με διαδοχικές αραιώσεις. Οι συγκεντρώσεις Cd μετρήθηκαν με Φασματογραφία Ατομικής απορρόφησης (AAS). Τα διαλύματα του μετάλλου επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα εξεταζόμενα δείγματα και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στις μετρήσεις που έγιναν με το φωτόμετρο μετά από 24 ώρες επώασης.

9. Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος με τα βακτήρια *E.coli* και *P. mirabilis*.

Χρησιμοποιήθηκε μια σειρά 6 αποστειρωμένων σωληνάρων (13x100mm) για την παρασκευή διαλυμάτων με θρεπτικό ζωμό Mueller Hinton Broth (CM0405, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) και αραιώσεις Cd 0,5 - 1,0 - 1,5 - 0,25 - 0,16 μg/l με μικροβιακό εναιώρημα βακτηρίων *E.coli* και *P. mirabilis*. Για τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκαν 24ωρα καθαρά καλλιεργήματα. Παρασκευάστηκαν μικροβιακά εναιωρήματα θολρότητας ίσης με το πρότυπο Mac Farland 0.5 (Vitek Densichek, Biomerieux, Marcy l' Etoile, France), που αντιπροσωπεύει περίπου $1-1.5 \times 10^8$ cfu/ml (Isenberg 2004, CLSI 2006). Η απορρόφηση του εναιωρήματος ποικίλλει από 0,080 έως 0,100 σε μήκος κύματος 600 nm. Από το μικροβιακό εναιώρημα προστέθηκε όγκος 35 μl σε κάθε σωληνάριο (10 ml), επιτυγχάνοντας τελική πυκνότητα του ενοφθαλμίσματος 5×10^5 cfu/ml.



10. Επώαση ανάγνωση και ενοφθαλμισμός

Τα σωληνάρια με θρεπτικό ζωμό Mueller Hinton Broth (CM0405, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England). Cd και βακτήρια *E.Coli* και *P. Mirabilis* επώαστηκαν στους 37 °C αεροβίως ενώ παράλληλα στις 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, και 48 ώρες γινόταν 1) ενοφθαλμισμός 10 μl από κάθε αραιώση σε στερεά θρεπτικά υλικά υποστρώματα Mueller Hinton Agar (MHA, CM0337, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England), τα οποία επωάζονταν για 24 με 48 ώρες στους 37 °C αεροβίως, και 2) φωτομέτρηση σε 600 nm κάθε σωληναρίου της πειραματικής σειράς για προσδιορισμό της θολερότητας.

Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν:

- Ένα σωληνάριο χωρίς ενοφθάμισμα μικροοργανισμού και Cd, ως τυφλό του φωτομέτρου.

- Σειρά σωληναρίων με θρεπτικό ζωμό και Cd στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (0,5 - 1,0 - 1,5 - 0,25 - 0,16 μg/l) που επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα εξεταζόμενα δείγματα και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στις μετρήσεις που έγιναν στο φωτόμετρο μετά από επώαση 24 ωρών.

- Ένα σωληνάριο με ζωμό και ενοφθάμισμα που επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες με τα εξεταζόμενα δείγματα στους 37 °C για 24 ώρες και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας του κάθε μικροοργανισμού.

Ο προσδιορισμός της καμπύλης ανάπτυξης (MIC) έγινε με δύο τρόπους: 1) Με την ανάγνωση των τρυβλίων όλων των αραιώσεων που εμβολιάστηκαν μετά από 24 και 48 h επώασης. 2) Με προσδιορισμό της απορρόφησης με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 600 nm για κάθε σωληνάριο της πειραματικής σειράς. Σύμφωνα με τους Si et al 2006 η αναστολή ανάπτυξης (inhibition) του μικροοργανισμού εκφράζεται από τον τύπο:

Inhibition % = $\{Abs(M) - Abs(\delta) / Abs(M)\} \times 100$, όπου,

Abs(M): η απορρόφηση του μάρτυρα του μικροβιακού στελέχους μετά από επώαση 24 ωρών

Abs(δ): η διαφορά απορροφήσεων ανάμεσα στ εξεταζόμενο δείγμα συγκεκριμένης αραιώσης του Cd στη χρονική στιγμή t=24h και του μάρτυρα Cd στην ίδια αραιώση και χρονική στιγμή.

Στις 48 ώρες ανακαλλιεργήθηκε ο μικροοργανισμός από όλα τα σωληνάρια της σειράς στο θρεπτικό άγαρ (48h επώασης).

11. Έλεγχος ευαισθησίας των βακτηρίων *E.Coli* και *P. Mirabilis* στα αντιβιοτικά

Για την ταυτοποίηση των στελεχών και τον έλεγχο ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek II (BioMerieux, France), η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ Bauer – Kirby (Λρσένη 1994, Lorian 2005, CLSI 2006, Koneman 2006) και η μέθοδος προσδιορισμού της MIC με τη χρήση ταινιών που φέρουν διαβάθμιση πυκνότητας, E – test (De La Maza 2001, Lorian 2005, Koneman 2006).

Ο έλεγχος ευαισθησίας των βακτηρίων *Escherichia Coli* και *Proteus Mirabilis* σε διάφορα αντιβιοτικά έγινε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και απεικονίζεται στους παρακάτω πίνακες:



(R=ανθεκτικό, S= ευαίσθητο, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας)

Αντιβιοτικό	<i>Escherichia Coli</i>
Amikacin	S
Amoxicillin/CA	S
Ampicillin	R
Cefaclor	S
Cefotaxime	S
Cefoxitin	S
Ceftazidime	S
Cefuroxime	S
Cephalothin	S
Ciprofloxacin	S
Gentamicin	S
Imipenem	S
Nalidixic Acid	S
Netilmicin	S
Norfloxacin	S
Ofloxacin	S
Piperacillin/tazobac	S
Ticarcillin	R
Ticarcillin/CA	S
Tobramycin	S
Trimethoprim/Sulfa	S
Nitrofurantoin	S

(R=ανθεκτικό, S= ευαίσθητο, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας)

Αντιβιοτικό	<i>Proteus Mirabilis</i>
Amikacin	S
Amoxicillin/CA	S
Ampicillin	S
Cefaclor	S
Cefotaxime	S
Cefoxitin	S
Ceftazidime	S
Cefuroxime	S
Cephalothin	S
Ciprofloxacin	I
Gentamicin	S
Imipenem	S
Nalidixic Acid	R
Netilmicin	S
Norfloxacin	S
Ofloxacin	S
Piperacillin/tazobac	S
Ticarcillin	S
Ticarcillin/CA	S
Tobramycin	S
Trimethoprim/Sulfa	R
Nitrofurantoin	R



III ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μετρήσεις Cd στα ούρα 24ώρου υγιών ατόμων

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσδιορισμός συγκέντρωσης Cd στα ούρα υγιών ασθενών με ατομική απορρόφηση φλόγας με τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας III 1. Συγκεντρώσεις Cd στα ούρα 24ώρου υγιών ανδρών

Καπνιστές			Μη καπνιστές		
No	Τιμές Cd (μg/l)	Ηλικία	No	Τιμές Cd (μg/l)	Ηλικία
1	0,4	35	1	0,9	36
2	1,0	43	2	0,8	35
3	0,6	40	3	0,4	37
4	1,1	45	4	1,0	45
5	0,6	37	5	0,6	38
6	1,5	45	6	0,9	40
7	0,8	38	7	1,6	44
8	0,4	36	8	0,3	35
9	0,9	37	9	0,8	39
10	1,4	42	10	1,5	44
11	0,6	41	11	0,4	44
12	0,9	43	12	0,7	42
13	0,4	35	13	0,4	40
14	0,8	39	14	0,6	43
15	1,4	44	15	1,0	45
M.O.	0,85	40	M.O.	0,79	40,46
S D	± 0,37	± 3,56	S D	± 0,38	± 3,66

Πίνακας III 2. Συγκεντρώσεις Cd στα ούρα 24ώρου υγιών γυναικών

Καπνίστριες			Μη καπνίστριες		
No	Τιμές Cd (μg/l)	Ηλικία	No	Τιμές Cd (μg/l)	Ηλικία
1	0,3	37	1	1,0	40
2	0,8	39	2	0,4	36
3	0,9	42	3	0,5	38
4	1,0	35	4	0,3	37
5	0,8	44	5	0,8	42
6	1,3	45	6	1,1	45
7	0,7	35	7	0,7	40
8	0,6	44	8	0,6	35
9	1,5	45	9	0,4	39
10	0,5	35	10	1,1	43
11	0,7	37	11	0,7	44
12	0,4	35	12	0,4	38
13	0,7	45	13	0,3	35
14	0,9	43	14	0,4	41
15	0,9	38	15	0,6	37
M.O.	0,83	39,9	M.O.	0,65	39,3
S D	±0,31	±4,16	S D	±0,27	±3,17



Για να είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές στις τιμές πρέπει $p < 0,05$. Συνεπώς οι υπολογισμοί από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στους πίνακες III 1 και III 2 έδειξαν ότι:

- 1) Οι διαφορές στις τιμές του Cd ανάμεσα σε άνδρες καπνιστές και μη καπνιστές δεν είναι στατιστικά σημαντικές, $p=0,25$
- 2) Οι διαφορές στις τιμές του Cd ανάμεσα σε γυναίκες καπνίστριες και μη καπνίστριες δεν είναι στατιστικά σημαντικές, $p=0,074$
- 3) Οι διαφορές στις τιμές του Cd ανάμεσα σε άνδρες καπνιστές και σε γυναίκες καπνίστριες δεν είναι στατιστικά σημαντικές, $p=0,29$
- 4) Οι διαφορές στις τιμές του Cd ανάμεσα σε άνδρες μη καπνιστές και σε γυναίκες μη καπνίστριες είναι στατιστικά σημαντικές, $p=0,045$

2. Οι επιδράσεις του καδμίου (Cd) στην ανάπτυξη των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*

Στην πειραματική μελέτη που πραγματοποιήθηκε έγινε προσδιορισμός των τιμών Απορρόφησης και Θολερότητας στο χρόνο μεταξύ 6 διαφορετικών συγκεντρώσεων Cd για τις οποίες έγιναν καταγραφές και συγκεκριμένα για τις:

- 0,00 $\mu\text{g/l}$ (ppb) Cd
- 0,16 $\mu\text{g/l}$ (ppb) Cd
- 0,25 $\mu\text{g/l}$ (ppb) Cd
- 0,50 $\mu\text{g/l}$ (ppb) Cd
- 1,00 $\mu\text{g/l}$ (ppb) Cd
- 1,50 $\mu\text{g/l}$ (ppb) Cd

Οι μετρήσεις των τιμών Απορρόφησης και Θολερότητας για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις που αναφερθήκανε πραγματοποιήθηκαν σε 7 χρονικές στιγμές.

Στο χρόνο προσθήκης του Καδμίου (0 ώρες μετά)

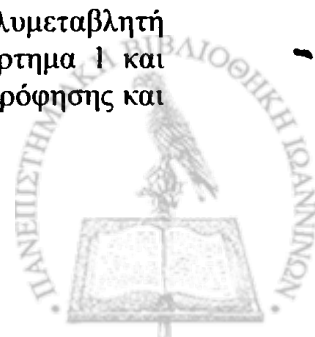
- 2 ώρες μετά
- 4 ώρες μετά
- 6 ώρες μετά
- 8 ώρες μετά
- 12 ώρες μετά
- 24 ώρες μετά

Οι μετρήσεις έγιναν για δύο διαφορετικά βακτήρια την *Escherichia coli* και τον *Proteus mirabilis*.

Εξετάστηκε αν οι τιμές της Απορρόφησης και της Θολερότητας διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα:

- 1) Με τη συγκέντρωση στην οποία γίνεται η μέτρηση
- 2) Με το βακτήριο που χρησιμοποιείται και
- 3) Με την αλληλεπίδρασή τους.

Προκειμένου να εντοπιστούν οι διαφορές αυτές εφαρμόστηκε πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Στο παράρτημα 1 και στον πίνακα Δ παρατίθενται οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις απορρόφησης και θολερότητας ανά βακτήριο και συγκέντρωση αλλά και συνολικά



Από τον πίνακα III 3 φαίνεται ότι η συγκέντρωση του Cd (concentration), το είδος του βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*) και η αλληλεπίδρασή τους επιδρούν σημαντικά τόσο στην εξέλιξη των τιμών απορρόφησης και θολερότητας με την πάροδο του χρόνου (within subjects effects), όσο και στις διαφορές μεταξύ των ομάδων (between subjects effects). Σύμφωνα με τον πίνακα οι p-values σε κάθε περίπτωση είναι ίσες με 0.000.

Πιο συγκεκριμένα όπως φαίνεται και από τον πίνακα III4 και τον έλεγχο Pillai's Trace αλλά και από τον πίνακα III5 και τον έλεγχο Greenhouse – Geisser, η συγκέντρωση του Cd (concentration), το είδος του βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*) και η αλληλεπίδρασή τους είναι παράγοντες που επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά τη μεταβολή των τιμών απορρόφησης και θολερότητας από τη μια χρονική στιγμή στην άλλη. Σε κάθε περίπτωση p-value= 0.000.

Επίσης σημαντικοί είναι οι δύο αυτοί παράγοντες και η αλληλεπίδρασή τους και για τις διαφορές στα επίπεδα απορρόφησης και θολερότητας μεταξύ δύο ομάδων (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* ή δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις Cd) σε όλες τις χρονικές στιγμές που εξετάζονται, όπως φαίνεται και από τον πίνακα III6. Και στην περίπτωση αυτή η p-value είναι πάντα ίση με 0.000.

Πίνακας III 3. Επιδράσεις του Cd και των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στην απορρόφηση και στην θολερότητα

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	
Between Subjects	Intercept	Pillai's Trace	1,000	2E+007 ^a	2,000	23,000	,000
		Wilks' Lambda	,000	2E+007 ^a	2,000	23,000	,000
		Hotelling's Trace	1417366	2E+007 ^a	2,000	23,000	,000
		Roy's Largest Root	1417366	2E+007 ^a	2,000	23,000	,000
	concentration	Pillai's Trace	1,239	7,821	10,000	48,000	,000
		Wilks' Lambda	,000	730,511 ^a	10,000	46,000	,000
		Hotelling's Trace	19423,899	42732,578	10,000	44,000	,000
		Roy's Largest Root	19423,584	93233,204 ^b	5,000	24,000	,000
	Coli_Pro	Pillai's Trace	1,000	190230,2 ^a	2,000	23,000	,000
		Wilks' Lambda	,000	190230,2 ^a	2,000	23,000	,000
		Hotelling's Trace	16541,757	190230,2 ^a	2,000	23,000	,000
		Roy's Largest Root	16541,757	190230,2 ^a	2,000	23,000	,000
	concentration * Coli_Pro	Pillai's Trace	1,230	7,674	10,000	48,000	,000
		Wilks' Lambda	,002	98,104 ^a	10,000	46,000	,000
		Hotelling's Trace	381,652	839,634	10,000	44,000	,000
		Roy's Largest Root	381,348	1830,470 ^b	5,000	24,000	,000
Within Subjects	Χρόνος	Pillai's Trace	1,000	3424695 ^a	12,000	13,000	,000
		Wilks' Lambda	,000	3424695 ^a	12,000	13,000	,000
		Hotelling's Trace	3161257	3424695 ^a	12,000	13,000	,000
		Roy's Largest Root	3161257	3424695 ^a	12,000	13,000	,000
	Χρόνος * concentration	Pillai's Trace	4,804	34,662	60,000	85,000	,000
		Wilks' Lambda	,000	1524,778	60,000	64,652	,000
		Hotelling's Trace	48136,258	9145,889	60,000	57,000	,000
		Roy's Largest Root	37388,008	52966,345 ^b	12,000	17,000	,000
	Χρόνος * Coli_Pro	Pillai's Trace	1,000	39501,941 ^a	12,000	13,000	,000
		Wilks' Lambda	,000	39501,941 ^a	12,000	13,000	,000
		Hotelling's Trace	36463,330	39501,941 ^a	12,000	13,000	,000
		Roy's Largest Root	36463,330	39501,941 ^a	12,000	13,000	,000
	Χρόνος * concentration * Coli_Pro	Pillai's Trace	4,892	63,894	60,000	85,000	,000
		Wilks' Lambda	,000	710,168	60,000	64,652	,000
		Hotelling's Trace	12690,063	2411,112	60,000	57,000	,000
		Roy's Largest Root	9363,329	13264,716 ^b	12,000	17,000	,000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level

c.

Design: Intercept+concentration+Coli_Pro+concentration * Coli_Pro
Within Subjects Design Χρόνος



Πίνακας III 4. Επιδράσεις του Cd και των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στην απορρόφηση και στην θολερότητα (Έλεγχος Pillai's Trace)

Within Subjects Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Χρόνος	Pillai's Trace	1,096	29,125	12,000	288,000	,000
	Wilks' Lambda	,000	8090,250 ^a	12,000	286,000	,000
	Hotelling's Trace	104723,2	1239225	12,000	284,000	,000
	Roy's Largest Root	104723,1	2513355 ^b	6,000	144,000	,000
Χρόνος * concentration	Pillai's Trace	1,336	9,660	60,000	288,000	,000
	Wilks' Lambda	,000	228,037 ^a	60,000	286,000	,000
	Hotelling's Trace	1581,602	3743,126	60,000	284,000	,000
	Roy's Largest Root	1581,095	7589,255 ^b	30,000	144,000	,000
Χρόνος * Coli_Pro	Pillai's Trace	1,043	26,173	12,000	288,000	,000
	Wilks' Lambda	,001	849,282 ^a	12,000	286,000	,000
	Hotelling's Trace	1281,931	15169,511	12,000	284,000	,000
	Roy's Largest Root	1281,884	30765,225 ^b	6,000	144,000	,000
Χρόνος * concentration * Coli_Pro	Pillai's Trace	1,406	11,365	60,000	288,000	,000
	Wilks' Lambda	,001	132,222 ^a	60,000	286,000	,000
	Hotelling's Trace	488,498	1156,112	60,000	284,000	,000
	Roy's Largest Root	487,808	2341,480 ^b	30,000	144,000	,000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c.

Design: Intercept+concentration+Coli_Pro+concentration * Coli_Pro

Within Subjects Design: Χρόνος

d. Tests are based on averaged variables.

Πίνακας III 5. Επιδράσεις του Cd και των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στην απορρόφηση και στην θολερότητα (Έλεγχος Greenhouse – Geisser)

Source	Measure		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Χρόνος	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	14,987	6	2,498	2040337	,000
		Greenhouse-Geisser	14,987	2,861	5,238	2040337	,000
		Huynh-Feldt	14,987	4,778	3,137	2040337	,000
		Lower-bound	14,987	1,000	14,987	2040337	,000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	3313565,128	6	552260,855	2428691	,000
		Greenhouse-Geisser	3313565,128	2,463	1345364,948	2428691	,000
		Huynh-Feldt	3313565,128	4,024	823440,440	2428691	,000
		Lower-bound	3313565,128	1,000	3313565,128	2428691	,000
Χρόνος * concentration	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	,224	30	,007	6101,359	,000
		Greenhouse-Geisser	,224	14,306	,016	6101,359	,000
		Huynh-Feldt	,224	23,891	,009	6101,359	,000
		Lower-bound	,224	5,000	,045	6101,359	,000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	50210,964	30	1673,699	7360,466	,000
		Greenhouse-Geisser	50210,964	12,315	4077,305	7360,466	,000
		Huynh-Feldt	50210,964	20,120	2495,544	7360,466	,000
		Lower-bound	50210,964	5,000	10042,193	7360,466	,000
Χρόνος * Coli_Pro	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	,185	6	,031	25231,509	,000
		Greenhouse-Geisser	,185	2,861	,065	25231,509	,000
		Huynh-Feldt	,185	4,778	,039	25231,509	,000
		Lower-bound	,185	1,000	,185	25231,509	,000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	40393,171	6	6732,195	29606,337	,000
		Greenhouse-Geisser	40393,171	2,463	16400,329	29606,337	,000
		Huynh-Feldt	40393,171	4,024	10037,941	29606,337	,000
		Lower-bound	40393,171	1,000	40393,171	29606,337	,000
Χρόνος * concentration * Coli_Pro	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	,070	30	,002	1894,568	,000
		Greenhouse-Geisser	,070	14,306	,005	1894,568	,000
		Huynh-Feldt	,070	23,891	,003	1894,568	,000
		Lower-bound	,070	5,000	,014	1894,568	,000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	15456,933	30	515,231	2265,844	,000
		Greenhouse-Geisser	15456,933	12,315	1255,157	2265,844	,000
		Huynh-Feldt	15456,933	20,120	768,228	2265,844	,000
		Lower-bound	15456,933	5,000	3091,387	2265,844	,000
Error(Χρόνος)	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	,000	144	1,22E-006		
		Greenhouse-Geisser	,000	68,669	2,57E-006		
		Huynh-Feldt	,000	114,675	1,54E-006		
		Lower-bound	,000	24,000	7,35E-006		
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	32,744	144	,227		
		Greenhouse-Geisser	32,744	59,111	,554		
		Huynh-Feldt	32,744	96,577	,339		
		Lower-bound	32,744	24,000	1,364		

Πίνακας III 6. Επιδράσεις του Cd και των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στην απορρόφηση και στην θολερότητα μεταξύ δύο ομάδων, σε όλες τις χρονικές στιγμές

Tests of Between-Subjects Effects

Transformed Variable: Average

Source	Measure	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Απορρόφηση	60,157	1	60,157	3E+007	,000
	Θολερότητα	13284467,7	1	13284467,73	3E+007	,000
concentration	Απορρόφηση	,827	5	,165	76773,143	,000
	Θολερότητα	182035,883	5	36407,177	93217,713	,000
Coli_Pro	Απορρόφηση	,700	1	,700	325078,8	,000
	Θολερότητα	155046,133	1	155046,133	396983,4	,000
concentration * Coli_Pro	Απορρόφηση	,017	5	,003	1548,370	,000
	Θολερότητα	3567,968	5	713,594	1827,100	,000
Error	Απορρόφηση	5,17E-005	24	2,15E-006		
	Θολερότητα	9,373	24	,391		

Οι διαφορές στις τιμές απορρόφησης (absorbance) μεταξύ των 6 διαφορετικών συγκεντρώσεων του Cd αποδίδονται από τα γραφήματα των σχημάτων III 1 και III 2 για την *Escherichia coli* και τον *Proteus mirabilis* αντίστοιχα. Από το γράφημα του σχήματος III 1, για το βακτήριο *Escherichia coli* και από το γράφημα του σχήματος III 2 για το βακτήριο *Proteus mirabilis*, φαίνεται ότι οι μεγαλύτερες διαφορές εντοπίζονται μεταξύ της συγκέντρωσης 0,16 µg/l και 1,50 µg/l Cd, σε όλες τις χρονικές στιγμές εξαιρουμένης της πρώτης (χρόνος 0) ενώ διαφορές ενδέχεται να εμφανίζονται μεταξύ 0,16 µg/l και 1 µg/l Cd, ή και μεταξύ 0 και 1,50 µg/l Cd, σε λίγες μόνο χρονικές στιγμές. Για την επαλήθευση των ενδείξεων αυτών χρησιμοποιούνται πολλαπλές συγκρίσεις με παραμετρικούς ελέγχους (Tukey, Sheffe, Bonferroni, LSD) και με τον μη παραμετρικό έλεγχο Tamhane. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Παράρτημα 2. Οι παραμετρικοί έλεγχοι οδηγούν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων, αποτέλεσμα που όμως δεν επαληθεύεται από τον μη παραμετρικό έλεγχο ο οποίος είναι και πιο κατάλληλος λόγω του αριθμού μετρήσεων που έχουν ληφθεί. Από τον έλεγχο αυτό προκύπτει ότι μεταξύ των συγκεντρώσεων 0,16 µg/l και 1,50 µg/l Cd υπάρχει, σε επίπεδο σημαντικότητας 95%, στατιστικά σημαντική διαφορά για όλες τις χρονικές στιγμές εκτός από τη στιγμή 0 (P-value = 0.017).

Επομένως οι τιμές της απορρόφησης είναι σημαντικά υψηλότερες στις χρονικές στιγμές αυτές για τη συγκέντρωση 0.16 µg/l Cd σε σχέση με τη συγκέντρωση 1.50 µg/l Cd. Σημαντικές φαίνεται να είναι και οι διαφορές μεταξύ 0 και 1.50 (p-value = 0,41) και μεταξύ 0,16 και 1 (p-value = 0,37). Όμως οι οριακές p-values που προκύπτουν ενισχύουν την εντύπωση ότι οι διαφορές που εντοπίζονται δεν είναι στατιστικά σημαντικές σε όλες τις χρονικές στιγμές.

Στα γραφήματα των σχημάτων III 3 έως και III 8 φαίνονται ανά συγκέντρωση Cd οι διαφορές στις τιμές της απορρόφησης για τα δύο βακτήρια *Escherichia coli* και τον *Proteus mirabilis*. Φαίνεται επομένως ότι για τις τιμές απορρόφησης όταν το βακτήριο είναι η *Escherichia coli* οι τιμές είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές που καταγράφονται για το βακτήριο *Proteus mirabilis*. Το αποτέλεσμα αυτό ισχύει για όλες τις συγκεντρώσεις και όλες τις χρονικές στιγμές εκτός από την πρώτη (Χρόνος = 0 ώρες).

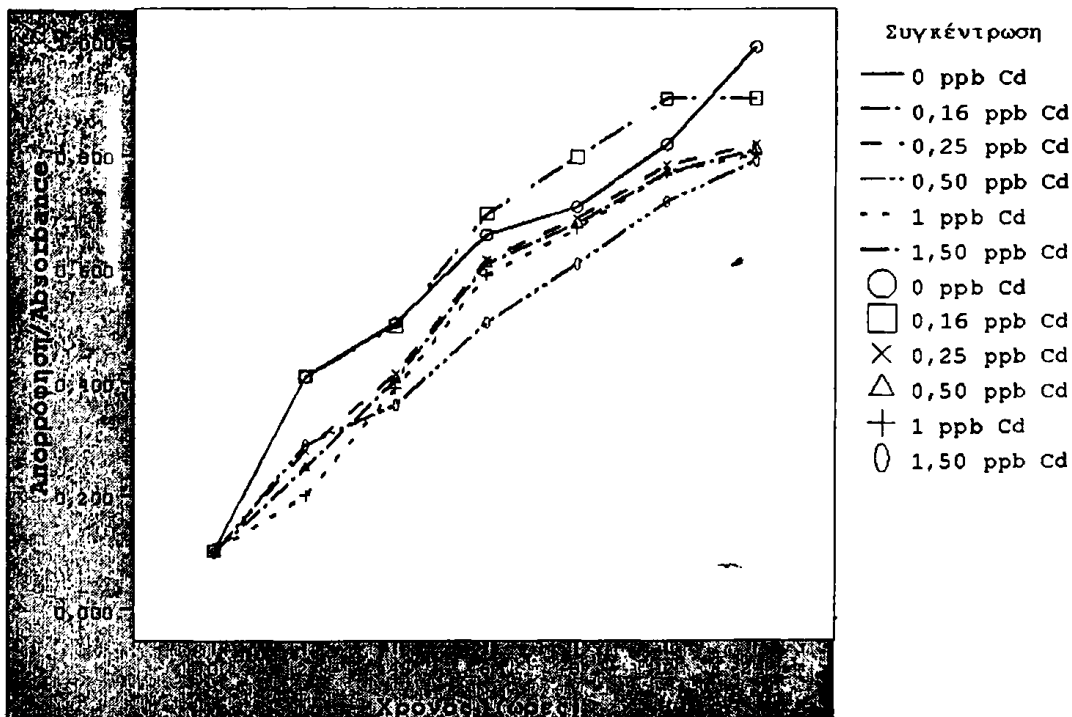


Στα ανάλογα γραφήματα παρατίθενται και οι τιμές της θολερότητας (NTU), τα οποία απεικονίζονται στα σχήματα III 9 και III 10 αντιστοίχως για τα δύο βακτήρια *Escherichia coli* και τον *Proteus mirabilis* και στα III 11 έως και III 16 για την κάθε συγκέντρωση Cd. Τα αποτελέσματα για την περίπτωση όπου μετριέται η θολερότητα είναι ακριβώς τα ίδια με την περίπτωση των μετρήσεων απορρόφησης. Εντοπίζονται δηλαδή ακριβώς οι ίδιες στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Τέλος στα σχήματα III 17 και III 18 απεικονίζεται η ανάπτυξη αποικιών στα στερεά υποστρώματα των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* αντίστοιχα μετά από ενοφθαλμισμό υπό τις δεδομένες συνθήκες επώασης (βλ. υλικά και μέθοδοι). Φαίνονται καθαρά οι διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων Cd, 0,16 μg/l και 1,50 μg/l και στα δύο βακτήρια. Η ανάπτυξη των αποικιών στην συγκέντρωση 0,16 μg/l Cd είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στα 0 μg/l Cd, ενώ η ανάπτυξη των αποικιών στην συγκέντρωση 1,50 μg/l Cd είναι εμφανώς μικρότερη από αυτή που παρατηρείται στα 0 και στα 0,16 μg/l Cd όπως επίσης και στις άλλες συγκεντρώσεις Cd (0,25, 0,5, και 1 μg/l).

E.Coli

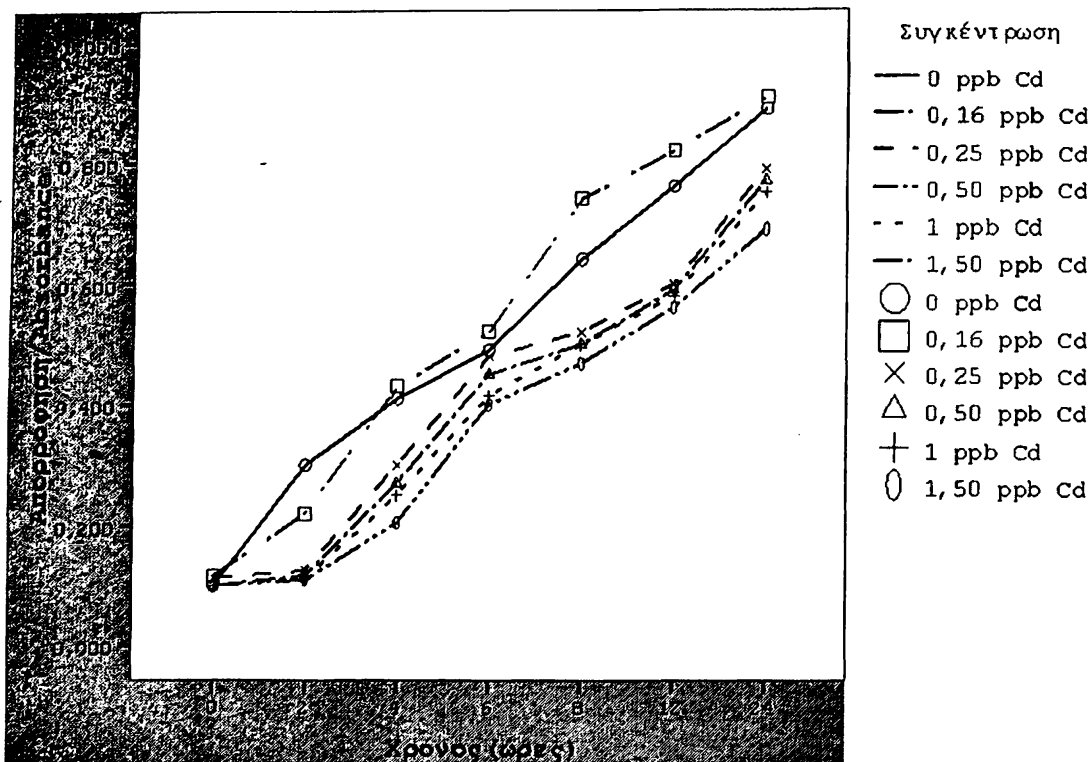
at Βακτήριο = E.Coli



Σχήμα III 1. Διαφορές στις τιμές απορρόφησης (absorbance) μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων Cd για το βακτήριο *Escherichia coli*

Estimated Marginal Means of Απορρόφηση

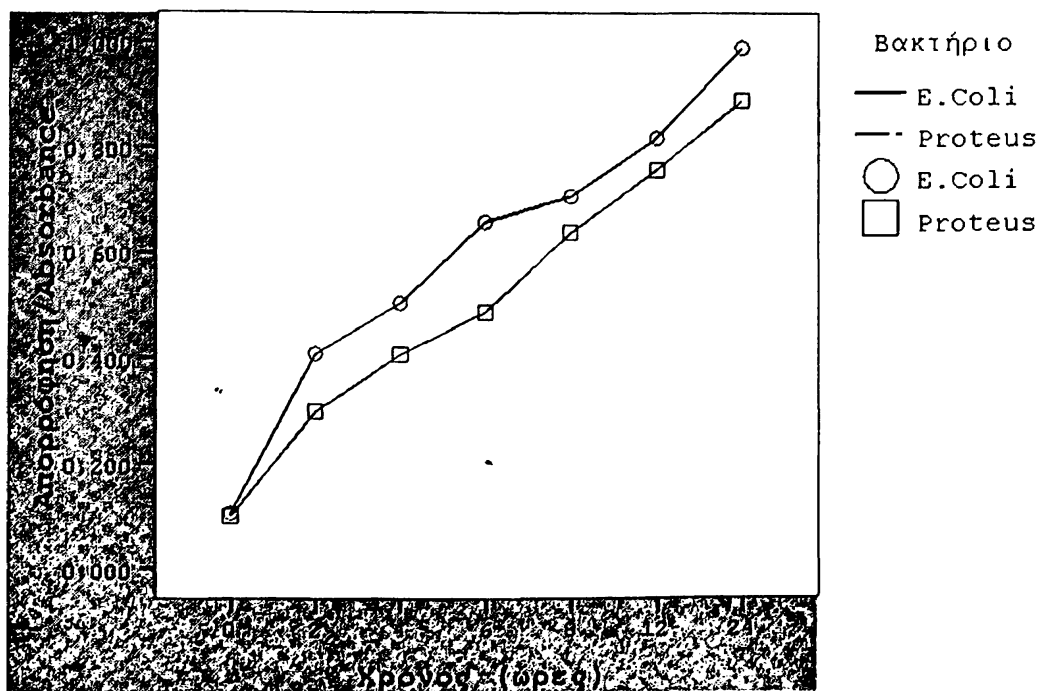
at Βακτήριο = Proteus



Σχήμα III 2. Διαφορές στις τιμές απορρόφησης (absorbance) μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων Cd για το βακτήριο *Proteus mirabilis*

Estimated Marginal Means of Απορρόφηση

at Συγκέντρωση = 0 ppb Cd

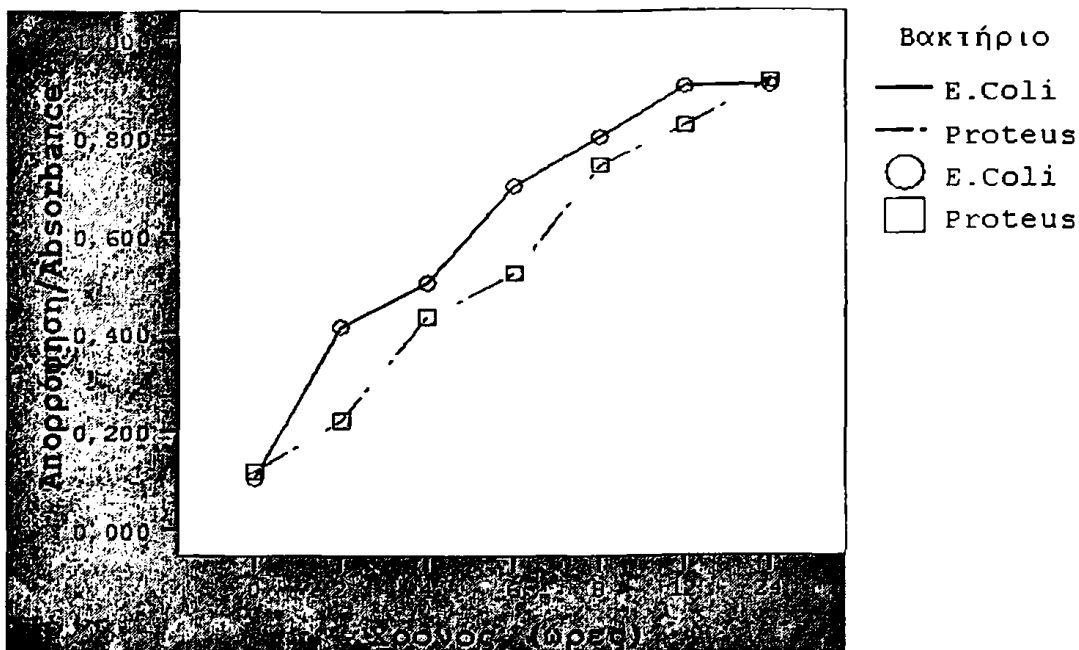


Σχήμα III 3. Οι διαφορές τιμών απορρόφησης για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 0 μg/l (ppb) Cd



Estimated Marginal Means of Απορρόφηση

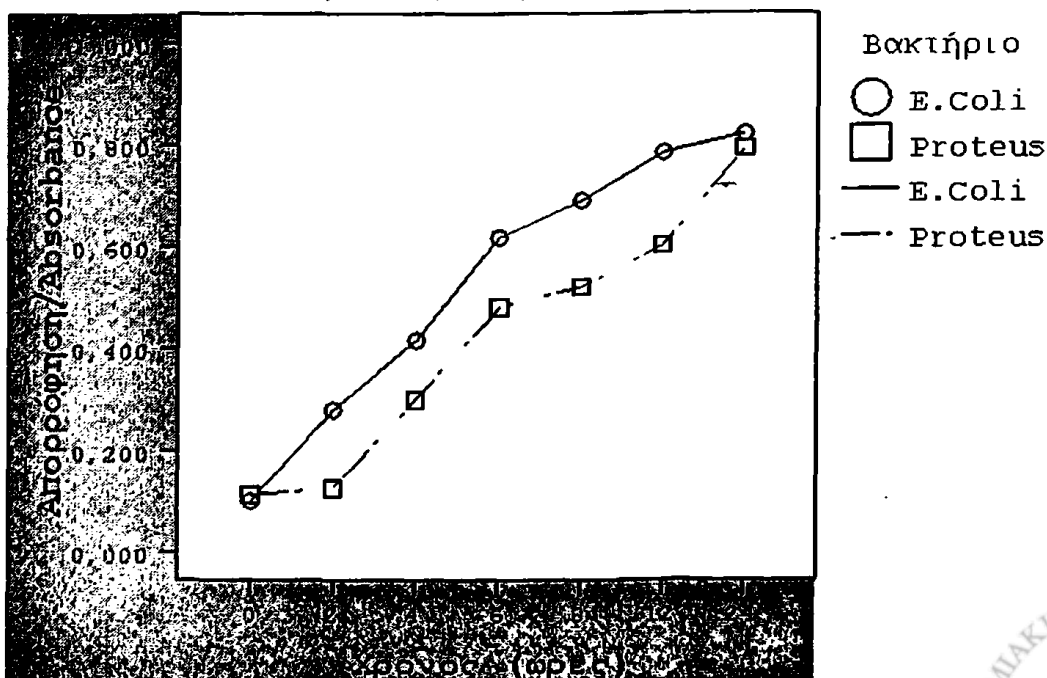
at Συγκέντρωση = 0,16 ppb Cd



Σχήμα III 4. Οι διαφορές τιμών απορρόφησης για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 0,16 μg/l (ppb) Cd

Estimated Marginal Means of Απορρόφηση

at Συγκέντρωση = 0,25 ppb Cd

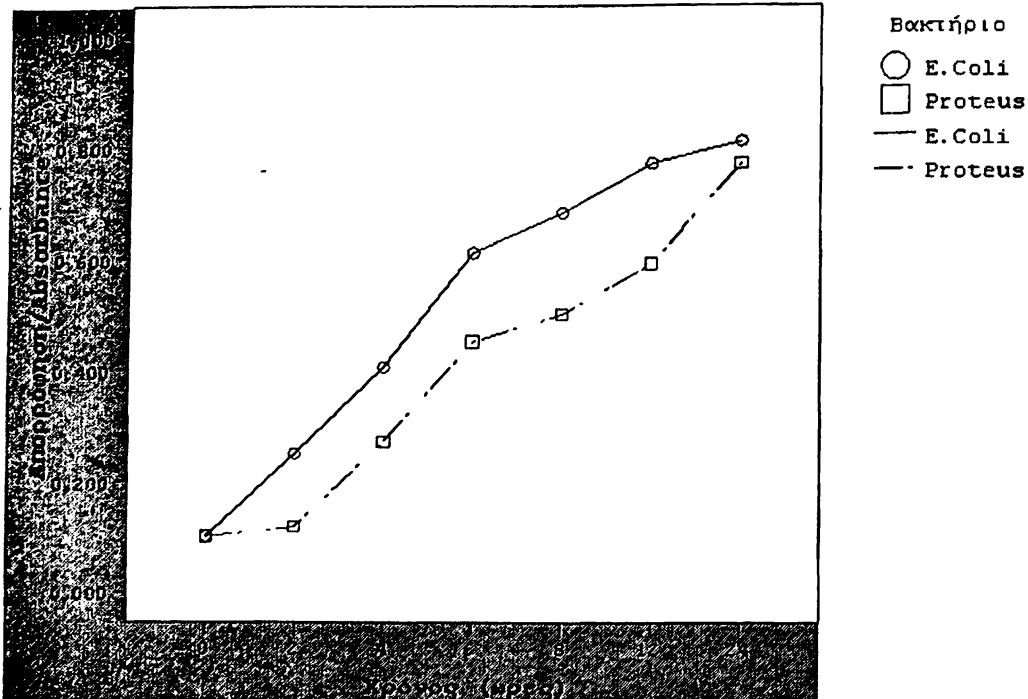


Σχήμα III 5. Οι διαφορές τιμών απορρόφησης για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωσή 0,25 μg/l (ppb) Cd



Estimated Marginal Means of Απορρόφηση

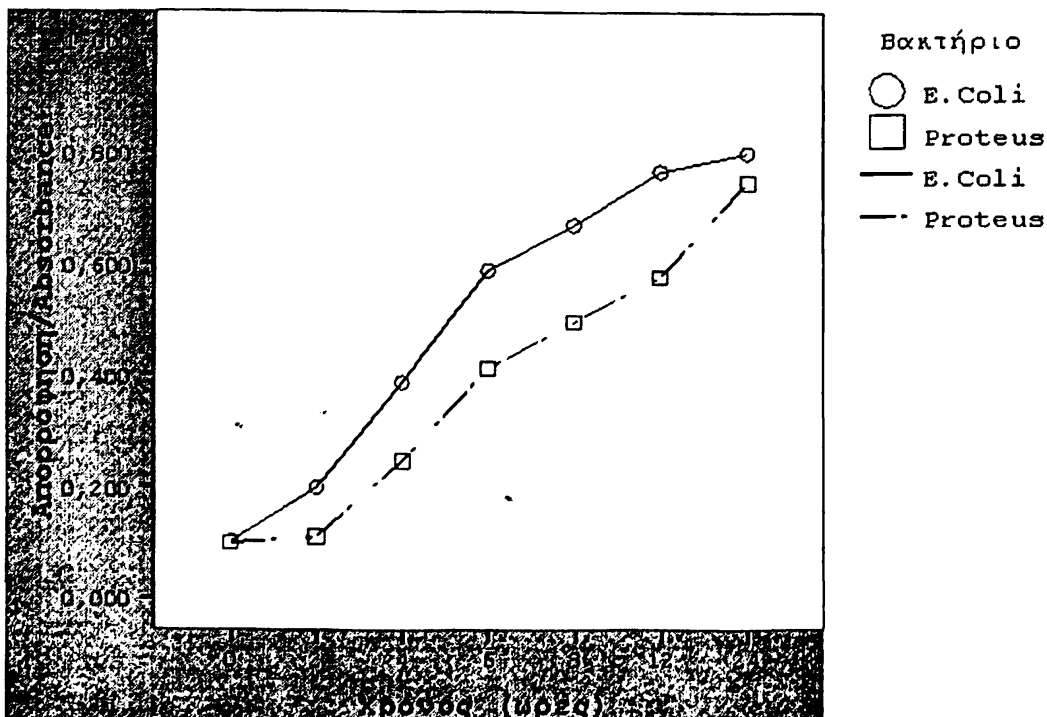
at Συγκέντρωση = 0,50 ppb Cd



Σχήμα III 6. Οι διαφορές τιμών απορρόφησης για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 0.50 ppb Cd

Estimated Marginal Means of Απορρόφηση

at Συγκέντρωση = 1 ppb Cd

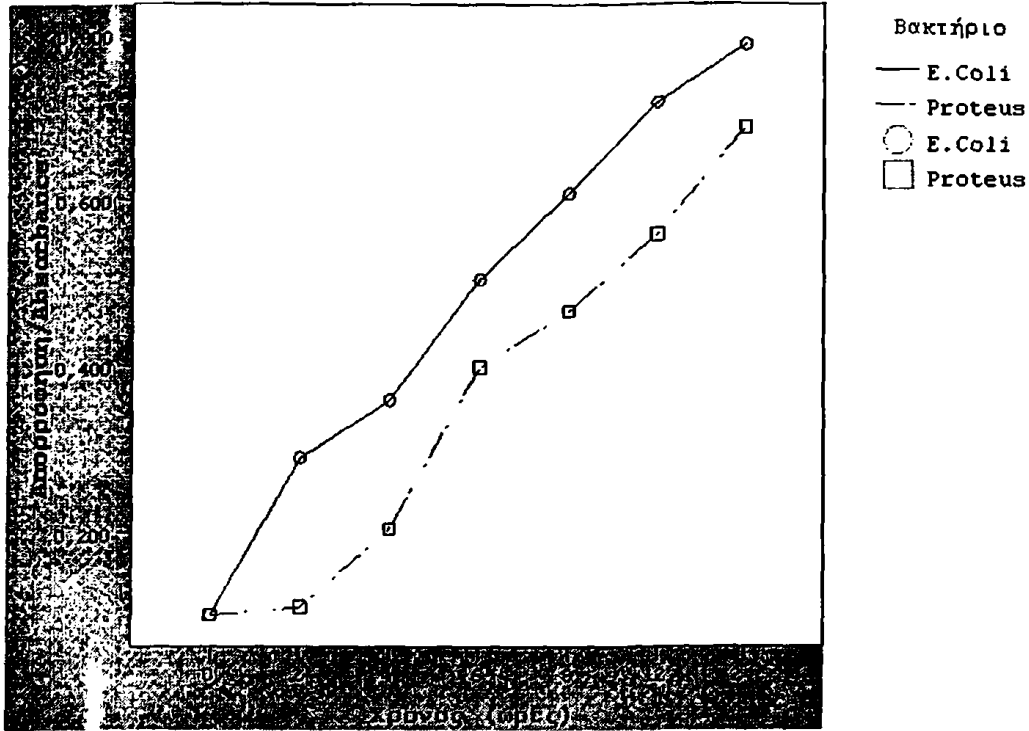


Σχήμα III 7. Οι διαφορές τιμών απορρόφησης για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 1 μg/l (ppb) Cd



Estimated Marginal Means of Απορρόφηση

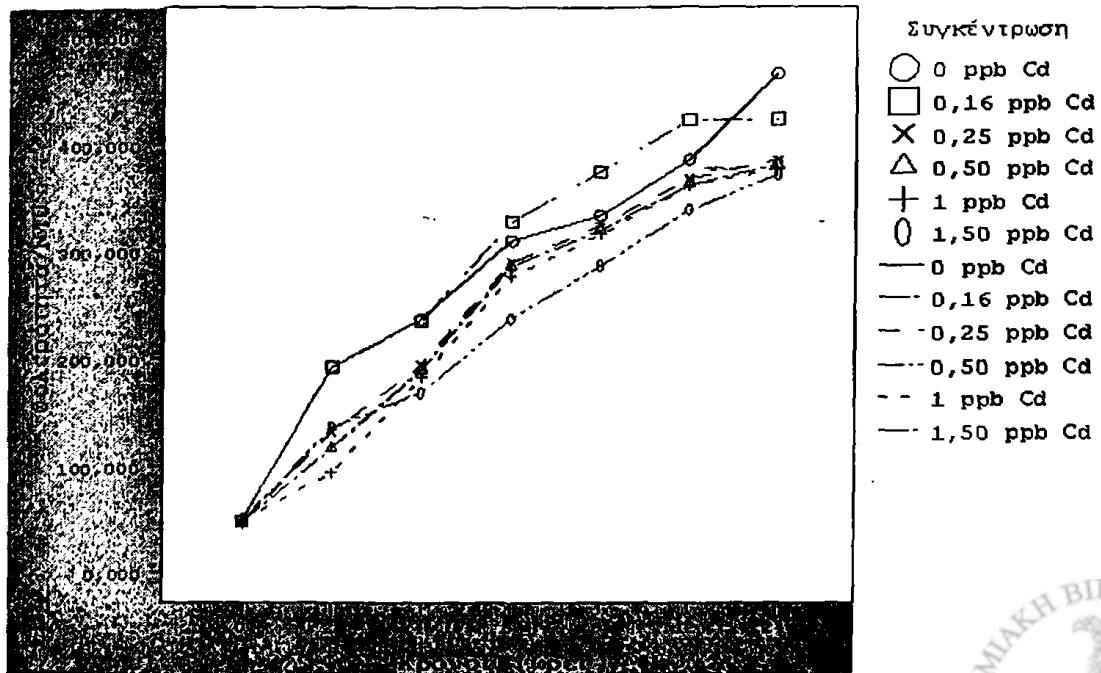
at Συγκέντρωση = 1,50 ppb Cd



Σχήμα III 8. Οι διαφορές τιμών απορρόφησης για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 1,50 µg/l (ppb) Cd,

Estimated Marginal Means of Θολερότητα

at Βακτήριο = E.Coli

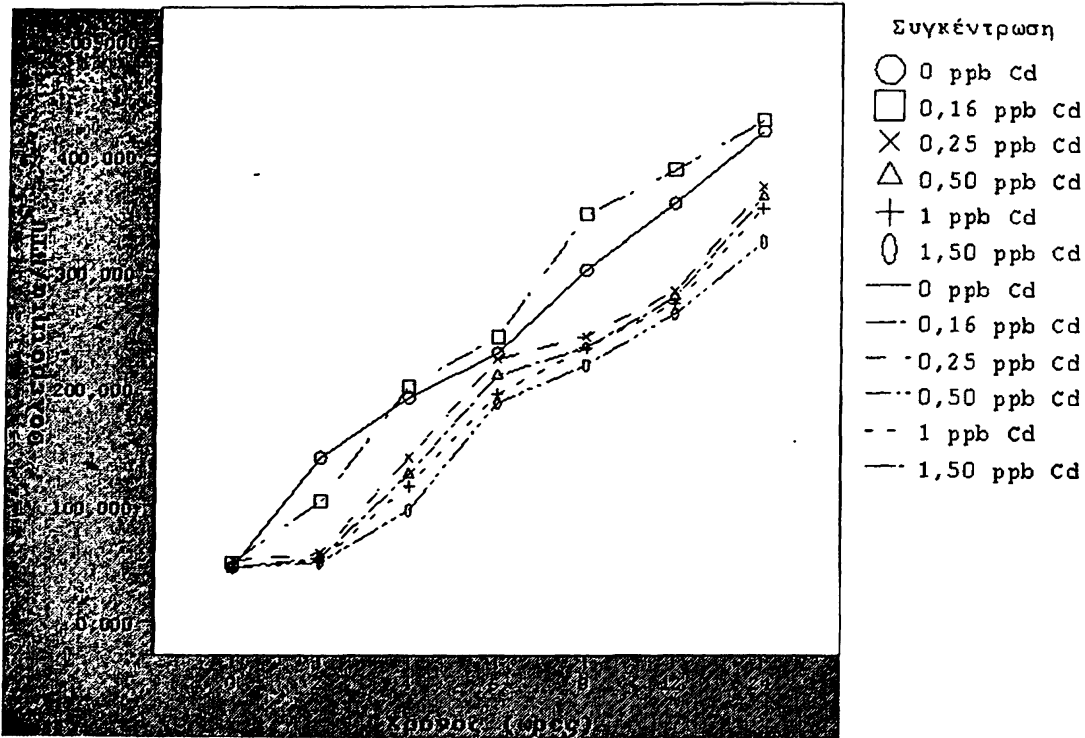


Σχήμα III 9. Διαφορές στις τιμές θολερότητας (NTU), μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων Cd για το βακτήριο *Escherichia coli*



Estimated Marginal Means of Θολερότητα

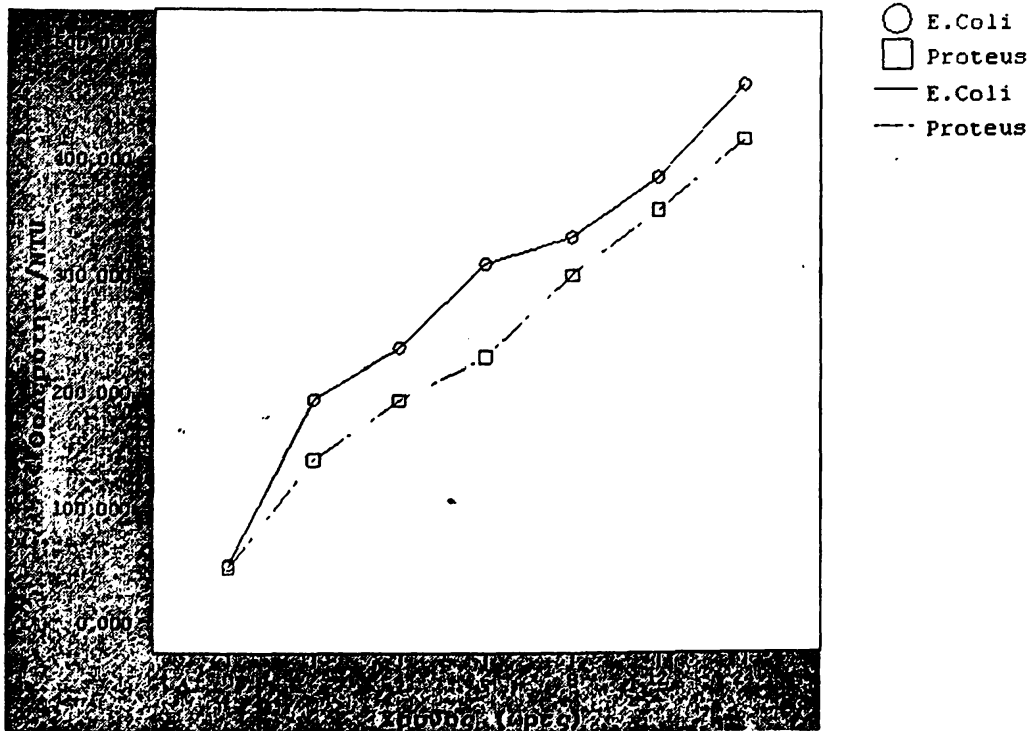
at Βακτήριο = Proteus



Σχήμα III 10. Διαφορές στις τιμές θολερότητας (NTU), μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων Cd για το βακτήριο *Proteus mirabilis*

Estimated Marginal Means of Θολερότητα

at Συγκέντρωση = 0 ppb Cd

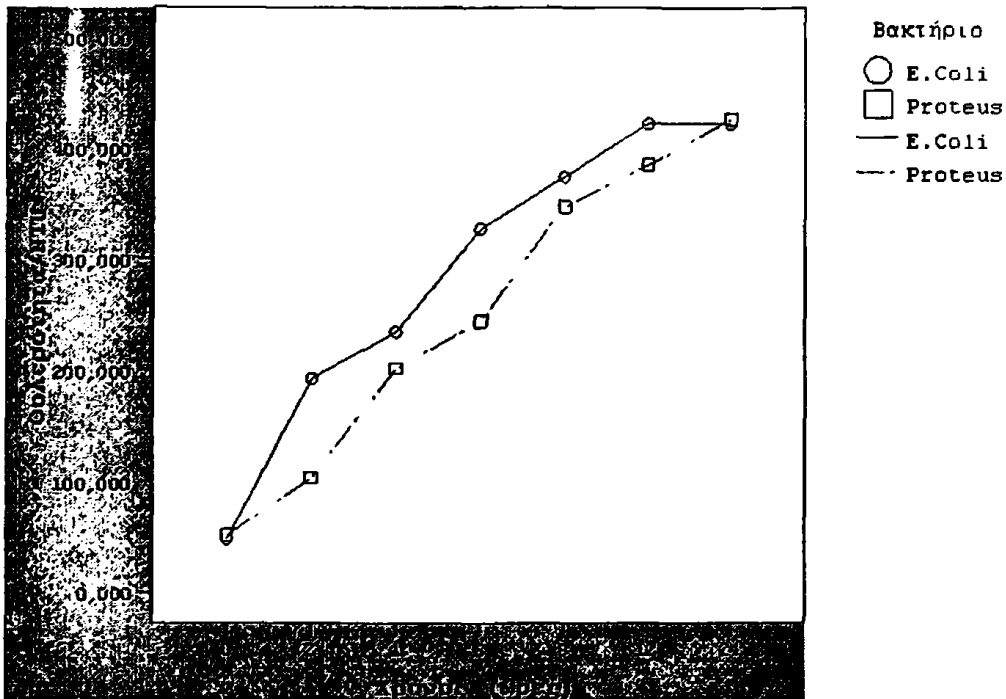


Σχήμα III 11. Οι διαφορές τιμών θολερότητας (NTU), για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 0 µg/l (ppb) Cd



Estimated Marginal Means of θολερότητα

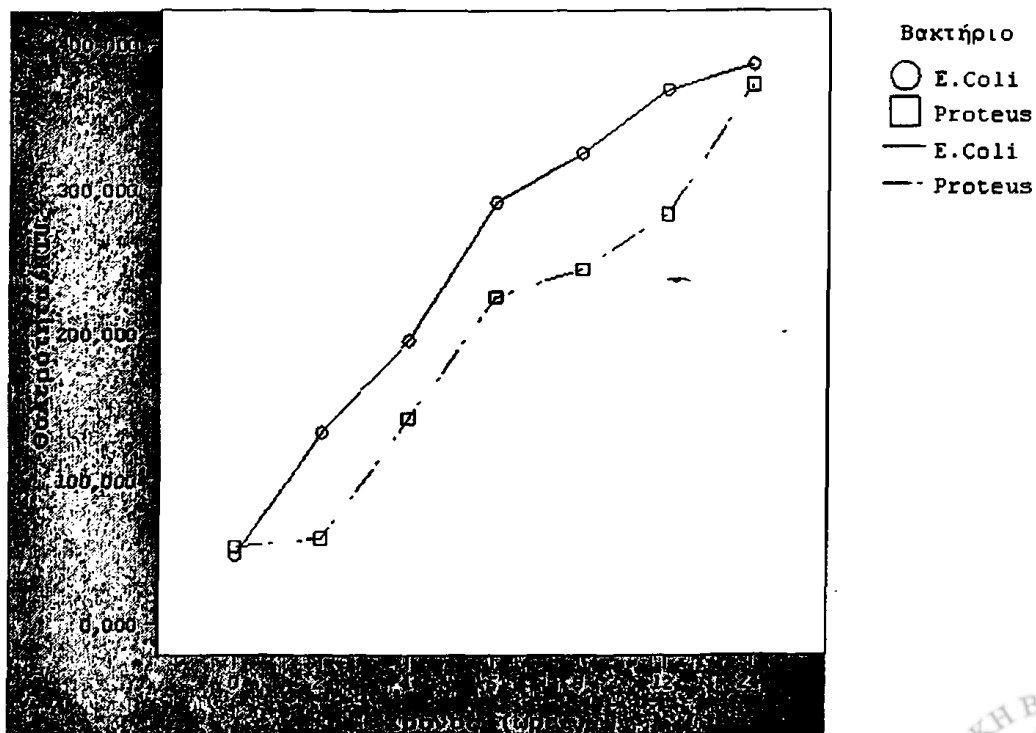
at Συγκέντρωση = 0,16 ppb Cd



Σχήμα III 12. Οι διαφορές τιμών θολερότητας (NTU), για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 0,16 $\mu\text{g/l}$ (ppb) Cd

Estimated Marginal Means of θολερότητα

at Συγκέντρωση = 0,25 ppb Cd

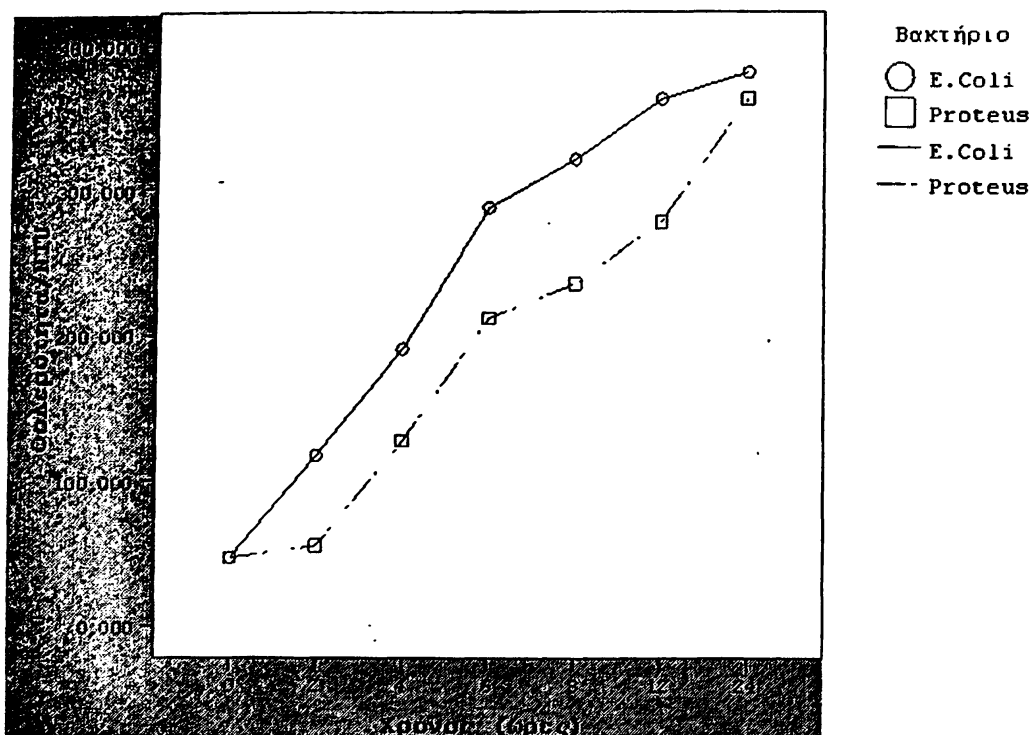


Σχήμα III 13. Οι διαφορές τιμών θολερότητας (NTU), για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 0,25 $\mu\text{g/l}$ Cd.



Estimated Marginal Means of θολερότητα

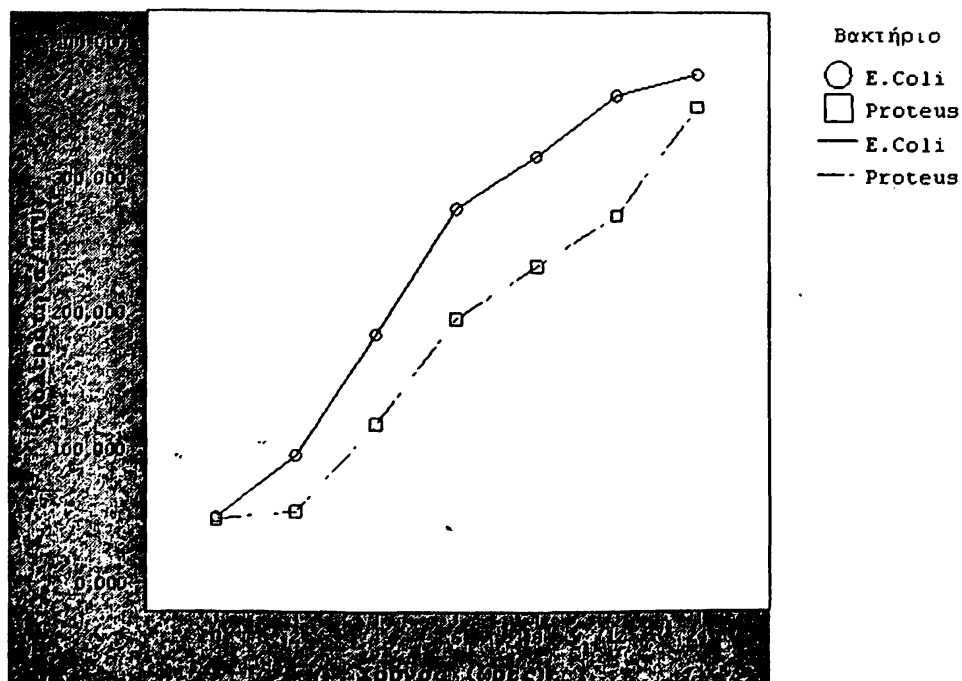
at Συγκέντρωση = 0,50 ppb Cd



Σχήμα III 14. Οι διαφορές τιμών θολερότητας (NTU), για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 0,50 μg/l (ppb) Cd.

Estimated Marginal Means of θολερότητα

at Συγκέντρωση = 1 ppb Cd

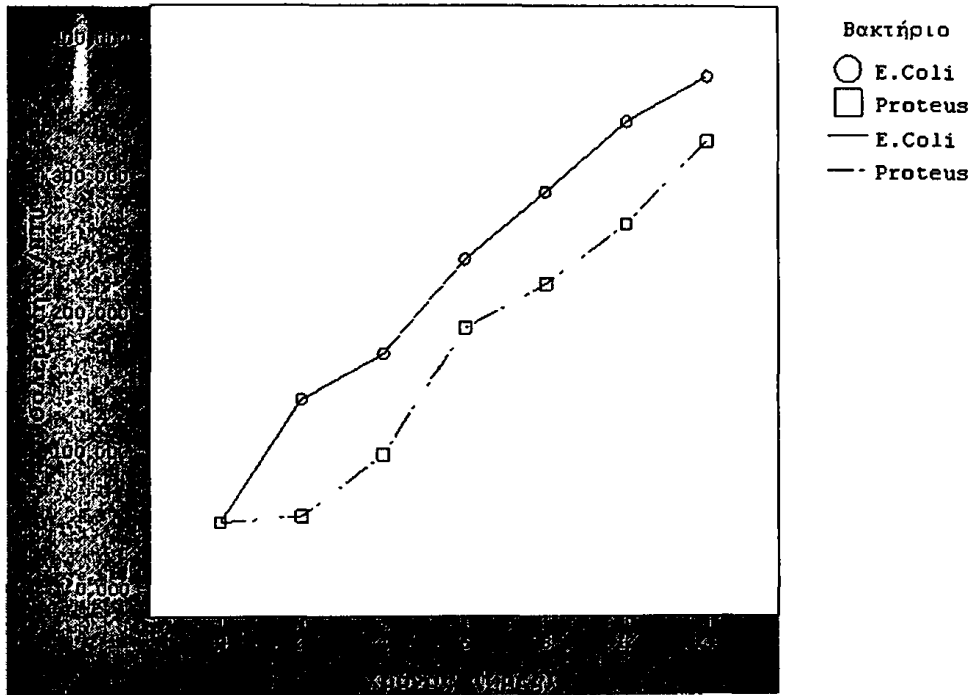


Σχήμα III 15. Οι διαφορές τιμών θολερότητας (NTU), για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 1 μg/l (ppb) Cd.



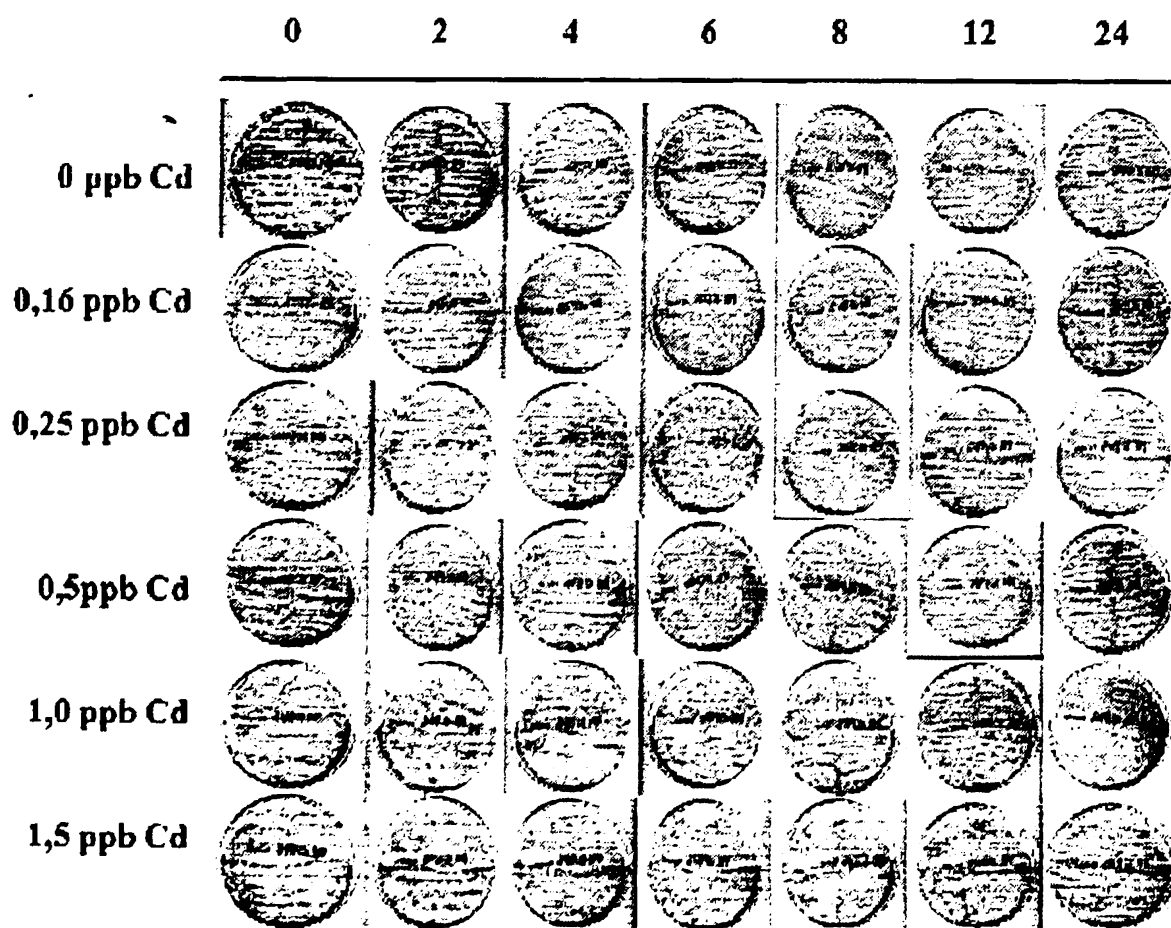
Estimated Marginal Means of θολερότητα

at Συγκέντρωση = 1,50 ppb Cd



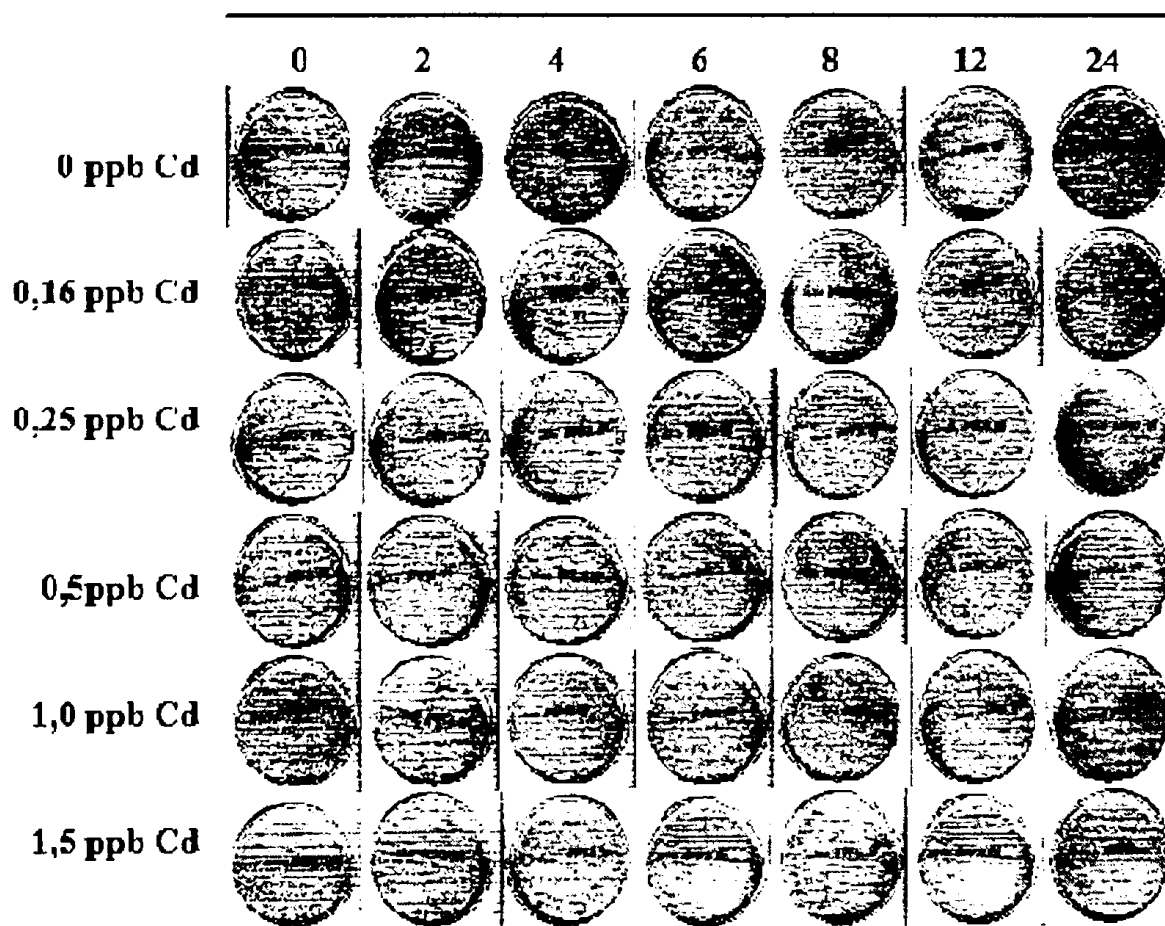
Σχήμα III 16. Οι διαφορές τιμών θολερότητας (NTU), για τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στη συγκέντρωση 1,50 $\mu\text{g/l}$ (ppb) Cd.

Escherichia coli
Χρόνος (ώρες)



Σχήμα ΙΙΙ 17. Επίδραση του Cd στην ανάπτυξη αποικιών του βακτηρίου *Escherichia coli*

Proteus mirabilis
Χρόνος (ώρες)



Σχήμα III 18. Επίδραση του Cd στην ανάπτυξη αποικιών του βακτηρίου *Proteus mirabilis*

3. Έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας του βακτηρίου *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* σε διάφορα αντιβιοτικά έγινε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και απεικονίζεται στον πίνακα III5.

Πίνακας III7. Ευαισθησία της *Escherichia coli* και του *Proteus mirabilis* στα αντιβιοτικά

Αντιβιοτικό	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Amikacin	S	S
Amoxicillin/CA	S	S
Ampicillin	R	S
Cefaclor	S	S
Cefotaxime	S	S
Cefoxitin	S	S
Ceftazidime	S	S
Cefuroxime	S	S
Cephalothin	S	S
Ciprofloxacin	S	I
Gentamicin	S	S
Imipenem	S	S
Nalidixic Acid	S	R
Netilmicin	S	S
Norfloxacin	S	S
Ofloxacin	S	S
Piperacillin/tazobac	S	S
Ticarcillin	R	S
Ticarcillin/CA	S	S
Tobramycin	S	S
Trimethoprim/Sulfa	S	R
Nitrofurantoin	S	R

(R=ανθεκτικό, S= ευαίσθητο, I= ενδιάμεσης ευαισθησίας)



4. Η επίδραση του καδμίου (Cd) και του cefuroxime στην ανάπτυξη της *Escherichia coli* και του *Proteus mirabilis*

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε έγιναν έλεγχοι για τη επίδραση του αντιβιοτικού cefuroxime (κεφαλοσπορίνη β γενιάς) στις τιμές απορρόφησης (absorbance) και θολερότητας (NTU) για τα δύο βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* αλλά και για τις δύο συγκεντρώσεις 0.16 μg/l και 1.50 μg/l Cd. Συγκεκριμένα αφού προστέθηκε cefuroxime στις συγκεντρώσεις 0.16 μg/l και 1.50 μg/l Cd έγινε εκ νέου δειγματοληψία, σε 7 χρονικές στιγμές (0 ώρες μετά, 2 ώρες μετά, 4 ώρες μετά, 6 ώρες μετά, 8 ώρες μετά, 12 ώρες μετά και 24 ώρες), προκειμένου να εξετασθεί η επίδρασή του στις τιμές απορρόφησης και θολερότητας στα δύο βακτήρια.

Χρησιμοποιήθηκε και πάλι πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις ανά κατηγορία φαίνονται στο παράρτημα I στον πίνακα Β. Στον πίνακα III 8 φαίνεται ότι η συγκέντρωση Cd (concentration), το είδος του βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*), το αντιβιοτικό cefuroxime αλλά και η αλληλεπίδρασή τους επιδρούν σημαντικά τόσο στην εξέλιξη των τιμών απορρόφησης και θολερότητας με την πάροδο του χρόνου (within subjects effects), όσο και στις διαφορές μεταξύ των ομάδων (between subjects effects). Σύμφωνα με τον πίνακα οι p-values σε κάθε περίπτωση είναι ίσες με 0.000.

Πιο συγκεκριμένα όπως φαίνεται και από τον πίνακα III 9 και τον έλεγχο Pilai's Trace αλλά και από τον πίνακα III 10 και τον έλεγχο Greenhouse – Geisser, η συγκέντρωση Cd (concentration), το είδος του βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*), το αντιβιοτικό cefuroxime αλλά και η αλληλεπίδρασή τους είναι παράγοντες που επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά τη μεταβολή των τιμών απορρόφησης και θολερότητας από τη μια χρονική στιγμή στην άλλη. Σε κάθε περίπτωση p-value= 0.000.

Επίσης σημαντικοί είναι οι τρεις αυτοί παράγοντες και η αλληλεπίδρασή τους και για τις διαφορές στα επίπεδα απορρόφησης και θολερότητας μεταξύ δύο ομάδων (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* ή δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις Cd) σε όλες τις χρονικές στιγμές που εξετάζονται, όπως φαίνεται και από τον πίνακα III 11. Και στην περίπτωση αυτή η p-value είναι πάντα ίση με 0.000



Πίνακας III 8. Επιδράσεις του Cd, των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* και του cefuroxime στην απορρόφηση και στην θολερότητα

Multivariate Tests^b

Effect			Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	
Between Subjects	Intercept	Pillai's Trace	1,000	669997,1 ^a	2,000	15,000	,000	
		Wilks' Lambda	,000	669997,1 ^a	2,000	15,000	,000	
		Hotelling's Trace	89332,941	669997,1 ^a	2,000	15,000	,000	
		Roy's Largest Root	89332,941	669997,1 ^a	2,000	15,000	,000	
		Zinacel	Pillai's Trace	1,000	438178,2 ^a	2,000	15,000	,000
		Wilks' Lambda	,000	438178,2 ^a	2,000	15,000	,000	
		Hotelling's Trace	58423,764	438178,2 ^a	2,000	15,000	,000	
		Roy's Largest Root	58423,764	438178,2 ^a	2,000	15,000	,000	
		Coli_Pro	Pillai's Trace	,999	14805,976 ^a	2,000	15,000	,000
			Wilks' Lambda	,001	14805,976 ^a	2,000	15,000	,000
			Hotelling's Trace	1974,130	14805,976 ^a	2,000	15,000	,000
			Roy's Largest Root	1974,130	14805,976 ^a	2,000	15,000	,000
		concentration	Pillai's Trace	1,000	20422,065 ^a	2,000	15,000	,000
			Wilks' Lambda	,000	20422,065 ^a	2,000	15,000	,000
			Hotelling's Trace	2722,942	20422,065 ^a	2,000	15,000	,000
			Roy's Largest Root	2722,942	20422,065 ^a	2,000	15,000	,000
		Zinacel * Coli_Pro	Pillai's Trace	,999	9979,037 ^a	2,000	15,000	,000
			Wilks' Lambda	,001	9979,037 ^a	2,000	15,000	,000
			Hotelling's Trace	1330,538	9979,037 ^a	2,000	15,000	,000
			Roy's Largest Root	1330,538	9979,037 ^a	2,000	15,000	,000
	Zinacel * concentration	Pillai's Trace	,999	13699,910 ^a	2,000	15,000	,000	
		Wilks' Lambda	,001	13699,910 ^a	2,000	15,000	,000	
		Hotelling's Trace	1826,655	13699,910 ^a	2,000	15,000	,000	
		Roy's Largest Root	1826,655	13699,910 ^a	2,000	15,000	,000	
	Coli_Pro * concentration	Pillai's Trace	,997	2256,920 ^a	2,000	15,000	,000	
		Wilks' Lambda	,003	2256,920 ^a	2,000	15,000	,000	
		Hotelling's Trace	300,923	2256,920 ^a	2,000	15,000	,000	
		Roy's Largest Root	300,923	2256,920 ^a	2,000	15,000	,000	
	Zinacel * Coli_Pro * concentration	Pillai's Trace	,997	2745,458 ^a	2,000	15,000	,000	
		Wilks' Lambda	,003	2745,458 ^a	2,000	15,000	,000	
		Hotelling's Trace	366,061	2745,458 ^a	2,000	15,000	,000	
		Roy's Largest Root	366,061	2745,458 ^a	2,000	15,000	,000	
Within Subjects	Χρόνος	Pillai's Trace	1,000	106827,5 ^a	12,000	5,000	,000	
		Wilks' Lambda	,000	106827,5 ^a	12,000	5,000	,000	
		Hotelling's Trace	256386,0	106827,5 ^a	12,000	5,000	,000	
		Roy's Largest Root	256386,0	106827,5 ^a	12,000	5,000	,000	
			Χρόνος * Zinacel	Pillai's Trace	1,000	141583,7 ^a	12,000	5,000
			Wilks' Lambda	,000	141583,7 ^a	12,000	5,000	,000
			Hotelling's Trace	339800,9	141583,7 ^a	12,000	5,000	,000
			Roy's Largest Root	339800,9	141583,7 ^a	12,000	5,000	,000
		Χρόνος * Coli_Pro	Pillai's Trace	1,000	5301,868 ^a	12,000	5,000	,000
			Wilks' Lambda	,000	5301,868 ^a	12,000	5,000	,000
			Hotelling's Trace	12724,482	5301,868 ^a	12,000	5,000	,000
			Roy's Largest Root	12724,482	5301,868 ^a	12,000	5,000	,000
		Χρόνος * concentration	Pillai's Trace	1,000	19788,245 ^a	12,000	5,000	,000
			Wilks' Lambda	,000	19788,245 ^a	12,000	5,000	,000
			Hotelling's Trace	47491,789	19788,245 ^a	12,000	5,000	,000
			Roy's Largest Root	47491,789	19788,245 ^a	12,000	5,000	,000
		Χρόνος * Zinacel * Coli_Pro	Pillai's Trace	1,000	3608,886 ^a	12,000	5,000	,000
			Wilks' Lambda	,000	3608,886 ^a	12,000	5,000	,000
			Hotelling's Trace	8661,325	3608,886 ^a	12,000	5,000	,000
			Roy's Largest Root	8661,325	3608,886 ^a	12,000	5,000	,000
	Χρόνος * Zinacel * concentration	Pillai's Trace	1,000	21684,782 ^a	12,000	5,000	,000	
		Wilks' Lambda	,000	21684,782 ^a	12,000	5,000	,000	
		Hotelling's Trace	52043,477	21684,782 ^a	12,000	5,000	,000	
		Roy's Largest Root	52043,477	21684,782 ^a	12,000	5,000	,000	
	Χρόνος * Coli_Pro * concentration	Pillai's Trace	1,000	869,314 ^a	12,000	5,000	,000	
		Wilks' Lambda	,000	869,314 ^a	12,000	5,000	,000	
		Hotelling's Trace	2086,353	869,314 ^a	12,000	5,000	,000	
		Roy's Largest Root	2086,353	869,314 ^a	12,000	5,000	,000	
	Χρόνος * Zinacel * Coli_Pro * concentration	Pillai's Trace	,999	768,607 ^a	12,000	5,000	,000	
		Wilks' Lambda	,001	768,607 ^a	12,000	5,000	,000	
		Hotelling's Trace	1844,657	768,607 ^a	12,000	5,000	,000	
		Roy's Largest Root	1844,657	768,607 ^a	12,000	5,000	,000	

^a Exact statistic^b Design: Intercept+Zinacel+Coli_Pro+concentration+Zinacel * Coli_Pro+Zinacel * concentration+Coli_Pro * concentration+Zinacel * Coli_Pro * concentration

Within Subjects Design: Χρόνος



Πίνακας III 9. Επιδράσεις του Cd, των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* και του cefuroxime στην απορρόφηση και στην θολερότητα από τη μια χρονική στιγμή στην άλλη (Έλεγχος Pillai's Trace)

Multivariate^{c,d}

Within Subjects Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Χρόνος	Pillai's Trace	1,048	17,631	12,000	192,000	,000
	Wilks' Lambda	,000	858,940 ^a	12,000	190,000	,000
	Hotelling's Trace	2902,427	22735,680	12,000	188,000	,000
	Roy's Largest Root	2902,376	46438,014 ^b	6,000	96,000	,000
Χρόνος * Zinacef	Pillai's Trace	1,044	17,490	12,000	192,000	,000
	Wilks' Lambda	,000	1075,595 ^a	12,000	190,000	,000
	Hotelling's Trace	4538,316	35550,145	12,000	188,000	,000
	Roy's Largest Root	4538,270	72612,313 ^b	6,000	96,000	,000
Χρόνος * Coli_Pro	Pillai's Trace	1,010	16,310	12,000	192,000	,000
	Wilks' Lambda	,010	143,357 ^a	12,000	190,000	,000
	Hotelling's Trace	98,116	768,576	12,000	188,000	,000
	Roy's Largest Root	98,096	1569,537 ^b	6,000	96,000	,000
Χρόνος * concentration	Pillai's Trace	1,013	16,426	12,000	192,000	,000
	Wilks' Lambda	,004	247,082 ^a	12,000	190,000	,000
	Hotelling's Trace	270,108	2115,848	12,000	188,000	,000
	Roy's Largest Root	270,091	4321,459 ^b	6,000	96,000	,000
Χρόνος * Zinacef * Coli_Pro	Pillai's Trace	1,016	16,534	12,000	192,000	,000
	Wilks' Lambda	,011	136,127 ^a	12,000	190,000	,000
	Hotelling's Trace	88,601	694,038	12,000	188,000	,000
	Roy's Largest Root	88,572	1417,155 ^b	6,000	96,000	,000
Χρόνος * Zinacef * concentration	Pillai's Trace	1,016	16,535	12,000	192,000	,000
	Wilks' Lambda	,004	226,961 ^a	12,000	190,000	,000
	Hotelling's Trace	229,276	1795,996	12,000	188,000	,000
	Roy's Largest Root	229,255	3668,077 ^b	6,000	96,000	,000
Χρόνος * Coli_Pro * concentration	Pillai's Trace	1,021	16,674	12,000	192,000	,000
	Wilks' Lambda	,029	76,913 ^a	12,000	190,000	,000
	Hotelling's Trace	31,605	247,570	12,000	188,000	,000
	Roy's Largest Root	31,551	504,808 ^b	6,000	96,000	,000
Χρόνος * Zinacef * Coli_Pro * concentration	Pillai's Trace	1,008	16,271	12,000	192,000	,000
	Wilks' Lambda	,039	64,467 ^a	12,000	190,000	,000
	Hotelling's Trace	23,505	184,125	12,000	188,000	,000
	Roy's Largest Root	23,453	375,256 ^b	6,000	96,000	,000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+Zinacef+Coli_Pro+concentration+Zinacef * Coli_Pro+Zinacef * concentration+Coli_Pro * concentration+Zinacef * Coli_Pro * concentration
 Within Subjects Design: Χρόνος

d. Tests are based on averaged variables.



Πίνακας III 10. Επιδράσεις του Cd, των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* και του cefuroxime στην απορρόφηση και στην θολερότητα από τη μια χρονική στιγμή στην άλλη (Έλεγχος Greenhouse Geisser)

Univariate Tests

Source	Measure		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Χρόνος	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.281	6	.047	31647,325	.000
		Greenhouse-Geisser	.281	2,816	.100	31647,325	.000
		Huynh-Feldt	.281	4,975	.057	31647,325	.000
		Lower-bound	.281	1,000	.281	31647,325	.000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	13161,817	6	2193,636	44036,982	.000
		Greenhouse-Geisser	13161,817	1,872	7031,940	44036,982	.000
		Huynh-Feldt	13161,817	3,038	4332,442	44036,982	.000
		Lower-bound	13161,817	1,000	13161,817	44036,982	.000
Χρόνος * Zinacel	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.441	6	.074	49634,380	.000
		Greenhouse-Geisser	.441	2,816	.157	49634,380	.000
		Huynh-Feldt	.441	4,975	.089	49634,380	.000
		Lower-bound	.441	1,000	.441	49634,380	.000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	20558,973	6	3426,496	68786,485	.000
		Greenhouse-Geisser	20558,973	1,872	10984,005	68786,485	.000
		Huynh-Feldt	20558,973	3,038	6767,344	68786,485	.000
		Lower-bound	20558,973	1,000	20558,973	68786,485	.000
Χρόνος * Coli_Pro	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.009	6	.002	1062,104	.000
		Greenhouse-Geisser	.009	2,816	.003	1062,104	.000
		Huynh-Feldt	.009	4,975	.002	1062,104	.000
		Lower-bound	.009	1,000	.009	1062,104	.000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	445,924	6	74,321	1491,978	.000
		Greenhouse-Geisser	445,924	1,872	238,243	1491,978	.000
		Huynh-Feldt	445,924	3,038	146,784	1491,978	.000
		Lower-bound	445,924	1,000	445,924	1491,978	.000
Χρόνος * concentration	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.026	6	.004	2967,494	.000
		Greenhouse-Geisser	.026	2,816	.009	2967,494	.000
		Huynh-Feldt	.026	4,975	.005	2967,494	.000
		Lower-bound	.026	1,000	.026	2967,494	.000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	1221,603	6	203,601	4087,256	.000
		Greenhouse-Geisser	1221,603	1,872	652,664	4087,256	.000
		Huynh-Feldt	1221,603	3,038	402,112	4087,256	.000
		Lower-bound	1221,603	1,000	1221,603	4087,256	.000
Χρόνος * Zinacel * Coli_Pro	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.009	6	.001	972,854	.000
		Greenhouse-Geisser	.009	2,816	.003	972,854	.000
		Huynh-Feldt	.009	4,975	.002	972,854	.000
		Lower-bound	.009	1,000	.009	972,854	.000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	400,671	6	66,778	1340,569	.000
		Greenhouse-Geisser	400,671	1,872	214,066	1340,569	.000
		Huynh-Feldt	400,671	3,038	131,888	1340,569	.000
		Lower-bound	400,671	1,000	400,671	1340,569	.000
Χρόνος * Zinacel * concentration	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.022	6	.004	2485,232	.000
		Greenhouse-Geisser	.022	2,816	.008	2485,232	.000
		Huynh-Feldt	.022	4,975	.004	2485,232	.000
		Lower-bound	.022	1,000	.022	2485,232	.000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	1041,696	6	173,616	3485,322	.000
		Greenhouse-Geisser	1041,696	1,872	556,545	3485,322	.000
		Huynh-Feldt	1041,696	3,038	342,893	3485,322	.000
		Lower-bound	1041,696	1,000	1041,696	3485,322	.000
Χρόνος * Coli_Pro * concentration	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.003	6	.001	350,964	.000
		Greenhouse-Geisser	.003	2,816	.001	350,964	.000
		Huynh-Feldt	.003	4,975	.001	350,964	.000
		Lower-bound	.003	1,000	.003	350,964	.000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	142,110	6	23,685	475,474	.000
		Greenhouse-Geisser	142,110	1,872	75,925	475,474	.000
		Huynh-Feldt	142,110	3,038	46,778	475,474	.000
		Lower-bound	142,110	1,000	142,110	475,474	.000
Χρόνος * Zinacel * Coli_Pro * concentration	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.002	6	.000	252,819	.000
		Greenhouse-Geisser	.002	2,816	.001	252,819	.000
		Huynh-Feldt	.002	4,975	.000	252,819	.000
		Lower-bound	.002	1,000	.002	252,819	.000
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	106,812	6	17,802	357,374	.000
		Greenhouse-Geisser	106,812	1,872	57,066	357,374	.000
		Huynh-Feldt	106,812	3,038	35,159	357,374	.000
		Lower-bound	106,812	1,000	106,812	357,374	.000
Error(Χρόνος)	Απορρόφηση	Sphericity Assumed	.000	98	1,48E-006		
		Greenhouse-Geisser	.000	45,060	3,16E-006		
		Huynh-Feldt	.000	79,600	1,79E-006		
		Lower-bound	.000	16,000	8,89E-006		
	Θολερότητα	Sphericity Assumed	4,782	98	.050		
		Greenhouse-Geisser	4,782	29,948	.160		
		Huynh-Feldt	4,782	48,807	.098		
		Lower-bound	4,782	16,000	.299		



Πίνακας III 11. Επιδράσεις του Cd, των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* και του cefuroxime στην απορρόφηση και στην θολερότητα μεταξύ δύο ομάδων, σε όλες τις χρονικές στιγμές

Tests of Between-Subjects Effects

Transformed Variable: Average

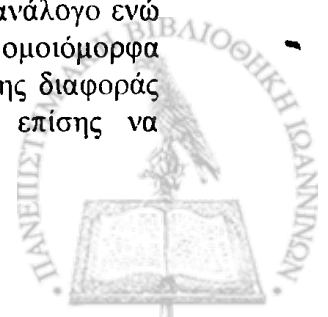
Source	Measure	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	Απορρόφηση	1,479	1	1,479	1124166	,000
	Θολερότητα	69089,661	1	69089,661	1219965	,000
Zinacef	Απορρόφηση	,969	1	,969	736731,2	,000
	Θολερότητα	45109,806	1	45109,806	796535,7	,000
Coli_Pro	Απορρόφηση	,033	1	,033	24776,471	,000
	Θολερότητα	1529,993	1	1529,993	27016,169	,000
concentration	Απορρόφηση	,045	1	,045	34418,842	,000
	Θολερότητα	2098,362	1	2098,362	37052,258	,000
Zinacef * Coli_Pro	Απορρόφηση	,022	1	,022	16784,959	,000
	Θολερότητα	1026,997	1	1026,997	18134,417	,000
Zinacef * concentration	Απορρόφηση	,030	1	,030	22947,982	,000
	Θολερότητα	1414,609	1	1414,609	24978,748	,000
Coli_Pro * concentration	Απορρόφηση	,005	1	,005	3829,864	,000
	Θολερότητα	230,589	1	230,589	4071,667	,000
Zinacef * Coli_Pro * concentration	Απορρόφηση	,006	1	,006	4543,005	,000
	Θολερότητα	286,145	1	286,145	5052,660	,000
Error	Απορρόφηση	2,10E-005	16	1,32E-006		
	Θολερότητα	,906	16	,057		

Σχηματικά οι διαφορές στις τιμές απορρόφησης (absorbance) μεταξύ των 2 διαφορετικών συγκεντρώσεων Cd ανά παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού cefuroxime και είδος βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*) αποδίδονται από τα γραφήματα των σχημάτων III 19 A, III 19 B και III 19 Γ. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα απεικονίζονται και στα γραφήματα των σχημάτων III 20 A, III 20 B και III 20 Γ για τις τιμές θολερότητας (NTU).

Η παρουσία του cefuroxime οδηγεί σε σημαντικά χαμηλότερες μετρήσεις απορρόφησης και για τα δύο βακτήρια (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*) και στις δύο συγκεντρώσεις Cd (1.50 µg/l και 0.16 µg/l). Οι σημαντικές διαφορές καταγράφονται από τις 2 ώρες και μετά όταν το βακτήριο είναι η *Escherichia coli* και από τις 4 ώρες και μετά όταν το βακτήριο είναι ο *Proteus mirabilis*.

Παρατηρούμε επίσης ότι και στις δύο συγκεντρώσεις Cd η παρουσία του cefuroxime οδηγεί σε πολύ μικρές μεταβολές στις τιμές απορρόφησης με την πάροδο του χρόνου και για τα δύο βακτήρια, ενώ χωρίς cefuroxime οι τιμές αυξάνουν σημαντικά σε όλους τους χρόνους για τη συγκέντρωση 0.16 µg/l Cd. Για τη συγκέντρωση 1.50 µg/l Cd παρατηρείται αρχικά σημαντική αύξηση στη συνέχεια στασιμότητα και τέλος πάλι σημαντική αύξηση.

Από το γράφημα του σχήματος III 19 B προκύπτει ότι η απουσία του cefuroxime έχει ως αποτέλεσμα και στις δύο συγκεντρώσεις Cd τα δύο βακτήρια να αυξάνουν τις τιμές απορρόφησης σε όλες τις χρονικές στιγμές και μάλιστα με τρόπο ανάλογο ενώ για το βακτήριο *Escherichia coli* οι τιμές είναι σημαντικά και ομοιόμορφα υψηλότερες. Η παρουσία του αντιβιοτικού οδηγεί σε εξάλειψη αυτής της διαφοράς μεταξύ των βακτηρίων και στις δύο συγκεντρώσεις Cd. Παύει επίσης να παρατηρείται η μεταβολή των τιμών με την πάροδο του χρόνου.

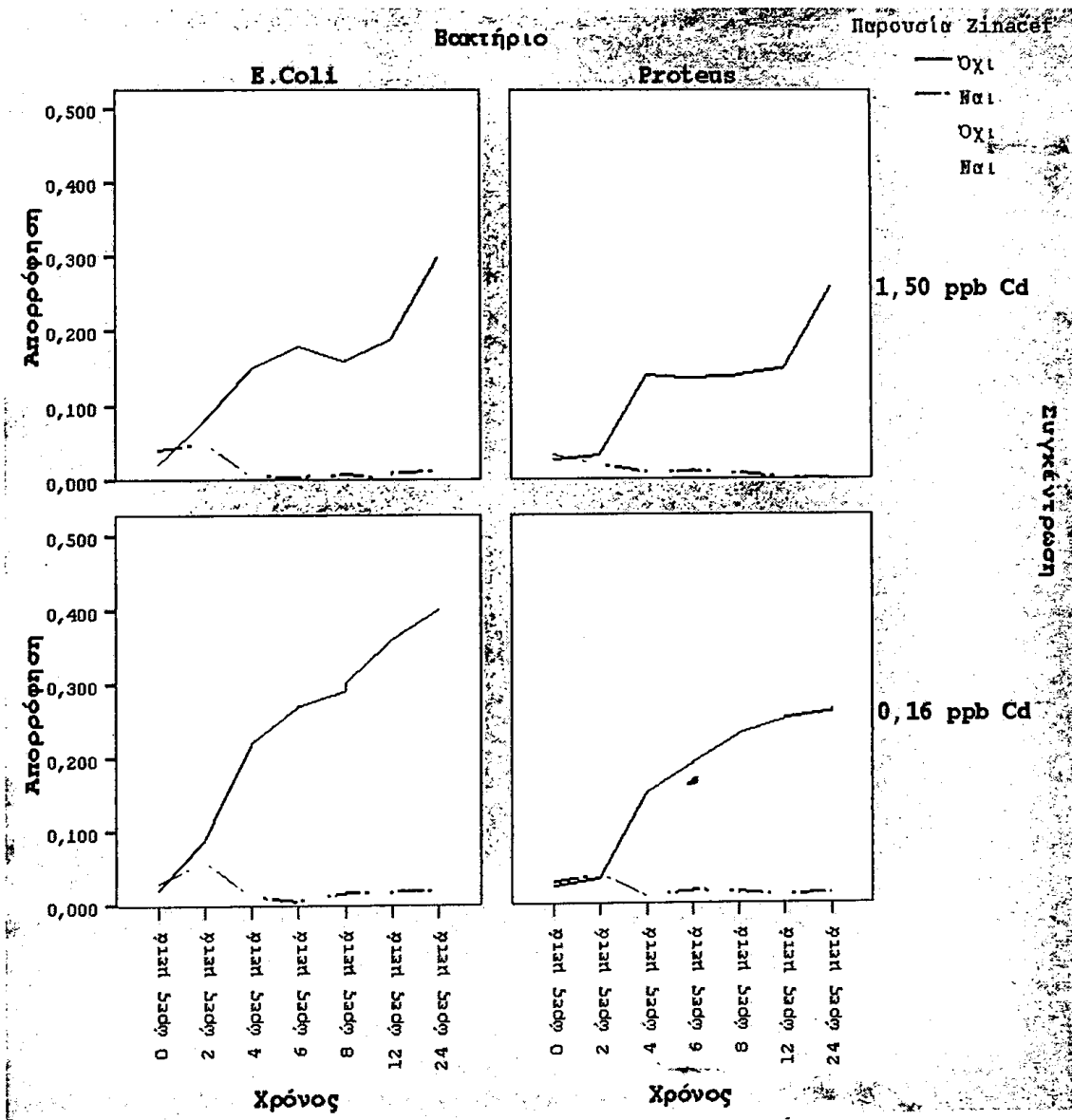


Από το γράφημα του σχήματος III 19 Γ προκύπτει ότι παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις τιμές απορρόφησης μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων Cd όταν δεν υπάρχει cefuroxime και για τα δύο βακτήρια. Οι διαφορές γίνονται σημαντικές από τις 6 ώρες και μετά ενώ στο τέλος (24 ώρες μετά) παρατηρείται τάση σύγκλισης. Η παρουσία του cefuroxime οδηγεί και για τα δύο βακτήρια σε εξάλειψη των διαφορών που οφείλονται στην πάροδο του χρόνου αλλά και στην εξάλειψη των διαφορών μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων Cd.

Στις μετρήσεις της θολερότητας (NTU) η παρουσία του αντιβιοτικού cefuroxime επιδρά με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Τα γραφήματα των σχημάτων III 20 A, III 20 B και III 20 Γ που ακολουθούν επιδέχονται της ίδιας ερμηνείας με τα γραφήματα των σχημάτων III 19 A, III 19 B και III 19 Γ. που προηγήθηκαν αντιστοίχως.

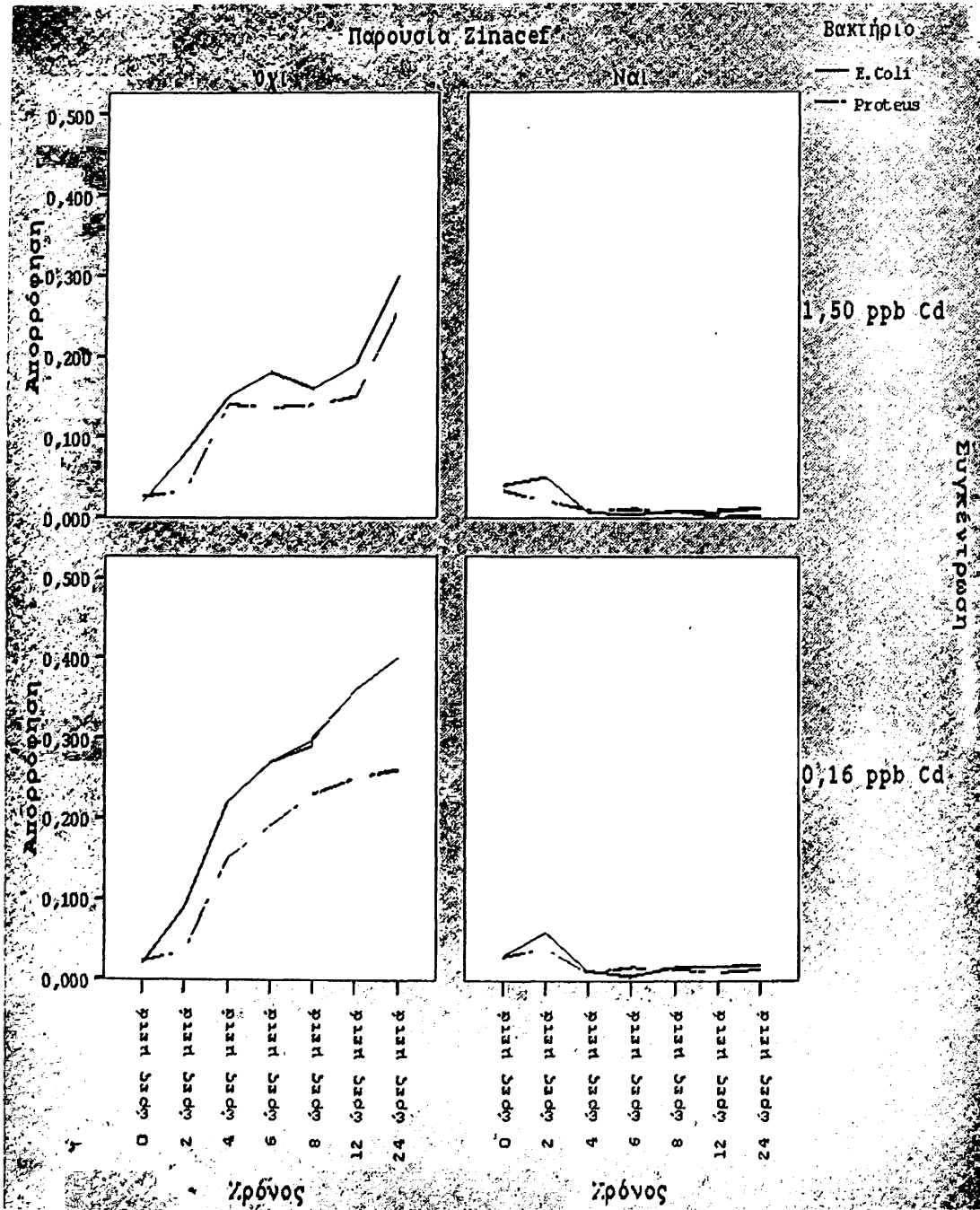
Τέλος στα σχήματα III 21 και III 22 απεικονίζεται η ανάπτυξη αποικιών στα στερεά υποστρώματα των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* αντίστοιχα μετά από ενοφθαλμισμό υπό τις δεδομένες συνθήκες επώασης (βλ. υλικά και μέθοδοι) με παρουσία ή απουσία αντιβιοτικού cefuroxime. Φαίνονται καθαρά οι διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων Cd, 0,16 μg/l και 1,50 μg/l και στα δύο βακτήρια όταν δεν υπάρχει αντιβιοτικό. Με την παρουσία του αντιβιοτικού η ανάπτυξη των αποικιών είναι σχεδόν μηδενική και για τις δύο δόσεις Cd.



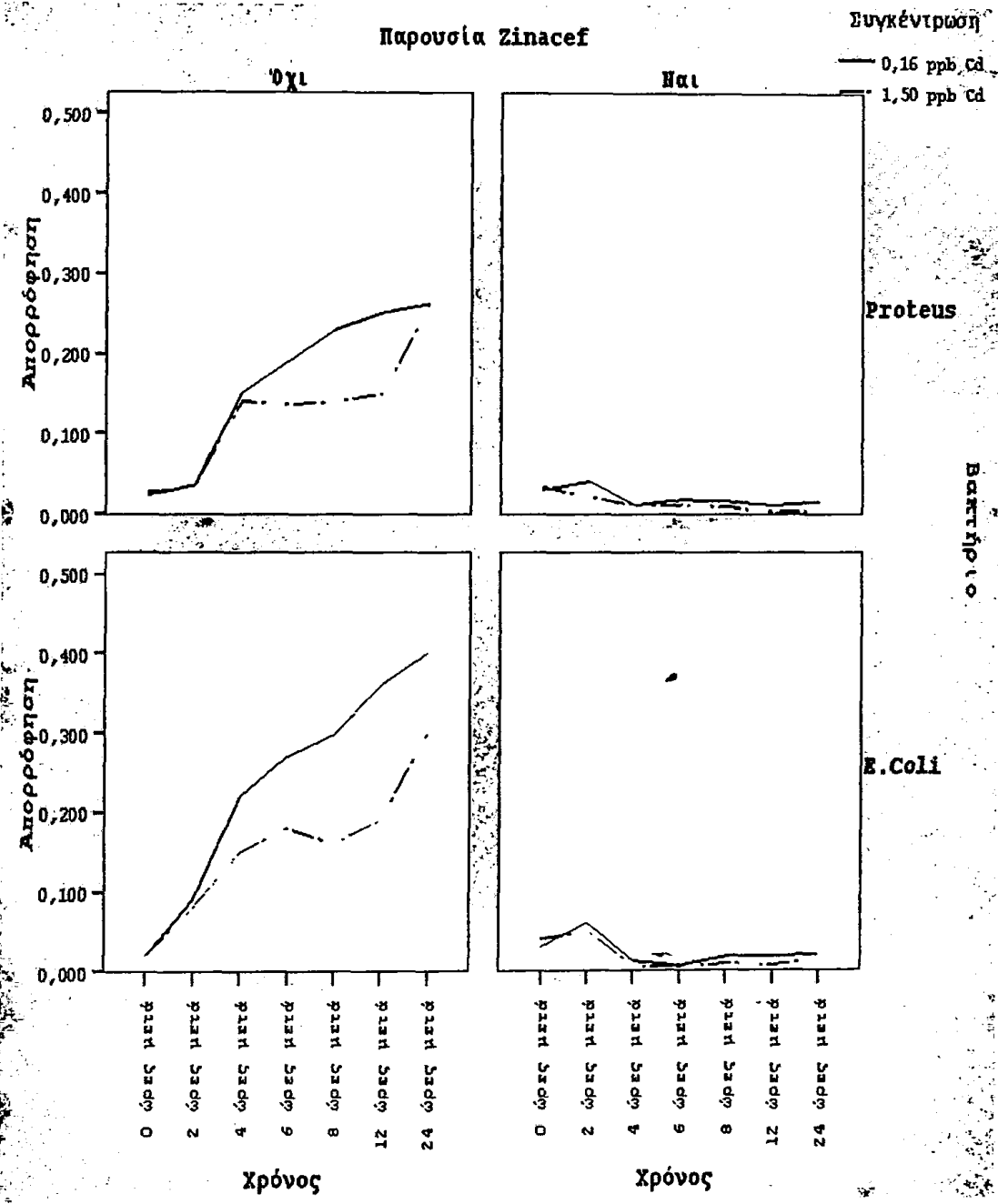


Σχήμα III 19 Α. Διαφορές τιμών απορρόφησης (absorbance) μεταξύ των 2 συγκεντρώσεων Cd, ανά παρουσία ή απουσία cefuroxime και είδος βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*)



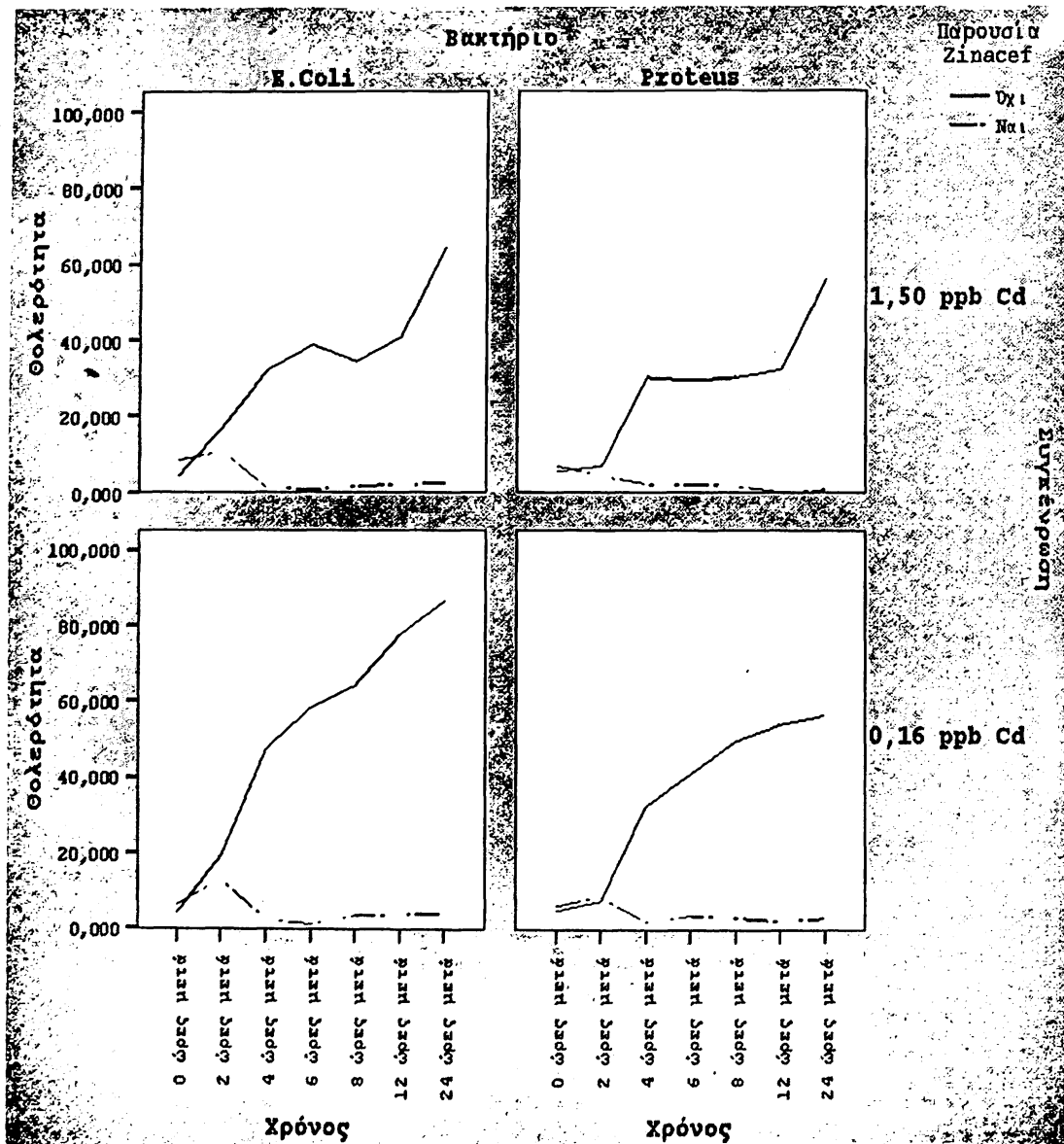


Σχήμα III 19 Β. Διαφορές τιμών απορρόφησης (absorbance) μεταξύ των 2 συγκεντρώσεων Cd, ανά παρουσία ή απουσία cefuroxime και είδος βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*)

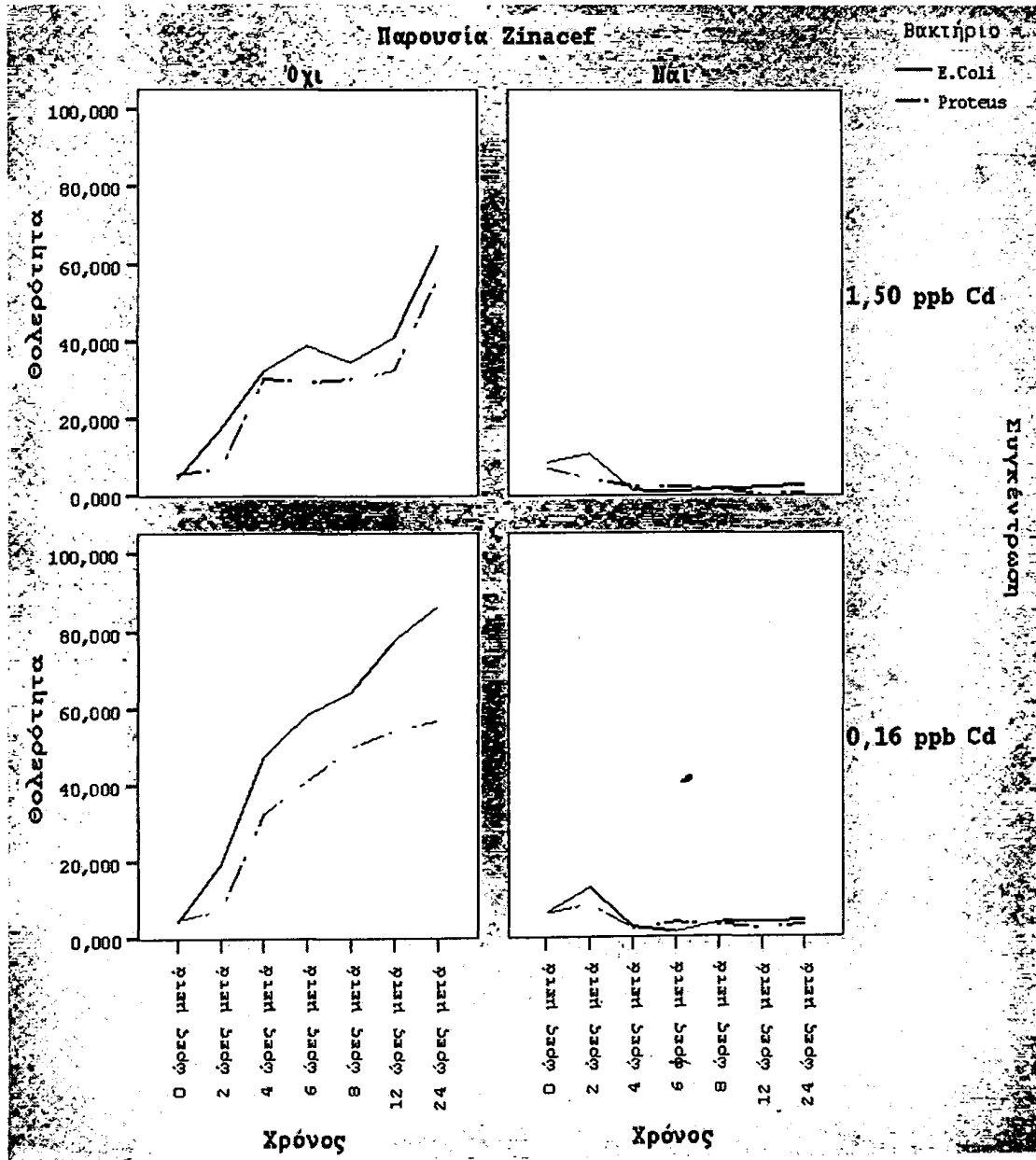


Σχήμα III 19 Γ. Διαφορές τιμών απορρόφησης (absorbance) μεταξύ των 2 συγκεντρώσεων Cd, ανά παρουσία ή απουσία cefuroxime και είδος βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*)

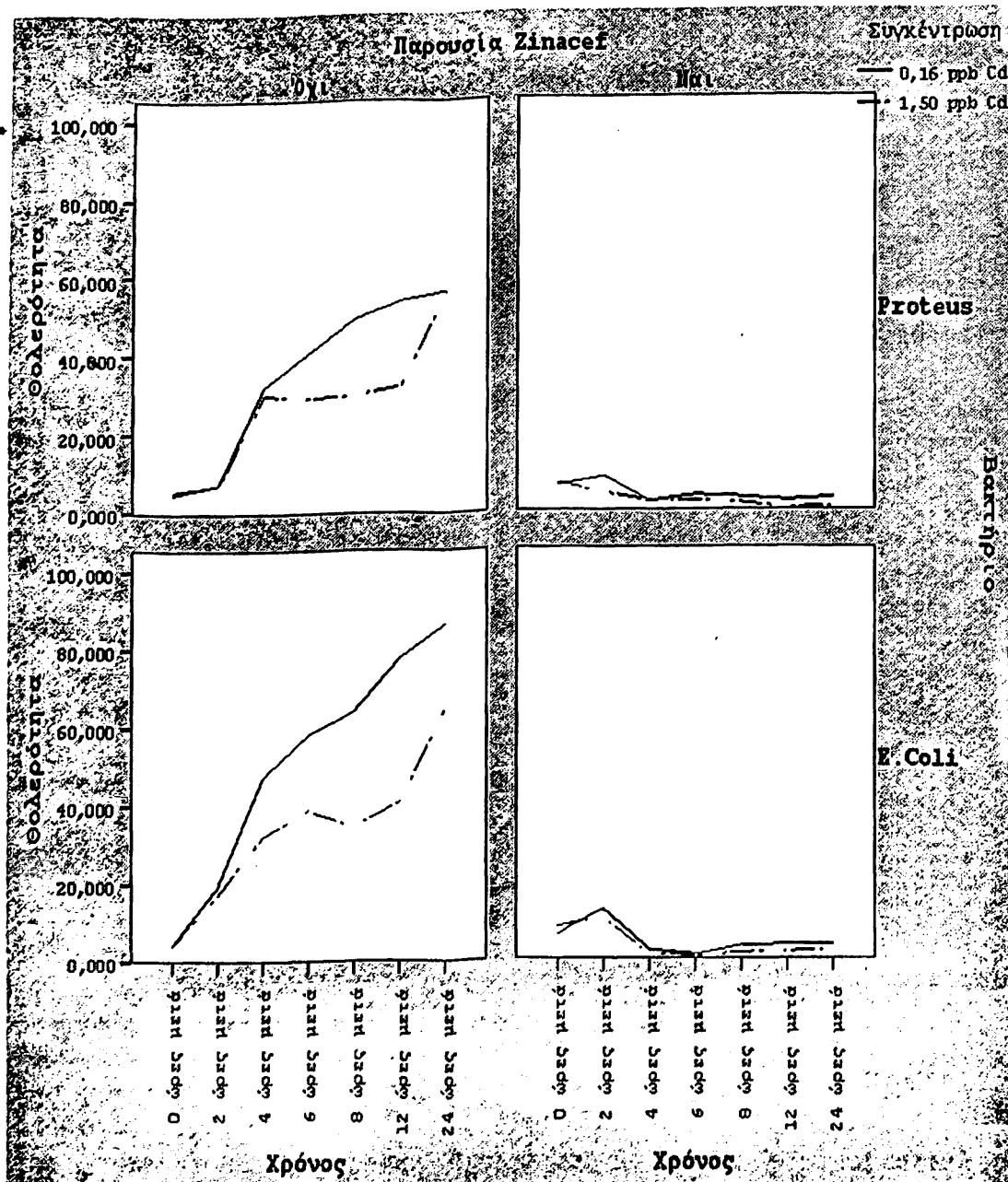




Σχήμα III 20 Α. Διαφορές τιμών θολερότητας (NTU) μεταξύ των 2 συγκεντρώσεων Cd, ανά παρουσία ή απουσία cefuroxime και είδος βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*).



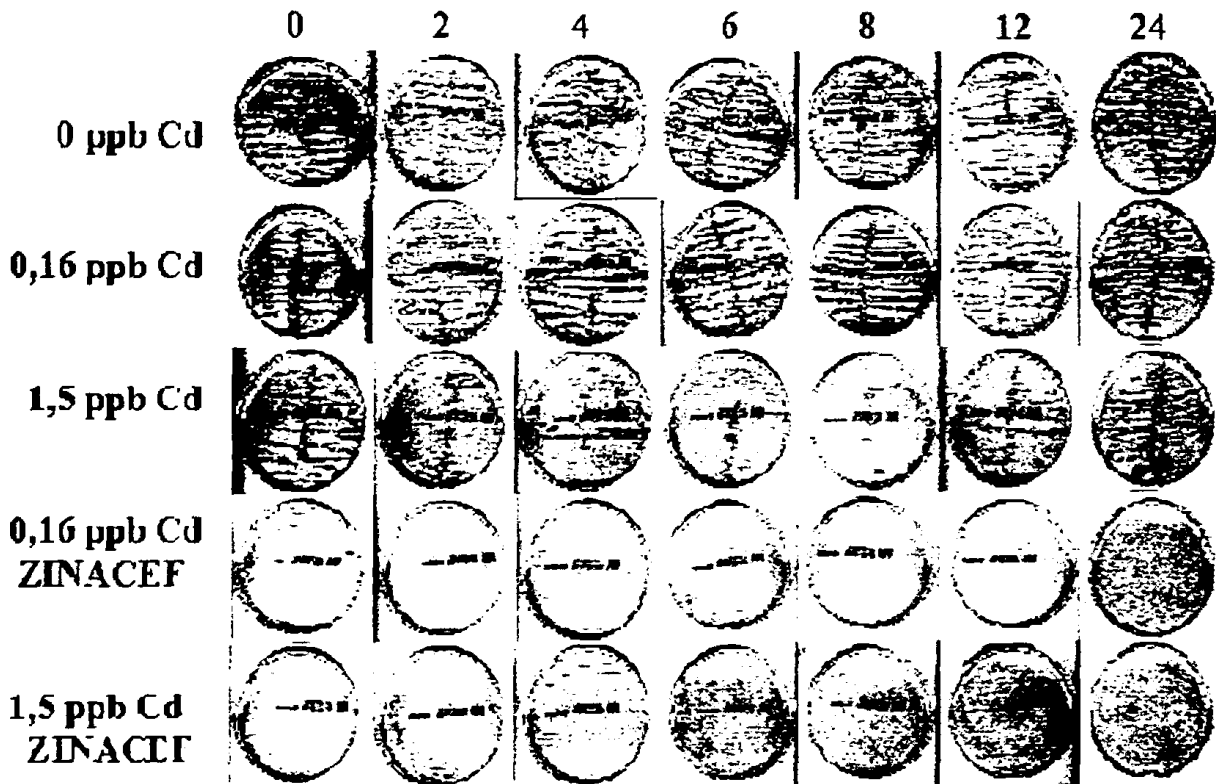
Σχήμα III 20 Β. Διαφορές τιμών θολρότητας (NTU) μεταξύ των 2 συγκεντρώσεων Cd, ανά παρουσία ή απουσία cefuroxime και είδος βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*)



Σχήμα III 20 Γ. Διαφορές τιμών θαλερότητας (NTU) μεταξύ των 2 συγκεντρώσεων Cd, ανά παρουσία ή απουσία cefuroxime και είδος βακτηρίου (*Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*)

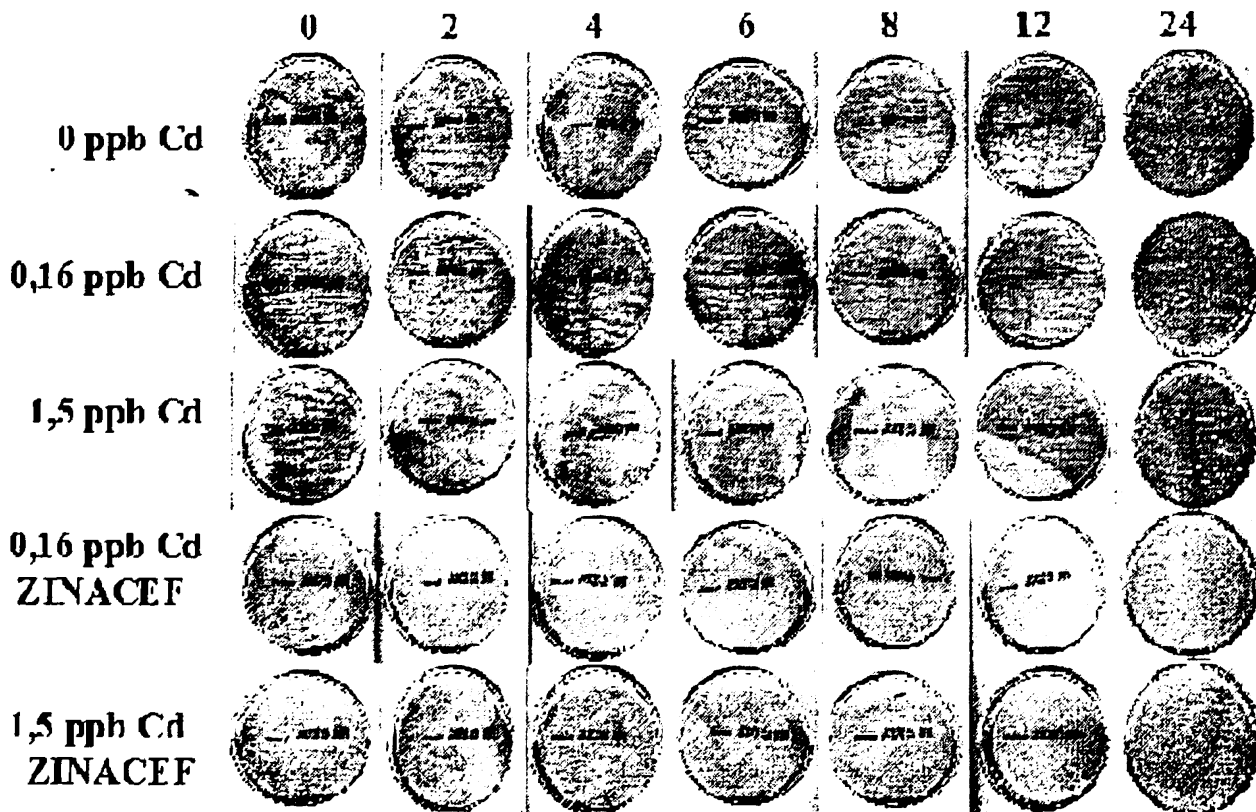


Escherichia coli
Χρόνος (ώρες)



Σχήμα III 21. Επίδραση του Cd στην ανάπτυξη αποικιών του βακτηρίου *Escherichia coli* με απουσία και παρουσία αντιβιοτικού cefuroxime

Proteus mirabilis
Χρόνος (ώρες)



Σχήμα III 22. Επίδραση του Cd στην ανάπτυξη αποικιών του βακτηρίου *Proteus mirabilis* με απουσία και παρουσία αντιβιοτικού cefuroxime

IV ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό ότι το Cd είναι ένα βαρύ μέταλλο σχετικά σπάνιο, κατέχει την 67^η θέση σε ότι αφορά τη χημική αφθονία και μπορεί να βρεθεί στον φλοιό της Γης. Παράγεται σαν παραπροϊόν κατά την διάρκεια επεξεργασίας θειούχων μεταλλευμάτων του Zn, του Cu και του Pb. Η ηφαιστειακή δραστηριότητα είναι η κύρια φυσική πηγή της απελευθέρωσής του στην ατμόσφαιρα. Επίσης απελευθερώνεται από εκπομπές μορίων του εδάφους από τον άνεμο, από πυρκαγιές δασών, από το αλάτι με τον μπουχό της θάλασσας και από βιογενείς διαδικασίες. Η συνολική ποσότητα του Cd που απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα από φυσικές πηγές είναι 1400 τόνοι τον χρόνο, ενώ η υπολογισμένη ποσότητα από ανθρωπογενείς πηγές είναι 7600 τόνοι τον χρόνο (Nriagu 1990, WHO 1992, Alloway 1990). Το Cd δεν έχει καμία βιοχημική ή διατροφική ιδιότητα και είναι πολύ τοξικό και στα φυτά και στα ζώα. Ο χρόνος ημιζώης του εκτιμάται ότι είναι περισσότερο από 15 χρόνια στον άνθρωπο. Κατά τη διάρκειά του 20^{ου} αιώνα, το φορτίο του ανθρώπινου σώματος σε Cd έχει αυξηθεί ως αποτέλεσμα των ανεξέλεγκτων βιομηχανικών εκπομπών στο παρελθόν. (USPHS 1997, WHO 1992, Alloway 1990). Η τοξική δράση του Cd εκδηλώνεται με διάφορους τρόπους, ένας από αυτούς είναι η αντικατάσταση του Zn, ιχνοστοιχείο απαραίτητο σε διάφορα βιολογικά συστήματα (Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου, 1990). Το Cd μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε διάφορα όργανα του ανθρώπινου σώματος, κυρίως στους νεφρούς μετά από παρατεταμένη έκθεση σε συνθήκες βιομηχανίας ή στο μολυσμένο περιβάλλον (Lauwerys, 1994, Bernard, 2004). Η βλάβη αυτή μελετάται κυρίως από βιολογικούς δείκτες στα ούρα όπως ο προσδιορισμός της α₁-μικροσφαιρίνης, της β₂-μικροσφαιρίνης, της RBP, της CC16 και της NAG (Bernard, 2004, Kawada, 1995).

Είναι γνωστό ότι ένα από τα σημαντικότερα βακτήρια που προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (μεταξύ άλλων και λοιμώξεις του αναπνευστικού, του γαστρεντερικού και του ΚΝΣ) στον άνθρωπο, είναι η *Escherichia coli*, το σημαντικότερο είδος του γένους *Escherichia*. Η *E.coli* προκαλεί το 90% των εξωνοσοκομειακών και το 50% των νοσοκομειακών λοιμώξεων του ουροποιητικού. Οι λοιμώξεις προκαλούνται από στελέχη του μικροβίου που βρίσκονται στο γαστρεντερικό σύστημα, είναι ανιούσες, είναι συχνότερες στις γυναίκες (κυρίως μετά την εμμηνόπαυση) παρά στους άνδρες και εκδηλώνονται ως ουρηθρίτιδα που μπορεί να εξελιχθεί σε αληθή πυελονεφρίτιδα. Τα στελέχη *Escherichia coli* που προκαλούν πυελονεφρίτιδα φέρουν P ινίδια ή gal-gal pilus με τα οποία προσκολλώνται στο επιθήλιο του ουροποιητικού, παράγουν αιμολυσίνες, ανθίστανται στην βακτηριοκτόνο δράση του ορού και φέρουν αεροβακτίνες. Για τη διαπίστωση του αριθμού των μικροβίων ανά ml ούρων γίνονται ποσοτικές καλλιέργειες. Ορισμένο ποσό αραιωμένου ούρων καλλιεργείται και από τον αριθμό των αναπτυσσομένων αποικιών υπολογίζεται ο αριθμός των μικροβίων ανά ml ούρων. Τέλος για τη θεραπεία των λοιμώξεων από *Escherichia coli* χρησιμοποιούνται διάφορα χημειοθεραπευτικά και αντιβιοτικά όπως σουλφοναμίδες, αμικικιλίνη, τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες, χλωραμφενικόλη, κεφαλοσπορίνες, τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη *in vitro*. (Δημόπουλος, 1991, Valiquette, 2001, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003, Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλάινα, 2004, Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005, Lockhart et al. 2007).

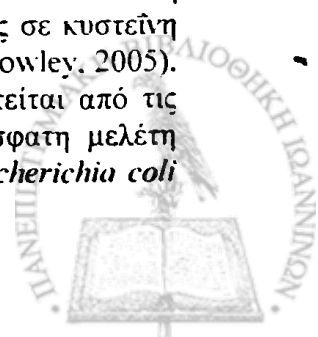
Ένα άλλο βακτήριο που είναι γνωστό ότι προκαλεί συχνά ουρολοιμώξεις σε ποσοστό 10% επί του συνόλου των λοιμώξεων του ουροποιητικού, (μετά την *Escherichia coli* και την *Klebsiella*) και ειδικότερα πυελονεφρίτιδες, είναι ο *Proteus*



mirabilis της φυλής *Proteaeae*. Συνήθως προσβάλλονται νεαρά αρσενικά και σπανιότερα νεαρά θηλυκά άτομα, ηλικιωμένοι ασθενείς με δομικές ανωμαλίες στην διάπλωση των ουροφόρων οδών, νοσηλεύόμενοι καθετηριασμένοι που υποβάλλονται σε ιατρικούς χειρισμούς στο ουροποιητικό. Οι ουρολοιμώξεις από τον *Proteus mirabilis* προκαλούνται από την παρουσία του στο έντερο, από την έντονη κινητικότητα του μικροβίου το οποίο εισέρχεται στο ουροποιητικό, από την ικανότητά του να παράγει υδροξείδιο του αμμωνίου (NH_4OH) από τη διάσπαση της ουρίας. Το NH_4OH αυξάνει το pH των ούρων δρώντας τοξικά στα κύτταρα του νεφρικού παρεγχύματος με συνέπεια τα νεκρά κύτταρα να αποτελούν πυρήνες για να σχηματισθούν λίθοι, οι οποίοι ευνοούν τη λοίμωξη στη χρονιότητα κατακράτησης ούρων και επίσης από τα ινίδιά του με τα οποία προσκολλάται στο βλεννογόνο του ουροποιητικού συστήματος. Όσον αφορά τη θεραπεία, ο *Proteus mirabilis* είναι ευαίσθητος στην αμπικιλίνη και στις κεφαλοσπορίνες (Αρσένη 1994, Coker et al, 2000, Φωκάς, Φωκάς και Μαρκάτου, 2003, Κούρτη, Λεγάκης και Παπαπαρασκευάς, 2005, Lockhart et al. 2007).

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπους που κατοικούσαν σε διάφορες περιοχές εκτεθειμένες σε βαριά μέταλλα συμπεριλαμβανομένου και του Cd, έχει ανιχνευτεί Cd στα ούρα τους. Οι περιοχές αυτές ήταν πολύ κοντά ή δίπλα σε περιοχές εξόρυξης άνθρακα και μετάλλων, σε βιομηχανίες αυτοκινητών και τροφίμων καθώς και σε σημεία έκθεσης σε καυσαέρια από ντίζελ. Παράγοντες που ελήφθησαν υπόψη κατά τις μελέτες αυτές ήταν η ηλικία, το γένος και η συνήθεια του καπνίσματος. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών ήταν αρκετά χρήσιμα και κατατοπιστικά σχετικά με την έκθεση στο Cd και την τοξική του επίδραση στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του Cd ήταν αυξημένη, μειωμένη ή παρέμεινε σταθερή ανάλογα με την ηλικία των ατόμων (Elinder, et al., 1978, Hietland and Köster, 2006, Batariova et al., 2006, Devi, Biswas and Biswas, 2007). Επίσης η συγκέντρωση του Cd στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν υψηλότερη σε καπνιστές από ότι σε μη καπνιστές (Elinder, et al., 1978, Hietland and Köster, 2006, Erie et al. 2007), αφού τα φύλλα του καπνού απορροφούν Cd από το έδαφος και το νερό άρδευσης των μολυσμένων περιοχών στις οποίες έγιναν οι μελέτες και απελευθερώνεται στο ρεύμα καπνού όταν καίγεται το τσιγάρο (Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου, 1990). Ακόμα, υπήρξε συσχετισμός μεταξύ του Cd στα ούρα και των καπνιστών που έπασχαν από AMD, ο οποίος δείχνει ότι το Cd μπορεί να μεσολαβεί μερικώς στη επίδραση του καπνίσματος στην AMD, πιθανόν μέσω της βλάβης του ιστού της ωχρής κηλίδας που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες (λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του Cd) (Erie et al, 2007).

Αρκετές επίσης μελέτες έδειξαν ότι το Cd ασκεί τοξική επίδραση στο βακτήριο της *Escherichia coli* με αναστολή της ανάπτυξής του (Trevors, Stratton and Gadd, 1986), που γίνεται πιθανόν μέσω ποικίλων δυσμενών επιδράσεων στην κυτταρική διαίρεση, στην πρωτεϊνσύνθεση και σε οργανίδια του κυττάρου όπως τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες (Trevors, Stratton and Gadd, 1986, Wang and Crowley, 2005). Οι μηχανισμοί τοξικότητας έχει βρεθεί ότι είναι η επαγωγή ορισμένων πρωτεϊνών του στρες (Faber, Egli and Harder W, 1993), η ενδοκυττάρια παραγωγή υπεροξειδίου (Geslin et al, 2001), η πρόκληση βλάβης στο DNA (Shapiro and Keasling, 1996), η μεταβολή στον αναερόβιο μεταβολισμό, η συνάθροιση των γ-πρωτεϊνών, και η μετατόπιση του Cd σε πρωτεΐνες που συνδέονται με τον Zn, πλούσιες σε κυστεΐνη (Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου, 1990, Wang and Crowley, 2005). Επίσης βρέθηκε ότι η τοξικότητα του Cd μπορεί παραδόξως να ασκείται από τις μεταλλοθειονίνες (Achard-Jori et al., 2007) και τέλος μια πιο πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι η παρεμβολή του Cd στην αλυσίδα αναπνοής της *Escherichia coli*



είναι η αιτία του οξειδωτικού στρες που επάγεται από το μέταλλο και ότι η αύξηση των αντιδραστικών μορφών οξυγόνου δεν οφείλεται στην έλλειψη γλουταθειονίνης, πεπτιδίο πολύ σημαντικό για την απαλλαγή από την τοξικότητα του Cd (Pacheco et al. 2008). Παρόμοιες μελέτες για τον *Proteus mirabilis* δεν έχουν πραγματοποιηθεί.

Εντούτοις παρότι το Cd έχει διαπιστωθεί ότι δεν έχει καμία βιοχημική ή διατροφική ιδιότητα και είναι πολύ τοξικό στα φυτά και στα ζώα (Gadd, 1990, Nriagu, 1990, USPHS 1997, WHO 1992, Alloway 1990), σε μια έρευνα διαπιστώθηκε ότι το βαρύ αυτό μέταλλο ασκεί ευεργετική δράση την ανάπτυξη του θαλασσινού διατόμου του φυτοπλαγκτόν, *Thalassiosira weissflogii* αυξάνοντας τη ταχύτητα ανάπτυξής του, σε συγκέντρωση 45 pM, υπό συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων Zn, οι οποίες προσομοιάζουν με το θαλάσσιο περιβάλλον. Η ευεργετική αυτή επίδραση του Cd ασκήθηκε μέσω της αύξησης της δραστηριότητας και της πρωτεϊνικής έκφρασης της συγκεκριμένης για το Cd, CA η οποία αντικαθιστά το αντίστοιχο ένζυμο για τον Zn που είναι η TWCA1, σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης του Zn (Lane and Morel, 2000).

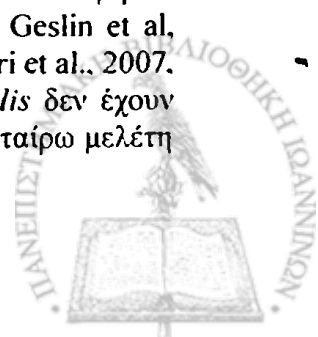
Τέλος έχει βρεθεί ότι στα βακτήρια όπως η *Escherichia coli* υπάρχουν πλασμίδια που φέρουν γονίδια τα οποία παρέχουν πολύ συγκεκριμένη ανθεκτικότητα σε διάφορα μέταλλα συμπεριλαμβανομένου και του Cd. Αυτά είναι η ATPase, cadA που απαλλάσσει τα κύτταρα από το Cd, (Silver, Misra and Laddaga, 1989), το γονίδιο *pcoABCD* και το *pcoRS* της *Escherichia coli* που παρέχει ανθεκτικότητα στον Cu (Silver and Phung, 1996), η τύπου-P ATPase, ZntA στην *Escherichia coli* η οποία εξασφαλίζει ανθεκτικότητα στο Cd, στον Zn και στον Pb (Nies and Silver, 1995, Silver, 1998, Rosen, 2002), η πρωτεΐνη εκροής ιόντων μετάλλων, Czr και Czc η οποία όταν εκφράζεται στην *Escherichia coli* έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ανθεκτικότητα στα ιόντα Zn και Cd και σε μικρότερο βαθμό στο Co (Spada, Pembroke and Wall, 2002) και η ανθρώπινη πρωτεΐνη MDR1 όσο και οι βακτηριακές MDR πρωτεΐνες LmrA και OmgA όπου παρέχουν ανθεκτικότητα στην *Escherichia coli* από την τοξική επίδραση του Cd (Achard-Joris, et al, 2005). Επίσης σημαντικό ρόλο στην προστασία της *Escherichia coli* από το οξειδωτικό στρες που προκαλεί το Cd παίζουν και οι SOD (Mn-SOD και Fe-SOD) οι οποίες διασπούν τη χημική ρίζα του υπεροξειδίου (Geslin et al, 2001, Achard-Jori et al., 2007).

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω επισημάνσεις κατανοείται ότι τα βακτήρια *Escherichia coli*, και *Proteus mirabilis*, όταν βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στα ούρα ανθρώπων που ενδεχομένως πάσχουν από ουρολοιμώξεις μπορεί να εκτεθούν σε διάφορες συγκεντρώσεις Cd οι οποίες εξαρτώνται από εργασιακούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες έκθεσης των ανθρώπων αυτών στο μέταλλο αλλά και από τη συνήθεια του καπνίσματος. Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκαν οι επιδράσεις διαφόρων δόσεων Cd στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* και σε συνδυασμό με το αντιβιοτικό cefuroxime (κεφαλοσπορίνη β γενιάς). Χρησιμοποιήθηκε ένας τρόπος ανάπτυξης των βακτηρίων που προσομοίαζε με την κατάσταση ουρολοίμωξης. Συγκεκριμένα, ο ειδικός θρεπτικός ζωμός στον οποίο ενοφθαλμίστηκαν και αναπτύχθηκαν τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* ήταν το υπόστρωμα που παρέχουν τα ούρα αντίστοιχα σε συνθήκες ουρολοίμωξης. Επίσης οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του Cd που προστέθηκαν και μετρήθηκαν στον θρεπτικό ζωμό με το κυτταρικό εναιώρημα των βακτηρίων, ήταν ποσοτικά χαμηλότερες, ίσες ή υψηλότερες από τις φυσιολογικές δόσεις που απαντώνται στα ούρα ανθρώπων οι οποίοι έχουν ή δεν έχουν εκτεθεί στο Cd. Τέλος η φαινομενικά ευεργετική και η τοξική δόση του Cd συνδυάστηκε και με το αντιβιοτικό cefuroxime στο οποίο και τα δύο βακτήρια βρέθηκε ότι είναι ευαίσθητα (πίνακας III7).



Ένα πρώτο σημαντικό αποτέλεσμα που μπορεί να αναφερθεί είναι ότι οι μεγαλύτερες διαφορές στην ανάπτυξη των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*. εντοπιστήκαν μεταξύ της συγκέντρωσης 0.16 $\mu\text{g/l}$ και 1.50 $\mu\text{g/l}$ Cd. σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης με εξαίρεση την χρονική στιγμή 0 (σχήματα III 1, III 2, III 9 και III 10). Όσον αφορά τη δόση 0.16 $\mu\text{g/l}$ Cd. φάνηκε ότι αύξησε την ταχύτητα ανάπτυξης των βακτηρίων αλλά και την ανάπτυξη αποικιών στην *Escherichia coli*, και στον *Proteus mirabilis* κυρίως σε ορισμένα χρονικά διαστήματα επώασης σε σύγκριση με την δόση 0 $\mu\text{g/l}$ Cd (σχήματα III 17, III 18, III 21 και III 22). Επομένως φάνηκε καθαρά ότι η συγκέντρωση 0.16 $\mu\text{g/l}$ Cd άσκησε μια ευεργετική επίδραση στην ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών. Αντίθετα η δόση 1.50 $\mu\text{g/l}$ Cd φάνηκε ότι ελάττωσε την ταχύτητα ανάπτυξης των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*, ασκώντας την μεγαλύτερη τοξικότητα στην ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών συγκριτικά με τις άλλες δόσεις Cd που μελετήθηκαν (0.25, 0,5 και 1,0 $\mu\text{g/l}$ Cd), σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης. Επίσης η δόση 1.50 $\mu\text{g/l}$ Cd ελάττωσε και την ανάπτυξη αποικιών της *Escherichia coli*, και του *Proteus mirabilis* σε σύγκριση με το 0 $\mu\text{g/l}$ Cd (σχήματα III 17, III 18, III 21 και III 22).

Η αύξηση στην ταχύτητα ανάπτυξης των βακτηρίων *Escherichia coli*, και *Proteus mirabilis* σε σύγκριση με αυτή της απουσίας του Cd (control), μπορεί να οφείλεται καταρχήν σε μια πιθανή προστατευτική ιδιότητα του Cd που ενδεχομένως να ασκείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα βακτήρια όπως συνέβη στην περίπτωση του θαλασσινού διατόμου του φυτοπλαγκτόν *Thalassiosira weissflogii*, όπου υπό συγκεκριμένες συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση της ταχύτητα ανάπτυξης του οργανισμού μετά από έκθεση σε 45 μM . Cd. Υπάρχει επομένως η πιθανότητα να επάγεται η έκφραση και η δραστηριότητα μιας πρωτεΐνης παρόμοιας με την CA στο *Thalassiosira weissflogii*, και να προκαλείται αυτή η αύξηση στην ταχύτητα ανάπτυξης (Lane and Morel, 2000). Επίσης η αύξηση στην ταχύτητα της ανάπτυξης της *Escherichia coli*, και του *Proteus mirabilis* από την δόση 0.16 $\mu\text{g/l}$ του Cd μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη μηχανισμών άμυνας και ανθεκτικότητας στις τοξικές επιδράσεις του Cd, όπως έχει αναφερθεί σε μελέτες. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να είναι η ενεργοποίηση πρωτεϊνών όπως οι «δισμουτάσες του υπεροξειδίου» (Mn-SOD και Fe-SOD) πρωτεΐνες που προστατεύουν την *Escherichia coli* από το οξειδωτικό στρες, που προκαλεί το Cd στο βακτήριο (Geslin et al. 2001), η τύπου-P ATPases, όπως η ZntA στην *Escherichia coli* η οποία προστατεύει από το Cd (Nies and Silver, 1995, Silver, 1998, Rosen, 2002), η πρωτεΐνη εκροής ιόντων μετάλλων, Czr και Czc στην *E. coli* η οποία αυξάνει την ανθεκτικότητα στα ιόντα Cd (Spada, Pembroke and Wall, 2002) και τέλος η ανθρώπινη πρωτεΐνη MDR1 και οι βακτηριακές MDR πρωτεΐνες LmrA και OmgA που παρέχουν ανθεκτικότητα στην *Escherichia coli* από την τοξική επίδραση του Cd (Achard-Joris, et al, 2005). Επομένως θα μπορούσαν στο μέλλον να σχεδιαστούν και να πραγματοποιηθούν ερευνητικές μελέτες και εργασίες στις οποίες εφαρμόζοντας εργαστηριακές τεχνικές κατάλληλες για την μελέτη έκφρασης και δραστηριότητας πρωτεϊνών, να αποκαλυφθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους η δόση 0.16 $\mu\text{g/l}$ του Cd αυξάνει την ευεργετική της επίδραση στην *Escherichia coli*, και στον *Proteus mirabilis*. Επίσης η τοξικότητα που προκαλεί η δόση 1.50 $\mu\text{g/l}$ Cd, στην ταχύτητα ανάπτυξης των βακτηρίων, σε ότι αφορά την *Escherichia coli* μπορεί να οφείλεται στους μηχανισμούς που ήδη έχουν αναφερθεί (Trevors, Stratton and Gadd, 1986, Faber, Egli and Harder W, 1993, Geslin et al, 2001, Shapiro and Keasling, 1996, Wang and Crowley, 2005, Achard-Jori et al., 2007, Pacheco et al, 2008). Αντίστοιχοι μηχανισμοί για τον *Proteus mirabilis* δεν έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Συνεπώς θα ήταν ενδιαφέρουσα μια περαιτέρω μελέτη



σχετικά με τους μηχανισμούς τοξικότητας ειδικά της δόσης 1,50 $\mu\text{g/l}$ Cd, στην *Escherichia coli* και ειδικά στον *Proteus mirabilis*.

Επίσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ταχύτητα ανάπτυξης του βακτηρίου *Escherichia coli* ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή του *Proteus mirabilis* για όλες τις συγκεντρώσεις Cd και σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης με εξαίρεση την χρονική στιγμή 0 (σχήματα III 3 έως III 8 και III 11 έως III 16). Δηλαδή φάνηκε ότι η *Escherichia coli* είναι πιο ανθεκτικό βακτήριο στην τοξική επίδραση του Cd από ότι ο *Proteus mirabilis* στις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν. Συνεπώς είναι φανερό ότι οι μηχανισμοί άμυνας και ανθεκτικότητας στις τοξικές επιδράσεις του Cd, που πιθανόν να αναπτύσσονται στα βακτήρια που μελετήθηκαν (Geslin et al, 2001, Nies and Silver, 1995, Silver, 1998, Rosen, 2002, Spada, Pembroke and Wall, 2002, Achard-Joris, et al, 2005) φαίνεται ότι επιδρούν πιο αποτελεσματικά στην *Escherichia coli* από ότι στον *Proteus mirabilis*.

Ακόμα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία του αντιβιοτικού cefuroxime προκάλεσε σημαντικά χαμηλότερη ανάπτυξη της ταχύτητας, οδηγώντας σε πολύ μικρές μεταβολές στις τιμές της, με την πάροδο του χρόνου επώασης και για τα δύο βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* και στις δύο συγκεντρώσεις Cd, σε σύγκριση με αυτή που προέκυψε από την απουσία του (σχήματα III 17 Α έως III 17 Γ και III 18 Α έως III 18 Γ). Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο αφού και τα δύο βακτήρια είναι ευαίσθητα στο cefuroxime (πίνακας III 5).

Επίσης φάνηκε ότι η απουσία του cefuroxime έχει ως αποτέλεσμα και στις δύο συγκεντρώσεις Cd, τα δύο βακτήρια να αυξάνουν την ταχύτητα ανάπτυξής τους με ανάλογο τρόπο σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης. Όσον αφορά το βακτήριο *Escherichia coli* η ταχύτητα ανάπτυξης ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή του *Proteus mirabilis*. Αντίθετα η παρουσία του cefuroxime είχε σαν συνέπεια την εξάλειψη αυτής της διαφοράς μεταξύ των βακτηρίων και στις δύο συγκεντρώσεις Cd γεγονός που αναμενόταν λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία των βακτηρίων στο αντιβιοτικό αυτό (σχήμα III 17 Β και III 18 Β). Συνεπώς τα αποτελέσματα έδειξαν για άλλη μια φορά ότι η *Escherichia coli* είναι πιο ανθεκτική στην τοξική επίδραση του Cd από ότι ο *Proteus mirabilis*, πιθανόν λόγω της αποτελεσματικής επίδρασης των μηχανισμών άμυνας και ανθεκτικότητας (Geslin et al, 2001, Nies and Silver, 1995, Silver, 1998, Rosen, 2002, Spada, Pembroke and Wall, 2002, Achard-Joris, et al, 2005).

Τέλος, από τα αποτελέσματα, όταν δεν υπάρχει cefuroxime, προέκυψαν σημαντικές διαφορές στην ταχύτητα ανάπτυξης μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων Cd (0,16 $\mu\text{g/l}$ και 1,50 $\mu\text{g/l}$) και για την *Escherichia coli* και για τον *Proteus mirabilis* κυρίως από τις 6 ώρες επώασης και μετά. Επίσης προέκυψαν και διαφορές στην ανάπτυξη αποικιών των δύο βακτηρίων, *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων Cd (σχήματα III 17, III 18, III 21 και III 22). Αντίθετα όπως ήταν αναμενόμενο η παρουσία του cefuroxime οδηγεί στην πλήρη αναστολή της ανάπτυξης αποικιών των δύο βακτηρίων και στις δύο συγκεντρώσεις Cd, σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης (σχήματα III 21 και III 22). Για άλλη μια φορά επομένως φάνηκε καθαρά η ευεργετική επίδραση της δόσης 0,16 $\mu\text{g/l}$ Cd και η τοξική επίδραση της δόσης 1,50 $\mu\text{g/l}$ Cd στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* λόγω πιθανών μηχανισμών άμυνας και ανθεκτικότητας (Geslin et al, 2001, Nies and Silver, 1995, Silver, 1998, Rosen, 2002, Spada, Pembroke and Wall, 2002, Achard-Joris, et al, 2005) και λόγω μηχανισμών τοξικότητας για την *Escherichia coli* (Trevors, Stratton and Gadd, 1986, Faber, Egli and Harder W, 1993, Geslin et al, 2001, Shapiro and Keasling, 1996, Wang and Crowley, 2005, Achard-Jori et al., 2007, Pacheco et al, 2008). Και σε αυτό το σημείο είναι ανάγκη να τονιστεί και πάλι η



σημασία περαιτέρω έρευνας σχετικά με τους μηχανισμούς τοξικότητας του Cd καθώς και σχετικά με τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας ενάντια στην τοξικότητα σε επίπεδο έκφρασης και λειτουργίας πρωτεϊνών, στην *Escherichia coli* και ειδικά στον *Proteus mirabilis*.

Επομένως είναι κατανοητό ότι όταν ορισμένα άτομα είναι εκτεθειμένα σε σχετικά υψηλές δόσεις Cd είτε γιατί εκτίθενται από το χώρο εργασίας τους και από το περιβάλλον τους, είτε γιατί είναι καπνιστές, μπορεί να υφίστανται τις τοξικές επιδράσεις του μετάλλου στον οργανισμό τους σε διάφορα όργανα και κυρίως στους νεφρούς. Παρόλα αυτά όμως, τους παρέχεται μια πιθανή προστασία από ουρολοιμώξεις αφού οι υψηλές δόσεις του Cd στα ούρα τους, είναι πιθανόν να δράσουν τοξικά σε βακτήρια υπεύθυνα για την εκδήλωση τέτοιων παθήσεων όπως είναι η *Escherichia coli*, και ο *Proteus mirabilis*. Επίσης ορισμένες χαμηλές δόσεις Cd που ενδεχομένως υπάρχουν στον οργανισμό ανθρώπων που δεν έχουν εκτεθεί στο μέταλλο από τις προαναφερόμενες αιτίες, να λειτουργήσουν ευεργετικά σε βακτήρια όπως είναι η *Escherichia coli* και ο *Proteus mirabilis*, που ήδη μπορεί να υπάρχουν στο ουροποιητικό σύστημα. Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος μπορεί να είναι η εκδήλωση ουρολοιμώξεων λόγω της αύξησης της ταχύτητας ανάπτυξης των βακτηρίων.



V ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Το Cd σε συγκέντρωση 0,16 µg/l ασκεί ευεργετική επίδραση στα βακτήρια *Escherichia coli*, και *Proteus mirabilis* αυξάνοντας την ταχύτητα ανάπτυξής τους κυρίως από τις 6 επώασης και μετά.
2. Το Cd σε συγκέντρωση 1,50 µg/l ασκεί προφανή τοξική επίδραση στα βακτήρια *Escherichia coli*, και *Proteus mirabilis* ελαττώνοντας την ταχύτητα ανάπτυξής τους σε όλες τις χρονικές περιόδους επώασης (0 έως και 24 ώρες).
3. Η *Escherichia coli* είναι πιο ανθεκτικό βακτήριο στην τοξική επίδραση του Cd από ότι ο *Proteus mirabilis* στις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν, αφού η ταχύτητα ανάπτυξης της *Escherichia coli* ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή του *Proteus mirabilis* για όλες τις συγκεντρώσεις Cd και σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.
4. Η δόση 0,16 µg/l Cd, φάνηκε ότι αύξησε την ανάπτυξη αποικιών στην *Escherichia coli*, και στον *Proteus mirabilis* κυρίως σε ορισμένα χρονικά διαστήματα επώασης σε σύγκριση με την δόση 0 µg/l Cd ενώ αντίθετα η δόση 1,50 µg/l Cd φάνηκε ότι ελάττωσε την ταχύτητα ανάπτυξης των βακτηρίων *Escherichia coli*, και *Proteus mirabilis*.
5. Η απουσία του cefuroxime προκάλεσε την αύξηση της ταχύτητας ανάπτυξης και των δύο βακτηρίων και στις δύο συγκεντρώσεις Cd (0,16 µg/l και 1,50 µg/l) με την ταχύτητα της *Escherichia coli* να είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή του *Proteus mirabilis*.
6. Όταν δεν υπήρχε cefuroxime παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ταχύτητα ανάπτυξης μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων Cd (0,16 µg/l και 1,50 µg/l) και για τα δύο βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* κυρίως από τις 6 ώρες επώασης και μετά.
7. Η παρουσία του cefuroxime είχε σαν συνέπεια την εξάλειψη της διαφοράς στην ταχύτητα ανάπτυξης μεταξύ των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* καθώς και μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων Cd (0,16 µg/l και 1,50 µg/l) που οφείλονται στην πάροδο του χρόνου επώασης. Επίσης οδηγεί στην πλήρη αναστολή της ανάπτυξης αποικιών των δύο βακτηρίων και στις δύο συγκεντρώσεις Cd , σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης
8. Τα άτομα που εκτίθενται σε σχετικά υψηλές δόσεις Cd προστατεύονται πιθανά από ουρολοιμώξεις λόγω της τοξικής επίδρασης του μετάλλου σε βακτήρια όπως η *Escherichia coli*, και ο *Proteus mirabilis*.
9. Χαμηλές δόσεις Cd στον οργανισμό ανθρώπων πιθανόν να λειτουργήσουν ευεργετικά σε βακτήρια όπως η *Escherichia coli*, και ο *Proteus mirabilis*, και να εκδηλωθούν ουρολοιμώξεις.



VI ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκαν οι επιδράσεις διαφόρων συγκεντρώσεων Cd στα βακτήρια *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* και σε συνδυασμό με το αντιβιοτικό cefuroxime. Καταρχήν και στην *Escherichia coli* και στον *Proteus mirabilis*, το Cd σε συγκέντρωση 0,16 μg/l ασκεί ευεργετική δράση αυξάνοντας την ταχύτητα ανάπτυξής τους και τον σχηματισμό αποικιών. Επίσης το Cd στη συγκέντρωση 1,5 μg/l ασκεί τη πιο μεγάλη τοξική δράση από όλες τις άλλες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (0,25, 0,5 και 1,0 μg/l Cd) στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* ελαττώνοντας την ταχύτητα ανάπτυξής τους από τις 0 έως και 24 ώρες επώασης καθώς και τον σχηματισμό αποικιών. Επίσης η ταχύτητα ανάπτυξης της *Escherichia coli* ήταν υψηλότερη από αυτή του *Proteus mirabilis* για όλες τις συγκεντρώσεις Cd και σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης και επομένως βγήκε το συμπέρασμα ότι η *Escherichia coli* είναι πιο ανθεκτικό βακτήριο στην τοξική επίδραση του Cd από ότι ο *Proteus mirabilis*. Η *Escherichia coli* και ο *Proteus mirabilis* είναι ευαίσθητα στο αντιβιοτικό cefuroxime. Η απουσία του cefuroxime προκάλεσε την αύξηση της ταχύτητας ανάπτυξης και των δύο βακτηρίων και στις δύο συγκεντρώσεις Cd (0,16 μg/l και 1,50 μg/l) με την ταχύτητα ανάπτυξης της *Escherichia coli* να είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή του *Proteus mirabilis*. Επίσης παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ταχύτητα ανάπτυξης μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων Cd (0,16 μg/l και 1,50 μg/l) και για τα δύο βακτήρια κυρίως από τις 6 ώρες επώασης και μετά, όταν δεν υπήρχε cefuroxime. Η παρουσία του cefuroxime είχε σαν συνέπεια την εξάλειψη της διαφοράς στην ταχύτητα ανάπτυξης μεταξύ των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* και μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων Cd (0,16 μg/l και 1,50 μg/l) που οφείλονται στην πάροδο του χρόνου επώασης. Επίσης οδηγεί στην πλήρη αναστολή της ανάπτυξης αποικιών των δύο βακτηρίων και στις δύο συγκεντρώσεις Cd και σε όλες τις χρονικές στιγμές επώασης.

Το κάδμιο (Cd) είναι ένα σπάνιο μέταλλο, κατέχει την 67^η θέση σε χημική αφθονία και βρίσκεται στον φλοιό της Γης σε συγκέντρωση, κατά μέσο όρο 0,1 mg/kg. Το Cd επίσης είναι βιοσυσσωρευτικό, πολύ τοξικό στον άνθρωπο και μένει σταθερό στο περιβάλλον με χρόνο ημιζωής ($t^{1/2}$) 10-30 χρόνια. Στον άνθρωπο, ο χρόνος ημιζωής ($t^{1/2}$), είναι περισσότερος από 15 χρόνια. Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, το φορτίο του σώματος σε Cd του γενικού πληθυσμού των πιο προηγμένων βιομηχανικά χωρών έχει αυξηθεί σαν αποτέλεσμα των ανεξέλεγκτων βιομηχανικών εκπομπών στο παρελθόν. Επιπλέον, το Cd μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους νεφρούς, μετά από παρατεταμένη έκθεση σε συνθήκες βιομηχανίας ή στο μολυσμένο περιβάλλον. Βιολογικοί δείκτες της νεφροτοξικότητας από το Cd στο άνθρωπο είναι η β₂-μικροσφαιρίνη, η RBP, η α₁-μικροσφαιρίνη, η CC16 και η NAG.

Λοιμώξεις του ουροποιητικού, παρατηρούνται με την είσοδο και εγκατάσταση μικροβίων στο ουροποιητικό, είναι αρκετά συχνές και διακρίνονται σε βακτηριακές ή μυκητιακές λοιμώξεις. Το βακτήριο *Escherichia coli* και ειδικά τα στελέχη που βρίσκονται στον γαστρεντερικό σωλήνα, είναι το συχνότερο αίτιο ουρολοιμώξεων προκαλώντας το 90% των εξωνοσοκομειακών και το 50% των νοσοκομειακών. Είναι συχνότερες στις γυναίκες (κυρίως μετά την εμμηνόπαυση) παρά στους άνδρες και για τη θεραπεία τους χρησιμοποιούνται διάφορα χημειοθεραπευτικά και αντιβιοτικά όπως σουλφοναμίδες, αμπικιλίνη, τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες, χλωραμφενικόλη και κεφαλοσπορίνες.



Το βακτήριο *Proteus mirabilis* αποτελεί επίσης συχνό αίτιο ουρολοιμώξεων, προσβάλλει νεαρά αρσενικά και σπανιότερα θηλυκά άτομα, ηλικιωμένους, ασθενείς με δομικές ανωμαλίες στην ουροφόρο οδό, νοσηλευόμενους, καθετηριασμένους, ασθενείς που υποβάλλονται σε ιατρικούς χειρισμούς στο ουροποιητικό. Η ικανότητά του να προκαλεί ουρολοιμώξεις οφείλεται στην παραγωγή NH_4OH από την διάσπαση της ουρίας και στα ινίδιά του, τα οποία συμβάλλουν στην προσκολλητικότητα του μικροβίου στο βλεννογόνο του ουροποιητικού συστήματος. Όσον αφορά τη θεραπεία σχεδόν όλα τα στελέχη *Proteus mirabilis* είναι ευαίσθητα στην αμπικιλίνη και στις κεφαλοσπορίνες.

Σύμφωνα με διάφορες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί κατά το παρελθόν πολλά τοξικά μέταλλα μεταξύ των οποίων και το Cd έχουν ανιχνευτεί στα ούρα ανθρώπων που κατοικούν σε περιοχές εκτεθειμένες στα μέταλλα αυτά (περιοχές εξόρυξης άνθρακα, σε βιομηχανίες αυτοκινήτων, μετάλλων και τροφίμων σε περιοχές έκθεσης σε καυσαέρια από ντίζελ).

Το Cd, έχει βρεθεί ότι ασκεί τοξική δράση στο βακτήριο *Escherichia coli* με διάφορους μηχανισμούς όπως η αύξηση παραγωγής ορισμένων πρωτεϊνών του στρες, η ενδοκυττάρια παραγωγή υπεροξειδίου, η πρόκληση βλάβης στο DNA, η μεταβολή στον αναερόβιο μεταβολισμό, η μετατόπιση του Cd σε πρωτεΐνες που συνδέονται με τον Zn πλούσιες σε κυστεΐνη και η επαγωγή οξειδωτικού στρες από παρεμβολή του Cd, στην αλυσίδα αναπνοής του βακτηρίου. Παρόμοιες μελέτες για τον *Proteus mirabilis* δεν έχουν πραγματοποιηθεί.

Τέλος έχει βρεθεί ότι στην *Escherichia coli* υπάρχουν πλασμίδια βακτηρίων με γονίδια τα οποία παρέχουν πολύ συγκεκριμένη ανθεκτικότητα σε διάφορα μέταλλα και στο Cd. Αυτά είναι η ATPase, *cadA* που απαλλάσσει τα κύτταρα από το Cd, το γονίδιο *pcoABCD* και το *pcoRS* που παρέχει ανθεκτικότητα στον Cu, η τύπου-P ATPase, *ZntA* η οποία εξασφαλίζει ανθεκτικότητα στο Cd, στον Zn και στον Pb, η πρωτεΐνη εκροής ιόντων μετάλλων, *Czr* και *Czc* η οποία όταν εκφράζεται στην *Escherichia coli* έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ανθεκτικότητα στα ιόντα Zn και Cd και σε μικρότερο βαθμό στο Co και η ανθρώπινη πρωτεΐνη MDR1 όσο και οι βακτηριακές MDR πρωτεΐνες *LmrA* και *OmrA* όπου παρέχουν ανθεκτικότητα στην *Escherichia coli* από την τοξική επίδραση του Cd.

Από την έρευνα αυτή προκύπτει ότι το Cd των ούρων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τον ρυθμό ανάπτυξης των δύο συχνότερων μικροβίων των ουρολοιμώξεων της *Escherichia coli* και του *Proteus mirabilis*. Η επίδραση αυτή είναι διαφορετικά εξαρτώμενη από τις συγκεντρώσεις του μετάλλου στα ούρα. Οι μικρές συγκεντρώσεις επιταχύνουν σημαντικά την ανάπτυξη και των δύο μικροβίων, ενώ συγκεντρώσεις Cd που αντιπροσωπεύουν τις μέσες απαντώμενες τιμές στα φυσιολογικά άτομα και μεγαλύτερες, αναστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη των μικροβίων και επηρεάζουν τις δοκιμασίες ευαισθησίας των μικροβίων στις κεφαλοσπορίνες.



ABSTRACT

Title: The effects of cadmium (Cd) on the proliferation of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*

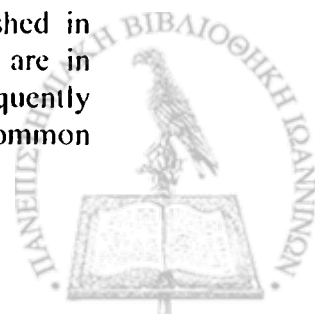
Stamatia Botsari, MD.

• **Laboratory of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina.**

In the presented work the effects of Cd in various doses in bacteria *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* and also in combination with the antibiotic cefuroxime were studied. First of all, 0.16 µg/l of Cd caused a beneficial effect on *Escherichia coli*, and on *Proteus mirabilis*, increasing the growth rate especially after 6 hours of incubation and also the colony formation. Furthermore, the concentrations of 0.25, 0.5, 1.0 and 1.5 µg/l of Cd were toxic on *Escherichia coli*, and on *Proteus mirabilis* causing a decrease in cell growth from 0 to 24 hours. The dose of 1.5 µg/l of Cd caused the highest toxicity of all studies concentrations 0.25, 0.5 και 1.0 µg/l of Cd against *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* by decreasing the growth rate and the colony formation of both bacteria. Moreover the results showed that the growth rate of *Escherichia coli* was higher than that of *Proteus mirabilis* in all Cd doses and in all incubation time periods. Therefore *Escherichia coli* is more resistant against the toxicity caused by Cd than *Proteus mirabilis*. Moreover it was found that both *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* are sensitive to the antibiotic cefuroxime. In the absence of cefuroxime there was an increase in growth rate of both bacteria and in both Cd concentrations (0.16 µg/l και 1.50 µg/l); the growth rate of *Escherichia coli* was higher than that of *Proteus mirabilis*. Furthermore there were significant differences between the growth rates of the two Cd doses (0.16 µg/l και 1.50 µg/l) in both bacteria especially after the 6th hour of incubation, when cefuroxime was absent. There were also differences in colony formation of the two Cd doses (0.16 µg/l και 1.50 µg/l) in both bacteria. The presence of cefuroxime resulted in the loss of differences in growth rates between *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* and also between the two Cd concentrations (0.16 µg/l και 1.50 µg/l), caused during the incubation time. It was also resulted in the complete inhibition of colony formation of both bacteria in both Cd concentrations and in all incubation times.

Cadmium (Cd) is a rare metal being 67th in order of chemical abundance it is found in the Earth's crust at an average concentration of 0.1 mg/kg. Cd is also bioaccumulative, very toxic to humans and it is persistent in the environment ($t^{1/2}$ of 10-30 years) and in the human organism ($t^{1/2}$ more than 15 years). During the 20th century, the burden of Cd in the human body of the general population of the industrially developed countries has been raised as a result of the uncontrolled industrial emission in the past. Furthermore, Cd can cause damage in the kidneys after prolonged exposure under industrialised conditions or under contaminated environment. Biological markers of nephrotoxicity caused by Cd, are β_2 -microglobulin, RBP, α_1 -microglobulin, CC16 and NAG.

Urinary tract infections are caused by the entrance and the installation of microorganisms in the urinary tract, are usually frequent and are distinguished in bacteria or fungal infections. *Escherichia coli*, and especially bacteria that are in gastrointestinal tract, is the bacterium that causes urinary infections more frequently (90% of non-hospitalized and 50% of hospitalized infection), that are more common



in women especially after the menopause, than in men and they also affect elderly people. Concerning the therapy against urinary infection several chemotheropoutics and antibiotics are used such as sulphonamides, ampicillin, tetracycline, aminoglucoisides, chloramphenicol, cephalosporins.

Proteus mirabilis also causes urinary infections (10% after *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*), it affects young males and rarely young females. elderly people, patients with abnormalities in urinary tract, hospitalized patients with urine collector and with obstruction. The ability of the bacterium to cause urinary infections is due to the production of NH_4OH by urea and also due to its adhesion on the urinary tract. Concerning the therapy it is known that *P. mirabilis* is sensitive in ampicillin and in cephalosporins.

According to various articles of studies that took place in the past, many toxic heavy metals. including Cd. have been found in urine samples of humans living in various areas in which they are exposed in these metals (industrial areas, coal mining areas. in car. metal and food industries. arias of diesel fumes and environments of home waste incinerators).

Cd is known to cause toxic effect on *Escherichia coli* by various mechanisms such as the induction of activity specific stress proteins, the production of endocytotic super oxide. DNA damage. the anaerobic metabolism, the accumulation of r-proteins, and the transposition of Cd to the proteins that are Zn-linked and are rich in cysteine and oxidizing stress caused by the interference of Cd in the respiration of the bacterium. There were not such studies for *Proteus mirabilis*.

Finally it was found that there are bacterial plasmids in *Escherichia coli* that carry genes which provide very specific resistance against various metals including Cd. These are the ATPase *cadA* that free the cells from Cd, the genes *pcoABCD* and *pcoRS* that provides resistance to Cd. Zn . and Pb. the metal ion efflux protein *Czr* and *Czc* that when is expressed on *E. coli* provides high resistance against Zn and Cd ions and the human protein MDR1 and the bacterial MDR proteins *LmrA* and *OmrA* that provide resistance to *Escherichia coli* against the toxicity of Cd.

The results of the presented work indicated that Cd in urine can significantly affect the growth rate of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, the two most frequent micro organisms of urinary tract infections. This effect is differentially dependent by the metal concentrations in urine. Low doses of Cd accelerate significantly the growth rate of both micro organisms, whereas the doses that represent the mean values in normal patients and higher that these, inhibit significantly the growth rate of micro organisms and also influence the sensitivity of the microbes on cephalosporins.

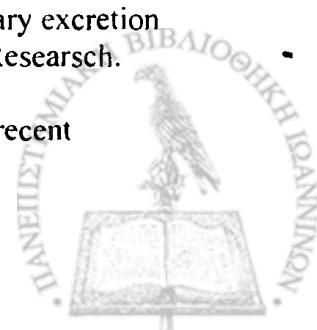


VII ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

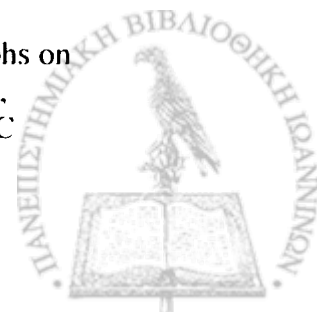
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F: Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 16th edition, ALPHA, Washington D. C., 1985.
- Al-Atia G. R. (1980). Toxicity of cadmium to *Amoeba proteus*: a biochemical approach. *Journal of Protozool.* 1980 Feb;27(1):128-32.
- Alloway, B. J. (1990). Heavy metals in soils. John Wiley and Sons, Inc. New York, ISBN 047215984
- Alloway, B. J. (1996). Soil pollution and land contamination. In Pollution, caused, effect and control, 3rd Edition. Harrison R. M. [Ed]/The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. ISBN 0854045341
- Achard-Joris, M., Bart van den Berg van Saparoea H. Driessen A. J. M., and Bourdineaud J.-P. (2005,) Heterologously Expressed Bacterial and Human Multidrug Resistance Proteins Confer Cadmium Resistance to *Escherichia coli* *Biochemistry* 44: 5916-5922
- Achard-Joris, M., Moreau, J. L., Lucas, M., Baudrimont, M., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Boudou, A. and Bourdineaud J. P. (2007). Role of metallothioneins in super oxide radical generation during copper redox cycling: Defining the fundamental function of metallothioneins. *Biochimie* 89: 1474-1488.
- Αρσένη Αντιγόνη (1998). «Εξετάσεις Ούρων στην Εργαστηριακή Διάγνωση», *Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα*, 141-145.
- Batáριοva A., Spěvácková V., Beneš B., Čejchanová M., Šmíd J., and Černá M. (2006). Blood and urine levels of Pb, Cd, and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *Int. Journal Hygiene Environmental Health* 209:359-366.
- Bergsten G, Wult B, and Svanborg, C. (2005) *Escherichia Coli*, fibriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int. Journal of Medical Microbiology*, 295 (6-7): 487-502.
- Bernard AM, Moreau D and Lauwerys R. (1982). Comparison of retinol-binding protein and beta2-microglobulin determination in urine for the early detection of tubular proteinuria. *Clin. Chim. Acta* 126, 1-7
- Bernard A, Ouled Amor A., Lauwerys R. (1987). The effects of low doses of cadmium-metallothionein on the renal uptake of b2-microglobulin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87, 440-445.
- Bernard A, Roels H, Buchet JP, Cardenas A and Lauwerys R. (1992). Cadmium and health: the Belgian experience. *IARC-Sci-Publ.* 118, 15-33.
- Bernard A, Thielemans N, Lauwerys R. (1994). Urinary protein I or Clara cell protein: a new sensitive markers of proximal tubular dysfunction. *Kidney International* 46, S34-S37.
- Bernard A. (1996). Biomarkers in surveillance of workers exposed to cadmium. *Intrnational Journal of Occupational Environmental Health* 3, 533-536.
- Bernard A. (1996b). The determination of β₂-microglobulin, retinol-binding protein and alpha 1-microglobulin in urine. In: *Biological monitoring of chemical exposure in the workplace*. WHO, Geneva, pp 74-90.
- Bernard A. (2004). Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biomaterials* 17: 519-523.



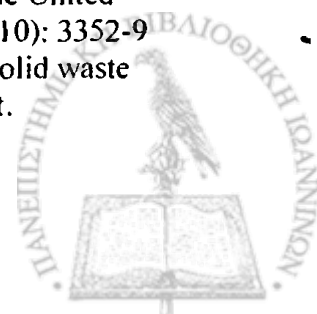
- Bradford PA (2001). Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:933-951.
- Bryan G. W. and Langston W. J. (1992) Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environmental Pollution* 76: 89-131.
- Buchet JP, Lauwerys R, Roels H, Bernard A, Bruaux P, Claeys F, Ducoffre G, de Plaen P, Staessen J and Amery A. (1990). Renal effects of cadmium body burden of the general population *Lancet* 336, 699-702.
- Bureau of Indian Standards (1995). Drinking water specifications. Second Edition, UDC 628.1.0033
- Bush K (2001) New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32:1085-1089.
- Cabrera, C., Ortega E., Gallego, C., Lopez. M. C., Lorenzo. M. L. and Asensio, C. (1994). Cadmium concentration in farmlands in southern Spain: possible sources of contamination. *The Science of the Total Environment* 153: 261-265.
- Campbell C.D., Hird M., Lumsdon D.G. and Meeussen J.C.L. (2000). The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn, and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of *Escherichia coli*. *Chemosphere* 40: 319-325
- Chen, Z. S. (1991). Cadmium and lead contamination of soils near plastic stabilizing materials producing plants in Northern Taiwan, *Water, Air and Soil Pollution* 57-58: 745-754.
- Cohn E. B. and Schaeffer A. J. (2004). Urinary tract infections in adults. *Scientific World Journal* 1: 76-88.
- Coker C., Poore C. A., Li X., Mobley H. L.T. (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and Infection*. 2: 1497-1505
- Δημόπουλος Κ. Α. (1991) Ουρολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδης Αθήνα σελ.184-188.
- Devi, S. S., Biswas A. R. and Biswas, R.A. (2007). Heavy metal status and oxidative stress in diesel engine tuning workers of central Indian population. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 49(11): 1228-1234.
- Doleans A., Issabre Y. and Freney J., (2003). [Fast tests in bacteriology]. *Ann. Biol. Clin (Paris)*1(4): 379-92.
- Dudka, S. and Driano, D.C. (1997). Environmental impacts of metal ore mining and Processing: a review. *Journal of Environmental Quality* 26: 590-602.
- Dudka, S. Piotrowska, M., Chlopecka. A. and Witek, T. (1995a). Trace metal contamination of soils and crop plants by mining and smelting industry in Upper Silesia, South Poland. *Journal Geochemical Exploration* 52: 237-250.
- Dudka, S., Ponce-Hernandez, R. and Hutchinson, T. C. (1995b). Current level of total element concentrations in the surface layer of Sudbury's soils. *Science Total Environment* 162: 161-171.
- Dulczak S and Kirk J., (2005). Overview of the evaluation, diagnosis, and management of urinary tract infections in infants and children. *Urological Nursing* 25(3): 185-191.
- Elinder. C. G., Kjellström T., Linnman L. and Pershagen G. (1978). Urinary excretion of cadmium and zinc among persons from Sweden. *Environmental Research*. 15: 473-484.
- Elinder, C. G. and Jarup, L. (1996). Cadmium exposure and health risks: recent findings. *Ambio* 25, 5: 370-373.



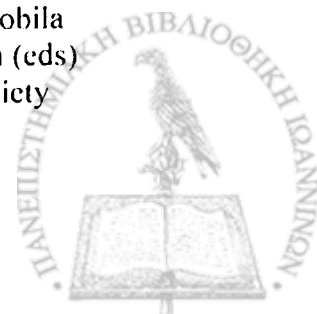
- Erie J. C., Godd J. A., Butz J. A., Hodge D. O., and Pulido J. S. (2007). Urinary Cadmium and Age-related Macular Degeneration. *American Journal of Ophthalmology* 144: 414-418.
- Ζαννάκη Κ.. Εργαστηριακός προσδιορισμός ρύπανσης στα νερά και απόβλητα, ΕΛΚΕΠΑ, Αθήνα 1983.
- Faber F., Egli T., and Harder W. (1993). Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiology Letters* 111(2-3):189-95.
- Farmer J. (1999). Enterobacteriaceae: introduction and identification. In Murray PR et al, editors: *Manual of Clinical microbiology*, ed 7, Washington DC, American Society of Microbiology
- Foster T. J. (1983). Plasmid-determined resistance to anti-microbial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiology Reviews* 47: 361-409.
- Gadd G. M. (1990). Metal tolerance. *Microbiology of Extreme Environments* McGraw-Hill Publishing Co., New York. p. 178-210.
- Geslin C., Llanos J., Prieur D. and Jeanthon C. (2001). The manganese and iron superoxide dismutases protect *Escherichia coli* from heavy metal toxicity. *Research in Microbiology* 152(10):901-5.
- Gil F, Capitán-Vallvey L F, De Santiago E, Balesta J, Pla A, Hernandez A F, Gutiérrez-Bedmar M, Fernández-Crehuet J, GómezJ, Lopez-Guardino O, Rodrigo L and Villanueva E (2006). Heavy metal concentrations in the general population of Andalusia, South of Spain, a comparison with the population within the area of influence of Aznacóllar mine spill (SW Spain). *Science of the Total Environment* 372: 49-57.
- Glandt M. (1999). Enterocoagulative *Escherichia Coli* as a cause of traveller's diarrhoea: clinical response to ciprofloxacin *Clinical Infection Disease* 29: 335-338.
- Gniadkowsky M (2001). Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clinical Microbiology and Infection*. 7:597-608.
- Gorbach SL, Bartlett JG and Blacklow NR (1998). Antimicrobial Drugs. In: Gorbach, Bartlett and Blacklow, *Infectious Diseases*. P 160-318, Saunders Company.
- Goyer, R. A. (1996). Toxic effects of metals. In Casarett & Doull's *Toxicology. The Basic Science of Poisons*, Fifth Edition, Klaassen, C. D. [Ed]. McGraw-Hill Health Professions Division, ISBN 0071054766.
- Goyer, R. A., Epstein S., Bhattacharyya, M., Korach, K. S., and Pounds, J. (1994). Environmental risk factors for osteoporosis. *Environmental Health Perspectives* 102, 4: 390-394.
- Halttunen T., Salminen S. and Tahvonen R. (2007) Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 114 30–35
- Hietland P. and Köster, H. D. (2006). Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clinica Chimica Acta* 365:310-318.
- Hotz P, Buchet JP, Brnard A, Lison D, Luwerys R (1999) Renal effects of low-level environmental cadmium exposure: 5-year follow up of a subcohort from the Cadmibel study. *Lancet* 30, 1508-1513.
- IARC (1998). Cadmium and certain cadmium compounds. In: *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans*. IARC



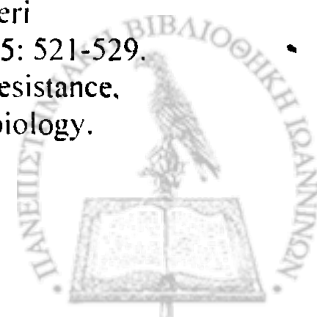
- monographs, Vol. 1 to 29.
- Ikedo M, Ezaki T, Tsukahara T, Moriguchi J, Furuki K, Fukui Y, Ukai H, Okamoto S and Sakurai H (2003) Threshold levels of urinary cadmium in relation to increases in beta2-microglobulin among general Japanese populations *Toxicology Letters* 137: 135-141.
- Iwata, K., Saito, H., Moriyama, M. and Nakano, A. (1993). Renal tubular function after reduction of environmental cadmium exposure: a ten year follow-up. *Archives of Environmental Health* 48, 3: 157-263.
- Jarup L, Hellstrom L, Alfven T., Carlsson MD, Grubb A, Persson B, Petteron C, Spang G, Schultz A and Elinder CG (2000). Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occup Environ. Med.* 57, 688-672.
- Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gerard A and Thevenot P. (2000). De l'antiboigramme a la prescription Edition 2000-French/Francais
- Jin T, Nordberg M, Frech W, Dumont X, Bernard A, Ye T, Kong Q, Wang Z, Li P, Lundsrtom N and Li Y (2002). Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposed to cadmium from smelting in China (China Cad). *Biometals* 15: 397-410.
- Jarup, L., Persson, B. and Elinder, C. G. (1997). Blood cadmium as an indicator of dose in a long-term follow-up of workers previously exposed to cadmium. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* 23, 1: 31-36.
- Kawada T. (1995). Indicators of renal effects of exposure to cadmium: N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and others. *Sangyo Eiseigaku Zasshi.* 37(2):69-73.
- Καλότας Νικήτας (2003). «Παθογόνα Μικρόβια και Λοιμώξεις», Αθήνα, σελ.70-75.
- Κουϊμτζής, Φυκάνου και Σακμάρα-Κωνσταντίνου (1990) *Χημεία Περιβάλλοντος* University Studio Press. 252-255.
- Κούρτη, Ε., Λεγάκης Ν. Ι. και Παπαπαρασκευάς, Ι. (2005). «Ιατρική Μικροβιολογία». Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Τόμος 2, Έκδοση 3^η. σελ.75-88.
- Lane T. W. and Morel F. M. M. (2000). A biological function for cadmium in marine Diatoms. *PANS.* 97 (9): 4627-4631.
- Lauwerys, R. R. , Bernard, A. M., Reels, H. A. and Buchet J. P. (1994) Cadmium: Exposure Markers as Predictors of Nephrotoxic Effects. *Clinical Chemistry* 40(7): 1391-1394.
- Levi, Primo (1989). An interview with *Escherichia coli* (One of "Five Intimate Interviews.") In "The Mirror Maker." Schoecken Books Inc., New York.
- Liao J. C., Mastali, M., Gau V., Suchard, M. A., Møller, A. K., Bruckner, D. A., Babbitt, J. T., Li, Y., Gornbein, J., Landaw, E. M. E., McCabe, R. B., Churchill, B. M. and Haake D. A. (2006) Use of Electrochemical DNA Biosensors for Rapid Molecular Identification of Uropathogens in Clinical Urine Specimens. *Journal of clinical Microbiology.* 44(2):561-570.
- Livermore DM, Trevor G and Shannon KP (2001) Interpret reading: recognizing the usual and interfering resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Agents.* 48:Suppl1, 87-102.
- Lockhart S. R., Abramson M. A., Beekmann S. E., Gallagher G., Riedel S., Diekema D. J, Quinn J. P. and Doern G.V. (2007). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology* 45(10): 3352-9
- Mitchell, D. J., Wild, S. R. and Jones, K. C. (1992). Arrested municipal solid waste incinerator fly ash as a source of heavy metals to the UK environment. *Environmental Pollution* 76: 79-84.



- Mueller P. W., Paschal D. C., Hammel R. R., Klincerwicz, S. L., and MacNeil, M. L. (1992). Chronic renal effect in three studies of men and women occupationally exposed to cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 125-136.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G.S. and Pfaller M. (2004). "Medical Microbiology" 4th Edition Mosby A Harcourt Health Sciences Company. St Louis. pp226-271.
- Nataro JP and Kaper JB (1998). Diarrheagenic *Escherichia Coli*, *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201.
- Neidhardt F. C., Ingraham J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger H. E. (1988). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. "Cellular and Molecular Biology." American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Neidhardt F. C., Ingraham J. L. and Schaechter, M. (1990). "Physiology of the Bacterial Cell." Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Nelson (1996), «Βασική Παιδιατρική», Εκδόσεις Λίτσας σελ. 749
- Nies D. H. (1992). Resistance to Cadmium, Cobalt, Zinc, and Nickel in Microbes *Plasmid* 27, 17-28
- Nies D. H. and Silver S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol.* 14(2):186-99
- Nordberg G, Jin T, Bernard A, Fierens S, Buchet JP, YeT, KongG, and Wang H (2002). Low bone density and renal dysfunction following environmental cadmium exposure. *Ambio* 31,478-481.
- Nriagu, J. O. (1988). A silent epidemic of environmental metal poisoning. *Environmental Pollution* 50: 139-161.
- Nriagu, J. O. (1990). Global metal pollution. Poisoning the biosphere? *Environment* 32, 7: 7-11; 28-33
- Olafson R. W., Abel K., and Sim R. S. (1979). Prokaryotic metallothionein: preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89:36-43.
- Omarova A. and Phillips C.J.C (2007) A meta-analysis of literature data relating to the relationships between cadmium intake and toxicity indicators in humans. *Environmental Research* 103 432–440
- Παπαπαναγιώτης Ι. και Κυριαζοπούλου-Δαλάινα, (2004). «Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία» 2^η έκδοση, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 91-96.
- Prescott L. M., Harley J. P. and Klein D. A. (1993). *Microbiology* Second Edition, Wm. C. Brown Publishers pp435-438.
- Παπαπαναγιώτου Κ. Ιωάννης (1994). «Ιατρική Μικροβιολογία και Ανοσοβιολογία», Εκδόσεις Παρατηρητής. σελ.137-138
- Pacheco C. C., Passos J. F., Castro A. R., Moradas-Ferreira P. and De Marco P. (2008) Role of respiration and glutathione in cadmium-induced oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol* 189:271–278
- Pain, D. J., Sanchez, A. and Meharg, A. A. (1998). The Donana ecological disaster: contamination of a world heritage estuarine marsh ecosystem with acidified pyrite mine waste. *The Science of the Total Environment* 222: 45-54
- Pulido P., Fuwa, K., and Vallee B. L. (1966). Determination of cadmium in biological materials by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Biochemistry* 14, 393-404.
- Quintiliani Jr P. and Quintiliani P. (1997) Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover and RH Tenover (eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Edition P. 1308-1326, American Society for Microbiology.



- Randrianirina F., Soares J. L., Carod J. F., Ratsima E., Thonnier V., Combe P., Grosjean P. and Talarmin A. (2007) Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007.59(2):309-12.
- Roels, H Bernard A. M., Cardenas A., Buchet, J. P., Lauwerys, R. R., Hotter, G., Ramis I., Mutti, A., Franchini, I., Bundshuh, I., Stolte, H., De Broe, M. E., Nuyts G. D., Taylor, S. A. and Price, R. G. (1993). Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. III. Application to workers exposed to cadmium. *British Journal of Industrial Medicine* 50: 37-48.
- Rosborg I., Hyllén E., Lidbeck J., Nihlgård B., and Gerhardsson L. (2007). Trace elements pattern in patients with fibromyalgia. *Science of the Total Environment*. 385: 20-27
- Rosen B. P. (2002). Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133: 689–693
- Rosner J. L. and Aumercier M. (1990) Potentiation by Salicylate and Salicyl Alcohol of Cadmium Toxicity and Accumulation in *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology*. 34: 2402-2406.
- Sadiq, M. (1992) Toxic metal chemistry in marine environments. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong. ISBN 0824786475
- Salomons, W. and Forstner, U. (1984). *Metals in the hydrocycle*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. ISBN 3540127550.
- Schroijen C., Baeyens W., Scoeters G., Homd E. D., Koppen G., Bruckers L., Nelen V., Van De Mierop E., Bilau M., Covaci A., Keune H., Loots I., Kleinjans., Dhooze W. and Van Larebeke N. (2008). Internal exposure to pollutants measured In blood and urine of Flemish adolescents in function of area of residence. *Chemosphere* 1: 1-9.
- Shapiro N. and Keasling J.D. (1996). The recA gene and cadmium toxicity in *Escherichia coli* K12. *Microbios*. 86(346):23-6.
- Si W., Gong J., Tsaa R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R. and Du Z. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 100: 296-305.
- Silver S., Misra T. K., Laddaga R. A. (1989) DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances *Biol Trace Elem Res*,21:145-63.
- Silver S. and Ji G (1994). Newer Systems for Bacterial Resistances to Toxic Heavy Metals. *Environmental Health Perspectives*. 3:107-113
- Silver S. and Phung L. T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: New Surprises *Annu. Rev. Microbiol.* 50:753–89
- Silver S. (1998) Genes for all metals. A bacterial view of the Periodic Table The 1996 Thom Award Lecture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 20: 1–12
- Spada S., Pembroke J. T., Wall J. G(2002) Isolation of a novel *Thermus thermophilus* metal efflux protein that improves *Escherichia coli* growth under stress conditions *Extremophiles* 6:301–308
- Thuvander A. (1989). Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: effects on immune functions. *Journal of Fish Biology*. 35: 521-529.
- Trevors J.T., Stratton G.W. and Gadd G.M. (1986). Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 32(6):447-64.



- USPHS (1997). Toxicological profile for cadmium on CD-ROM. Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- Valiquette L. (2001). Urinary tract infections in women. *Canadian Journal of Urology*. 1: 6-12
- Wang A. and Crowley D. E. (2005). Global Gene Expression Responses to Cadmium Toxicity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 187: 3259–3266
- World Health Organization (1992). Cadmium. *Environmental Health Criteria* 135. ISBN 9241571357
- World Health Organization (1993). Guidelines for drinking water quality. Volume 1: Recommendations ISBN 9241544600
- Wu X, Jin T, Wang Z, Ye T, Kong Q and Nordberg G (2001). Urinary calcium as a biomarker of renal dysfunction in a general population exposed to cadmium. *Journal of Occupational Environmental Medicine* 43, 898-904.
- Yao JDC and Moellering RC Jr (1997) Antibacterial agents. In: PR Murray, EJ Baron, MA Tenover and RH Tenover (eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Edition P. 1281-1307, American Society for Microbiology.
- Yao J, Xu C, Wang F, Tian L, Wang Y, Chen H, Yong Z, Choi MM, Bramanti E, Maskow T. (2007) An in vitro microcalorimetric method for studying the toxic effect of cadmium on microbial activity of an agricultural soil. *Ecotoxicology*. Oct;16(7):503-9.
- Φωκάς Σ. Π., Φωκάς Σ. Τ. και Μαρκάτου Φ., (2003). «Κλινική Μικροβιολογία», Τόμος 1^{ος}, Ιατρικές Εκδόσεις Αργυρού, σελ. 109-132
- Χαλεβελάκης ΓΕ, Λεγάκης ΝΙ και Περόγαμβρος ΤΗ (1994) Αντιβιοτικά. Στο: Αντιβιοτικά και συνήθειες λοιμώξεων. Σελ. 105-318, Εκδόσεις Χαλεβελάκη.
- Χαρβάλου Αικατερίνη (2007) Πρωτόκολλα Κλινικής Μικροβιολογίας. Σύνοψη Εργαστηριακής Προσπέλασης Βακτηριακών Λοιμώξεων. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. Σελ 12-18, 51-90.



VIII ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

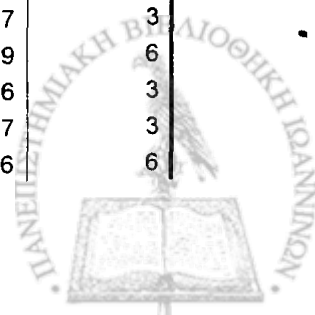
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Πίνακας Α.

	Συγκέντρωση	Βακτήριο	Mean	Std. Deviation	N	
Απορρόφηση κατά την προσθήκη	0 ppb Cd	E.coli	,10567	,000577	3	
		P. mirabilis	,10033	,001528	3	
		Total	,10300	,003098	6	
	0,16 ppb Cd	E.coli	,10233	,000577	3	
		P. mirabilis	,11633	,004619	3	
		Total	,10933	,008214	6	
	0,25 ppb Cd	E.coli	,10033	,000577	3	
		P. mirabilis	,11333	,000577	3	
		Total	,10683	,007139	6	
	0,50 ppb Cd	E.coli	,10033	,000577	3	
		P. mirabilis	,10000	,001000	3	
		Total	,10017	,000753	6	
	1 ppb Cd	E.coli	,10267	,000577	3	
		P. mirabilis	,09967	,000577	3	
		Total	,10117	,001722	6	
	1,50 ppb Cd	E.coli	,10033	,000577	3	
		P. mirabilis	,10033	,000577	3	
		Total	,10033	,000516	6	
	Total	E.coli	,10194	,002043	18	
		P. mirabilis	,10500	,007420	18	
		Total	,10347	,005583	36	
	Απορρόφηση 2 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	,41033	,000577	3
			P. mirabilis	,30000	,001000	3
			Total	,35517	,060436	6
		0,16 ppb Cd	E.coli	,41033	,000577	3
			P. mirabilis	,22000	,001000	3
			Total	,31517	,104252	6
		0,25 ppb Cd	E.coli	,28000	,001000	3
			P. mirabilis	,12567	,000577	3
			Total	,20283	,084535	6
		0,50 ppb Cd	E.coli	,24933	,000577	3
			P. mirabilis	,11767	,000577	3
			Total	,18350	,072119	6
		1 ppb Cd	E.coli	,20033	,000577	3
			P. mirabilis	,11167	,000577	3
			Total	,15600	,048567	6
1,50 ppb Cd		E.coli	,29000	,001000	3	
		P. mirabilis	,10967	,000577	3	
		Total	,19983	,098775	6	



Απορρόφηση 4 ώρες μετά	Total	E.coli	,30672	,080890	18
		P. mirabilis	,16411	,073893	18
		Total	,23542	,105167	36
	0 ppb Cd	E.coli	,50533	,000577	3
		P. mirabilis	,40967	,000577	3
		Total	,45750	,052401	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	,49967	,000577	3
		P. mirabilis	,43000	,001000	3
		Total	,46483	,038165	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	,41533	,000577	3
		P. mirabilis	,30033	,000577	3
		Total	,35783	,062990	6
	0,50 ppb Cd	E.coli	,40467	,000577	3
		P. mirabilis	,27033	,000577	3
		Total	,33750	,073579	6
	1 ppb Cd	E.coli	,38967	,000577	3
		P. mirabilis	,24967	,000577	3
		Total	,31967	,076683	6
1,50 ppb Cd	E.coli	,36000	,001000	3	
	P. mirabilis	,20467	,000577	3	
	Total	,28233	,085083	6	
Total	E.coli	,42911	,056218	18	
	P. mirabilis	,31078	,084784	18	
	Total	,36994	,092883	36	
Απορρόφηση 6 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	,66033	,000577	3
		P. mirabilis	,48967	,000577	3
		Total	,57500	,093479	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	,69700	,005196	3
		P. mirabilis	,51967	,000577	3
		Total	,60833	,097186	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	,61733	,000577	3
		P. mirabilis	,47933	,001155	3
		Total	,54833	,075590	6
	0,50 ppb Cd	E.coli	,60967	,000577	3
		P. mirabilis	,44967	,000577	3
		Total	,52967	,087637	6
	1 ppb Cd	E.coli	,58967	,000577	3
		P. mirabilis	,41467	,000577	3
		Total	,50217	,095853	6
	1,50 ppb Cd	E.coli	,50533	,000577	3
		P. mirabilis	,39967	,000577	3
		Total	,45250	,057878	6
Total	E.coli	,61322	,061570	18	
	P. mirabilis	,45878	,043269	18	
	Total	,53600	,094256	36	
Απορρόφηση 8 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	,70967	,000577	3
		P. mirabilis	,64033	,000577	3
		Total	,67500	,037979	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	,79700	,005196	3
		P. mirabilis	,73967	,000577	3
		Total	,76833	,031576	6



Απορρόφηση 12 ώρες μετά	0,25 ppb Cd	E.coli	,68967	,000577	3	
		P. mirabilis	,52000	,001000	3	
		Total	,60483	,092933	6	
	0,50 ppb Cd	E.coli	,68067	,000577	3	
		P. mirabilis	,49967	,000577	3	
		Total	,59017	,099139	6	
	1 ppb Cd	E.coli	,67167	,000577	3	
		P. mirabilis	,49900	,001000	3	
		Total	,58533	,094576	6	
	1,50 ppb Cd	E.coli	,60967	,000577	3	
		P. mirabilis	,46767	,000577	3	
		Total	,53867	,077778	6	
	Total	E.coli	,69306	,057408	18	
		P. mirabilis	,56106	,099601	18	
		Total	,62706	,104402	36	
	Απορρόφηση 24 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	,81967	,000577	3
			P. mirabilis	,76000	,001000	3
			Total	,78983	,032689	6
0,16 ppb Cd		E.coli	,89967	,000577	3	
		P. mirabilis	,81967	,000577	3	
		Total	,85967	,043821	6	
0,25 ppb Cd		E.coli	,78267	,000577	3	
		P. mirabilis	,60000	,001000	3	
		Total	,69133	,100053	6	
0,50 ppb Cd		E.coli	,76967	,000577	3	
		P. mirabilis	,58967	,000577	3	
		Total	,67967	,098591	6	
1 ppb Cd		E.coli	,76833	,000577	3	
		P. mirabilis	,57967	,000577	3	
		Total	,67400	,103338	6	
1,50 ppb Cd		E.coli	,71967	,000577	3	
		P. mirabilis	,56033	,000577	3	
		Total	,64000	,087272	6	
Total	E.coli	,79328	,057487	18		
	P. mirabilis	,65156	,102900	18		
	Total	,72242	,109146	36		
Απορρόφηση 24 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	,99033	,000577	3	
		P. mirabilis	,88967	,000577	3	
		Total	,94000	,055140	6	
	0,16 ppb Cd	E.coli	,90033	,000577	3	
		P. mirabilis	,90967	,000577	3	
		Total	,90500	,005138	6	
	0,25 ppb Cd	E.coli	,81933	,000577	3	
		P. mirabilis	,79000	,001000	3	
		Total	,80467	,016083	6	
	0,50 ppb Cd	E.coli	,80967	,000577	3	
		P. mirabilis	,77000	,001000	3	
		Total	,78983	,021739	6	
	1 ppb Cd	E.coli	,80167	,000577	3	
		P. mirabilis	,74967	,000577	3	
		Total	,77567	,028486	6	



Θολερότητα κατά την προσθήκη	1,50 ppb Cd	E.coli	,78967	,000577	3
		P. mirabilis	,68967	,000577	3
		Total	,73967	,054775	6
	Total	E.coli	,85183	,073666	18
		P. mirabilis	,79978	,079457	18
		Total	,82581	,079995	36
	0 ppb Cd	E.coli	49,66333	,271355	3
		P. mirabilis	47,00000	,470000	3
		Total	48,33167	1,498605	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	48,09667	,271355	3
		P. mirabilis	51,70000	,470000	3
		Total	49,89833	2,003252	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	47,15667	,271355	3
		P. mirabilis	53,26667	,271355	3
		Total	50,21167	3,355374	6
	0,50 ppb Cd	E.coli	47,15667	,271355	3
		P. mirabilis	47,00000	,470000	3
		Total	47,07833	,353803	6
1 ppb Cd	E.coli	48,25333	,271355	3	
	P. mirabilis	46,84333	,271355	3	
	Total	47,54833	,809529	6	
1,50 ppb Cd	E.coli	47,15667	,271355	3	
	P. mirabilis	47,15667	,271355	3	
	Total	47,15667	,242707	6	
Total	E.coli	47,91389	,960136	18	
	P. mirabilis	48,82778	2,720985	18	
	Total	48,37083	2,063646	36	
Θολερότητα 2 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	192,85667	,271355	3
		P. mirabilis	141,00000	,470000	3
		Total	166,92833	28,405140	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	192,85667	,271355	3
		P. mirabilis	103,40000	,470000	3
		Total	148,12833	48,998636	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	131,60000	,470000	3
		P. mirabilis	59,06333	,271355	3
		Total	95,33167	39,731451	6
	0,50 ppb Cd	E.coli	117,18667	,271355	3
		P. mirabilis	55,30333	,271355	3
		Total	86,24500	33,895767	6
	1 ppb Cd	E.coli	94,15667	,271355	3
		P. mirabilis	52,64000	,000000	3
		Total	73,39833	22,740262	6
	1,50 ppb Cd	E.coli	136,29000	,485077	3
		P. mirabilis	51,54333	,271355	3
		Total	93,91667	46,418992	6
Total	E.coli	144,15778	38,018917	18	
	P. mirabilis	77,15833	34,710158	18	
	Total	110,65806	49,412056	36	
Θολερότητα 4 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	237,50667	,271355	3
		P. mirabilis	192,54333	,271355	3
		Total	215,02500	24,628628	6



	0,16 ppb Cd	E.coli	234,84333	,271355	3
		P. mirabilis	202,10000	,470000	3
		Total	218,47167	17,937547	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	195,20667	,271355	3
		P. mirabilis	141,19000	,247588	3
		Total	168,19833	29,587059	6
	0,50 ppb Cd	E.coli	190,19333	,271355	3
		P. mirabilis	127,05667	,271355	3
		Total	158,62500	34,582228	6
	1 ppb Cd	E.coli	183,14333	,271355	3
		P. mirabilis	117,34333	,271355	3
		Total	150,24333	36,040962	6
	1,50 ppb Cd	E.coli	169,20000	,470000	3
		P. mirabilis	96,19333	,271355	3
		Total	132,69667	39,988871	6
	Total	E.coli	201,68222	26,422435	18
		P. mirabilis	146,07111	39,847667	18
		Total	173,87667	43,652867	36
Θολερότητα ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	310,35667	,271355	3
		P. mirabilis	230,14333	,271355	3
		Total	270,25000	43,935322	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	327,59000	2,442192	3
		P. mirabilis	244,48667	,075056	3
		Total	286,03833	45,543794	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	290,14667	,271355	3
		P. mirabilis	225,28667	,542709	3
		Total	257,71667	35,527358	6
	0,50 ppb Cd	E.coli	286,54333	,271355	3
		P. mirabilis	211,34333	,271355	3
		Total	248,94333	41,189451	6
	1 ppb Cd	E.coli	276,86667	,750555	3
		P. mirabilis	195,22667	,305996	3
		Total	236,04667	44,719008	6
	1,50 ppb Cd	E.coli	237,50667	,271355	3
		P. mirabilis	187,84333	,271355	3
		Total	212,67500	27,202811	6
Total	E.coli	288,16833	28,957854	18	
	P. mirabilis	215,72167	20,337122	18	
	Total	251,94500	44,247139	36	
Θολερότητα 8 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	333,53333	,288675	3
		P. mirabilis	300,95667	,271355	3
		Total	317,24500	17,844735	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	374,59000	2,442192	3
		P. mirabilis	347,64333	,271355	3
		Total	361,11667	14,840890	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	324,14333	,271355	3
		P. mirabilis	244,40000	,470000	3
		Total	284,27167	43,678571	6
	0,50 ppb Cd	E.coli	319,91333	,271355	3
		P. mirabilis	234,84333	,271355	3
		Total	277,37833	46,595390	6



Θολερότητα 12 ώρες μετά	1 ppb Cd	E.coli	315,68333	,271355	3
		P. mirabilis	234,52000	,470319	3
		Total	275,10167	44,456315	6
	1,50 ppb Cd	E.coli	286,54333	,271355	3
		P. mirabilis	219,80000	,268514	3
		Total	253,17167	36,557627	6
	Total	E.coli	325,73444	26,981370	18
		P. mirabilis	263,69389	46,814236	18
		Total	294,71417	49,069605	36
	0 ppb Cd	E.coli	385,24333	,271355	3
		P. mirabilis	357,20000	,470000	3
		Total	371,22167	15,363801	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	422,84333	,271355	3
		P. mirabilis	385,24333	,271355	3
		Total	404,04333	20,595798	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	367,85333	,271355	3
		P. mirabilis	281,99000	,485077	3
		Total	324,92167	47,030598	6
0,50 ppb Cd	E.coli	361,73333	,288675	3	
	P. mirabilis	277,14333	,271355	3	
	Total	319,43833	46,332529	6	
1 ppb Cd	E.coli	361,11667	,271355	3	
	P. mirabilis	272,44333	,271355	3	
	Total	316,78000	48,568991	6	
1,50 ppb Cd	E.coli	338,24333	,271355	3	
	P. mirabilis	263,35667	,271355	3	
	Total	300,80000	41,017835	6	
Total	E.coli	372,83889	27,019822	18	
	P. mirabilis	306,22944	48,364100	18	
	Total	339,53417	51,299410	36	
Θολερότητα 24 ώρες μετά	0 ppb Cd	E.coli	465,45667	,271355	3
		P. mirabilis	418,14333	,271355	3
		Total	441,80000	25,915716	6
	0,16 ppb Cd	E.coli	423,15667	,271355	3
		P. mirabilis	427,54333	,271355	3
		Total	425,35000	2,414904	6
	0,25 ppb Cd	E.coli	385,08667	,271355	3
		P. mirabilis	371,30000	,470000	3
		Total	378,19333	7,559065	6
	0,50 ppb Cd	E.coli	380,38667	,271355	3
		P. mirabilis	361,90000	,470000	3
		Total	371,14333	10,131380	6
	1 ppb Cd	E.coli	376,78333	,271355	3
		P. mirabilis	352,34333	,271355	3
		Total	364,56333	13,388539	6
	1,50 ppb Cd	E.coli	371,14333	,271355	3
		P. mirabilis	323,96667	,577350	3
		Total	347,55500	25,842874	6
Total	E.coli	400,33556	34,639071	18	
	P. mirabilis	375,86611	37,388276	18	

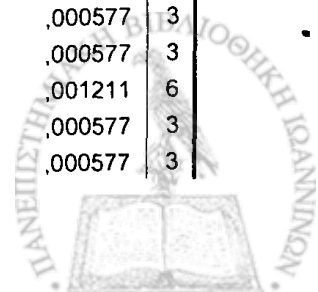


Πίνακας Β

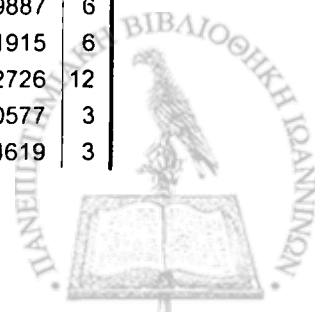
	Παρουσία Zinacef	Βακτήριο	Συγκέντρωση	Mean	Std. Deviation	N	
Απορρόφηση κατά την προσθήκη	Όχι	E. coli	0,16 ppb Cd	,01933	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,01967	,000577	3	
			Total	,01950	,000548	6	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,02233	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,02533	,000577	3	
			Total	,02383	,001722	6	
		Total	0,16 ppb Cd	,02083	,001722	6	
			1,50 ppb Cd	,02250	,003146	6	
			Total	,02167	,002570	12	
		Ναι	E. coli	0,16 ppb Cd	,02967	,000577	3
				1,50 ppb Cd	,03933	,000577	3
				Total	,03450	,005320	6
	P. mirabilis		0,16 ppb Cd	,02867	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,03233	,000577	3	
			Total	,03050	,002074	6	
	Total		0,16 ppb Cd	,02917	,000753	6	
			1,50 ppb Cd	,03583	,003869	6	
			Total	,03250	,004380	12	
	Total		E. coli	0,16 ppb Cd	,02450	,005683	6
				1,50 ppb Cd	,02950	,010784	6
				Total	,02700	,008623	12
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,02550	,003507	6	
			1,50 ppb Cd	,02883	,003869	6	
			Total	,02717	,003927	12	
Total		0,16 ppb Cd	,02500	,004533	12		
		1,50 ppb Cd	,02917	,007732	12		
		Total	,02708	,006554	24		
Απορρόφηση 2 ώρες μετά		Όχι	E. coli	0,16 ppb Cd	,08933	,000577	3
				1,50 ppb Cd	,07967	,000577	3
				Total	,08450	,005320	6
	P. mirabilis		0,16 ppb Cd	,03467	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,03233	,000577	3	
			Total	,03350	,001378	6	
	Total		0,16 ppb Cd	,06200	,029947	6	
			1,50 ppb Cd	,05600	,025931	6	
			Total	,05900	,026890	12	
	Ναι		E. coli	0,16 ppb Cd	,05967	,000577	3
				1,50 ppb Cd	,04967	,000577	3
				Total	,05467	,005502	6
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,03933	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,01967	,000577	3	
			Total	,02950	,010784	6	
		Total	0,16 ppb Cd	,04950	,011149	6	
			1,50 ppb Cd	,03467	,016440	6	



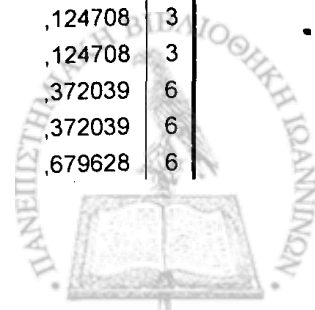
Απορρόφηση 4 ώρες μετά	Total	Total		,04208	,015471	12	
		E.coli	0,16 ppb Cd	,07450	,016257	6	
			1,50 ppb Cd	,06467	,016440	6	
			Total	,06958	,016412	12	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,03700	,002608	6	
			1,50 ppb Cd	,02600	,006957	6	
			Total	,03150	,007622	12	
		Total	0,16 ppb Cd	,05575	,022511	12	
			1,50 ppb Cd	,04533	,023508	12	
			Total	,05054	,023129	24	
		Όχι	E.coli	0,16 ppb Cd	,21967	,000577	3
				1,50 ppb Cd	,14933	,000577	3
			Total	,18450	,038527	6	
	P. mirabilis		0,16 ppb Cd	,15000	,000000	3	
			1,50 ppb Cd	,13967	,000577	3	
			Total	,14483	,005672	6	
	Total		0,16 ppb Cd	,18483	,038160	6	
			1,50 ppb Cd	,14450	,005320	6	
			Total	,16467	,033443	12	
	Ναι		E.coli	0,16 ppb Cd	,01167	,000577	3
				1,50 ppb Cd	,00567	,000577	3
				Total	,00867	,003327	6
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,00967	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,00967	,000577	3	
		Total	,00967	,000516	6		
Total		0,16 ppb Cd	,01067	,001211	6		
		1,50 ppb Cd	,00767	,002251	6		
		Total	,00917	,002329	12		
Total		E.coli	0,16 ppb Cd	,11567	,113927	6	
			1,50 ppb Cd	,07750	,078691	6	
			Total	,09658	,095455	12	
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,07983	,076865	6		
		1,50 ppb Cd	,07467	,071206	6		
		Total	,07725	,070693	12		
	Total	0,16 ppb Cd	,09775	,094528	12		
		1,50 ppb Cd	,07608	,071565	12		
		Total	,08692	,082737	24		
	Όχι	E.coli	0,16 ppb Cd	,26967	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,17967	,000577	3	
			Total	,22467	,049298	6	
P. mirabilis		0,16 ppb Cd	,19033	,000577	3		
		1,50 ppb Cd	,13567	,000577	3		
		Total	,16300	,029947	6		
Total		0,16 ppb Cd	,23000	,043456	6		
		1,50 ppb Cd	,15767	,024105	6		
		Total	,19383	,050492	12		
Ναι		E.coli	0,16 ppb Cd	,00567	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,00367	,000577	3	
			Total	,00467	,001211	6	
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,01667	,000577	3		
		1,50 ppb Cd	,01033	,000577	3		
		Total	,01033	,000577	3		



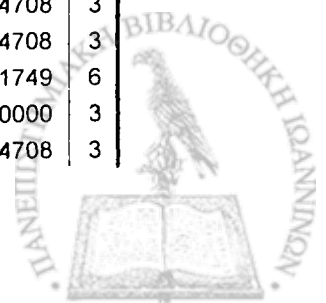
		Total	,01350	,003507	6	
	Total	0,16 ppb Cd	,01117	,006047	6	
		1,50 ppb Cd	,00700	,003688	6	
		Total	,00908	,005248	12	
	Total	E.coli 0,16 ppb Cd	,13767	,144600	6	
		1,50 ppb Cd	,09167	,096401	6	
		Total	,11467	,119605	12	
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,10350	,095123	6	
		1,50 ppb Cd	,07300	,068650	6	
		Total	,08825	,080677	12	
	Total	0,16 ppb Cd	,12058	,118048	12	
		1,50 ppb Cd	,08233	,080382	12	
		Total	,10146	,100681	24	
Απορρόφηση 8 ώρες μετά	Όχι	E.coli 0,16 ppb Cd	,29700	,006083	3	
			1,50 ppb Cd	,15967	,000577	3
			Total	,22833	,075320	6
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,22967	,000577	3
			1,50 ppb Cd	,13967	,000577	3
			Total	,18467	,049298	6
		Total	0,16 ppb Cd	,26333	,037082	6
			1,50 ppb Cd	,14967	,010967	6
			Total	,20650	,064833	12
	Ναι	E.coli 0,16 ppb Cd	,01667	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,00767	,000577	3
			Total	,01217	,004956	6
P. mirabilis		0,16 ppb Cd	,01433	,000577	3	
		1,50 ppb Cd	,00767	,000577	3	
		Total	,01100	,003688	6	
	Total	0,16 ppb Cd	,01550	,001378	6	
		1,50 ppb Cd	,00767	,000516	6	
		Total	,01158	,004209	12	
Απορρόφηση 12 ώρες μετά	Όχι	E.coli 0,16 ppb Cd	,15683	,153594	6	
			1,50 ppb Cd	,08367	,083255	6
			Total	,12025	,123830	12
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,12200	,117944	6
			1,50 ppb Cd	,07367	,072301	6
			Total	,09783	,096625	12
		Total	0,16 ppb Cd	,13942	,131823	12
			1,50 ppb Cd	,07867	,074526	12
			Total	,10904	,109224	24
	Ναι	E.coli 0,16 ppb Cd	,35967	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,18967	,000577	3
			Total	,27467	,093114	6
P. mirabilis		0,16 ppb Cd	,25033	,000577	3	
		1,50 ppb Cd	,14967	,000577	3	
		Total	,20000	,055140	6	
	Total	0,16 ppb Cd	,30500	,059887	6	
		1,50 ppb Cd	,16967	,021915	6	
		Total	,23733	,082726	12	
	E.coli 0,16 ppb Cd	,01767	,000577	3		
		1,50 ppb Cd	,00633	,004619	3	



		Total	,01200	,006870	6		
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,00967	,000577	3		
		1,50 ppb Cd	,00100	,000000	3		
		Total	,00533	,004761	6		
	Total	0,16 ppb Cd	,01367	,004412	6		
		1,50 ppb Cd	,00367	,004131	6		
		Total	,00867	,006624	12		
	Total	E.coli	0,16 ppb Cd	,18867	,187322	6	
		1,50 ppb Cd	,09800	,100459	6		
		Total	,14333	,150927	12		
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,13000	,131820	6		
		1,50 ppb Cd	,07533	,081429	6		
		Total	,10267	,108293	12		
	Total	0,16 ppb Cd	,15933	,157438	12		
		1,50 ppb Cd	,08667	,087985	12		
		Total	,12300	,130132	24		
Απορρόφηση 24 ώρες μετά	Όχι	E.coli	0,16 ppb Cd	,40033	,000577	3	
			1,50 ppb Cd	,29967	,000577	3	
			Total	,35000	,055140	6	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,26200	,002646	3	
			1,50 ppb Cd	,25967	,000577	3	
			Total	,26083	,002137	6	
		Total	0,16 ppb Cd	,33117	,075788	6	
			1,50 ppb Cd	,27967	,021915	6	
			Total	,30542	,059602	12	
	Ναι	E.coli	0,16 ppb Cd	,01900	,000000	3	
			1,50 ppb Cd	,01233	,000577	3	
			Total	,01567	,003670	6	
P. mirabilis		0,16 ppb Cd	,01400	,000000	3		
		1,50 ppb Cd	,00267	,000577	3		
		Total	,00833	,006218	6		
	Total	0,16 ppb Cd	,01650	,002739	6		
		1,50 ppb Cd	,00750	,005320	6		
		Total	,01200	,006194	12		
Θαλερότητα κατά την προσθήκη	Όχι	Total	E.coli	0,16 ppb Cd	,20967	,208865	6
			1,50 ppb Cd	,15600	,157380	6	
			Total	,18283	,178531	12	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,13800	,135846	6	
			1,50 ppb Cd	,13117	,140766	6	
			Total	,13458	,131938	12	
		Total	0,16 ppb Cd	,17383	,172100	12	
			1,50 ppb Cd	,14358	,142945	12	
			Total	,15871	,155488	24	
	Ναι	E.coli	0,16 ppb Cd	4,17600	,124708	3	
			1,50 ppb Cd	4,24800	,124708	3	
			Total	4,21200	,118308	6	
P. mirabilis		0,16 ppb Cd	4,82400	,124708	3		
		1,50 ppb Cd	5,47200	,124708	3		
		Total	5,14800	,372039	6		
	Total	0,16 ppb Cd	4,50000	,372039	6		
		1,50 ppb Cd	4,86000	,679628	6		



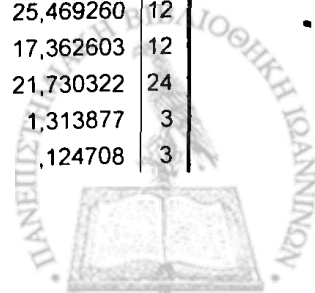
		Total	4,68000	,555169	12
	Nai	E.coli 0,16 ppb Cd	6,40800	,124708	3
		1,50 ppb Cd	8,49600	,124708	3
		Total	7,45200	1,149071	6
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	6,19200	,124708	3
		1,50 ppb Cd	6,98400	,124708	3
		Total	6,58800	,447907	6
	Total	0,16 ppb Cd	6,30000	,162599	6
		1,50 ppb Cd	7,74000	,835634	6
		Total	7,02000	,946016	12
	Total	E.coli 0,16 ppb Cd	5,29200	1,227595	6
		1,50 ppb Cd	6,37200	2,329398	6
		Total	5,83200	1,862662	12
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	5,50800	,757541	6
		1,50 ppb Cd	6,22800	,835634	6
		Total	5,86800	,848312	12
	Total	0,16 ppb Cd	5,40000	,979065	12
		1,50 ppb Cd	6,30000	1,670169	12
		Total	5,85000	1,415571	24
Θολερότητα 2 ώρες μετά	Όχι	E.coli 0,16 ppb Cd	19,29600	,124708	3
		1,50 ppb Cd	17,20800	,124708	3
		Total	18,25200	1,149071	6
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	7,41600	,124708	3
		1,50 ppb Cd	6,98400	,124708	3
		Total	7,20000	,261589	6
	Total	0,16 ppb Cd	13,35600	6,507900	6
		1,50 ppb Cd	12,09600	5,601026	6
		Total	12,72600	5,826149	12
	Nai	E.coli 0,16 ppb Cd	12,88800	,124708	3
		1,50 ppb Cd	10,72800	,124708	3
		Total	11,80800	1,188327	6
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	8,49600	,124708	3
		1,50 ppb Cd	4,24800	,124708	3
		Total	6,37200	2,329398	6
	Total	0,16 ppb Cd	10,69200	2,408182	6
		1,50 ppb Cd	7,48800	3,550994	6
		Total	9,09000	3,341765	12
	Total	E.coli 0,16 ppb Cd	16,09200	3,511578	6
		1,50 ppb Cd	13,96800	3,550994	6
		Total	15,03000	3,545007	12
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	7,95600	,601965	6
		1,50 ppb Cd	5,61600	1,502714	6
		Total	6,78600	1,638441	12
	Total	0,16 ppb Cd	12,02400	4,880864	12
		1,50 ppb Cd	9,79200	5,077636	12
		Total	10,90800	5,002384	24
Θολερότητα 4 ώρες μετά	Όχι	E.coli 0,16 ppb Cd	47,44800	,124708	3
		1,50 ppb Cd	32,25600	,124708	3
		Total	39,85200	8,321749	6
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	32,40000	,000000	3
		1,50 ppb Cd	30,16800	,124708	3



		Total	31,28400	1,225058	6	
	Total	0,16 ppb Cd	39,92400	8,242506	6	
		1,50 ppb Cd	31,21200	1,149071	6	
		Total	35,56800	7,223656	12	
	Nαι	E.coli	0,16 ppb Cd	,124708	3	
			1,50 ppb Cd	,124708	3	
		Total	1,87200	,718559	6	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,124708	3	
			1,50 ppb Cd	,124708	3	
		Total	2,16000	,136610	6	
	Total	0,16 ppb Cd	2,30400	,261589	6	
		1,50 ppb Cd	1,72800	,563259	6	
		Total	2,01600	,515556	12	
	Total	E.coli	0,16 ppb Cd	24,608332	6	
			1,50 ppb Cd	16,997292	6	
		Total	20,86200	20,618351	12	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	17,24400	16,602754	6
			1,50 ppb Cd	16,20000	15,301584	6
		Total	16,72200	15,232201	12	
	Total	0,16 ppb Cd	21,11400	20,417973	12	
		1,50 ppb Cd	16,47000	15,421670	12	
		Total	18,79200	17,853677	24	
	Όχι	E.coli	0,16 ppb Cd	,124708	3	
			1,50 ppb Cd	,124708	3	
		Total	48,52800	10,648311	6	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,017321	3	
			1,50 ppb Cd	,124708	3	
		Total	35,16700	6,423088	6	
	Total	0,16 ppb Cd	49,63900	9,431023	6	
		1,50 ppb Cd	34,05600	5,206750	6	
		Total	41,84750	10,907720	12	
	Nαι	E.coli	0,16 ppb Cd	,124708	3	
			1,50 ppb Cd	,124708	3	
		Total	1,00800	,261589	6	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	,208051	3	
			1,50 ppb Cd	,124708	3	
		Total	2,94933	,800634	6	
	Total	0,16 ppb Cd	2,44533	1,346670	6	
		1,50 ppb Cd	1,51200	,796569	6	
		Total	1,97867	1,162034	12	
	Total	E.coli	0,16 ppb Cd	31,233530	6	
			1,50 ppb Cd	20,822520	6	
		Total	24,76800	25,834660	12	
		P. mirabilis	0,16 ppb Cd	20,465166	6	
			1,50 ppb Cd	14,828365	6	
		Total	19,05817	17,381860	12	
	Total	0,16 ppb Cd	26,04217	25,469260	12	
		1,50 ppb Cd	17,78400	17,362603	12	
		Total	21,91308	21,730322	24	
	Όχι	E.coli	0,16 ppb Cd	,1313877	3	
			-1,50 ppb Cd	,124708	3	
			34,48800			

Θαλερότητα
6 ώρες μετά

Θαλερότητα
8 ώρες μετά



Θολερότητα
12 ώρες μετά

		Total	49,32000	16,269069	6
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	49,60800	,124708	3
		1,50 ppb Cd	30,16800	,124708	3
		Total	39,88800	10,648311	6
	Total	0,16 ppb Cd	56,88000	8,009689	6
		1,50 ppb Cd	32,32800	2,368789	6
		Total	44,60400	14,004004	12
Nαι	E.coli	0,16 ppb Cd	3,60000	,124708	3
		1,50 ppb Cd	1,65600	,124708	3
		Total	2,62800	1,070599	6
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	3,09600	,124708	3
		1,50 ppb Cd	1,58400	,124708	3
		Total	2,34000	,835634	6
	Total	0,16 ppb Cd	3,34800	,297735	6
		1,50 ppb Cd	1,62000	,118308	6
		Total	2,48400	,927909	12
Total	E.coli	0,16 ppb Cd	33,87600	33,176198	6
		1,50 ppb Cd	18,07200	17,983173	6
		Total	25,97400	26,747256	12
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	26,35200	25,475916	6
		1,50 ppb Cd	15,87600	15,656499	6
		Total	21,11400	20,889277	12
	Total	0,16 ppb Cd	30,11400	28,473662	12
		1,50 ppb Cd	16,97400	16,116253	12
		Total	23,54400	23,601097	24
Όχι	E.coli	0,16 ppb Cd	77,68667	,127017	3
		1,50 ppb Cd	40,96800	,124708	3
		Total	59,32733	20,111957	6
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	54,07200	,124708	3
		1,50 ppb Cd	32,32800	,124708	3
		Total	43,20000	11,910202	6
	Total	0,16 ppb Cd	65,87933	12,934776	6
		1,50 ppb Cd	36,64800	4,733637	6
		Total	51,26367	17,868182	12
Nαι	E.coli	0,16 ppb Cd	3,81600	,124708	3
		1,50 ppb Cd	2,01600	,124708	3
		Total	2,91600	,992190	6
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	2,23200	,124708	3
		1,50 ppb Cd	,21600	,000000	3
		Total	1,22400	1,107022	6
	Total	0,16 ppb Cd	3,02400	,874733	6
		1,50 ppb Cd	1,11600	,989050	6
		Total	2,07000	1,336151	12
Total	E.coli	0,16 ppb Cd	40,75133	40,460787	6
		1,50 ppb Cd	21,49200	21,335181	6
		Total	31,12167	32,437481	12
	P. mirabilis	0,16 ppb Cd	28,15200	28,394156	6
		1,50 ppb Cd	16,27200	17,588644	6
		Total	22,21200	23,357587	12
	Total	0,16 ppb Cd	34,45167	33,968898	12
		1,50 ppb Cd	18,88200	18,840230	12



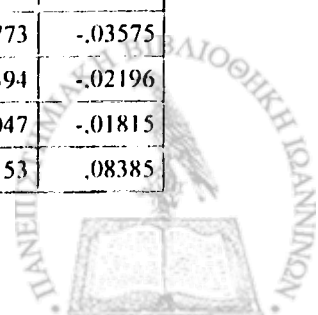
Θολερότητα 24 ώρες μετά	Όχι	E.coli	Total	26,66683	28,015315	24	
			0,16 ppb Cd	86,47200	,124708	3	
			1,50 ppb Cd	64,72667	,127017	3	
		P. mirabilis	Total	75,59933	11,910942	6	
			0,16 ppb Cd	56,59200	,571482	3	
			1,50 ppb Cd	56,08800	,124708	3	
		Ναι	E.coli	Total	56,34000	,461587	6
				0,16 ppb Cd	71,53200	16,370131	6
				1,50 ppb Cd	60,40733	4,732932	6
			P. mirabilis	Total	65,96967	12,874159	12
				0,16 ppb Cd	4,10400	,000000	3
				1,50 ppb Cd	2,66400	,124708	3
	Total		E.coli	Total	3,38400	,792654	6
				0,16 ppb Cd	3,02400	,000000	3
				1,50 ppb Cd	,57600	,124708	3
			P. mirabilis	Total	1,80000	1,343143	6
				0,16 ppb Cd	3,56400	,591540	6
				1,50 ppb Cd	1,62000	1,149071	6
		Total	E.coli	Total	2,59200	1,337869	12
				0,16 ppb Cd	45,28800	45,114881	6
				1,50 ppb Cd	33,69533	33,993309	6
			P. mirabilis	Total	39,49167	38,562414	12
				0,16 ppb Cd	29,80800	29,342628	6
				1,50 ppb Cd	28,33200	30,405379	6
Total	Total		29,07000	28,498677	12		
	0,16 ppb Cd		37,54800	37,173552	12		
	1,50 ppb Cd		31,01367	30,875787	12		
Total	Total	34,28083	33,585222	24			



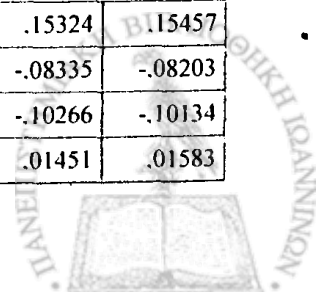
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Multiple Comparisons

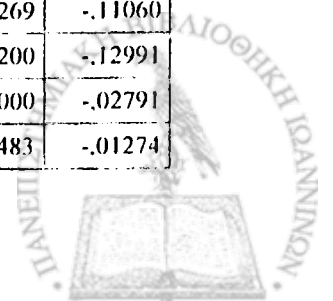
Measure		(I) Συγκέντρωση	(J) Συγκέντρωση	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound	
Απορρόφηση	Tukey HSD	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-,01931(*)	,000320	,000	-,02030	-,01832	
			0,25 ppb Cd	,08269(*)	,000320	,000	,08170	,08368	
			0,50 ppb Cd	,09786(*)	,000320	,000	,09687	,09885	
			1 ppb Cd	,11164(*)	,000320	,000	,11065	,11263	
			1,50 ppb Cd	,13460(*)	,000320	,000	,13360	,13559	
		0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	,01931(*)	,000320	,000	,01832	,02030	
			0,25 ppb Cd	,10200(*)	,000320	,000	,10101	,10299	
			0,50 ppb Cd	,11717(*)	,000320	,000	,11618	,11816	
			1 ppb Cd	,13095(*)	,000320	,000	,12996	,13194	
			1,50 ppb Cd	,15390(*)	,000320	,000	,15291	,15490	
		0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	-,08269(*)	,000320	,000	-,08368	-,08170	
			0,16 ppb Cd	-,10200(*)	,000320	,000	-,10299	-,10101	
			0,50 ppb Cd	,01517(*)	,000320	,000	,01418	,01616	
			1 ppb Cd	,02895(*)	,000320	,000	,02796	,02994	
			1,50 ppb Cd	,05190(*)	,000320	,000	,05091	,05290	
		0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-,09786(*)	,000320	,000	-,09885	-,09687	
			0,16 ppb Cd	-,11717(*)	,000320	,000	-,11816	-,11618	
			0,25 ppb Cd	-,01517(*)	,000320	,000	-,01616	-,01418	
			1 ppb Cd	,01379(*)	,000320	,000	,01280	,01478	
			1,50 ppb Cd	,03674(*)	,000320	,000	,03575	,03773	
		1 ppb Cd	0 ppb Cd	-,11164(*)	,000320	,000	-,11263	-,11065	
			0,16 ppb Cd	-,13095(*)	,000320	,000	-,13194	-,12996	
			0,25 ppb Cd	-,02895(*)	,000320	,000	-,02994	-,02796	
			0,50 ppb Cd	-,01379(*)	,000320	,000	-,01478	-,01280	
			1,50 ppb Cd	,02295(*)	,000320	,000	,02196	,02394	
		1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-,13460(*)	,000320	,000	-,13559	-,13360	
			0,16 ppb Cd	-,15390(*)	,000320	,000	-,15490	-,15291	
			0,25 ppb Cd	-,05190(*)	,000320	,000	-,05290	-,05091	
			0,50 ppb Cd	-,03674(*)	,000320	,000	-,03773	-,03575	
			1 ppb Cd	-,02295(*)	,000320	,000	-,02394	-,02196	
		Scheffe	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-,01931(*)	,000320	,000	-,02047	-,01815
				0,25 ppb Cd	,08269(*)	,000320	,000	,08153	,08385



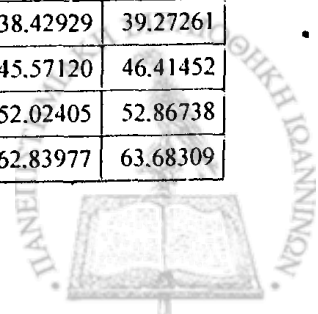
		0,50 ppb Cd	.09786(*)	.000320	.000	.09670	.09902
		1 ppb Cd	.11164(*)	.000320	.000	.11048	.11280
		1,50 ppb Cd	.13460(*)	.000320	.000	.13344	.13575
	0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	.01931(*)	.000320	.000	.01815	.02047
		0,25 ppb Cd	.10200(*)	.000320	.000	.10084	.10316
		0,50 ppb Cd	.11717(*)	.000320	.000	.11601	.11833
		1 ppb Cd	.13095(*)	.000320	.000	.12979	.13211
		1,50 ppb Cd	.15390(*)	.000320	.000	.15275	.15506
	0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	-.08269(*)	.000320	.000	-.08385	-.08153
		0,16 ppb Cd	-.10200(*)	.000320	.000	-.10316	-.10084
		0,50 ppb Cd	.01517(*)	.000320	.000	.01401	.01633
		1 ppb Cd	.02895(*)	.000320	.000	.02779	.03011
		1,50 ppb Cd	.05190(*)	.000320	.000	.05075	.05306
	0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-.09786(*)	.000320	.000	-.09902	-.09670
		0,16 ppb Cd	-.11717(*)	.000320	.000	-.11833	-.11601
		0,25 ppb Cd	-.01517(*)	.000320	.000	-.01633	-.01401
		1 ppb Cd	.01379(*)	.000320	.000	.01263	.01495
		1,50 ppb Cd	.03674(*)	.000320	.000	.03558	.03790
	1 ppb Cd	0 ppb Cd	-.11164(*)	.000320	.000	-.11280	-.11048
		0,16 ppb Cd	-.13095(*)	.000320	.000	-.13211	-.12979
		0,25 ppb Cd	-.02895(*)	.000320	.000	-.03011	-.02779
		0,50 ppb Cd	-.01379(*)	.000320	.000	-.01495	-.01263
		1,50 ppb Cd	.02295(*)	.000320	.000	.02179	.02411
	1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-.13460(*)	.000320	.000	-.13575	-.13344
		0,16 ppb Cd	-.15390(*)	.000320	.000	-.15506	-.15275
		0,25 ppb Cd	-.05190(*)	.000320	.000	-.05306	-.05075
		0,50 ppb Cd	-.03674(*)	.000320	.000	-.03790	-.03558
		1 ppb Cd	-.02295(*)	.000320	.000	-.02411	-.02179
LSD	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-.01931(*)	.000320	.000	-.01997	-.01865
		0,25 ppb Cd	.08269(*)	.000320	.000	.08203	.08335
		0,50 ppb Cd	.09786(*)	.000320	.000	.09720	.09852
		1 ppb Cd	.11164(*)	.000320	.000	.11098	.11230
		1,50 ppb Cd	.13460(*)	.000320	.000	.13393	.13526
	0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	.01931(*)	.000320	.000	.01865	.01997
		0,25 ppb Cd	.10200(*)	.000320	.000	.10134	.10266
		0,50 ppb Cd	.11717(*)	.000320	.000	.11651	.11783
		1 ppb Cd	.13095(*)	.000320	.000	.13029	.13161
		1,50 ppb Cd	.15390(*)	.000320	.000	.15324	.15457
	0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	-.08269(*)	.000320	.000	-.08335	-.08203
		0,16 ppb Cd	-.10200(*)	.000320	.000	-.10266	-.10134
		0,50 ppb Cd	.01517(*)	.000320	.000	.01451	.01583



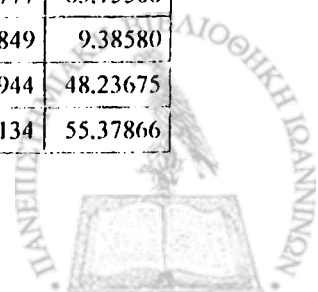
		1 ppb Cd	.02895(*)	.000320	.000	.02829	.02961
		1,50 ppb Cd	.05190(*)	.000320	.000	.05124	.05257
	0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-.09786(*)	.000320	.000	-.09852	-.09720
		0,16 ppb Cd	-.11717(*)	.000320	.000	-.11783	-.11651
		0,25 ppb Cd	-.01517(*)	.000320	.000	-.01583	-.01451
		1 ppb Cd	.01379(*)	.000320	.000	.01312	.01445
		1,50 ppb Cd	.03674(*)	.000320	.000	.03608	.03740
	1 ppb Cd	0 ppb Cd	-.11164(*)	.000320	.000	-.11230	-.11098
		0,16 ppb Cd	-.13095(*)	.000320	.000	-.13161	-.13029
		0,25 ppb Cd	-.02895(*)	.000320	.000	-.02961	-.02829
		0,50 ppb Cd	-.01379(*)	.000320	.000	-.01445	-.01312
		1,50 ppb Cd	.02295(*)	.000320	.000	.02229	.02361
	1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-.13460(*)	.000320	.000	-.13526	-.13393
		0,16 ppb Cd	-.15390(*)	.000320	.000	-.15457	-.15324
		0,25 ppb Cd	-.05190(*)	.000320	.000	-.05257	-.05124
		0,50 ppb Cd	-.03674(*)	.000320	.000	-.03740	-.03608
		1 ppb Cd	-.02295(*)	.000320	.000	-.02361	-.02229
Bonferroni	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-.01931(*)	.000320	.000	-.02035	-.01827
		0,25 ppb Cd	.08269(*)	.000320	.000	.08165	.08373
		0,50 ppb Cd	.09786(*)	.000320	.000	.09681	.09890
		1 ppb Cd	.11164(*)	.000320	.000	.11060	.11269
		1,50 ppb Cd	.13460(*)	.000320	.000	.13355	.13564
	0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	.01931(*)	.000320	.000	.01827	.02035
		0,25 ppb Cd	.10200(*)	.000320	.000	.10096	.10304
		0,50 ppb Cd	.11717(*)	.000320	.000	.11612	.11821
		1 ppb Cd	.13095(*)	.000320	.000	.12991	.13200
		1,50 ppb Cd	.15390(*)	.000320	.000	.15286	.15495
	0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	-.08269(*)	.000320	.000	-.08373	-.08165
		0,16 ppb Cd	-.10200(*)	.000320	.000	-.10304	-.10096
		0,50 ppb Cd	.01517(*)	.000320	.000	.01412	.01621
		1 ppb Cd	.02895(*)	.000320	.000	.02791	.03000
		1,50 ppb Cd	.05190(*)	.000320	.000	.05086	.05295
	0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-.09786(*)	.000320	.000	-.09890	-.09681
		0,16 ppb Cd	-.11717(*)	.000320	.000	-.11821	-.11612
		0,25 ppb Cd	-.01517(*)	.000320	.000	-.01621	-.01412
		1 ppb Cd	.01379(*)	.000320	.000	.01274	.01483
		1,50 ppb Cd	.03674(*)	.000320	.000	.03569	.03778
	1 ppb Cd	0 ppb Cd	-.11164(*)	.000320	.000	-.11269	-.11060
		0,16 ppb Cd	-.13095(*)	.000320	.000	-.13200	-.12991
		0,25 ppb Cd	-.02895(*)	.000320	.000	-.03000	-.02791
		0,50 ppb Cd	-.01379(*)	.000320	.000	-.01483	-.01274



		1,50 ppb Cd	.02295(*)	.000320	.000	.02191	.02400	
	1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-.13460(*)	.000320	.000	-.13564	-.13355	
		0,16 ppb Cd	-.15390(*)	.000320	.000	-.15495	-.15286	
		0,25 ppb Cd	-.05190(*)	.000320	.000	-.05295	-.05086	
		0,50 ppb Cd	-.03674(*)	.000320	.000	-.03778	-.03569	
		1 ppb Cd	-.02295(*)	.000320	.000	-.02400	-.02191	
			1,50 ppb Cd	.02295(*)	.000320	.000	.02191	.02400
Tamhane	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-.01931	.026309	1.000	-.11993	.08131	
		0,25 ppb Cd	.08269	.031564	.334	-.03958	.20496	
		0,50 ppb Cd	.09786	.032858	.204	-.03059	.22631	
		1 ppb Cd	.11164	.032679	.105	-.01594	.23922	
		1,50 ppb Cd	.13460(*)	.033262	.041	.00417	.26502	
	0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	.01931	.026309	1.000	-.08131	.11993	
		0,25 ppb Cd	.10200	.030411	.119	-.01767	.22167	
		0,50 ppb Cd	.11717	.031753	.076	-.00925	.24359	
		1 ppb Cd	.13095(*)	.031567	.039	.00548	.25643	
		1,50 ppb Cd	.15390(*)	.032171	.017	.02535	.28246	
	0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	-.08269	.031564	.334	-.20496	.03958	
		0,16 ppb Cd	-.10200	.030411	.119	-.22167	.01767	
		0,50 ppb Cd	.01517	.036227	1.000	-.12312	.15345	
		1 ppb Cd	.02895	.036064	1.000	-.10867	.16658	
		1,50 ppb Cd	.05190	.036593	.955	-.08789	.19170	
	0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-.09786	.032858	.204	-.22631	.03059	
		0,16 ppb Cd	-.11717	.031753	.076	-.24359	.00925	
		0,25 ppb Cd	-.01517	.036227	1.000	-.15345	.12312	
		1 ppb Cd	.01379	.037202	1.000	-.12806	.15563	
		1,50 ppb Cd	.03674	.037716	.999	-.10708	.18055	
	1 ppb Cd	0 ppb Cd	-.11164	.032679	.105	-.23922	.01594	
		0,16 ppb Cd	-.13095(*)	.031567	.039	-.25643	-.00548	
		0,25 ppb Cd	-.02895	.036064	1.000	-.16658	.10867	
		0,50 ppb Cd	-.01379	.037202	1.000	-.15563	.12806	
		1,50 ppb Cd	.02295	.037560	1.000	-.12028	.16619	
	1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-.13460(*)	.033262	.041	-.26502	-.00417	
		0,16 ppb Cd	-.15390(*)	.032171	.017	-.28246	-.02535	
		0,25 ppb Cd	-.05190	.036593	.955	-.19170	.08789	
		0,50 ppb Cd	-.03674	.037716	.999	-.18055	.10708	
		1 ppb Cd	-.02295	.037560	1.000	-.16619	.12028	
Θολερότητα	Tukey HSD	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-8.89214(*)	.136375	.000	-9.31380	-8.47048
			0,25 ppb Cd	38.85095(*)	.136375	.000	38.42929	39.27261
			0,50 ppb Cd	45.99286(*)	.136375	.000	45.57120	46.41452
			1 ppb Cd	52.44571(*)	.136375	.000	52.02405	52.86738
			1,50 ppb Cd	63.26143(*)	.136375	.000	62.83977	63.68309

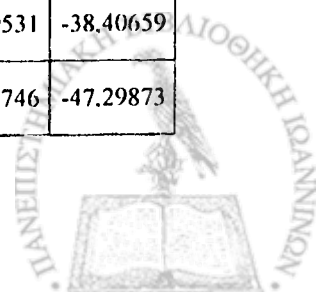


	0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	8,89214(*)	,136375	,000	8,47048	9,31380
		0,25 ppb Cd	47,74310(*)	,136375	,000	47,32143	48,16476
		0,50 ppb Cd	54,88500(*)	,136375	,000	54,46334	55,30666
		1 ppb Cd	61,33786(*)	,136375	,000	60,91620	61,75952
		1,50 ppb Cd	72,15357(*)	,136375	,000	71,73191	72,57523
	0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	38,85095(*)	,136375	,000	-39,27261	-38,42929
		0,16 ppb Cd	47,74310(*)	,136375	,000	-48,16476	-47,32143
		0,50 ppb Cd	7,14190(*)	,136375	,000	6,72024	7,56357
		1 ppb Cd	13,59476(*)	,136375	,000	13,17310	14,01642
		1,50 ppb Cd	24,41048(*)	,136375	,000	23,98881	24,83214
	0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	45,99286(*)	,136375	,000	-46,41452	-45,57120
		0,16 ppb Cd	54,88500(*)	,136375	,000	-55,30666	-54,46334
		0,25 ppb Cd	-7,14190(*)	,136375	,000	-7,56357	-6,72024
		1 ppb Cd	6,45286(*)	,136375	,000	6,03120	6,87452
		1,50 ppb Cd	17,26857(*)	,136375	,000	16,84691	17,69023
	1 ppb Cd	0 ppb Cd	52,44571(*)	,136375	,000	-52,86738	-52,02405
		0,16 ppb Cd	61,33786(*)	,136375	,000	-61,75952	-60,91620
		0,25 ppb Cd	13,59476(*)	,136375	,000	-14,01642	-13,17310
		0,50 ppb Cd	-6,45286(*)	,136375	,000	-6,87452	-6,03120
		1,50 ppb Cd	10,81571(*)	,136375	,000	10,39405	11,23738
1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	63,26143(*)	,136375	,000	-63,68309	-62,83977	
	0,16 ppb Cd	72,15357(*)	,136375	,000	-72,57523	-71,73191	
	0,25 ppb Cd	24,41048(*)	,136375	,000	-24,83214	-23,98881	
	0,50 ppb Cd	17,26857(*)	,136375	,000	-17,69023	-16,84691	
	1 ppb Cd	10,81571(*)	,136375	,000	-11,23738	-10,39405	
Scheffe	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-8,89214(*)	,136375	,000	-9,38580	-8,39849
		0,25 ppb Cd	38,85095(*)	,136375	,000	38,35730	39,34461
		0,50 ppb Cd	45,99286(*)	,136375	,000	45,49920	46,48651
		1 ppb Cd	52,44571(*)	,136375	,000	51,95206	52,93937
		1,50 ppb Cd	63,26143(*)	,136375	,000	62,76777	63,75508
	0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	8,89214(*)	,136375	,000	8,39849	9,38580
		0,25 ppb Cd	47,74310(*)	,136375	,000	47,24944	48,23675
		0,50 ppb Cd	54,88500(*)	,136375	,000	54,39134	55,37866

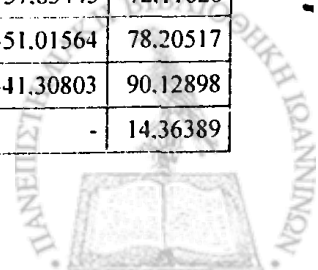


		1 ppb Cd	61,33786(*)	,136375	,000	60,84420	61,83151
		1,50 ppb Cd	72,15357(*)	,136375	,000	71,65992	72,64723
	0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	38,85095(*)	,136375	,000	-39,34461	-38,35730
		0,16 ppb Cd	47,74310(*)	,136375	,000	-48,23675	-47,24944
		0,50 ppb Cd	7,14190(*)	,136375	,000	6,64825	7,63556
		1 ppb Cd	13,59476(*)	,136375	,000	13,10111	14,08842
		1,50 ppb Cd	24,41048(*)	,136375	,000	23,91682	24,90413
		0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	45,99286(*)	,136375	,000	-46,48651
	0,16 ppb Cd		54,88500(*)	,136375	,000	-55,37866	-54,39134
	0,25 ppb Cd		-7,14190(*)	,136375	,000	-7,63556	-6,64825
	1 ppb Cd		6,45286(*)	,136375	,000	5,95920	6,94651
	1,50 ppb Cd		17,26857(*)	,136375	,000	16,77492	17,76223
	1 ppb Cd	0 ppb Cd	52,44571(*)	,136375	,000	-52,93937	-51,95206
		0,16 ppb Cd	61,33786(*)	,136375	,000	-61,83151	-60,84420
		0,25 ppb Cd	13,59476(*)	,136375	,000	-14,08842	-13,10111
		0,50 ppb Cd	-6,45286(*)	,136375	,000	-6,94651	-5,95920
		1,50 ppb Cd	10,81571(*)	,136375	,000	10,32206	11,30937
	1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	63,26143(*)	,136375	,000	-63,75508	-62,76777
		0,16 ppb Cd	72,15357(*)	,136375	,000	-72,64723	-71,65992
		0,25 ppb Cd	24,41048(*)	,136375	,000	-24,90413	-23,91682
		0,50 ppb Cd	17,26857(*)	,136375	,000	-17,76223	-16,77492
		1 ppb Cd	10,81571(*)	,136375	,000	-11,30937	-10,32206
LSD	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-8,89214(*)	,136375	,000	-9,17361	-8,61068
		0,25 ppb Cd	38,85095(*)	,136375	,000	38,56949	39,13242
		0,50 ppb Cd	45,99286(*)	,136375	,000	45,71139	46,27432
		1 ppb Cd	52,44571(*)	,136375	,000	52,16425	52,72718
		1,50 ppb Cd	63,26143(*)	,136375	,000	62,97996	63,54289
	0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	8,89214(*)	,136375	,000	8,61068	9,17361
		0,25 ppb Cd	47,74310(*)	,136375	,000	47,46163	48,02456
		0,50 ppb Cd	54,88500(*)	,136375	,000	54,60354	55,16646
		1 ppb Cd	61,33786(*)	,136375	,000	61,05639	61,61932
		1,50 ppb Cd	72,15357(*)	,136375	,000	71,87211	72,43504
	0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	-	,136375	,000	-39,13242	-38,56949

		38.85095(*)				
	0,16 ppb Cd	47.74310(*)	,136375	,000	-48.02456	-47,46163
	0,50 ppb Cd	7.14190(*)	,136375	,000	6.86044	7,42337
	1 ppb Cd	13.59476(*)	,136375	,000	13,31330	13,87623
	1,50 ppb Cd	24.41048(*)	,136375	,000	24,12901	24,69194
	0 ppb Cd	45.99286(*)	,136375	,000	-46,27432	-45,71139
	0,16 ppb Cd	54.88500(*)	,136375	,000	-55,16646	-54,60354
	0,25 ppb Cd	-7,14190(*)	,136375	,000	-7,42337	-6,86044
	1 ppb Cd	6,45286(*)	,136375	,000	6,17139	6,73432
	1,50 ppb Cd	17,26857(*)	,136375	,000	16,98711	17,55004
	0 ppb Cd	52,44571(*)	,136375	,000	-52,72718	-52,16425
	0,16 ppb Cd	61,33786(*)	,136375	,000	-61,61932	-61,05639
	0,25 ppb Cd	13,59476(*)	,136375	,000	-13,87623	-13,31330
	0,50 ppb Cd	-6,45286(*)	,136375	,000	-6,73432	-6,17139
	1,50 ppb Cd	10,81571(*)	,136375	,000	10,53425	11,09718
	0 ppb Cd	63,26143(*)	,136375	,000	-63,54289	-62,97996
	0,16 ppb Cd	72,15357(*)	,136375	,000	-72,43504	-71,87211
	0,25 ppb Cd	24,41048(*)	,136375	,000	-24,69194	-24,12901
	0,50 ppb Cd	17,26857(*)	,136375	,000	-17,55004	-16,98711
	1 ppb Cd	10,81571(*)	,136375	,000	-11,09718	-10,53425
	0,16 ppb Cd	-8,89214(*)	,136375	,000	-9,33650	-8,44778
	0,25 ppb Cd	38,85095(*)	,136375	,000	38,40659	39,29531
	0,50 ppb Cd	45,99286(*)	,136375	,000	45,54850	46,43722
	1 ppb Cd	52,44571(*)	,136375	,000	52,00135	52,89008
	1,50 ppb Cd	63,26143(*)	,136375	,000	62,81707	63,70579
	0 ppb Cd	8,89214(*)	,136375	,000	8,44778	9,33650
	0,25 ppb Cd	47,74310(*)	,136375	,000	47,29873	48,18746
	0,50 ppb Cd	54,88500(*)	,136375	,000	54,44064	55,32936
	1 ppb Cd	61,33786(*)	,136375	,000	60,89350	61,78222
	1,50 ppb Cd	72,15357(*)	,136375	,000	71,70921	72,59793
	0 ppb Cd	38,85095(*)	,136375	,000	-39,29531	-38,40659
	0,16 ppb Cd	47,74310(*)	,136375	,000	-48,18746	-47,29873
Bonferroni						



		0,50 ppb Cd	7.14190(*)	.136375	.000	6.69754	7.58627
		1 ppb Cd	13.59476(*)	.136375	.000	13.15040	14.03912
		1,50 ppb Cd	24.41048(*)	.136375	.000	23.96611	24.85484
	0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	45.99286(*)	.136375	.000	-46.43722	-45.54850
		0,16 ppb Cd	54.88500(*)	.136375	.000	-55.32936	-54.44064
		0,25 ppb Cd	-7.14190(*)	.136375	.000	-7.58627	-6.69754
		1 ppb Cd	6.45286(*)	.136375	.000	6.00850	6.89722
		1,50 ppb Cd	17.26857(*)	.136375	.000	16.82421	17.71293
	1 ppb Cd	0 ppb Cd	52.44571(*)	.136375	.000	-52.89008	-52.00135
		0,16 ppb Cd	61.33786(*)	.136375	.000	-61.78222	-60.89350
		0,25 ppb Cd	13.59476(*)	.136375	.000	-14.03912	-13.15040
		0,50 ppb Cd	-6.45286(*)	.136375	.000	-6.89722	-6.00850
		1,50 ppb Cd	10.81571(*)	.136375	.000	10.37135	11.26008
	1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	63.26143(*)	.136375	.000	-63.70579	-62.81707
		0,16 ppb Cd	72.15357(*)	.136375	.000	-72.59793	-71.70921
		0,25 ppb Cd	24.41048(*)	.136375	.000	-24.85484	-23.96611
		0,50 ppb Cd	17.26857(*)	.136375	.000	-17.71293	-16.82421
		1 ppb Cd	10.81571(*)	.136375	.000	-11.26008	-10.37135
Tamhane	0 ppb Cd	0,16 ppb Cd	-8.89214	12.426871	1.000	-56.39259	38.60830
		0,25 ppb Cd	38.85095	14.837195	.334	-18.61947	96.32138
		0,50 ppb Cd	45.99286	15.441965	.204	-14.36389	106.34960
		1 ppb Cd	52.44571	15.342516	.105	-7.42930	112.32073
		1,50 ppb Cd	63.26143(*)	15.640413	.042	1.93580	124.58706
	0,16 ppb Cd	0 ppb Cd	8.89214	12.426871	1.000	-38.60830	56.39259
		0,25 ppb Cd	47.74310	14.343112	.123	-8.59648	104.08267
		0,50 ppb Cd	54.88500	14.967859	.078	-4.58317	114.35317
		1 ppb Cd	61.33786(*)	14.865239	.040	2.38957	120.28614
		1,50 ppb Cd	72.15357(*)	15.172509	.017	11.64229	132.66485
	0,25 ppb Cd	0 ppb Cd	-38.85095	14.837195	.334	-96.32138	18.61947
		0,16 ppb Cd	-47.74310	14.343112	.123	104.08267	8.59648
		0,50 ppb Cd	7.14190	17.022104	1.000	-57.83445	72.11826
		1 ppb Cd	13.59476	16.931939	1.000	-51.01564	78.20517
		1,50 ppb Cd	24.41048	17.202333	.955	-41.30803	90.12898
	0,50 ppb Cd	0 ppb Cd	-45.99286	15.441965	.204	-	14.36389



					106,34960	
	0,16 ppb Cd	-54,88500	14,967859	,078	-	4,58317
	0,25 ppb Cd	-7,14190	17,022104	1,000	-72,11826	57,83445
	1 ppb Cd	6,45286	17,464321	1,000	-60,13647	73,04218
	1,50 ppb Cd	17,26857	17,726596	,999	-50,32634	84,86348
1 ppb Cd	0 ppb Cd	-52,44571	15,342516	,105	-	7,42930
	0,16 ppb Cd	61,33786(*)	14,865239	,040	-	-2,38957
	0,25 ppb Cd	-13,59476	16,931939	1,000	-78,20517	51,01564
	0,50 ppb Cd	-6,45286	17,464321	1,000	-73,04218	60,13647
	1,50 ppb Cd	10,81571	17,640032	1,000	-56,45873	78,09016
1,50 ppb Cd	0 ppb Cd	63,26143(*)	15,640413	,042	-	-1,93580
	0,16 ppb Cd	72,15357(*)	15,172509	,017	-	-11,64229
	0,25 ppb Cd	-24,41048	17,202333	,955	-90,12898	41,30803
	0,50 ppb Cd	-17,26857	17,726596	,999	-84,86348	50,32634
	1 ppb Cd	-10,81571	17,640032	1,000	-78,09016	56,45873

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the ,05 level.

