



Σχολή

Πρόγραμμα Σπουδών

Διπλωματική Εργασία

«Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό»

ΕΛΕΝΗ ΤΟΜΑΖΟΥ

Επιβλέπων καθηγήτρια: Λαμπροπούλου Δημητρούλα

Συν-επιβλέπων καθηγητής: Κοντογιάννης Χρίστος

Πάτρα, Ιανουάριος, 2025

© Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, 2017

Η παρούσα Εργασία καθώς και τα αποτελέσματα αυτής, αποτελούν συνιδιοκτησία του ΕΑΠ και του φοιτητή, ο καθένας από τους οποίους έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης, αναπαραγωγής και αναδιανομής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και το συγγραφέα της Εργασίας καθώς και το όνομα του ΕΑΠ όπου εκπονήθηκε.



«Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό»

ΕΛΕΝΗ ΤΟΜΑΖΟΥ

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:
Δημητρούλα Λαμπροπούλου

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:
Κοντογιάννης Χρήστος

Πάτρα, Ιανουάριος, 2025

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει συστηματικά τις διαθέσιμες τεχνολογίες και στρατηγικές για την ανίχνευση μικροοργανισμών που αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Εστιάζει στους κύριους παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*), πρωτόζωα (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*), κυανοβακτήρια (*Microcystis* spp., *Anabaena* spp.), και ιούς. Παρουσιάζονται οι ασθένειες που προκαλούν, όπως γαστρεντερίτιδα, δυσεντερία, χολέρα, καθώς και πιο σοβαρές λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους.

Η εργασία περιγράφει τεχνικές ανίχνευσης, ξεκινώντας από παραδοσιακές μεθόδους, όπως η καλλιέργεια σε θρεπτικά μέσα, που αν και οικονομική, είναι χρονοβόρα και περιορισμένη σε καλλιεργήσιμα βακτήρια. Συγχρόνως, σύγχρονες μοριακές μέθοδοι, όπως η PCR, qPCR, και Digital PCR, επιτρέπουν την ταχεία και ακριβή ανίχνευση DNA. Αναδεικνύεται η χρησιμότητα της κυτταρομετρίας ροής για την ανάλυση μοριακών δεικτών, της τεχνολογίας μικροσυστοιχιών DNA για ταυτοποίηση μικροβίων, καθώς και η αξιοποίηση βιοαισθητήρων και νανοτεχνολογίας για ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο. Η ανάλυση υπογραμμίζει την εφαρμογή της τεχνολογίας CRISPR-Cas για την ταχεία ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων, ενώ γίνεται αναφορά στη χρήση τεχνικών φθορισμού και ανοσοενζυμικών δοκιμών (ELISA). Εξετάζονται, επίσης, η αλληλούχιση 16S rDNA και η ολοκληρωμένη μεταγονιδιωματική ανάλυση.

Το έγγραφο καταλήγει στη σημασία της διαρκούς παρακολούθησης της ποιότητας του νερού, της εφαρμογής προληπτικών μέτρων και της υιοθέτησης καινοτόμων τεχνολογιών για την πρόληψη ασθενειών που συνδέονται με το μολυσμένο νερό. Η πολυπλοκότητα και το εύρος των τεχνικών που περιγράφονται αντικατοπτρίζουν τις εξελίξεις στον τομέα και τονίζουν την ανάγκη για διεπιστημονική προσέγγιση στη διαχείριση υδάτινων πόρων.

Λέξεις – Κλειδιά

Παθογόνοι μικροοργανισμοί, Ποιότητα νερού, Μέθοδοι ανίχνευσης, Μοριακή τεχνολογία, Βιοαισθητήρες, Δημόσια υγεία.

Abstract

This thesis systematically examines the available technologies and strategies for detecting microorganisms that pose a risk to public health. It focuses on key pathogenic microorganisms, including bacteria (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*), protozoa (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*), cyanobacteria (*Microcystis* spp., *Anabaena* spp.), and viruses. The diseases they cause are presented, such as gastroenteritis, dysentery, cholera, as well as more severe infections in immunocompromised individuals.

The study describes detection techniques, starting with traditional methods such as culture on nutrient media, which, although cost-effective, are time-consuming and limited to culturable bacteria. Simultaneously, modern molecular methods, such as PCR, qPCR, and Digital PCR, allow for rapid and precise DNA detection. The utility of flow cytometry for analyzing molecular markers, DNA microarray technology for microbial identification, and the application of biosensors and nanotechnology for real-time detection is highlighted. The analysis emphasizes the application of CRISPR-Cas technology for the rapid detection of pathogenic bacteria, while also referencing the use of fluorescence techniques and immunoenzymatic assays (ELISA). Additionally, 16S rDNA sequencing and comprehensive metagenomic analysis are examined.

The document concludes by stressing the importance of continuous water quality monitoring, the implementation of preventive measures, and the adoption of innovative technologies to prevent diseases associated with contaminated water. The complexity and range of techniques described reflect advancements in the field and underscore the need for an interdisciplinary approach to water resource management.

Keywords

Pathogenic microorganisms, Water quality, Detection methods, Molecular technology, Biosensors, Public health.

Περιεχόμενα

Περίληψη	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	ix
Κατάλογος Πινάκων	x
1. Εισαγωγή	1
1.1. Ιστορική αναδρομή	1
1.2. Νομικό πλαίσιο	5
1.2.1. Οδηγία 2000/60/EK - Οδηγία Πλαίσιο για τα Νερά	5
1.2.2. Οδηγία 98/83/EK για την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης	7
1.2.3. Εθνική Νομοθεσία	8
2. Μικροοργανισμοί που μελετώνται συνήθως στο νερό	11
2.1. Βακτήρια (Bacteria)	11
2.1.1. Κολοβακτηρίδια (<i>Coliform Bacteria</i>)	12
2.1.2. <i>Legionella</i> spp.	16
2.1.3. <i>Clostridium perfringens</i>	18
2.1.4. <i>Vibrio cholerae</i>	20
2.2. Ιοί (Viruses)	22
2.2.1. <i>Norovirus</i>	22
2.2.2. <i>Adenovirus</i>	23
2.2.3. <i>Hepatitis A</i> και <i>E</i>	25
2.3. Πρωτόζωα (Protozoa)	27
2.3.1. <i>Giardia lamblia</i>	27
2.3.2. <i>Cryptosporidium parvum</i>	28
2.3.3. <i>Entamoeba histolytica</i>	30
2.4. Μύκητες (Fungi)	31
2.4.1. <i>Aspergillus</i> spp.	31
2.4.2. <i>Candida</i> spp.	33
2.5. Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria)	34
2.5.1. <i>Microcystis</i> spp.	34
2.5.2. <i>Anabaena</i> spp.	36
2.6. Άλλοι Δείκτες Μικροοργανισμών	37
2.6.1. <i>Enterococcus</i> sp. :	37
2.6.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
3. Τεχνικές ανάλυσης μικροοργανισμών στο νερό.	42
3.1. Flow Cytometry (Κυτταρομετρία Ροής)	42
3.2. PCR	44
3.2.1. Κλασική PCR:	44
3.2.2. <i>real-time PCR</i>	46
3.2.3. <i>Multiplex PCR</i>	48
3.2.4. <i>Digital PCR (dPCR)</i>	49
3.3. Πολιτισμικές Μέθοδοι (Culture-Based Methods)	51
3.4. Μεθοδολογία μεμβρανών φίλτρων	53

3.5. Μικροσκοπική ανάλυση.....	54
3.7. Τεχνικές φθορισμού και Immunofluorescence.....	55
3.6.1. Τεχνικές Φθορισμού	55
3.6.2. Immunofluorescence (Ανοσοφθορισμός)	55
3.7. Ενζυμικές Τεχνικές (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	56
3.8. Next-Generation Sequencing (NGS) για μικροβιακές κοινότητες.....	57
3.8.1. 16S rDNA Αλληλούχιση	58
3.8.2. Ολόκληρη Μεταγονιδιωματική Αλληλούχιση (WMS)	61
3.9. Ανάλυση με Μικροσυστοιχίες DNA (DNA Microarrays).....	63
3.10. Ισοθερμική Ενίσχυση Βρόχου (Loop-Mediated Isothermal Amplification - LAMP)	64
3.11. Νέες Τεχνολογίες Ανίχνευσης (Emerging Detection Technologies).....	65
3.11.1. Ανάπτυξη Μεθόδων με Βιοαισθητήρες.....	65
3.11.2. Βιοαισθητήρες (Biosensors)	66
3.11.3. Εφαρμογές με Νανοσωματίδια και Νανοϋλικά	67
3.11.4. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas) για την Ανίχνευση Παθογόνων Βακτηρίων	68
4. Επίλογος.....	72
Βιβλιογραφία	74

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1.1. Ο Ναπολέων επισκέπτεται τους πληγέντες από πανώλη της Γιάφας. Antoine-Jean Gros – “Bonaparte visitant les pestiférés de Jaffa”	3
Εικόνα 2.2. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου Escherichia coli (E. coli). National Geographic	12
Εικόνα 2.3. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από Salmonella Typhimurium, η οποία εισβάλλει σε επιθηλιακό κύτταρο ανθρώπου. NIH	14
Εικόνα 2.4. Shigella dysenteriae. Χρωματισμένη εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βακτηρίων Shigella dysenteriae που προκαλούν δυσεντερία στον άνθρωπο. Science photo library	15
Εικόνα 2.5. Legionella. geberit.co.uk	17
Εικόνα 2.6. Μορφολογία του βακτηρίου Clostridium perfringens. Microbe Notes	18
Εικόνα 2.7. Vibrio cholerae. Harvard Medical School	21
Εικόνα 2.8. Χρωματισμένη εικόνα νοροϊού από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. medicine.washu.edu	22
Εικόνα 2.9. Adenovirus. vircell.com	24
Εικόνα 2.10. Οι διάφοροι τύποι Hepatitis. Οι Α και Ε δεν διαθέτουν έλυτρο.	25
Εικόνα 2.11. Giardia lamblia. By Bradley A. Connor, M.D.	28
Εικόνα 2.12. Cryptosporidium parvum. Online Science Notes	29
Εικόνα 2.13. Entamoeba histolytica. Original micrograph: CDC/ Dr. Mae Melvin; Dr. Greene Annotations by Mikael Häggström, M.D.	30
Εικόνα 2.14. Aspergillus spp. Ανώτερη ανάπτυξη: Στο ανώτερο άκρο τους, οι μύκητες μούχλας αναπτύσσουν νήματα. hartmann-science-center	32
Εικόνα 2.15. Candida albicans. Cleveland clinic.	33
Εικόνα 2.16. Microcystis spp. ScienceDirect	35
Εικόνα 2.17. Anabaena spp. Microbiology. Brandon Ward	36
Εικόνα 2.18. Enterococcus sp . United States Department of Agriculture	38
Εικόνα 2.19. Pseudomonas aeruginosa. Condalab.	39
Εικόνα 3.20 Παρουσίαση τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση νερού σήμερα, αλλά και στο μέλλον. (16)	42
Εικόνα 3.21. Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην real-time PCR. a) χρωστική SYBR green I, b) ανιχνευτές υδρόλυσης, c) ανιχνευτές Taqman, d) μοριακοί φάροι, e) ανιχνευτές sunrise, f) σκορπιό. (77)	47
Εικόνα 3.22. Φθορισμός συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων αρχικής ποσότητας DNA που μελετάται 78)	48
Εικόνα 3. 23. Αρχές της digital PCR	50
Εικόνα 3.24. Οι περιοχές HVRs του 16S rDNA του Escherichia coli συμβολίζονται με κόκκινο χρώμα. (97)	60

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1. Μικροοργανισμοί, Ασθένειες και Παρουσία σε Υδάτινα Περιβάλλοντα	40
Πίνακας 3.2. Διαφορές ανάμεσα σε dPCR και qPCR.....	51
Πίνακας 3.3. Σύγκριση WMS και 16S rDNA.....	62
Πίνακας 3.4. Σύγκριση Τεχνικών Ανίχνευσης Παθογόνων	70

1. Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή

Από τα αρχαία χρόνια το νερό ήταν βασικό θέμα της οργάνωσης των πόλεων των ανθρώπων. Στους αρχαίους πολιτισμούς, όπως οι Έλληνες, οι Μεσοποταμίοι και οι Αιγύπτιοι, το νερό έπαιξε σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πόλεων. Στη Μεσοποταμία και την Αίγυπτο, το νερό προερχόταν κυρίως από μεγάλους ποταμούς, όπως ο Τίγρης, ο Ευφράτης και ο Νείλος, ενώ στην Ελλάδα, όπου οι υδάτινοι πόροι ήταν περιορισμένοι, υπήρξε ανάγκη για καινοτόμες λύσεις, όπως η χρήση πηγαδιών και στέρνων. (1)

Στην αρχαία Ελλάδα, ιδιαίτερα στην Αθήνα, το νερό προερχόταν κυρίως από πηγές και πηγάδια, καθώς δεν υπήρχαν μεγάλοι ποταμοί σε κοντινή απόσταση. Οι Αθηναίοι χρησιμοποίησαν συστήματα για τη συλλογή όμβριων υδάτων και υπόγεια πηγάδια για την παροχή νερού στην πόλη τους. Σημαντικά έργα, όπως το Ευπαλίνειο Όρυγμα στη Σάμο (520 π.Χ.), αποτελούν παραδείγματα προηγμένων τεχνολογιών στην υδροδότηση, χρησιμοποιώντας γεωμετρία και τοπογραφία. (2)

Στην αρχαία Κρήτη, κατά τη Μινωική και την Ελληνιστική περίοδο, αναπτύχθηκαν συστήματα αποχέτευσης και ύδρευσης που ήταν ιδιαίτερα προχωρημένα για την εποχή τους. Οι τεχνολογίες αυτές συνεχίστηκαν και βελτιώθηκαν κατά τη Ρωμαϊκή εποχή. Συστήματα όπως το ανάποδο σιφώνι, που χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά νερού σε πόλεις όπως η Έφεσος και η Πέργαμος, ήταν ενδεικτικά της προόδου στη μηχανική. (3)

Οι Ρωμαίοι, επηρεασμένοι από τους Έλληνες και άλλους πολιτισμούς, ανέπτυξαν και διέδωσαν τη χρήση υδραγωγείων για τη μεταφορά νερού σε μεγάλες αποστάσεις. Η Ρώμη ήταν διάσημη για τα υδραγωγεία της, ενώ έργα όπως το Αδριάνειο υδραγωγείο στην Αθήνα κατασκευάστηκαν για να καλύψουν τις αυξανόμενες ανάγκες της πόλης. Επίσης ανέπτυξαν μεγάλες δημόσιες υποδομές, όπως τα νυμφαία, μεγαλοπρεπή σιντριβάνια, τα οποία έπαιζαν συμβολικό ρόλο στην προβολή της αυτοκρατορικής εξουσίας. (4)

Στον Μεσαίωνα, το νερό άρχισε να χρησιμοποιείται εκτός από την υδροδότηση και για βιομηχανικούς σκοπούς, όπως οι υδρόμυλοι και η βυρσοδεψία. Η διαχείριση των υδάτινων πόρων, καθώς και η υγιεινή και η αποχέτευση, έγιναν ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των μεσαιωνικών πόλεων. (5)

Στη σύγχρονη εποχή, το ζήτημα της διαχείρισης των υδάτινων πόρων παραμένει ένα συνεχές πρόβλημα, ιδιαίτερα στις πόλεις με μεγάλο πληθυσμό όπως η Αθήνα. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και υποδομών, όπως η χρήση πλαστικών σωλήνων, αυτοματοποιημένων συστημάτων διανομής και η χρήση αντλιών, έχει βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της διαχείρισης νερού. Η διαχείριση του νερού γίνεται με σύγχρονα εργαλεία, όπως τα συστήματα υποστήριξης αποφάσεων (DSS) που αναπτύχθηκαν με τη συνεργασία της ΕΥΔΑΠ και του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, με στόχο την καλύτερη λειτουργία και προγραμματισμό του υδροδοτικού συστήματος. (6)

1.1.1 Ασθένειες που μεταδόθηκαν μέσω του νερού ανά τους αιώνες

Ανά τους αιώνες έχει βρεθεί ότι ένα μεγάλο μέρος ασθενειών μπορούν να μεταδοθούν από το νερό, άρα είναι πολύ σημαντική η ανάλυση του για να διασφαλιστεί η ποιότητά του. Ιστορικά ασθένειες που μεταδόθηκαν από τα ύδατα και δημιούργησαν σοβαρά προβλήματα και μαζικούς θανάτους σε περιοχές του πλανήτη ήταν:

Γύρω στο 430 π.Χ., μια σοβαρή επιδημία τυφοειδούς πυρετού πλήττει την Αττική και επανεμφανίζεται κατά διαστήματα για τρία χρόνια, με θνησιμότητα περίπου 25%. Η επιδημία εξαπλώνεται προς τα νότια μέχρι τη Λακωνία και προς βόρεια μέχρι την Ιλλυρία. Ο Ιπποκράτης, προσπαθώντας να αποτρέψει μια πανδημία, οργανώνει τους Ασκληπιάδες σε όλο τον ελλαδικό χώρο, με στόχο να απομονώσουν τα κρούσματα και να περιορίσουν την εξάπλωση της ασθένειας.

Η πανώλης, μιας σοβαρής μεταδοτικής ασθένειας που έχει επηρεάσει σημαντικά την ανθρωπότητα. (Εικόνα 1.1.) Ο όρος "λοιμός" χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια, ενώ κατά τον Μεσαίωνα ταυτίστηκε με την πανώλη. Η πανώλη ξεκίνησε να εξαπλώνεται το 541 μ.Χ. και συνέχισε για αιώνες, με σημαντικά επιδημικά κύματα, όπως ο «Μαύρος Θάνατος» του 14ου αιώνα, που προκάλεσε τον θάνατο 200 εκατομμυρίων ανθρώπων. (7)

Η τρίτη φάση της πανδημίας ξεκίνησε από το Χονγκ Κονγκ και εξαπλώθηκε παγκοσμίως. Η ασθένεια εξαπλωνόταν μέσω μολυσμένων τροφικών που μετέφεραν ψύλλοι. Το βακτήριο που ευθύνεται για την πανώλη είναι το *Yersinia pestis*, το οποίο ανακαλύφθηκε από τους γιατρούς Alexander Yersin και Kitasato Shibasaburō το 1894. Το βακτήριο ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών και χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά. (8) (9)

Ο κοινωνικός και εμπορικός ρόλος της πανώλης ήταν καθοριστικός, προκαλώντας μεγάλες απώλειες, κοινωνικές αλλαγές, και δεισδιαιμονίες, όπως η πεποίθηση ότι η ασθένεια ήταν θεία τιμωρία. (10)



Εικόνα 1.1. Ο Ναπολέων επισκέπτεται τους πληγέντες από πανώλη της Γιάφας. Antoine-Jean Gros – “Bonaparte visitant les pestiférés de Jaffa”

Η χολέρα, γνωστή και ως η πρώτη πανδημία χολέρας στην Ασία ή ασιατική χολέρα (1817-1824), ξεκίνησε κοντά στην πόλη της Καλκούτας και εξαπλώθηκε γρήγορα στη Νότια και Νοτιοανατολική Ασία, φτάνοντας μέχρι τη Μέση Ανατολή, την Ανατολική Αφρική και τις ακτές της Μεσογείου. Αν και η χολέρα είχε εμφανιστεί ξανά στην Ινδία στο παρελθόν, αυτό το ξέσπασμα ήταν πιο εκτεταμένο. Έφτασε έως την Κίνα και τη Μεσόγειο πριν αρχίσει να υποχωρεί. Χιλιάδες άνθρωποι πέθαναν, συμπεριλαμβανομένων πολλών Βρετανών στρατιωτών, γεγονός που τράβηξε την προσοχή της Ευρώπης. Αυτή ήταν η πρώτη από πολλές πανδημίες χολέρας που έπληξαν την Ασία και την Ευρώπη κατά τον 19ο και 20ο αιώνα, επηρεάζοντας σχεδόν όλες τις χώρες της Ασίας. (11)

Η αμοιβάδωση, γνωστή και ως αμοιβαδική δυσεντερία, είναι μια μόλυνση που προκαλείται από την αμοιβάδα *Entamoeba histolytica*, η οποία εμφανίζεται κυρίως σε τροπικές περιοχές.

Είναι σημαντικό να θεραπευτεί σωστά, διότι αν δεν αντιμετωπιστεί επαρκώς, η αμοιβάδωση μπορεί να παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση για χρόνια και να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές, που μπορεί να αποβούν θανατηφόρες. Η αμοιβάδωση προσβάλλει πάνω από 50 εκατομμύρια ανθρώπους ανά έτος, εκ των οποίων τα 50.000 αποβιώνουν . (12)

Μηνιγγίτιδα. Φλεγμονή των μεμβρανών (μήνιγγες) που περιβάλλουν τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Εκδηλώνεται με υψηλό πυρετό, πονοκέφαλο, πόνο στον αυχένα, δυσκολία των κινήσεων στον λαιμό, έμετο, ναυτία, σύγχυση ή δυσκολία συγκέντρωσης, υπνηλία ή δυσκολία αφύπνισης και ευαισθησία στο φως. (13) Η μεγαλύτερη επιδημία που έχει καταγραφεί, αφορούσε όλη την περιοχή της υποσαχάριας Αφρικής το 1996-1997, προκαλώντας πάνω από 250.000 κρούσματα και πάνω από 25.000 θανάτους. (14)

Πολιομυελίτιδα: Η πολιομυελίτιδα είναι μια ασθένεια γνωστή από την αρχαιότητα, με απεικονίσεις σε αιγυπτιακά έργα που δείχνουν υγιείς ανθρώπους με παραλυμένα άκρα και παιδιά που περπατούν με μπαστούνια από μικρή ηλικία. Η πρώτη κλινική περιγραφή έγινε από τον Άγγλο γιατρό Michael Underwood το 1789, όπου χαρακτήρισε την ασθένεια ως "αδυναμία των κάτω άκρων". Αργότερα, οι γιατροί Jakob Heine και Karl Oskar Medin ανέλυσαν περαιτέρω την ασθένεια, η οποία ονομάστηκε "νόσος Heine-Medin" και στη συνέχεια "παιδική παράλυση" λόγω της τάσης της να προσβάλλει παιδιά. Πριν από τον 20ό αιώνα, η πολιομυελίτιδα επηρέαζε κυρίως βρέφη και παιδιά μικρότερης ηλικίας, με την κακή υγιεινή να συμβάλλει στην ανάπτυξη φυσικής ανοσίας. Ωστόσο, με τη βελτίωση των συνθηκών υγιεινής στις ανεπτυγμένες χώρες στα τέλη του 19ου και στις αρχές του 20ού αιώνα, μειώθηκε η πρόωπη έκθεση στον ιό, αυξάνοντας τον κίνδυνο μόλυνσης και παράλυσης σε μεγαλύτερες ηλικίες.

Μικρές τοπικές επιδημίες άρχισαν να εμφανίζονται στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ γύρω στο 1900, με τη νόσο να αποκτά διαστάσεις πανδημίας κατά τον 20ό αιώνα, επηρεάζοντας την Ευρώπη, τη Βόρεια Αμερική, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία. Στις ΗΠΑ, η επιδημία του 1952 ήταν η χειρότερη, με σχεδόν 58.000 κρούσματα, εκ των οποίων 3.145 άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους και πάνω από 21.000 παρέμειναν με παράλυση. Αυτή η επιδημία οδήγησε στην ανάπτυξη μονάδων εντατικής θεραπείας, όπως το πρώτο κέντρο εντατικής θεραπείας που δημιουργήθηκε στην Κοπεγχάγη το 1952 από τον Δανό αναισθησιολόγο Børn Ibsen.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι υπάρχουν 10 με 20 εκατομμύρια επιζώντες πολιομυελίτιδας παγκοσμίως. Στις ΗΠΑ, το 1977 υπήρχαν 254.000 άνθρωποι που είχαν παραλύσει από την ασθένεια. Πολλοί επιζώντες της πολιομυελίτιδας από διάφορες χώρες, όπως η Γερμανία, η Ιαπωνία, η Γαλλία, ο Καναδάς και το Ηνωμένο Βασίλειο, συνέχισαν να ζουν με τις συνέπειες της νόσου. Η πολιομυελίτιδα έλαβε μεγάλη δημοσιότητα τη δεκαετία του 1950, με τα ΜΜΕ να καλύπτουν εκτενώς κάθε επιστημονική εξέλιξη που μπορούσε να οδηγήσει σε θεραπεία. Οι επιστήμονες που εργάστηκαν πάνω στην πολιομυελίτιδα έγιναν διάσημοι, και το 1957 τιμήθηκαν σε ένα Hall of Fame στο Ινστιτούτο Αποκατάστασης του Roosevelt στο Warm Springs των ΗΠΑ. (15)

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) επίσης εκτιμά ότι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως το *Escherichia coli*, που συνδέονται κυρίως με τη μόλυνση τροφίμων και νερού, ευθύνονται για 485.000 θανάτους από διάρροια ετησίως, προκαλώντας τεράστιες οικονομικές απώλειες που αγγίζουν τα 12 δισεκατομμύρια δολάρια παγκοσμίως κάθε χρόνο. Διεθνείς οργανισμοί, όπως ο ΠΟΥ και η UNICEF, έχουν καθορίσει κατευθυντήριες γραμμές και κριτήρια για τεχνολογίες ανίχνευσης παθογόνων, ενθαρρύνοντας την αναζήτηση καινοτόμων και αποτελεσματικών μεθόδων ανίχνευσης. (16)

1.2. Νομικό πλαίσιο

Στην Ελλάδα το νομικό πλαίσιο που διέπει την ανάλυση και την ποιότητα του νερού βασίζεται κυρίως σε ευρωπαϊκές οδηγίες, οι οποίες έχουν ενσωματωθεί στην εθνική νομοθεσία. Οι κύριες διατάξεις περιλαμβάνουν:

1.2.1. Οδηγία 2000/60/ΕΚ - Οδηγία Πλαίσιο για τα Νερά

Η Οδηγία 2000/60/ΕΚ, γνωστή ως Οδηγία Πλαίσιο για τα Νερά (Water Framework Directive - WFD), αποτελεί το βασικό νομοθετικό κείμενο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη διαχείριση και προστασία των υδάτινων πόρων. Ο κύριος στόχος της είναι η διασφάλιση της βιώσιμης χρήσης του νερού, προστατεύοντας τα οικοσυστήματα που εξαρτώνται από αυτό. Τα βασικά σημεία της οδηγίας αυτής είναι: (17)

1. Στόχος: "Καλή Κατάσταση" των Υδατικών Σωμάτων

Η οδηγία απαιτεί από τα κράτη μέλη να διασφαλίσουν ότι όλα τα υδατικά σώματα (ποτάμια, λίμνες, υπόγεια και παράκτια νερά):

- Θα φτάσουν σε "καλή οικολογική κατάσταση" (για τα επιφανειακά ύδατα).
- Θα εξασφαλίσουν "καλή χημική κατάσταση" (για υπόγεια και επιφανειακά ύδατα).

Η "καλή κατάσταση" σημαίνει ότι οι δείκτες ποιότητας νερού (χημικοί, βιολογικοί, φυσικοί) πληρούν συγκεκριμένα πρότυπα. (17)

2. Διαχείριση μέσω Λεκάνης Απορροής Ποταμού

Η οδηγία αναγνωρίζει ότι τα υδατικά σώματα δεν ακολουθούν διοικητικά όρια. Έτσι, απαιτεί τη διαχείριση του νερού σε επίπεδο λεκάνης απορροής ποταμού: Κάθε λεκάνη απορροής ποταμού (π.χ. ο Αξιός ή ο Έβρος) πρέπει να έχει Σχέδιο Διαχείρισης Υδάτων και τα σχέδια αυτά περιλαμβάνουν μέτρα για την προστασία και αποκατάσταση των υδατικών πόρων. (17)

3. Πρόληψη Ρύπανσης

Η οδηγία περιλαμβάνει μέτρα για την πρόληψη ρύπανσης από:

- Γεωργικές δραστηριότητες (π.χ. λιπάσματα και φυτοφάρμακα).
- Βιομηχανικές απορρίψεις.
- Αστικά λύματα. (17)

4. Οικολογική και Χημική Παρακολούθηση

Τα κράτη μέλη πρέπει να εφαρμόζουν συστήματα παρακολούθησης για την οικολογική κατάσταση του νερού, όπου παρακολουθείται η βιοποικιλότητα, όπως φυτά, ψάρια και μικροοργανισμοί και την χημική κατάσταση, όπου μετριοούνται οι συγκεντρώσεις επικίνδυνων ουσιών, όπως βαρέα μέταλλα ή οργανοφωσφορικές ενώσεις. (17)

5. Μέτρα Αποκατάστασης

Όπου η καλή κατάσταση δεν επιτυγχάνεται, απαιτούνται επεμβάσεις αποκατάστασης (π.χ. καθαρισμός ποταμών ή λιμνών) και μείωση της χρήσης ρύπων στις δραστηριότητες γύρω από τα υδατικά σώματα. (17)

6. Συμμετοχή Κοινού

Η οδηγία ενθαρρύνει τη συμμετοχή του κοινού και των ενδιαφερόμενων φορέων όσων αφορά τα σχέδια διαχείρισης νερού και τη λήψη αποφάσεων για τη διαχείριση των υδάτων. (17)

7. Συνεργασία Μεταξύ Κρατών

Εάν μια λεκάνη απορροής εκτείνεται σε περισσότερες χώρες (π.χ. Δούναβης), τα κράτη μέλη πρέπει να συνεργάζονται για τη διαχείριση και προστασία της. (17)

Χρονοδιαγράμματα

Η οδηγία έθεσε ένα σαφές χρονοδιάγραμμα:

- Μέχρι το 2015, όλα τα υδατικά σώματα έπρεπε να έχουν φτάσει σε "καλή κατάσταση".
- Εάν αυτό δεν ήταν δυνατό, υπήρχε περιθώριο παράτασης έως το 2027, με αιτιολόγηση.

Η Οδηγία 2000/60/EK θεωρείται σημαντική γιατί εισάγει μια ολιστική προσέγγιση στη διαχείριση του νερού, προάγοντας τη βιωσιμότητα και τη διατήρηση του περιβάλλοντος. (17)

1.2.2. Οδηγία 98/83/EK για την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης

Η Οδηγία 98/83/EK, γνωστή και ως Οδηγία για την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης, αποτελεί το κύριο νομοθετικό πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης που διασφαλίζει την ποιότητα και την ασφάλεια του πόσιμου νερού για τους πολίτες της. Σκοπός της είναι να προστατεύσει την υγεία των καταναλωτών από την κατανάλωση μη ασφαλούς νερού. (18)

Η Οδηγία στοχεύει στη διασφάλιση ότι το νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι υγιεινό και καθαρό και στη θέσπιση ελάχιστων απαιτήσεων ποιότητας για όλα τα δίκτυα ύδρευσης (δημόσια ή ιδιωτικά). Εφαρμόζεται στο νερό που προορίζεται για πόση, μαγείρεμα, ή παρασκευή τροφίμων και παρέχεται από δημόσια δίκτυα ή ιδιωτικές πηγές (εάν εξυπηρετούν περισσότερα από 50 άτομα ή παρέχουν πάνω από 10 κυβικά μέτρα την ημέρα), ενώ δεν καλύπτει το νερό που χρησιμοποιείται για βιομηχανικούς σκοπούς (εάν δεν επηρεάζει την υγεία των καταναλωτών). (18)

Η Οδηγία καθορίζει παραμέτρους ποιότητας που πρέπει να πληροί το πόσιμο νερό, όπως μικροβιολογικές παραμέτρους, όπου δεν πρέπει να ανιχνεύονται καθόλου στο πόσιμο νερό μικροοργανισμοί όπως *Escherichia coli* (*E. Coli*) ή *Enterococci* και χημικές παραμέτρους, όπου τοξικές ουσίες όπως νιτρικά άλατα, αρσενικό, μόλυβδος και υδράργυρος έχουν συγκεκριμένα ανώτατα όρια. Π.χ., για το μόλυβδο, το όριο είναι 10 μικρογραμμάρια ανά λίτρο (μg/L). (18)

Επίσης ελέγχεται η παρουσία οργανικών ουσιών, όπως για παράδειγμα υποπροϊόντα απολύμανσης, όπως τα τριαλογομεθάνια (THMs), τα οποία έχουν επίσης ανώτατα επιτρεπτά όρια και φυσικές και αισθητικές παραμέτρους, όπως το χρώμα, η οσμή, η γεύση και η θολότητα του νερού πρέπει να είναι εντός αποδεκτών επιπέδων. (18)

Η Οδηγία απαιτεί τακτική παρακολούθηση της ποιότητας του νερού από, τις αρμόδιες αρχές των κρατών μελών και τις εταιρείες ύδρευσης, οι οποίες πρέπει να διεξάγουν δοκιμές στις παραμέτρους ποιότητας. Επίσης προβλέπει ότι οι καταναλωτές πρέπει να ενημερώνονται για την ποιότητα του πόσιμου νερού στην περιοχή τους και να λαμβάνουν ειδοποιήσεις σε περιπτώσεις απόκλισης από τα πρότυπα. (18)

Εάν το πόσιμο νερό δεν πληροί τις απαιτήσεις, λαμβάνονται διορθωτικά μέτρα για την αποκατάσταση της ποιότητας και οι αρμόδιες αρχές μπορούν να αποφασίσουν περιορισμούς χρήσης του νερού ή να παρέχουν εναλλακτικές πηγές. Απαιτείται τακτική ενημέρωση και αναθεώρηση των παραμέτρων με βάση την επιστημονική πρόοδο. Για το λόγο αυτό οι χώρες μέλη υποχρεούνται να υποβάλλουν εκθέσεις στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή. (18)

1.2.3. Εθνική Νομοθεσία

Η Ελλάδα έχει ενσωματώσει τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ποιότητα του πόσιμου νερού μέσω της εθνικής νομοθεσίας, κυρίως με Κοινές Υπουργικές Αποφάσεις (ΚΥΑ) και εγκυκλίους του Υπουργείου Υγείας. Αυτές οι νομοθετικές πράξεις εστιάζουν στη διασφάλιση της ποιότητας του νερού που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση, προλαμβάνοντας κινδύνους για τη δημόσια υγεία. (19)

1. ΚΥΑ Δ1(δ)/ΓΠ οικ. 27829/15.5.2023

Αυτή η Κοινή Υπουργική Απόφαση αντικατοπτρίζει τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Οδηγίας 98/83/ΕΚ (και την αναθεώρησή της). Περιλαμβάνει συγκεκριμένες διατάξεις που εφαρμόζονται στην Ελλάδα. Καθορίζει τα πρότυπα που πρέπει να πληρούνται για το πόσιμο νερό, περιλαμβάνει παραμέτρους για την παρακολούθηση της μικροβιολογικής, χημικής και φυσικής ποιότητας και υποχρεώνει τις εταιρείες ύδρευσης (π.χ., ΕΥΔΑΠ, ΕΥΑΘ) και άλλους παρόχους να διεξάγουν τακτικούς ελέγχους ποιότητας, προβλέποντας την παρακολούθηση του νερού από την πηγή μέχρι τη βρύση του καταναλωτή. (19)

Ζητείται από τους φορείς ύδρευσης να εφαρμόσουν Σχέδια Ασφάλειας Νερού (Water Safety Plans). Αυτά τα σχέδια περιλαμβάνουν την εκτίμηση και διαχείριση κινδύνων σε όλα τα στάδια, από την άντληση του νερού έως τη διανομή του και περιλαμβάνει μέτρα που πρέπει να ληφθούν σε περιπτώσεις μόλυνσης ή άλλων προβλημάτων στο δίκτυο ύδρευσης, καθώς και την πρόβλεψη παροχής εναλλακτικών λύσεων ύδρευσης σε περίπτωση έκτακτης

ανάγκης. Τέλος, υποχρεώνει τις αρχές να ενημερώνουν το κοινό για την ποιότητα του πόσιμου νερού μέσω ανακοινώσεων ή εκθέσεων. (19)

2. Εγκύκλιοι του Υπουργείου Υγείας

Οι εγκύκλιοι λειτουργούν ως πρακτικές οδηγίες για την εφαρμογή της νομοθεσίας και εστιάζουν σε επιμέρους ζητήματα που αφορούν την ποιότητα του νερού.

Βασικά Σημεία:

- Βελτίωση της πρόσβασης σε ασφαλές πόσιμο νερό:
- Παρέχονται κατευθύνσεις για τη βελτίωση της υποδομής στις περιοχές που αντιμετωπίζουν προβλήματα ύδρευσης.
- Ενθαρρύνεται η χρήση τεχνολογιών επεξεργασίας νερού (π.χ., φίλτρα, συστήματα απολύμανσης).

Υποχρεωτική πληροφόρηση του κοινού:

- Οι πάροχοι ύδρευσης πρέπει να ενημερώνουν τους καταναλωτές για τη χημική και μικροβιολογική ποιότητα του νερού.
- Σε περιπτώσεις απόκλισης από τα πρότυπα, οι καταναλωτές πρέπει να ενημερώνονται άμεσα για την ασφάλεια του νερού και τα μέτρα που πρέπει να λάβουν.
- Ενθαρρύνονται πρόσθετες προφυλάξεις για την προστασία των ευπαθών ομάδων, όπως παιδιά, ηλικιωμένοι και ασθενείς.

Οι νομοθετικές ρυθμίσεις αποτρέπουν την κατανάλωση νερού με επικίνδυνες ουσίες ή παθογόνους μικροοργανισμούς και η εφαρμογή αυτών των νομοθετικών πράξεων διασφαλίζει ότι η Ελλάδα συμμορφώνεται με τα ευρωπαϊκά πρότυπα ποιότητας. (19)

Αντιμετώπιση Περιβαλλοντικών Προκλήσεων:

Η παρακολούθηση και οι εκτιμήσεις κινδύνου συμβάλλουν στη διατήρηση των υδάτινων πόρων, οι οποίοι απειλούνται από την κλιματική αλλαγή και τη ρύπανση. Αυτές οι ρυθμίσεις διασφαλίζουν την παροχή ασφαλούς και καθαρού πόσιμου νερού, αποτελώντας βασικό εργαλείο για την προστασία της δημόσιας υγείας και την περιβαλλοντική βιωσιμότητα. (19)

Βάσει των παραπάνω και κατανοώντας τη σημασία της προστασίας των πολιτών από μολύνσεις του νερού διεξήχθη η έρευνα για τη συγκεκριμένη διπλωματική, η οποία επικεντρώνεται στα παθογόνα βακτήρια που μεταδίδονται μέσω νερού και αναγνωρίζονται

ως απειλές για τη δημόσια υγεία, καθώς και την εξέλιξη των τεχνολογιών ανίχνευσης παθογόνων βακτηρίων που μεταδίδονται μέσω νερού, από τις παραδοσιακές τεχνικές, δηλαδή τις μεθόδους καλλιέργειας, έως τις σύγχρονες μεθόδους ανίχνευσης, όπως οι διάφορες μορφές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) [ποιοτική πραγματικού χρόνου PCR, ψηφιακή PCR, ELISA, ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP), αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)] και τις αναδυόμενες τεχνικές, όπως οι βιοαισθητήρες και η τεχνητή νοημοσύνη (AI).

2. Μικροοργανισμοί που μελετώνται συνήθως στο νερό

Η ανίχνευση και η μελέτη των μικροοργανισμών στο νερό είναι πολύ σημαντική για τη διασφάλιση της ποιότητας του νερού και της δημόσιας υγείας. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες μικροοργανισμών που μελετώνται, καθώς η παρουσία ορισμένων μπορεί να είναι ένδειξη μόλυνσης ή να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες.

Οι υδατογενείς ασθένειες είναι λοιμώξεις που μεταδίδονται μέσω μολυσμένου πόσιμου νερού. Αν και υπάρχουν πολλοί παθογόνοι οργανισμοί που μπορούν να μεταδοθούν μέσω του νερού, τα βακτήρια και τα πρωτόζωα είναι μερικοί από τους πιο συνηθισμένους οργανισμούς που προκαλούν ασθένειες. Η παρακολούθηση των υδατογενών ασθενειών μπορεί να είναι δύσκολη, διότι οι άνθρωποι συχνά αποβάλλουν πολύ μικρό αριθμό παθογόνων βακτηρίων όταν είναι μολυσμένοι. Για να ελεγχθεί εάν μπορεί να υπάρχουν βακτήρια που προκαλούν ασθένειες, οι ερευνητές μετρούν την παρουσία δεικτών ειδών, όπως τα κολοβακτηρίδια (στα οποία ανήκει το παθογόνο *E. coli*) ή το *Pseudomonas aeruginosa*. Αν και τα περισσότερα κολοβακτηρίδια δεν προκαλούν ασθένειες, βρίσκονται συχνά στο ανθρώπινο έντερο και στα λύματα, και η παρουσία τους υποδηλώνει ότι τα ανθρώπινα απόβλητα έχουν φτάσει στο υδάτινο σύστημα. (20)

Οι ερευνητές συνήθως ελέγχουν την ποιότητα του νερού λαμβάνοντας δείγματα και μετρώντας τη συγκέντρωση όλων των βακτηρίων σε ένα δείγμα. Εάν ο αριθμός των βακτηρίων υπερβαίνει τα όρια που έχουν τεθεί από τα πρότυπα ποιότητας νερού, το επόμενο βήμα είναι να ελεγχθεί η παρουσία συγκεκριμένων παθογόνων. Οι επιστήμονες μπορούν να χρησιμοποιήσουν γενετικούς ανιχνευτές ή ειδικές τεχνικές καλλιέργειας για να διαπιστώσουν εάν υπάρχουν επιβλαβή παθογόνα. Τα πρότυπα δοκιμών ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με την πηγή του νερού: το πόσιμο νερό υπόκειται σε πολύ αυστηρά πρότυπα, ενώ η ποιότητα του νερού σε λίμνες και ποτάμια μπορεί να υπόκειται σε πιο χαλαρά πρότυπα, καθώς οι κολυμβητές αναψυχής συνήθως καταπίνουν πολύ λίγο νερό. (20)

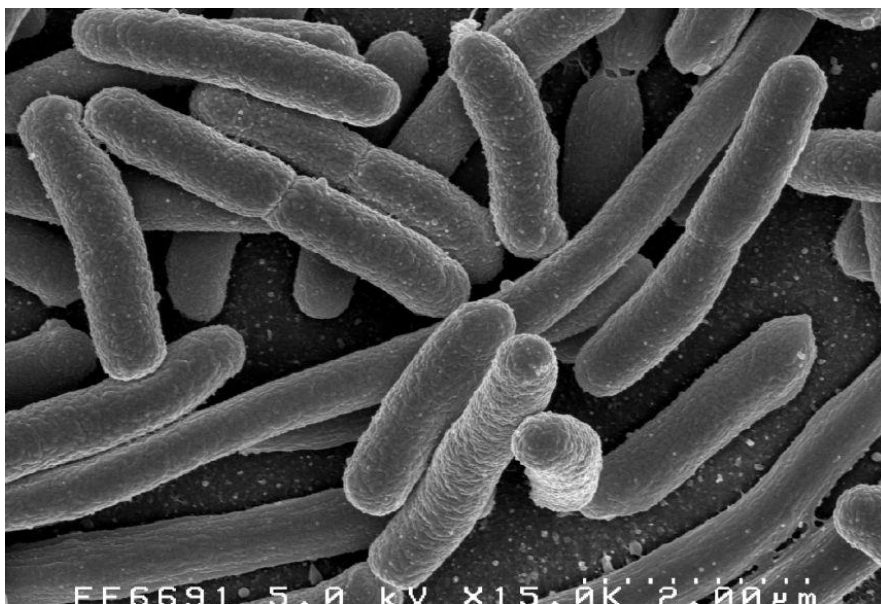
Οι μικροοργανισμοί που μελετώνται συνήθως στο νερό είναι:

2.1. Βακτήρια (Bacteria)

Τα βακτήρια είναι η πιο κοινή κατηγορία μικροοργανισμών που ανιχνεύονται στο νερό, τόσο για την εκτίμηση της ποιότητας του νερού όσο και για την ανίχνευση παθογόνων.

2.1.1. Κολοβακτηρίδια (*Coliform Bacteria*)

Escherichia coli (*E. coli*): Η εξασφάλιση της ασφάλειας του νερού αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τους φορείς δημόσιας υγείας. Η αξιολόγηση της παρουσίας δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης στο νερό είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία της δημόσιας υγείας από ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνα μεταδιδόμενα μέσω του νερού. (21)



Εικόνα 2.2. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου *Escherichia coli* (*E. coli*). National Geographic

Δεν είναι εφικτό να εντοπιστούν όλοι οι παθογόνοι οργανισμοί που μπορεί να υπάρχουν στο νερό λόγω του υψηλού κόστους και της απαραίτητης εργασίας. Αντίθετα, επιλέγονται ένας ή περισσότεροι μικροοργανισμοί ως δείκτες της πιθανής παρουσίας παθογόνων στο νερό. Ιστορικά, πολλές χώρες χρησιμοποιούν βακτήρια δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης, όπως τα συνολικά κολοβακτηρίδια, τα κοπρανώδη κολοβακτηρίδια, το *Escherichia coli* (Εικόνα 2.2.) και τα εντερόκοκκα, ως εργαλεία παρακολούθησης για να προβλέψουν την παρουσία βακτηριακών, ιικών και πρωτοζωικών παθογόνων που προέρχονται από κοπρανώδη μόλυνση. (22)

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (EC), η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (USEPA) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συνιστούν τη χρήση του *E. coli* ως το πιο αποτελεσματικό βακτήριο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης για την πρόβλεψη της παρουσίας παθογόνων στο νερό που προορίζεται για κατανάλωση και για κολύμβηση, και το *Enterococcus* sp. ως τον πιο κατάλληλο δείκτη για θαλάσσια νερά. (23)

Το *E. coli* είναι ευρέως αποδεκτό ως βακτήριο δείκτης επειδή:

- Είναι συγκεκριμένο για τα έντερα ανθρώπων και άλλων θερμόαιμων ζώων.
- Είναι εύκολο να ανιχνευθεί και να καλλιεργηθεί.
- Βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από άλλα παθογόνα στο νερό. (24)

Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το *E. coli* δεν είναι αξιόπιστος δείκτης για ορισμένα παθογόνα, καθώς έχουν παρατηρηθεί ασθένειες χωρίς την παρουσία του. Ορισμένα παθογόνα είναι πιο ανθεκτικά στις διαδικασίες επεξεργασίας νερού από το *E. coli*, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα και πιθανή έκθεση του ανθρώπου μέσω του πόσιμου και του αναψυκτικού νερού. (24).

Salmonella: Η *Salmonella* είναι ένα γένος Gram-αρνητικών, κινητικών βακτηρίων με σχήμα ράβδου, που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Είναι προαιρετικά αναερόβια, δηλαδή μπορούν να επιβιώσουν τόσο παρουσία όσο και απουσία οξυγόνου. (25)

Φυσικό Περιβάλλον: Η *Salmonella* απαντάται κυρίως στο γαστρεντερικό σύστημα ανθρώπων και ζώων, ιδιαίτερα πτηνών και ερπετών. Μπορεί επίσης να επιβιώσει σε περιβαλλοντικά δείγματα όπως νερό, έδαφος και τρόφιμα, ειδικά όταν αυτά έχουν επιμολυνθεί με κόπρανα μολυσμένων οργανισμών. (25)

Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει δύο κύρια είδη:

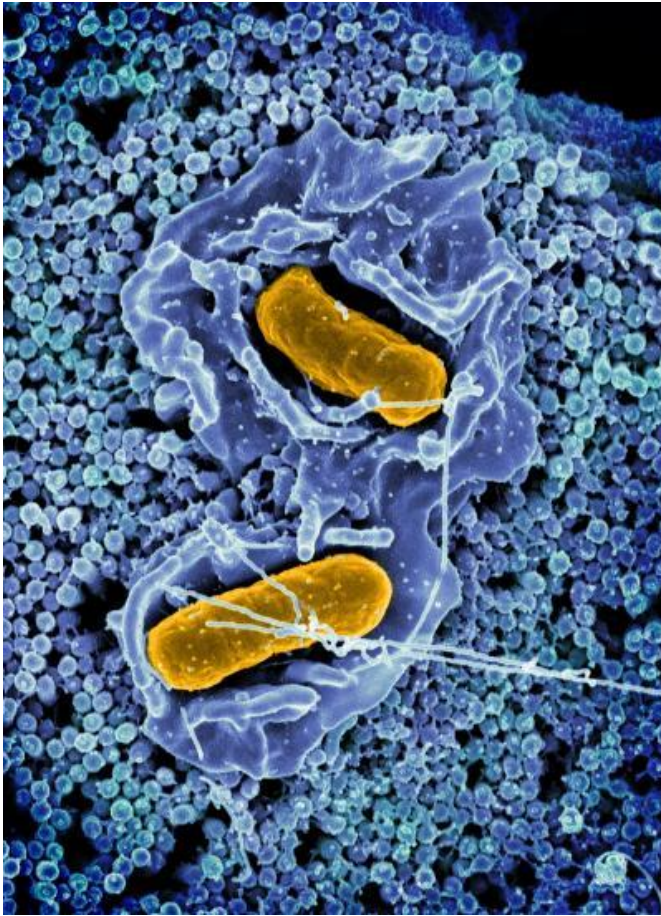
- *Salmonella enterica*: Περιλαμβάνει τα περισσότερα παθογόνα στελέχη για τον άνθρωπο.
- *Salmonella bongori*: Σπάνια προκαλεί νόσο στον άνθρωπο.

Η *Salmonella enterica* υποδιαιρείται σε διάφορα οροτυπικά, με τα πιο επικίνδυνα να είναι:

1. *Salmonella Typhi*: Προκαλεί τον τυφοειδή πυρετό.
2. *Salmonella Paratyphi*: Προκαλεί τον παρατυφοειδή πυρετό.
3. *Salmonella Typhimurium* (Εικόνα 2.3.) και *Salmonella Enteritidis*: Συχνά υπεύθυνα για τροφιμογενείς λοιμώξεις. (25)

Η παρουσία της *Salmonella* στο πόσιμο νερό αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού μπορεί να οδηγήσει σε:

- Γαστρεντερίτιδα: Συμπτώματα όπως διάρροια, πυρετός και κοιλιακός πόνος.
- Τυφοειδή και Παρατυφοειδή Πυρετό: Σοβαρές συστηματικές λοιμώξεις με υψηλό πυρετό, εξάντληση και, σε ορισμένες περιπτώσεις, θάνατο.



Εικόνα 2.3. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από *Salmonella Typhimurium*, η οποία εισβάλλει σε επιθηλιακό κύτταρο ανθρώπου. NIH

Η ανίχνευση της *Salmonella* στο πόσιμο νερό είναι κρίσιμη για την προστασία της δημόσιας υγείας. Τα πρωτόκολλα μελέτης περιλαμβάνουν:

- Δειγματοληψία: Συλλογή δειγμάτων νερού από διάφορα σημεία του δικτύου ύδρευσης.
- Εμπλουτισμός: Επώαση των δειγμάτων σε ειδικά θρεπτικά υλικά που προάγουν την ανάπτυξη της *Salmonella*.
- Απομόνωση: Καλλιέργεια σε εκλεκτικά μέσα για την απομόνωση των βακτηρίων.
- Επιβεβαίωση: Χρήση βιοχημικών και μοριακών μεθόδων, όπως PCR, για την επιβεβαίωση της παρουσίας της *Salmonella*.

Η συνεχής παρακολούθηση και η εφαρμογή αυστηρών πρωτοκόλλων ανίχνευσης είναι απαραίτητες για την πρόληψη επιδημιών που σχετίζονται με τη *Salmonella* στο πόσιμο νερό. (26)

Shigella: Η *Shigella* είναι ένα γένος Gram-αρνητικών βακτηρίων, μη κινητικών, που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και

αποτελούν κύριο αιτιολογικό παράγοντα της βακτηριακής δυσεντερίας, γνωστής και ως σιγγέλωση. Η *Shigella* εντοπίζεται κυρίως στο ανθρώπινο έντερο και σε μολυσμένα νερά ή τρόφιμα. Η μετάδοση γίνεται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού, συνήθως λόγω κακής υγιεινής ή κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων και νερού. (27)



Εικόνα 2.4. *Shigella dysenteriae*. Χρωματισμένη εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βακτηρίων *Shigella dysenteriae* που προκαλούν δυσεντερία στον άνθρωπο. Science photo library

Το γένος *Shigella* περιλαμβάνει τέσσερα κύρια είδη:

- *Shigella dysenteriae*: Προκαλεί σοβαρές μορφές δυσεντερίας και παράγει την τοξίνη Shiga, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. (Εικόνα 2.4.)
- *Shigella flexneri*: Συχνή σε αναπτυσσόμενες χώρες, προκαλεί ενδημικές λοιμώξεις.
- *Shigella boydii*: Λιγότερο κοινή, αλλά παθογόνος.
- *Shigella sonnei*: Κυριαρχεί σε ανεπτυγμένες χώρες και προκαλεί ηπιότερες λοιμώξεις.

Η παρουσία της *Shigella* στο πόσιμο νερό αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού μπορεί να οδηγήσει σε σιγγέλωση, με συμπτώματα όπως διάρροια, κοιλιακό άλγος, πυρετό και, σε σοβαρές περιπτώσεις, αφυδάτωση και επιπλοκές όπως το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. (27)

Η ανίχνευση της *Shigella* στο νερό περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, όπου γίνεται συλλογή δειγμάτων νερού από ύποπτες πηγές και την καλλιέργεια των δειγμάτων μετά από εμβολιασμό σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, όπως το Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) άγαρ, για την απομόνωση του βακτηρίου. Για να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα των μικροοργανισμών πραγματοποιούνται δοκιμές, όπως η δοκιμή οξειδάσης και η ζύμωση σακχάρων ή η χρήση PCR για την ανίχνευση γονιδίων ειδικών για τη *Shigella*, όπως το *ipaH* γονίδιο. (27)

Η έγκαιρη ανίχνευση και η εφαρμογή κατάλληλων μέτρων επεξεργασίας του νερού είναι κρίσιμες για την πρόληψη επιδημιών σιγγέλωσης. Η τήρηση των πρωτοκόλλων υγιεινής και η συνεχής παρακολούθηση της ποιότητας του πόσιμου νερού συμβάλλουν σημαντικά στην προστασία της δημόσιας υγείας. (27)

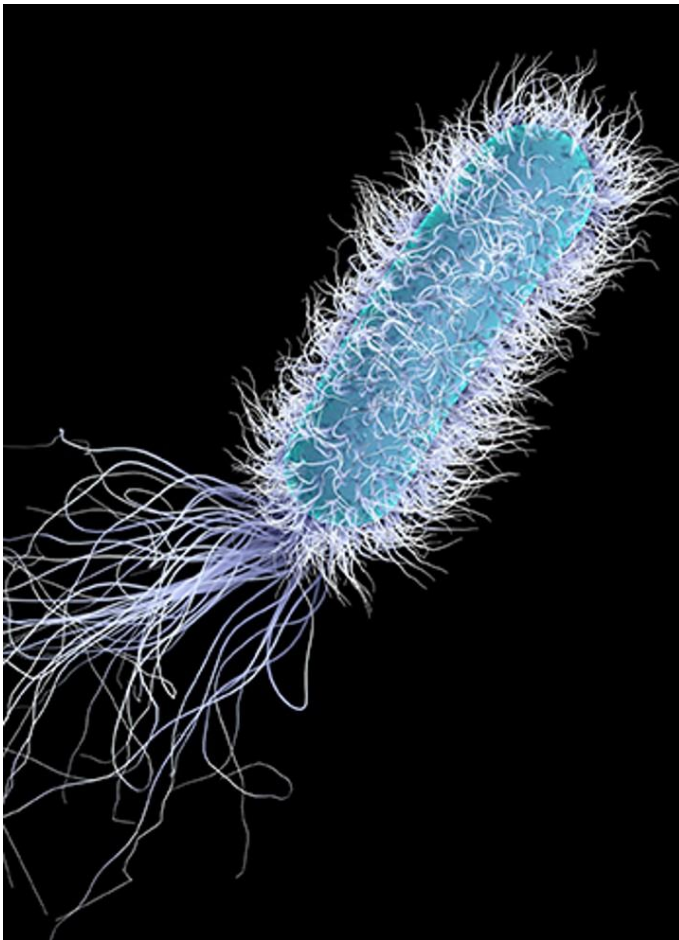
2.1.2. *Legionella spp.*

Legionella pneumophila: Το *Legionella pneumophila* είναι ένα Gram-αρνητικό, αερόβιο βακτήριο, που ανήκει στην οικογένεια *Legionellaceae*. Είναι κινητικό λόγω παρουσίας μαστιγίων και αναπαράγεται σε θερμοκρασίες 20°C–45°C, με βέλτιστη ανάπτυξη μεταξύ 25°C και 42°C. Το βακτήριο είναι υπεύθυνο για τη λεγεωνέλλωση (*Legionellosis*), μια σοβαρή αναπνευστική λοίμωξη που περιλαμβάνει δύο μορφές, τη νόσο των Λεγεωνάριων, η οποία είναι σοβαρή πνευμονία με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και ο πυρετός Pontiac, ο οποίος είναι ηπιότερος χωρίς πνευμονία. (28) (Εικόνα 2.5.)

Το *L. pneumophila* βρίσκεται φυσικά σε υδάτινα περιβάλλοντα, όπως:

- Λίμνες και ποτάμια.
- Θερμές πηγές.
- Τεχνητά συστήματα νερού: πύργοι ψύξης, θερμοσίφωνες, υδραυλικά συστήματα.

Το βακτήριο αναπτύσσεται συχνά εντός αμοιβάδων ή άλλων πρωτοζώων, τα οποία λειτουργούν ως ξενιστές, προστατεύοντάς το από περιβαλλοντικές συνθήκες και απολυμαντικά. Σχηματίζει βιομεμβράνες που του επιτρέπουν να προσκολλάται στις σωληνώσεις, δυσκολεύοντας την εξάλειψή του. (29)



Εικόνα 2.5. Legionella. geberit.co.uk

Υπάρχουν περισσότερα από 50 είδη Legionella και 70 ορότυποι. Το *L. pneumophila* είναι το κύριο παθογόνο και περιλαμβάνει διάφορους ορότυπους, όπως τον ορότυπο 1 που είναι υπεύθυνος για το 80-90% των περιπτώσεων λεγεωνέλλωσης. Άλλοι ορότυποι έχουν μικρότερη κλινική σημασία αλλά παραμένουν παθογόνοι. (30)

Μόλυνση από *L. pneumophila* συμβαίνει κυρίως μέσω εισπνοής μολυσμένων αερολυμάτων, όπως από ντους, κλιματιστικά ή πύργους ψύξης. Η παρουσία του βακτηρίου μπορεί να οδηγήσει σε επιδημίες, ειδικά σε συστήματα νερού που δεν παρακολουθούνται σωστά ή δεν απολυμαίνονται επαρκώς. (31)

Η ανίχνευση του *L. pneumophila* περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

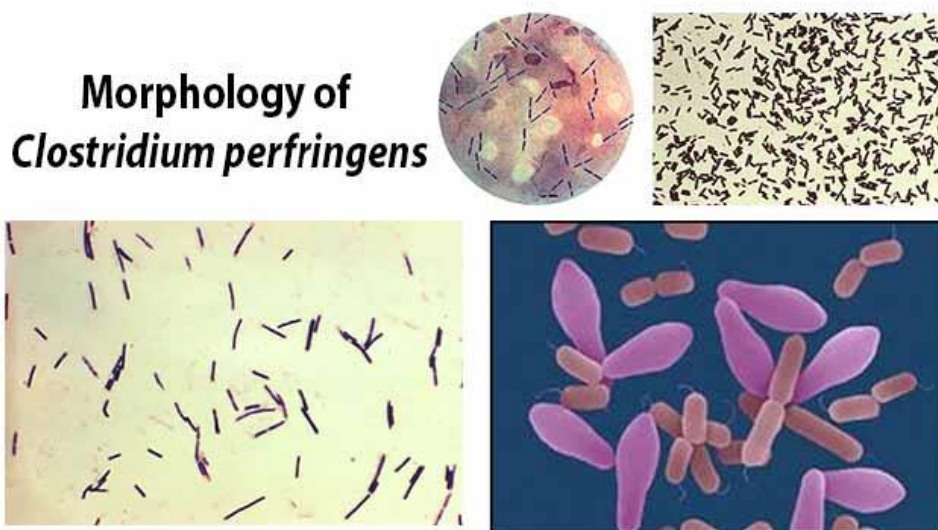
- Συλλογή δειγμάτων νερού από συστήματα ύδρευσης ή ύποπτες πηγές μόλυνσης ή δειγματοληψία βιομεμβρανών από σωληνώσεις ή δεξαμενές.
- Εμβολιασμός σε εκλεκτικά μέσα όπως BCYE-Άγαρ (Buffered Charcoal Yeast Extract), με προσθήκη αντιβιοτικών για αποτροπή ανάπτυξης άλλων βακτηρίων, όπου απαιτούνται 3-10 ημέρες επώασης.

- PCR (Polymerase Chain Reaction): Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση DNA του *L. pneumophila* σε σύντομα χρονικά διαστήματα.
- qPCR (ποσοτική PCR): Παρέχει ευαισθησία και ποσοτικοποίηση.
- Άμεσος Αντικειμενοφόρος Μικροσκοπικός Έλεγχος:
- Χρήση ανοσοφθορισμού με μονοκλωνικά αντισώματα. (32)

Η πρόληψη μόλυνσης από *Legionella* περιλαμβάνει τακτικό καθαρισμό και απολύμανση συστημάτων ύδρευσης, διατήρηση θερμοκρασίας νερού κάτω από 20°C ή πάνω από 60°C για αναστολή της ανάπτυξης και χρήση φίλτρων και χημικών απολυμαντικών όπως χλωρίωση ή διοξείδιο του χλωρίου. (31)

2.1.3. *Clostridium perfringens*

Το *Clostridium perfringens* είναι ένα Gram-θετικό, αναερόβιο, σπορογόνο βακτήριο που απαντάται ευρέως στο περιβάλλον και στο έντερο ανθρώπων και ζώων. Είναι γνωστό για την παραγωγή τοξινών που προκαλούν διάφορες ασθένειες, όπως τροφική δηλητηρίαση και αερογόνο γάγγραινα. Το *C. perfringens* βρίσκεται συνήθως στο έδαφος, στα ιζήματα, στη σκόνη, καθώς και στο έντερο ανθρώπων και ζώων. Η παρουσία του σε επιφανειακά νερά ποταμών έχει επίσης καταγραφεί. (33) (Εικόνα 2.6.)



Εικόνα 2.6. Μορφολογία του βακτηρίου *Clostridium perfringens*. Microbe Notes

Επικίνδυνα Υποείδη: Το *C. perfringens* ταξινομείται σε πέντε τύπους (A, B, C, D, E) με βάση τις τοξίνες που παράγει. Ο τύπος A είναι ο πιο κοινός και συνδέεται με τροφικές δηλητηριάσεις, ενώ οι άλλοι τύποι σχετίζονται με σοβαρότερες ασθένειες, όπως νεκρωτική εντερίτιδα. (33)

Η παρουσία του *C. perfringens* στο πόσιμο νερό υποδηλώνει πιθανή μόλυνση από κόπρανα και μπορεί να αποτελεί ένδειξη παρουσίας άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Αν και το ίδιο το βακτήριο δεν προκαλεί άμεσα ασθένειες μέσω του νερού, η παρουσία του μπορεί να υποδηλώνει ανεπαρκή επεξεργασία ή μόλυνση του υδροδοτικού συστήματος. (33)

Η ανίχνευση του *C. perfringens* σε τρόφιμα πραγματοποιείται σύμφωνα με το κεφάλαιο 16 του Bacteriological Analytical Manual (BAM) του FDA, το οποίο περιγράφει τις μεθόδους ανίχνευσης και απαρίθμησης του *Clostridium perfringens* σε τρόφιμα. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι: (34)

Το *C. perfringens* είναι βακτήριο που μπορεί να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση όταν τρόφιμα, όπως κρέας ή πουλερικά, μαγειρεύονται και διατηρούνται χωρίς επαρκή θέρμανση ή ψύξη πριν την κατανάλωση. Η παρουσία μικρών ποσοτήτων του βακτηρίου σε ωμά κρέατα, λαχανικά και μπαχαρικά δεν είναι ασυνήθιστη. Ωστόσο, η ανεπαρκής ψύξη μετά το μαγείρεμα μπορεί να επιτρέψει την ταχεία ανάπτυξή του, οδηγώντας σε τροφική δηλητηρίαση. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν έντονους κοιλιακούς πόνους, αέρια και διάρροια, που εμφανίζονται 8-15 ώρες μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου. (34)

Δειγματοληψία και Μεταφορά:

Συνιστάται η συλλογή ολόκληρου του δείγματος τροφίμου ή αντιπροσωπευτικών δειγμάτων 25 γραμμαρίων από διαφορετικά μέρη του ύποπτου τροφίμου, καθώς η μόλυνση μπορεί να είναι ανομοιόμορφα κατανομημένη. Τα δείγματα πρέπει να μεταφέρονται και να εξετάζονται άμεσα χωρίς κατάψυξη, εάν είναι δυνατόν, και να αποθηκεύονται σε περίπου 10°C μέχρι την ανάλυση. Εάν η ανάλυση δεν μπορεί να ξεκινήσει εντός 8 ωρών ή εάν το δείγμα πρέπει να αποσταλεί σε εργαστήριο, συνιστάται η επεξεργασία με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης-αλατιού και η άμεση αποθήκευση σε -70 έως -90°F (-56 έως -68°C). (34)

Για τη διαδικασία της ταυτοποίησης του μικροοργανισμού απαιτείται άγαρ θειώδους κυκλοσερίνης (TSC), γαλακτωματοποιημένο κρόκο αυγού, ζωμό ψιλοκομμένου ήπατος ή τροποποιημένο μέσο μαγειρεμένου κρέατος, υγρό μέσο θειογλυκολικού, τροποποιημένο μέσο σιδηρούχου γάλακτος, μέσο λακτόζης-ζελατίνης για *C. perfringens*, ζωμό σπορίωσης για *C. perfringens*, τροποποιημένο μέσο κινητικότητας-νιτρικών, μέσο ζύμωσης Spray's για *C. perfringens*, τροποποιημένο μέσο σπορίωσης AE, τροποποιημένο μέσο σπορίωσης

Duncan-Strong, αραιωτικό πεπτόνης, αντιδραστήρια ανίχνευσης νιτρωδών, ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης-αλατιού και αντιδραστήρια χρώσης κατά Gram, ενώ για τις διαδικασίες Καλλιέργειας και Απομόνωσης, περιλαμβάνεται η ομογενοποίηση του δείγματος, η καλλιέργεια σε εκλεκτικά μέσα, η επώαση σε αναερόβιες συνθήκες και η απαρίθμηση των χαρακτηριστικών αποικιών. (34)

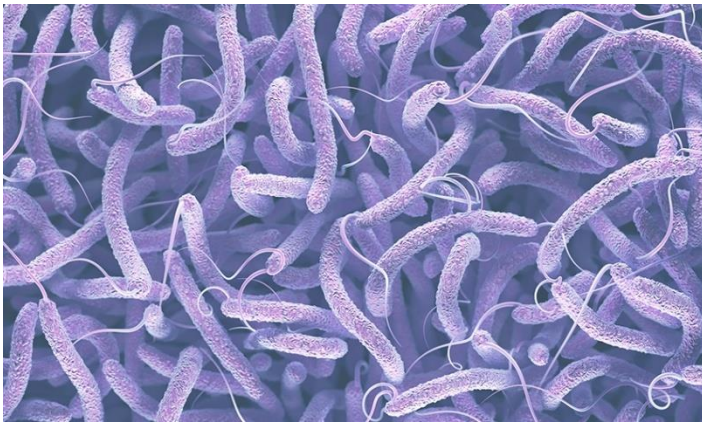
Στις Δοκιμές Επιβεβαίωσης περιλαμβάνονται βιοχημικές δοκιμές, όπως η δοκιμή παραγωγής αερίου, η δοκιμή ζύμωσης σακχάρων, η δοκιμή κινητικότητας και η δοκιμή μείωσης νιτρικών, για την επιβεβαίωση της ταυτότητας του *C. Perfringens*, ενώ για τις διαδικασίες Καλλιέργειας για Σπορίωση και Παραγωγή Εντεροτοξίνης, περιλαμβάνονται μέθοδοι για την επαγωγή της σπορίωσης και την ανίχνευση της εντεροτοξίνης σε καλλιέργειες, δεδομένου ότι η παραγωγή εντεροτοξίνης συνδέεται στενά με την ικανότητα του βακτηρίου να προκαλεί τροφική δηλητηρίαση. (34)

Σημείωση: Η παρουσία του *C. perfringens* στο πόσιμο νερό αποτελεί δείκτη υγειονομικής ποιότητας και απαιτείται τακτική παρακολούθηση για την εξασφάλιση της δημόσιας υγείας.

2.1.4. *Vibrio cholerae*

Το *Vibrio cholerae* είναι ένα Gram-αρνητικό, κινητό βακτήριο με σχήμα καμπύλου ραβδίου, υπεύθυνο για την πρόκληση της χολέρας, μιας οξείας διαρροϊκής νόσου που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή αφυδάτωση και θάνατο εάν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα. (35) (Εικόνα 2.7.)

Το *V. cholerae* απαντάται φυσιολογικά σε υδάτινα περιβάλλοντα, ιδιαίτερα σε παράκτιες και εκβολικές περιοχές. Μπορεί να επιβιώνει σε ποτάμια, λίμνες και θαλάσσια ύδατα, συχνά συνδεδεμένο με πλαγκτονικούς οργανισμούς, όπως τα καρκινοειδή. Η παρουσία του σε επιφανειακά νερά ποταμών έχει επίσης καταγραφεί. (36)



Εικόνα 2.7. *Vibrio cholerae*. Harvard Medical School

Επικίνδυνα Υποείδη: Το *V. cholerae* διακρίνεται σε διάφορα οροτύπους, με τους O1 και O139 να είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για επιδημίες χολέρας. Ο ορότυπος O1 υποδιαιρείται σε δύο βιοτύπους: τον κλασικό και τον El Tor, με τον τελευταίο να είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες σύγχρονες επιδημίες. (37)

Η παρουσία του *V. cholerae* στο πόσιμο νερό αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, καθώς η κατανάλωση μολυσμένου νερού μπορεί να οδηγήσει σε επιδημίες χολέρας. Η χολέρα χαρακτηρίζεται από αιφνίδια έναρξη υδαρούς διάρροιας, που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή αφυδάτωση και θάνατο εάν δεν αντιμετωπιστεί άμεσα. (38)

Η ανίχνευση του *V. cholerae* σε δείγματα νερού περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Συλλογή Δειγμάτων: Λήψη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων νερού από ύποπτες πηγές.
- Εμπλουτισμός: Επώαση των δειγμάτων σε εκλεκτικά υγρά θρεπτικά υλικά για την προώθηση της ανάπτυξης του *V. cholerae*.
- Καλλιέργεια: Εμβολιασμός σε στερεά εκλεκτικά μέσα, όπως το θειοθειικό-κιτρικό-άλατα χολής-σακχαρόζη (TCBS) άγαρ, όπου το *V. cholerae* σχηματίζει χαρακτηριστικές κίτρινες αποικίες.
- Βιοχημική Ταυτοποίηση: Διενέργεια δοκιμών, όπως η οξειδάση και η κατάλυση, για την επιβεβαίωση του βακτηρίου.
- Σεροτυπία: Χρήση ειδικών αντισωμάτων για τον προσδιορισμό του οροτύπου (O1, O139 κ.λπ.).
- Μοριακές Μέθοδοι: Εφαρμογή PCR για την ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν την τοξίνη της χολέρας (ctxA, ctxB) και άλλων παραγόντων λοιμογόνου δράσης.

Η έγκαιρη ανίχνευση και παρακολούθηση του *V. cholerae* σε υδάτινα περιβάλλοντα είναι κρίσιμη για την πρόληψη επιδημιών χολέρας, ιδιαίτερα σε περιοχές με ανεπαρκή

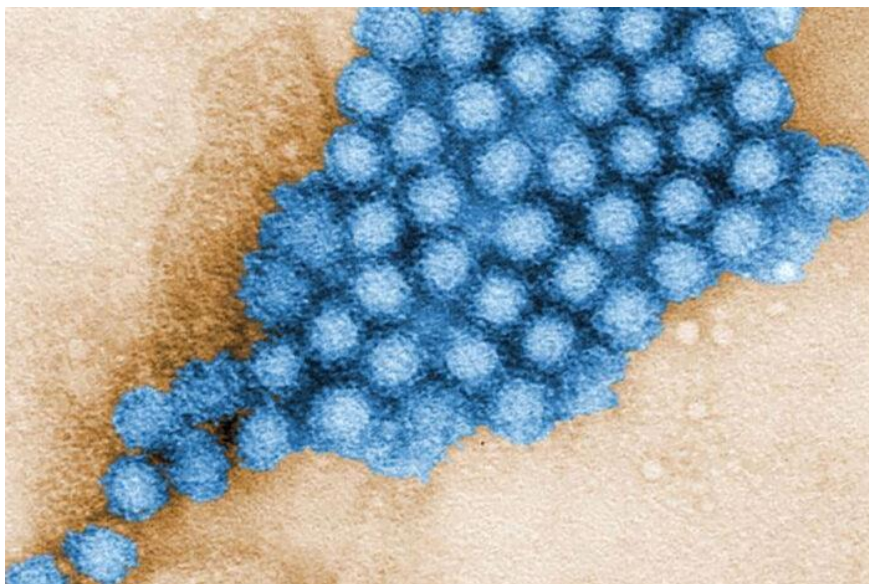
υγειονομική υποδομή. Η εφαρμογή πρωτοκόλλων, όπως τα Σχέδια Ασφάλειας Νερού (Water Safety Plans), συμβάλλει στην ελαχιστοποίηση της παρουσίας ρυπαντών στο πόσιμο νερό και ειδικά στην πηγή του. (39)

2.2. Ιοί (Viruses)

Οι ιοί αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και ανιχνεύονται συχνά σε μολυσμένο νερό, ειδικά σε περιοχές με ανεπαρκή συστήματα αποχέτευσης.

2.2.1. *Norovirus*

Ο νοροϊός (*Norovirus*) είναι ένας RNA ιός που ανήκει στην οικογένεια *Caliciviridae* και αποτελεί κύρια αιτία ιογενούς γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως. (Εικόνα 2.8.) Είναι εξαιρετικά μεταδοτικός και μπορεί να προκαλέσει επιδημίες σε κοινότητες, νοσοκομεία, σχολεία και κρουαζιερόπλοια. Ο νοροϊός εντοπίζεται κυρίως σε ανθρώπους, αλλά μπορεί να επιβιώσει σε μολυσμένες επιφάνειες, τρόφιμα και νερό. Η μετάδοση γίνεται κυρίως μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, δηλαδή μέσω κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων ή νερού, καθώς και μέσω επαφής με μολυσμένες επιφάνειες ή άτομα. Ο ιός είναι ανθεκτικός σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες και μπορεί να επιβιώσει σε θερμοκρασίες από -20°C έως 60°C , καθώς και σε ευρύ φάσμα pH. Επιπλέον, μπορεί να παραμείνει μολυσματικός σε επιφάνειες για αρκετές ημέρες, γεγονός που διευκολύνει τη μετάδοσή του. (40)



Εικόνα 2.8. Χρωματισμένη εικόνα νοροϊού από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. medicine.washu.edu

Το γένος *Norovirus* περιλαμβάνει πέντε γενοομάδες (genogroups ή phylogenetic clusters): GI, GII, GIII, GIV και GV. Ο όρος «γενοομάδα» αντιπροσωπεύει τη μονάδα ταξινόμησης, η οποία αποτελείται από γονοτύπους (genotypes ή genetic clusters). Παρουσιάζει

σημαντική γενετική ποικιλότητα, με διάφορα γονιδιακά συμπλέγματα (genogroups) και γονότυπους. Τα γονιδιακά συμπλέγματα I και II (GI και GII) είναι τα πιο κοινά στους ανθρώπους, με τον γονότυπο GII.4 να ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό των επιδημιών παγκοσμίως. Η συνεχής εξέλιξη και εμφάνιση νέων γονότυπων συμβάλλει στην ικανότητα του ιού να διαφεύγει της ανοσολογικής απόκρισης και να προκαλεί επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις. (41)

Η παρουσία του νοροϊού στο πόσιμο νερό μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένες επιδημίες γαστρεντερίτιδας, δεδομένης της υψηλής μεταδοτικότητάς του. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα σε περιοχές με ανεπαρκή υποδομή ύδρευσης και αποχέτευσης. Επιπλέον, ο ιός μπορεί να μολύνει επιφανειακά ύδατα και να εισχωρήσει στην τροφική αλυσίδα μέσω της άρδευσης, μολύνοντας φρούτα, λαχανικά ή οστρακοειδή. (42)

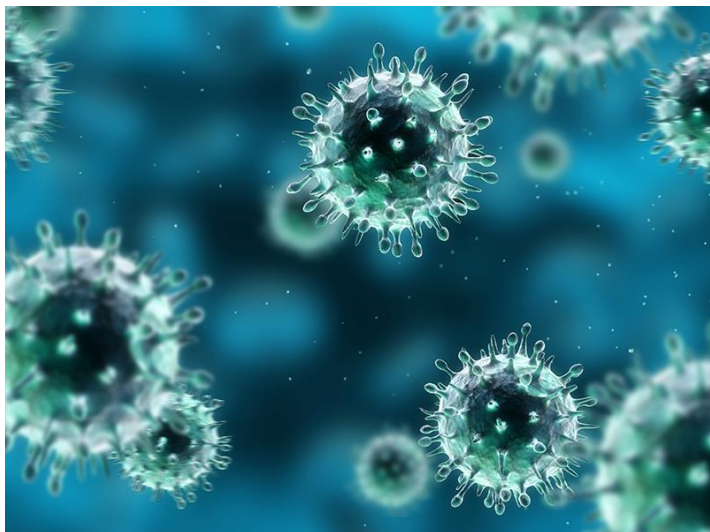
Πρωτόκολλο Μελέτης και Ανίχνευση: Η ανίχνευση του νοροϊού σε δείγματα νερού και τροφίμων πραγματοποιείται μέσω μοριακών μεθόδων, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR), η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του ιικού RNA. Επιπλέον, η εφαρμογή πρωτοκόλλων υγιεινής και η επεξεργασία του νερού με κατάλληλες μεθόδους απολύμανσης είναι κρίσιμη για την πρόληψη της μετάδοσης του νοροϊού. Η έγκαιρη ανίχνευση και παρακολούθηση του νοροϊού σε υδάτινα περιβάλλοντα και τρόφιμα είναι απαραίτητη για την πρόληψη επιδημιών και τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. (43)

Πρόληψη και Έλεγχος: Η πρόληψη της μετάδοσης του νοροϊού περιλαμβάνει την τήρηση αυστηρών κανόνων υγιεινής, όπως το συχνό και σωστό πλύσιμο των χεριών με σαπούνι και νερό, ιδιαίτερα μετά τη χρήση της τουαλέτας και πριν την προετοιμασία τροφίμων. Επιπλέον, η απολύμανση επιφανειών με κατάλληλα απολυμαντικά, η σωστή προετοιμασία και μαγείρεμα των τροφίμων, καθώς και η αποφυγή κατανάλωσης μολυσμένου νερού, είναι κρίσιμα μέτρα για τον έλεγχο της εξάπλωσης του ιού. Σε περιπτώσεις επιδημιών, η απομόνωση των ασθενών και η εφαρμογή μέτρων ελέγχου σε νοσοκομειακά και άλλα ιδρύματα είναι απαραίτητα για την αποτροπή περαιτέρω μετάδοσης. (44)

2.2.2. Adenovirus

Οι αδενοϊοί (*Adenoviridae*) είναι μια οικογένεια ιών με διπλή έλικα DNA χωρίς έλυτρο, που προκαλούν ποικιλία λοιμώξεων στον άνθρωπο, επηρεάζοντας κυρίως το αναπνευστικό

σύστημα, αλλά και το γαστρεντερικό, τα μάτια και το ουροποιητικό σύστημα. (45) (Εικόνα 2.9)



Εικόνα 2.9. Adenovirus. vircell.com

Οι αδενοϊοί είναι ευρέως διαδεδομένοι και μπορούν να επιβιώσουν σε διάφορα περιβάλλοντα. Μεταδίδονται μέσω άμεσης επαφής, αναπνευστικών σταγονιδίων, μολυσμένων επιφανειών και, λιγότερο συχνά, μέσω μολυσμένου νερού, όπως σε πισίνες με ανεπαρκή χλωρίωση. (46)

Υπάρχουν πάνω από 50 ορότυποι αδενοϊών που μολύνουν τον άνθρωπο, ταξινομημένοι σε επτά είδη (A-G). Ορισμένοι ορότυποι συνδέονται με σοβαρότερες λοιμώξεις, όπως:

- Ορότυπος 14: Έχει συσχετιστεί με σοβαρές αναπνευστικές λοιμώξεις.
- Ορότυποι 40 και 41: Προκαλούν γαστρεντερίτιδα, ιδιαίτερα σε παιδιά.
- Ορότυπος 7: Μπορεί να προκαλέσει σοβαρή πνευμονία.

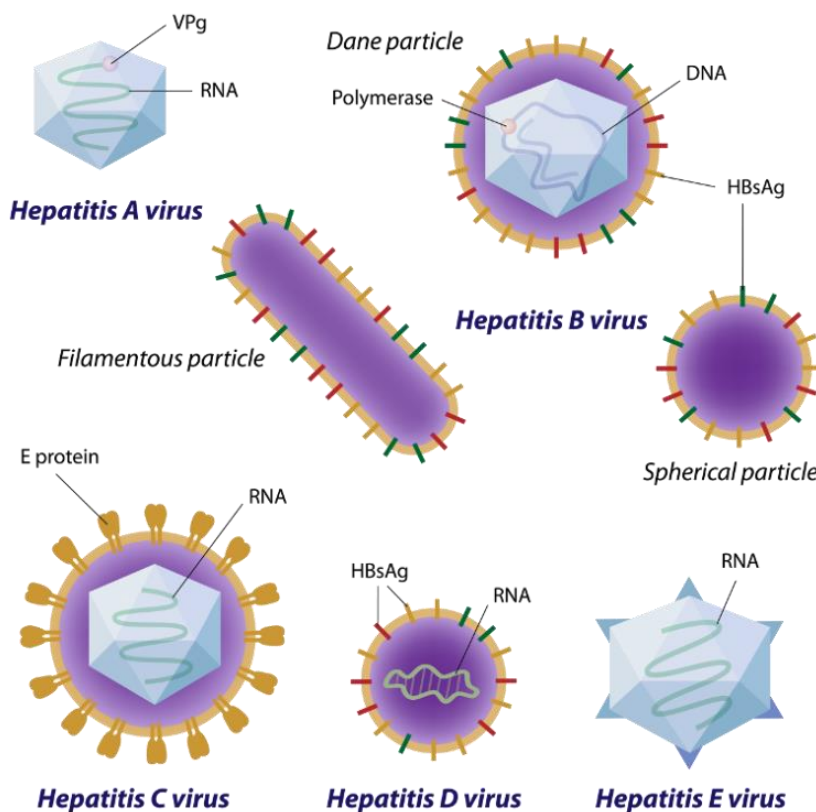
Η παρουσία αδενοϊών στο πόσιμο νερό αποτελεί κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, καθώς μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερικές λοιμώξεις. Η ανθεκτικότητά τους σε συμβατικές μεθόδους απολύμανσης, όπως η χλωρίωση, καθιστά την ανίχνευση και απομάκρυνσή τους από το νερό ιδιαίτερα σημαντική. (47)

Πρωτόκολλο Μελέτης και Ανίχνευση: Η ανίχνευση αδενοϊών σε δείγματα νερού πραγματοποιείται κυρίως μέσω μοριακών μεθόδων, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), που επιτρέπει την ανίχνευση του ιικού DNA. Επιπλέον, η καλλιέργεια σε κυτταρικές σειρές μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση και ταυτοποίηση του ιού. Η ανάπτυξη και εφαρμογή πρωτοκόλλων για την ανίχνευση αδενοϊών στο νερό είναι

κρίσιμη για την προστασία της δημόσιας υγείας. Η συνεχής επιτήρηση και η εφαρμογή κατάλληλων μεθόδων επεξεργασίας του νερού είναι απαραίτητες για την αποτροπή της μετάδοσης αδενοϊών μέσω του πόσιμου νερού. (46)

2.2.3. Hepatitis A και E

Ο ιός της ηπατίτιδας A (HAV) είναι ένας RNA ιός που ανήκει στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος Hepatovirus. Είναι σφαιρικός, μη περιβλημένος και έχει διάμετρο περίπου 27-32 nm. (48) (Εικόνα 2.10)



Εικόνα 2.10. Οι διάφοροι τύποι Hepatitis. Οι A και E δεν διαθέτουν έλυτρο.

Ο HAV είναι ανθεκτικός σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των υψηλών θερμοκρασιών, της ξήρανσης και των όξινων pH. Μπορεί να επιβιώσει για μήνες σε γλυκά και αλμυρά νερά, γεγονός που διευκολύνει τη μετάδοσή του μέσω μολυσμένων υδάτων. Δεν υπάρχουν γνωστοί ορότυποι του HAV που να διαφέρουν σημαντικά ως προς την παθογένεια. Ο ιός θεωρείται ότι έχει έναν μόνο ορότυπο, με μικρές γενετικές διαφορές μεταξύ των στελεχών. (48)

Η παρουσία του HAV στο πόσιμο νερό μπορεί να προκαλέσει επιδημίες ηπατίτιδας Α, ιδιαίτερα σε περιοχές με ανεπαρκή υγειονομική υποδομή. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού ή τροφίμων, όπως οστρακοειδή από μολυσμένα ύδατα, αποτελεί κύρια οδό μετάδοσης. (49)

Πρωτόκολλο Μελέτης και Ανίχνευση:

Η ανίχνευση του HAV σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως νερό, πραγματοποιείται κυρίως μέσω μοριακών μεθόδων, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), που επιτρέπει την ανίχνευση του ιικού RNA. Επιπλέον, η ανίχνευση αντισωμάτων IgM κατά του HAV στον ορό χρησιμοποιείται για τη διάγνωση πρόσφατης λοίμωξης. (50)

Η πρόληψη της μετάδοσης του HAV μέσω του πόσιμου νερού περιλαμβάνει την εξασφάλιση καθαρού νερού, την τήρηση κανόνων υγιεινής και τον εμβολιασμό σε περιοχές με υψηλή ενδημικότητα. (49)

Η ηπατίτιδα Ε (HEV) είναι μια λοιμώδης νόσος που προκαλείται από τον ιό της ηπατίτιδας Ε, με παγκόσμια κατανομή και ιδιαίτερη επίπτωση σε περιοχές με ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής. Ο ιός της ηπατίτιδας Ε (HEV) είναι ένας RNA ιός που ανήκει στην οικογένεια *Hepeviridae* και στο γένος *Orthohepevirus*. Είναι μη περιβλημένος, σφαιρικός και έχει διάμετρο περίπου 27-34 nm. (51)

Ο HEV εντοπίζεται κυρίως σε περιοχές με ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής, όπου η μόλυνση του πόσιμου νερού με ανθρώπινα ή ζωικά περιττώματα είναι συχνή. Η μετάδοση γίνεται κυρίως μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού, με την κατανάλωση μολυσμένου νερού ή τροφής. Επιπλέον, ο ιός έχει ανιχνευθεί σε ζώα, όπως χοίρους και ελάφια, υποδηλώνοντας ζωνοσογόνο δυναμικό. (51)

Ο HEV έχει τέσσερις κύριους γονότυπους που προσβάλλουν τον άνθρωπο:

- Γονότυποι 1 και 2: Ενδημικοί σε αναπτυσσόμενες χώρες, μεταδίδονται κυρίως μέσω μολυσμένου νερού και προκαλούν επιδημίες.
- Γονότυποι 3 και 4: Εντοπίζονται σε ανεπτυγμένες χώρες, μεταδίδονται κυρίως μέσω κατανάλωσης ανεπαρκώς μαγειρεμένου κρέατος από μολυσμένα ζώα και συνδέονται με σποραδικά κρούσματα.

Οι γονότυποι 1 και 2 θεωρούνται πιο επικίνδυνοι, καθώς σχετίζονται με σοβαρές επιδημίες και υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας, ιδιαίτερα σε εγκύους. (51)

Η παρουσία του HEV στο πόσιμο νερό μπορεί να οδηγήσει σε επιδημίες ηπατίτιδας E, ιδιαίτερα σε περιοχές με κακή υγιεινή και ανεπαρκή επεξεργασία νερού. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού αποτελεί την κύρια οδό μετάδοσης για τους γονότυπους 1 και 2. Η λοίμωξη μπορεί να είναι ιδιαίτερα σοβαρή σε εγκύους, με αυξημένο κίνδυνο ηπατικής ανεπάρκειας και θνησιμότητας. (51)

Η ανίχνευση του HEV πραγματοποιείται μέσω μοριακών μεθόδων, όπου γίνεται ανίχνευση του ιικού RNA σε δείγματα αίματος ή κοπράνων με τη μέθοδο RT-PCR και με ορολογικές δοκιμές, όπου γίνεται ανίχνευση αντισωμάτων IgM και IgG κατά του HEV στον ορό, που υποδηλώνουν οξεία ή προηγούμενη λοίμωξη αντίστοιχα. (51)

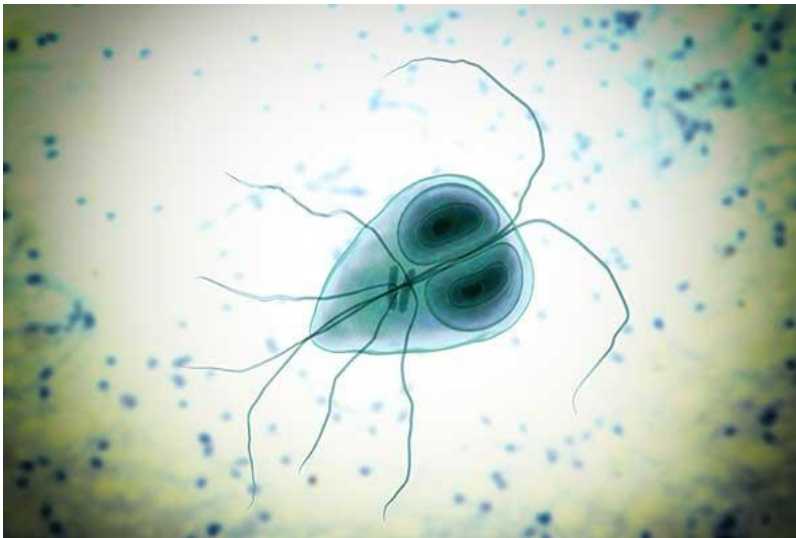
Η πρόληψη περιλαμβάνει τη διασφάλιση καθαρού πόσιμου νερού, την τήρηση κανόνων υγιεινής και την αποφυγή κατανάλωσης ανεπαρκώς μαγειρεμένου κρέατος. Επίσης, υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για τον HEV σε ορισμένες χώρες, το οποίο προσφέρει προστασία έναντι του ιού. (51)

2.3. Πρωτόζωα (Protozoa)

Τα πρωτόζωα είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες, ειδικά σε ανθρώπους με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα.

2.3.1. *Giardia lamblia*

Το *Giardia lamblia* (επίσης γνωστό ως *Giardia intestinalis* ή *Giardia duodenalis*) είναι ένα μονοκύτταρο, μαστιγοφόρο πρωτόζωο που παρασιτεί στο λεπτό έντερο ανθρώπων και άλλων θηλαστικών, προκαλώντας τη νόσο γνωστή ως γιγαρδίαση, μια γαστρεντερική νόσο με συμπτώματα όπως διάρροια, κοιλιακό άλγος, φούσκωμα και ναυτία. (Εικόνα 2.11.) Η μόλυνση συμβαίνει μέσω κατάποσης κύστεων του παρασίτου, οι οποίες είναι ανθεκτικές σε ορισμένες μεθόδους επεξεργασίας νερού.. Εντοπίζεται κυρίως στο λεπτό έντερο των ξενιστών του. Οι ανθεκτικές κύστεις του απεκκρίνονται με τα κόπρανα και μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε υγρό περιβάλλον, όπως σε ποτάμια, λίμνες και άλλες πηγές νερού. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού ή τροφής αποτελεί κύριο μέσο μετάδοσης. (52)



Εικόνα 2.11. *Giardia lamblia*. By Bradley A. Connor, M.D.

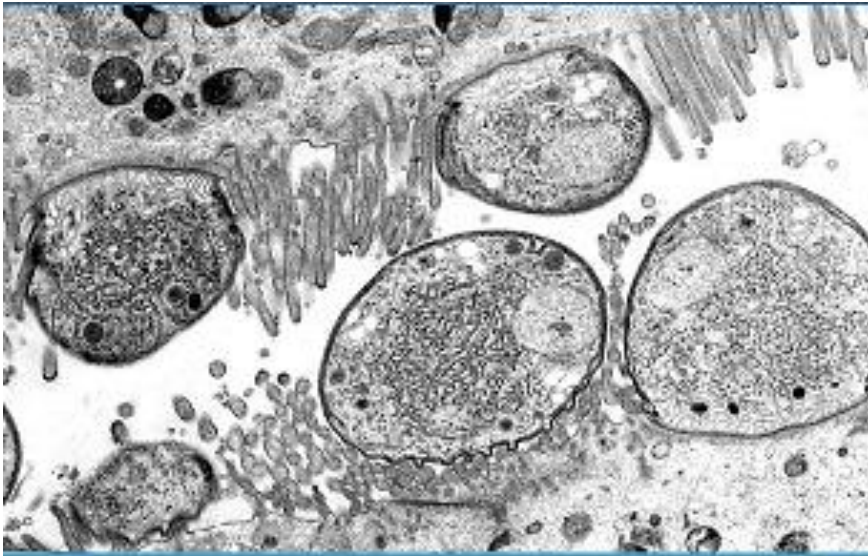
Το *Giardia lamblia* παρουσιάζει γενετική ποικιλομορφία, με διαφορετικούς γονοτύπους (assemblages) που προσβάλλουν συγκεκριμένους ξενιστές. Οι γονότυποι Α και Β είναι γνωστοί για την προσβολή ανθρώπων, ενώ άλλοι γονότυποι προσβάλλουν ζώα. Η ποικιλομορφία αυτή μπορεί να επηρεάσει την παθογένεια και την ανταπόκριση στη θεραπεία. (52)

Πρωτόκολλο Μελέτης και Ανίχνευσης: Η διάγνωση της γιγαρδίασης γίνεται συνήθως μέσω μικροσκοπικής ανάλυσης κοπράνων για την ανίχνευση κύστεων ή τροφοζωιτών. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται ανοσολογικές μέθοδοι, όπως το ανοσοενζυμικό προσδιορισμό (ELISA) ή ανοσοχρωματογραφικές δοκιμές, για την ανίχνευση αντιγόνων του παρασίτου. Η μοριακή διάγνωση με PCR μπορεί να προσφέρει αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα. (52)

Η πρόληψη της μόλυνσης περιλαμβάνει την κατανάλωση ασφαλούς, επεξεργασμένου νερού, την τήρηση κανόνων υγιεινής και την αποφυγή κατανάλωσης ακατέργαστου νερού από φυσικές πηγές. (52)

2.3.2. *Cryptosporidium parvum*

Το *Cryptosporidium parvum* είναι ένα μονοκύτταρο, ενδοκυτταρικό πρωτόζωο του φύλου Apicomplexa, γνωστό για την πρόκληση της κρυπτοσποριδίωσης, μιας παρασιτικής νόσου που επηρεάζει το γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. (53) (Εικόνα 2.12.)



Εικόνα 2.12. *Cryptosporidium parvum*. Online Science Notes

Το *C. parvum* είναι ευρέως διαδεδομένο και μπορεί να μολύνει μια ποικιλία σπονδυλωτών, όπως πτηνά, ερπετά και θηλαστικά. Οι ανθεκτικές ωοκύστες του απεκκρίνονται με τα κόπρανα των μολυσμένων ξενιστών και μπορούν να επιβιώσουν σε διάφορα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένου του νερού, του εδάφους και επιφανειών που έχουν μολυνθεί με κόπρανα. (53)

Το γένος *Cryptosporidium* περιλαμβάνει διάφορα είδη και γονότυπους που είναι προσαρμοσμένα σε συγκεκριμένους ξενιστές. Το *C. parvum* είναι ένα από τα είδη που προκαλούν κρυπτοσποριδίωση στους ανθρώπους, ενώ άλλα είδη, όπως το *C. hominis*, προσβάλλουν κυρίως ανθρώπους. Ορισμένα είδη και γονότυποι είναι ζωνοτικά, δηλαδή μπορούν να μεταδοθούν μεταξύ ζώων και ανθρώπων, αυξάνοντας την επικινδυνότητα για τη δημόσια υγεία. (53)

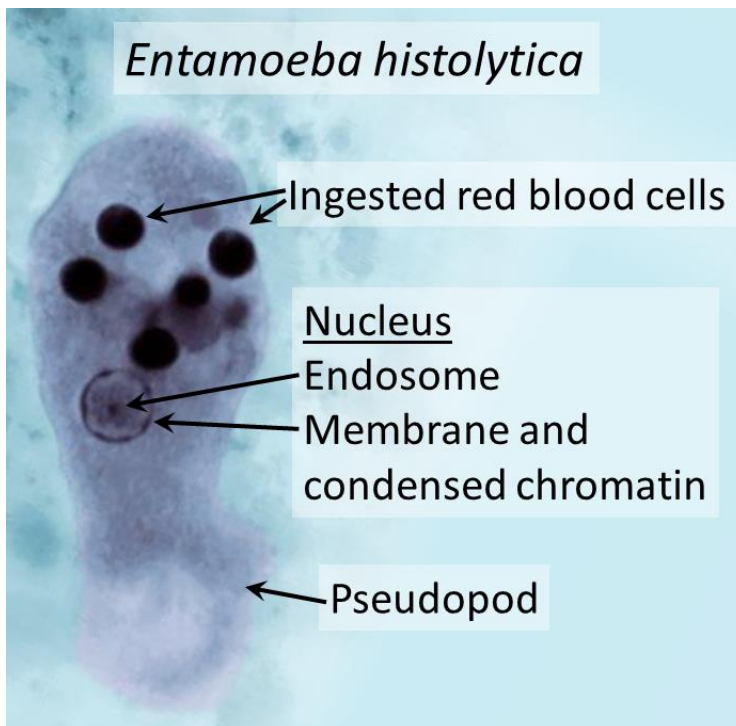
Η παρουσία του *C. parvum* στο πόσιμο νερό μπορεί να οδηγήσει σε κρυπτοσποριδίωση, η οποία χαρακτηρίζεται από υδαρή διάρροια, κοιλιακό άλγος, ναυτία και έμετο. Το παράσιτο είναι ανθεκτικό σε συνήθεις μεθόδους χλωρίωσης, καθιστώντας την απομάκρυνσή του από το νερό δύσκολη. Η κατανάλωση μολυσμένου νερού αποτελεί σημαντικό παράγοντα μετάδοσης, όπως αποδείχθηκε σε επιδημίες, όπως αυτή στο Μιλγουόκι των ΗΠΑ το 1993, όπου 403.000 άνθρωποι ασθένησαν λόγω μόλυνσης του πόσιμου νερού με *C. parvum*. (54)

Πρωτόκολλο Μελέτης και Ανίχνευσης: Η ανίχνευση του *C. parvum* είναι δύσκολη λόγω του μικρού μεγέθους των ωοκύστεών του. Η διάγνωση μπορεί να γίνει μέσω μικροσκοπικής εξέτασης κοπράνων, ανοσοενζυμικών μεθόδων (ELISA) για την ανίχνευση αντιγόνων του

παρασίτου ή μοριακών τεχνικών, όπως η PCR, που προσφέρουν αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα. Η πρόληψη της μόλυνσης περιλαμβάνει την αποφυγή επαφής με μολυσμένα κόπρανα, την καλή υγιεινή και την κατανάλωση ασφαλούς, επεξεργασμένου νερού. (54)

2.3.3. *Entamoeba histolytica*

Η *Entamoeba histolytica* είναι ένα αναερόβιο παρασιτικό πρωτόζωο του γένους *Entamoeba*, γνωστό για την πρόκληση αμοιβάδωσης, μιας παρασιτικής λοίμωξης που επηρεάζει το γαστρεντερικό σύστημα των ανθρώπων και άλλων πρωτευόντων. (Εικόνα 2.13) Η αμοιβάδωση είναι η τρίτη κύρια αιτία θανάτου από παρασιτικές λοιμώξεις παγκοσμίως, μετά την ελονοσία και τη σχιστοσωμίαση. Η μόλυνση μπορεί να είναι ασυμπτωματική ή να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές, όπως αμοιβαδική δυσεντερία και αποστήματα στο ήπαρ. Η διάγνωση είναι δύσκολη λόγω της μορφολογικής ομοιότητας με μη παθογόνα είδη, και συχνά απαιτούνται μοριακές μέθοδοι για την ακριβή ταυτοποίηση. Το παράσιτο εντοπίζεται κυρίως στο παχύ έντερο των ξενιστών του. Οι ανθεκτικές κύστες του απεκκρίνονται με τα κόπρανα και μπορούν να επιβιώσουν σε υγρά περιβάλλοντα, όπως το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα, ιδιαίτερα υπό υγρές συνθήκες. Η μόλυνση συμβαίνει μέσω κατάποσης κύστεων από μολυσμένο νερό, τρόφιμα ή επιφάνειες. (53)



Εικόνα 2.13. *Entamoeba histolytica*. Original micrograph: CDC/ Dr. Mae Melvin; Dr. Greene Annotations by Mikael Häggström, M.D.

Εκτός από την *E. histolytica*, υπάρχουν και άλλα μορφολογικά παρόμοια είδη, όπως η *E. dispar*, η *E. moshkovskii* και η *E. bangladeshi*, τα οποία γενικά δεν συνδέονται με ασθένειες. Ωστόσο, η *E. histolytica* είναι παθογόνος και μπορεί να προκαλέσει εντερικές και εξωεντερικές λοιμώξεις. (53)

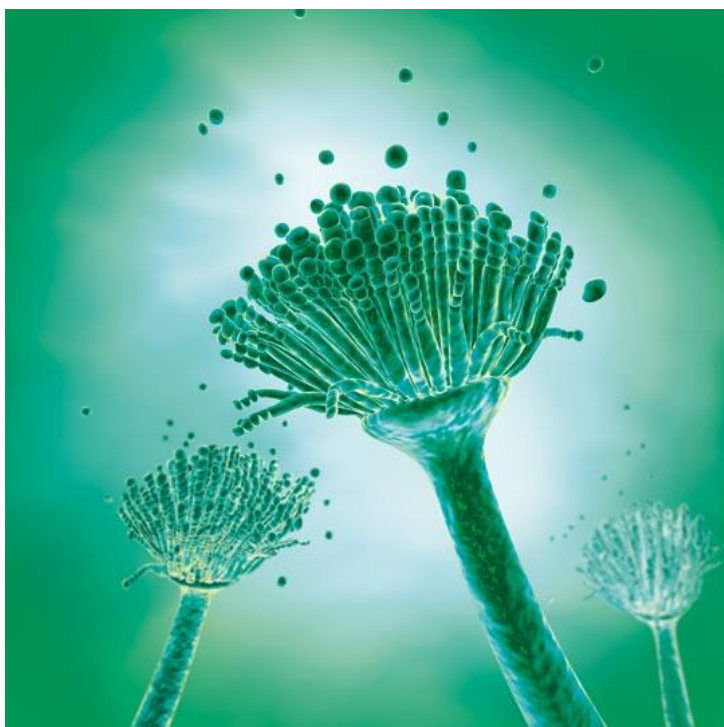
Η παρουσία της *E. histolytica* στο πόσιμο νερό μπορεί να οδηγήσει σε αμοιβάδωση, με συμπτώματα όπως διάρροια, κοιλιακό άλγος, απώλεια βάρους και κόπωση. Σε σοβαρές περιπτώσεις, μπορεί να προκαλέσει αμοιβαδική δυσεντερία ή αποστήματα στο ήπαρ, τα οποία μπορεί να είναι θανατηφόρα αν δεν αντιμετωπιστούν. Η διάγνωση της αμοιβάδωσης περιλαμβάνει μικροσκοπική εξέταση κοπράνων για την ανίχνευση κύστεων ή τροφοζωιτών. Ωστόσο, λόγω της μορφολογικής ομοιότητας με μη παθογόνα είδη, συνιστώνται ανοσολογικές μέθοδοι, όπως το ELISA, ή μοριακές τεχνικές, όπως η PCR, για αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα. (54)

2.4. Μύκητες (Fungi)

Οι μύκητες βρίσκονται στο νερό, κυρίως σε υγρά περιβάλλοντα, και ενώ σπάνια αποτελούν σημαντική απειλή για την υγεία του ανθρώπου, μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

2.4.1. *Aspergillus spp.*

Το γένος *Aspergillus* περιλαμβάνει περίπου 250 είδη μυκήτων, εκ των οποίων περίπου 40 είναι γνωστό ότι προκαλούν λοιμώξεις σε ανθρώπους ή ζώα. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* είναι σαπροτροφικοί, δηλαδή ζουν και τρέφονται από νεκρή οργανική ύλη. Είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον, ιδιαίτερα σε εδάφη, αποσυντιθέμενα φυτικά υλικά και οργανικά υπολείμματα. (55) (Εικόνα 2.14)



Εικόνα 2.14. *Aspergillus* spp. Ανώτερη ανάπτυξη: Στο ανώτερο άκρο τους, οι μύκητες μούχλας αναπτύσσουν νήματα. hartmann-science-center

Ορισμένα είδη του γένους *Aspergillus* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Το *Aspergillus fumigatus* είναι το πιο κοινό είδος που προκαλεί ασπεργίλλωση, μια σοβαρή μυκητιασική λοίμωξη. Άλλα είδη, όπως το *Aspergillus flavus*, το *Aspergillus niger* και το *Aspergillus terreus*, μπορούν επίσης να προκαλέσουν λοιμώξεις, ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. (56)

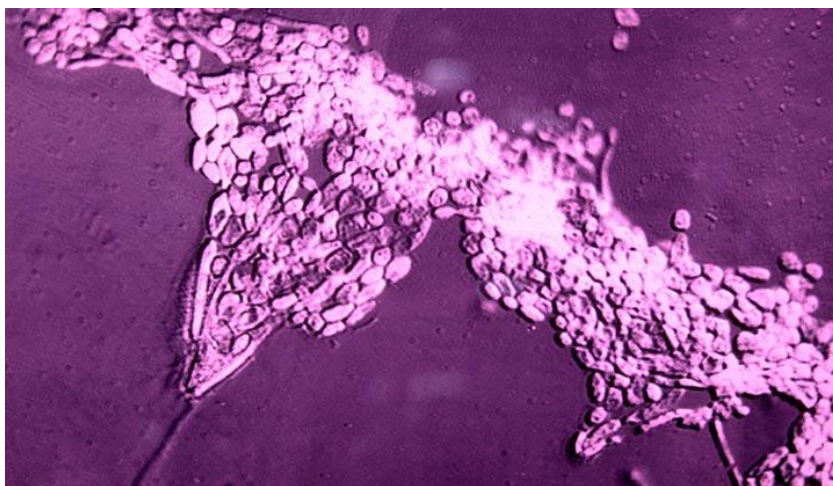
Η παρουσία σπορίων *Aspergillus* στο πόσιμο νερό είναι σπάνια, καθώς οι συνθήκες του νερού δεν είναι ιδανικές για την ανάπτυξή τους. Ωστόσο, σε περιπτώσεις μόλυνσης του νερού, τα σπόρια μπορούν να εισέλθουν στο ανθρώπινο σώμα μέσω της εισπνοής αερολυμάτων κατά τη διάρκεια του ντους ή άλλων δραστηριοτήτων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λοιμώξεις, ιδιαίτερα σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. (57)

Η ανίχνευση των ειδών *Aspergillus* σε δείγματα νερού ή κλινικά δείγματα μπορεί να γίνει μέσω καλλιέργειας σε ειδικά θρεπτικά υλικά, μικροσκοπικής εξέτασης και μοριακών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Επιπλέον, η ανίχνευση του αντιγόνου γαλακτομαννάνης (GM) στον ορό ή σε υγρό βρογχοκυελιδικής έκπλυσης (BAL) αποτελεί σημαντική διαγνωστική μέθοδο για την ασπεργίλλωση. (58)

Η πρόληψη της μόλυνσης από *Aspergillus* περιλαμβάνει τη διατήρηση καλής υγιεινής, την αποφυγή έκθεσης σε περιβάλλοντα με υψηλή συγκέντρωση σπορίων και την κατάλληλη επεξεργασία του πόσιμου νερού. (59)

2.4.2. *Candida spp.*

Το γένος *Candida* περιλαμβάνει περισσότερα από 200 είδη ζυμομυκήτων, με ορισμένα από αυτά να είναι γνωστά παθογόνα για τον άνθρωπο. Το πιο διαδεδομένο και κλινικά σημαντικό είδος είναι το *Candida albicans*. (Εικόνα 2.15) Το *Candida albicans* είναι γνωστό για την ικανότητά του να προκαλεί επιφανειακές και συστηματικές λοιμώξεις στον άνθρωπο. Είναι μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, αλλά μπορεί να γίνει παθογόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες. (60) Άλλα είδη όπως το *Candida auris*, έχουν δείξει αυξημένη ανθεκτικότητα σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, γεγονός που συμβάλλει στην εξάπλωσή τους σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα. (61)



Εικόνα 2.15. *Candida albicans*. Cleveland clinic.

Εκτός από το *Candida albicans*, άλλα είδη όπως το *Candida glabrata*, το *Candida tropicalis*, το *Candida parapsilosis* και το *Candida krusei* έχουν αναγνωριστεί ως παθογόνα, ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Ορισμένα από αυτά τα είδη παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιμυκητιασικά φάρμακα, καθιστώντας τις λοιμώξεις δύσκολες στη θεραπεία.

Η παρουσία ζυμομυκήτων του γένους *Candida* στο πόσιμο νερό είναι σπάνια και γενικά δεν αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, η ανίχνευσή τους μπορεί να υποδηλώνει προβλήματα στη διαδικασία επεξεργασίας ή αποθήκευσης του νερού. Σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα, η παρουσία *Candida spp.* στο νερό μπορεί να σχετίζεται με λοιμώξεις σε ευπαθείς πληθυσμούς. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση των ειδών

Candida σε κλινικά δείγματα γίνεται μέσω καλλιέργειας σε ειδικά θρεπτικά υλικά, μικροσκοπικής εξέτασης και βιοχημικών δοκιμών. Επιπλέον, μοριακές τεχνικές όπως η PCR χρησιμοποιούνται για την ταχεία και ακριβή ταυτοποίηση των ειδών. Η ευαισθησία σε αντιμυκητιασικά φάρμακα αξιολογείται μέσω δοκιμών ευαισθησίας *in vitro*, προκειμένου να καθοριστεί η κατάλληλη θεραπεία. (62)

Η παρουσία παθογόνων ειδών *Candida* σε δείγματα νερού έχει μελετηθεί με τη χρήση μεθόδων όπως η ποσοτική PCR (qPCR), η οποία επιτρέπει την ταχεία και ακριβή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αυτών των μικροοργανισμών. (62)

Μελέτες έχουν εντοπίσει την παρουσία του *Candida auris* σε αστικά λύματα, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα χρήσης της επιδημιολογίας των λυμάτων για την παρακολούθηση της εξάπλωσης αυτού του παθογόνου. (63)

Έχουν αναπτυχθεί ταχείες μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση ειδών *Candida* σε κλινικά δείγματα, όπως η χρήση ειδικών ανιχνευτών (IM Q-probes) για την ταυτοποίηση οκτώ ειδών *Candida* σε περιπτώσεις καντιναιμίας. (64)

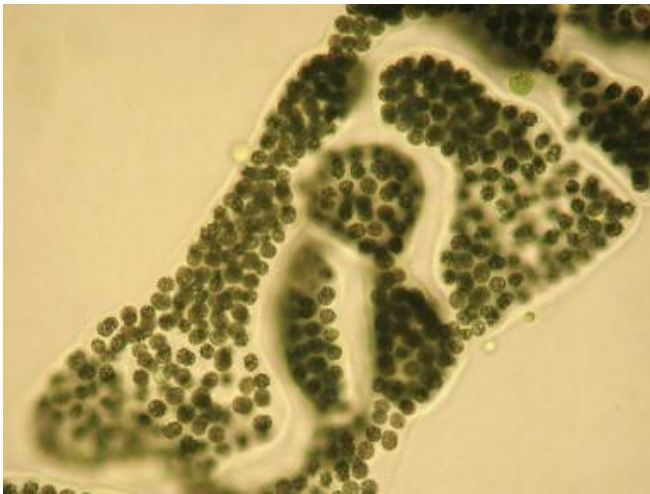
Η επιβίωση του *Candida albicans* σε εδαφικά περιβάλλοντα έχει επίσης μελετηθεί, υποδεικνύοντας την ικανότητά του να επιβιώνει εκτός του ανθρώπινου ξενιστή. (65)

2.5. Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria)

Τα κυανοβακτήρια είναι μικροοργανισμοί που παράγουν τοξίνες, οι οποίες μπορεί να είναι επικίνδυνες για τον άνθρωπο και τα ζώα.

2.5.1. *Microcystis* spp.

Το γένος *Microcystis* αποτελείται από κυανοβακτήρια (γνωστά και ως κυανοφύκη) που απαντώνται κυρίως σε γλυκά νερά. (Εικόνα 2.16) Το γένος *Microcystis*, ιδιαίτερα το είδος *Microcystis aeruginosa*, είναι γνωστό για την παραγωγή τοξινών, όπως οι μικροκυστίνες, που μπορούν να προκαλέσουν ηπατοτοξικότητα σε ανθρώπους και ζώα. Οι ανθίσεις (blooms) κυανοβακτηρίων σε λίμνες και ποτάμια αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, επηρεάζοντας την ποιότητα του πόσιμου νερού. Τα *Microcystis* είναι ευρέως διαδεδομένα σε γλυκά νερά παγκοσμίως, εκτός από την Ανταρκτική. Ευδοκμούν σε ευτροφικά περιβάλλοντα με υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών, όπως φωσφόρου και αζώτου, και μπορούν να σχηματίσουν πυκνές ανθίσεις στην επιφάνεια του νερού. (66)



Εικόνα 2.16. *Microcystis* spp. ScienceDirect

Το είδος *Microcystis aeruginosa* είναι ιδιαίτερα γνωστό για την παραγωγή μικροκυστίνης, μιας ηπατοτοξίνης που μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στο ήπαρ. Η τοξικότητα της μικροκυστίνης έχει μελετηθεί εκτενώς, με έμφαση στην επίδρασή της σε ηπατικά κύτταρα. (67)

Η παρουσία *Microcystis* στο πόσιμο νερό αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, καθώς οι τοξίνες που παράγονται μπορούν να προκαλέσουν ηπατοτοξικότητα και άλλες επιπλοκές. Οι ανθίσεις *Microcystis* μπορούν να οδηγήσουν σε:

- Απόφραξη συστημάτων ύδρευσης.
- Ανάγκη εντατικής επεξεργασίας του νερού.
- Οικονομικές επιπτώσεις λόγω της επεξεργασίας και των επιπτώσεων στην υγεία. (68)

Η ανίχνευση των *Microcystis* και των τοξινών τους στο νερό περιλαμβάνει:

- Δειγματοληψία νερού και μικροσκοπική ανάλυση για την ταυτοποίηση των κυττάρων *Microcystis*.
- Χημικές αναλύσεις, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μικροκυστινών.
- Μοριακές τεχνικές, όπως η PCR, για την ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή τοξινών.
- Η παρακολούθηση των ανθίσεων *Microcystis* και των τοξινών τους είναι κρίσιμη για την προστασία της δημόσιας υγείας και την εξασφάλιση ασφαλούς πόσιμου νερού. (66)

Επιπλέον, η διαχείριση των κυανοτοξινών σε δημόσια συστήματα πόσιμου νερού αποτελεί σημαντική πρόκληση, απαιτώντας συνδυασμό μεθόδων επεξεργασίας και συνεχούς παρακολούθησης. (68)

2.5.2. *Anabaena* spp.

Το γένος *Anabaena* αποτελείται από νηματοειδή κυανοβακτήρια, γνωστά και ως κυανοφύκη, τα οποία είναι ικανά για φωτοσύνθεση και αζωτοδέσμευση. (Εικόνα 2.17) Τα κυανοβακτήρια αυτά σχηματίζουν μακρές αλυσίδες κυττάρων και είναι ευρέως διαδεδομένα σε υδάτινα οικοσυστήματα. Απαντώνται κυρίως σε γλυκά νερά και είναι γνωστά για την ικανότητά τους να παράγουν τοξίνες επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία. Ειδικότερα, το είδος *Anabaena flos-aquae* έχει μελετηθεί για την παραγωγή νευροτοξινών, όπως η ανατοξίνη-α, η οποία μπορεί να προκαλέσει ταχεία νευρομυϊκή παράλυση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η τοξίνη αυτή προκαλεί έναν διαρκή μετασυναπτικό αποπολωτικό νευρομυϊκό αποκλεισμό, οδηγώντας σε αναπνευστική ανακοπή σε ζώα που εκτέθηκαν σε αυτήν. (69)



Εικόνα 2.17. *Anabaena* spp. Microbiology. Brandon Ward

Τα *Anabaena* απαντώνται κυρίως σε γλυκά νερά, όπως λίμνες, ποτάμια και υγροτόπους, αλλά μπορούν να βρεθούν και σε εδάφη με υψηλή υγρασία. Ευδοκιμούν σε θρεπτικά πλούσια περιβάλλοντα και συχνά σχηματίζουν ανθίσεις (blooms) σε ευτροφικά νερά, ιδιαίτερα κατά τους θερμότερους μήνες. Ορισμένα είδη του γένους *Anabaena*, όπως το *Anabaena flos-aquae*, είναι γνωστά για την παραγωγή τοξινών, όπως αναβαινοτοξίνες και μικροκυστίνες, που είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η παρουσία αυτών των τοξικών ειδών σε υδάτινα συστήματα μπορεί να προκαλέσει προβλήματα υγείας και οικολογικές διαταραχές. (69)

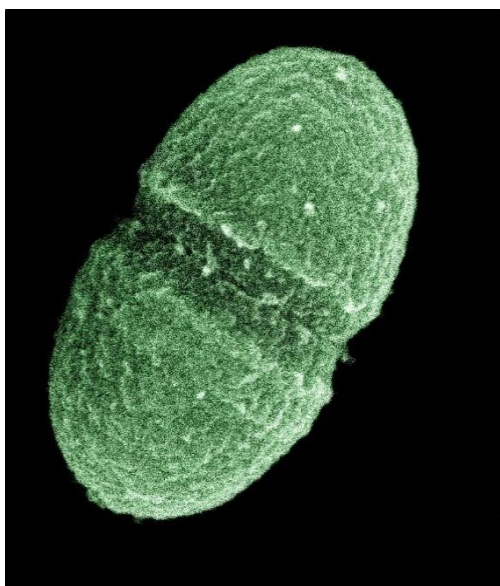
Η ανίχνευση και ταυτοποίηση τοξινών που παράγονται από το *Anabaena* σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μοριακών τεχνικών, όπως η ποσοτική PCR (qPCR), η οποία επιτρέπει την ταχεία και ακριβή ταυτοποίηση των τοξινογόνων στελεχών. Επιπλέον, η χρήση χρωματογραφικών μεθόδων, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), είναι κρίσιμη για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των τοξινών στο νερό, διασφαλίζοντας την ποιότητα του πόσιμου νερού και την προστασία της δημόσιας υγείας. (69)

Η παρακολούθηση των ανθίσεων του γένους *Anabaena* και των τοξινών τους είναι κρίσιμη για την προστασία της δημόσιας υγείας και την εξασφάλιση ασφαλούς πόσιμου νερού. Η επεξεργασία του νερού με κατάλληλες μεθόδους, όπως η χρήση ενεργού άνθρακα και η οζόνωση, μπορεί να συμβάλει στην απομάκρυνση των τοξινών. Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO), η οζόνωση μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αποδόμηση των κυανοβακτηρίων, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του ακατέργαστου νερού, όπως η συγκέντρωση φυσικών οργανικών ουσιών και το pH. (70) Επιπλέον, η χρήση ενεργού άνθρακα έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην απομάκρυνση τοξικότητας από πόσιμο νερό που περιέχει ανθίσεις κυανοβακτηρίων. (71)

2.6. Άλλοι Δείκτες Μικροοργανισμών

2.6.1. *Enterococcus* sp. :

Το *Enterococcus* sp. είναι ένα γένος βακτηρίων που ανήκει στην ομάδα των θετικών κατά Gram βακτηρίων. (Εικόνα 2.18) Πρόκειται για κόκκους (σφαιρικά βακτήρια), που συνήθως απαντώνται σε ζεύγη ή σε βραχείες αλυσίδες. Είναι μέλη της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου ανθρώπων και ζώων, αλλά μπορούν επίσης να προκαλέσουν λοιμώξεις, ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. (72)



Εικόνα 2.18. *Enterococcus* sp . United States Department of Agriculture

Επιδεικνύει σημαντική ανθεκτικότητα στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, είναι ανθεκτικό στη θερμότητα, την ξηρασία και την αλατότητα και κάποια στελέχη είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά (π.χ. Vancomycin-Resistant Enterococci, VRE). (72)

Τα πιο κοινά είδη περιλαμβάνουν:

- *Enterococcus faecalis*: Εμφανίζεται συχνά και είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες λοιμώξεις που προκαλούνται από *Enterococcus*.
- *Enterococcus faecium*: Συνήθως συνδέεται με νοσοκομειακές λοιμώξεις και παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Το *Enterococcus* sp. χρησιμοποιείται ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης στο νερό, ιδιαίτερα σε θαλάσσια νερά, λόγω της παρουσίας του στα κόπρανα ανθρώπων και ζώων και της μεγαλύτερης επιβίωσής του σε θαλάσσιες συνθήκες σε σύγκριση με το *E. coli*. (72)

Το *Enterococcus* sp. μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις όπως:

- Ουρολοιμώξεις.
- Ενδοκαρδίτιδα.
- Λοιμώξεις τραυμάτων και νοσοκομειακές λοιμώξεις.

Είναι σημαντικός τόσο ως δείκτης περιβαλλοντικής μόλυνσης όσο και στην κλινική ιατρική. (72)

2.6.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα Gram-αρνητικό, αερόβιο, ραβδοειδές βακτήριο, γνωστό για την ικανότητά του να προκαλεί λοιμώξεις σε ανθρώπους, ιδιαίτερα σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. (Εικόνα 2.19) Το βακτήριο αυτό απαντάται ευρέως στο περιβάλλον, ιδιαίτερα σε εδάφη και υδάτινα συστήματα. Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι το κύριο παθογόνο είδος του γένους *Pseudomonas* που σχετίζεται με λοιμώξεις στον άνθρωπο. Δεν υπάρχουν συγκεκριμένα υποείδη με αυξημένη επικινδυνότητα, αλλά ορισμένα στελέχη μπορεί να εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, καθιστώντας τις λοιμώξεις δυσκολότερες στη θεραπεία. (73)



Εικόνα 2.19. *Pseudomonas aeruginosa*. Condalab.

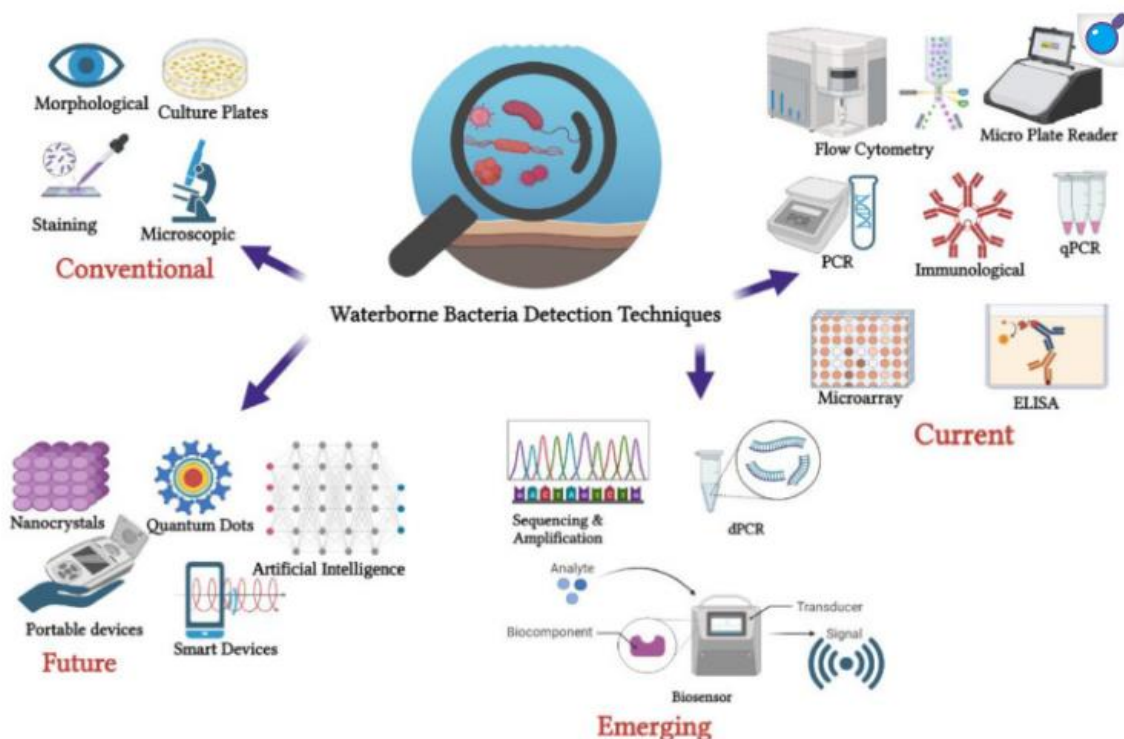
Η παρουσία της *Pseudomonas aeruginosa* στο πόσιμο νερό μπορεί να υποδηλώνει επιμόλυνση και αποτελεί κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα για άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Το βακτήριο μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις σε διάφορα μέρη του σώματος, όπως το ουροποιητικό σύστημα, το αναπνευστικό σύστημα και το δέρμα. Για αυτό είναι σημαντική η ανίχνευση της *Pseudomonas aeruginosa* στο πόσιμο νερό, η οποία πραγματοποιείται μέσω καλλιεργητικών μεθόδων, όπου δείγματα νερού επωάζονται σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα που προάγουν την ανάπτυξη του βακτηρίου. Επιπλέον, μοριακές τεχνικές, όπως η Real-Time PCR, έχουν αναπτυχθεί για την ταχεία και ακριβή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του βακτηρίου σε δείγματα νερού. (73)

Πίνακας 2.1. Μικροοργανισμοί, Ασθένειες και Παρουσία σε Υδάτινα Περιβάλλοντα

Μικροοργανισμός	Ασθένειες που προκαλεί	Πότε συναντάται σε υδάτινα περιβάλλοντα
<i>Escherichia coli</i> (E. coli)	Δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, σχετίζεται με γαστρεντερίτιδα	Υπάρχει σε μολυσμένα νερά λόγω κοπρανώδους μόλυνσης
<i>Salmonella</i> spp.	Γαστρεντερίτιδα, τυφοειδής πυρετός	Μολυσμένα νερά, ειδικά κοντά σε κοπρανώδη μόλυνση
<i>Shigella</i> spp.	Βακτηριακή δυσεντερία (σιγγέλωση)	Υδάτινα συστήματα μολυσμένα από κακή υγιεινή και κοπρανώδη μόλυνση
<i>Legionella pneumophila</i>	Νόσος των Λεγεωνάριων (σοβαρή πνευμονία), πυρετός Pontiac	Τεχνητά συστήματα νερού, όπως πύργοι ψύξης, θερμοσίφωνες, και υδραυλικά συστήματα
<i>Clostridium perfringens</i>	Τροφική δηλητηρίαση, αερογόνος γάγγραινα	Υπάρχει σε ποτάμια, έδαφος και τρόφιμα
<i>Vibrio cholerae</i>	Χολέρα	Παράκτιες περιοχές, εκβολές ποταμών, μολυσμένα επιφανειακά νερά
<i>Giardia lamblia</i>	Γιγαρδίαση (γαστρεντερίτιδα με διάρροια)	Λίμνες, ποτάμια, πηγές νερού, ιδιαίτερα αν είναι μολυσμένα με κόπρανα
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Κρυπτοσποριδίωση (υδαρή διάρροια, κοιλιακός πόνος)	Ανθεκτικό σε χλωρίωση, εμφανίζεται σε μολυσμένα ποτάμια και λίμνες
<i>Entamoeba histolytica</i>	Αμοιβάδωση (δυσεντερία, αποστήματα στο ήπαρ)	Παχύ έντερο ξενιστών, νερό μολυσμένο με κόπρανα
<i>Aspergillus</i> spp.	Ασπεργίλλωση (μυκητιασικές λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους)	Σπάνια στο πόσιμο νερό, μπορεί να εισέλθει μέσω αερολυμάτων
<i>Candida</i> spp.	Λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα	Σπάνια στο νερό, εντοπίζεται κυρίως σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα
<i>Microcystis</i> spp.	Ηπατοτοξικότητα (λόγω μικροκυστινών)	Ανθίσκει κυανοβακτηρίων σε λίμνες και ποτάμια
<i>Anabaena</i> spp.	Νευροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα	Εμφανίζεται σε θρεπτικά πλούσια ευτροφικά νερά

Pseudomonas aeruginosa	Λοιμώξεις ουροποιητικού, αναπνευστικού, δέρματος	Σε εδάφη και υδάτινα περιβάλλοντα, ιδίως σε μολυσμένο πόσιμο νερό
------------------------	---	---

3.Τεχνικές ανάλυσης μικροοργανισμών στο νερό.



Εικόνα 3.20 Παρουσίαση τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση νερού σήμερα, αλλά και στο μέλλον. (16)

Η ανίχνευση μικροοργανισμών στο νερό είναι μια διαδικασία που απαιτεί ακριβείς τεχνικές, οι οποίες επιλέγονται με βάση τον τύπο των μικροοργανισμών που θέλουμε να ανιχνεύσουμε (βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα, μύκητες κ.λπ.). (Εικόνα 3.20) Ακολουθούν πιο αναλυτικά κάποιες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μικροοργανισμών στο νερό:

3.1. Flow Cytometry (Κυτταρομετρία Ροής)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία που παρέχει γρήγορη πολυπαραμετρική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων σε διάλυμα. Οι κυτταρομετρητές ροής χρησιμοποιούν λέιζερ ως πηγές φωτός για να παράγουν σήματα σκέδασης και φθορισμού, τα οποία διαβάζονται από ανιχνευτές όπως φωτοδιόδους ή σωλήνες φωτοπολλαπλασιαστών. Αυτά τα φωτεινά σήματα μετατρέπονται σε ηλεκτρονικά σήματα που αναλύονται από έναν υπολογιστή και αποθηκεύονται σε ένα αρχείο δεδομένων τυποποιημένης μορφής (.fcs). Οι κυτταρικοί πληθυσμοί μπορούν να αναλυθούν ή/και να καθαριστούν βάσει των χαρακτηριστικών φθορισμού ή σκέδασης φωτός τους. Μια ποικιλία φθορίζοντων

αντιδραστηρίων χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής, συμπεριλαμβανομένων αντισωμάτων συζευγμένων με φθορίζοντες δείκτες, χρωστικών δεσμευτικών νουκλεϊκών οξέων, χρωστικών ζωτικότητας, δεικτών ιόντων και φθορίζοντων πρωτεϊνών έκφρασης. (74)

Η κυτταρομετρία ροής είναι ένα ισχυρό εργαλείο με εφαρμογές στην ανοσολογία, τη μοριακή βιολογία, τη βακτηριολογία, τη ιολογία, τη βιολογία του καρκίνου και την παρακολούθηση μολυσματικών ασθενειών. Τα τελευταία 30 χρόνια έχουν σημειωθεί εντυπωσιακές εξελίξεις, επιτρέποντας λεπτομερείς μελέτες του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλων τομέων της κυτταρικής βιολογίας. (74)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την ανάλυση και τον διαχωρισμό κυττάρων, βασισμένη σε πολλαπλές παραμέτρους. Τα παραδοσιακά συστήματα κυτταρομετρίας ροής αποτελούνται από τρία βασικά συστήματα: ρευστοδυναμικής, οπτικής και ηλεκτρονικής. Το σύστημα ρευστοδυναμικής περιλαμβάνει ένα διάλυμα που χρησιμοποιείται για την παράδοση και εστίαση του δείγματος προς ανάλυση. Το οπτικό σύστημα αποτελείται από λέιζερ για την ανίχνευση των χαρακτηριστικών των κυττάρων μέσω φωτός που διαχέεται ή φθορίζει. Το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει τα σήματα φωτός σε ψηφιακά σήματα που μπορούν να αναλυθούν από έναν υπολογιστή. (74)

Η τεχνολογία κυτταρομετρίας ροής έχει εξελιχθεί σημαντικά, με νέες πλατφόρμες που διαθέτουν πολλαπλά λέιζερ και ανιχνευτές για την ανίχνευση έως και 30-50 παραμέτρων ταυτόχρονα. Εκτός από την ανάλυση, η κυτταρομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση κυττάρων, καθώς και για την ανάλυση μοριακών δεικτών μέσω φθορισμού ή χρωμάτων δέσμευσης DNA και RNA. (74)

Υπάρχουν διάφοροι τύποι κυτταρομέτρων, όπως τα ακουστικά κυτταρόμετρα, τα οποία χρησιμοποιούν υπερηχητικά κύματα για καλύτερη εστίαση των κυττάρων, και τα κυτταρόμετρα μαζικής φασματομετρίας, τα οποία συνδυάζουν τη φασματομετρία μάζας με την κυτταρομετρία. Τα μαζικά κυτταρόμετρα χρησιμοποιούν μεταλλικά ιόντα αντί για φθορίζοντες δείκτες και επιτρέπουν την ανάλυση πολλαπλών παραμέτρων χωρίς να χρειάζεται διόρθωση για την αλληλοεπικάλυψη φασμάτων φθορισμού. Ωστόσο, το δείγμα καταστρέφεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης και ο ρυθμός ανάλυσης είναι χαμηλότερος από τα παραδοσιακά κυτταρόμετρα. (74)

Επιπλέον, υπάρχουν κυτταρόμετρα για την ανάλυση σφαιριδίων, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μεγάλων ποσοτήτων αναλυτών σε μικρά δείγματα, καθώς και νέες τεχνολογίες ανιχνευτών όπως οι φωτοπολλαπλασιαστές και τα ανιχνευτικά φωτοδιόδια (APDs). Οι φωτοπολλαπλασιαστές παραμένουν η κύρια τεχνολογία για την ανίχνευση φθορισμού λόγω της υψηλής τους ευαισθησίας, αλλά τα στερεά ανιχνευτικά συστήματα αρχίζουν να εμφανίζονται σε ορισμένα κυτταρόμετρα, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και γραμμικότητα. (74)

Διάφοροι τύποι φθορίζοντων παραγόντων χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής, όπως οργανικά μόρια, πρωτεΐνες φθορισμού και δείκτες DNA και RNA. Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ευρέως ως συστήματα αναφοράς για την έκφραση γονιδίων, ενώ οι δείκτες που δεσμεύουν το DNA χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, τη διαλογή χρωμοσωμάτων και τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Παράλληλα, οι δείκτες πολλαπλασιασμού κυττάρων και βιωσιμότητας είναι επίσης σημαντικοί για τη μελέτη της ανάπτυξης και της κατάστασης των κυττάρων. (74)

Στην περίπτωση δειγμάτων νερού, το δείγμα νερού περνά μέσα από το σύστημα, και κάθε κύτταρο ανιχνεύεται από τη διασπορά του φωτός και τη φθορίζουσα χρωστική του. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων μικροοργανισμών ταυτόχρονα. Η τεχνική πλεονεκτεί σε ταχύτητα μιας και μπορεί να αναλύσει χιλιάδες κύτταρα σε δευτερόλεπτα, αλλά είναι πολύ ακριβή. (74)

3.2 PCR

Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) είναι μια τεχνική που επιτρέπει την πολλαπλή αντιγραφή ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA, δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα αυτού του τμήματος, προκειμένου να αναλυθεί πιο εύκολα. Αυτή η τεχνική είναι πολύ σημαντική για την ανίχνευση παρουσίας μικροοργανισμών ή άλλων χαρακτηριστικών του DNA που μπορεί να ενδιαφέρουν στην έρευνα και τη διάγνωση. Υπάρχουν διάφοροι τύποι PCR, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ανάλογα με την κάθε περίπτωση και την ακρίβεια που απαιτείται.

3.2.1 Κλασική PCR:

Η κλασική ή παραδοσιακή PCR είναι η βασική μορφή αυτής της τεχνικής και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και αντιγραφή μικρών τμημάτων DNA. Αυτό μας επιτρέπει να δημιουργούμε τεράστιο αριθμό αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών

DNA που θέλουμε να αναλύσουμε και στην περίπτωση ανίχνευσης μικροοργανισμών επιλέγουμε ειδικές αλληλουχίες DNA που γνωρίζουμε ότι υπάρχουν στο συγκεκριμένο μικροοργανισμό που θέλουμε να εντοπίσουμε. (75)

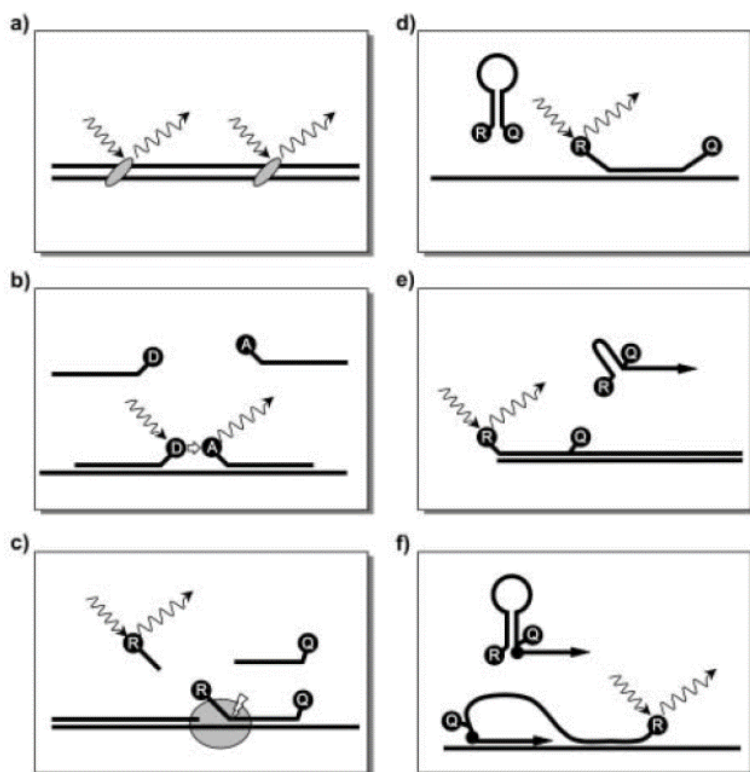
Πρώτα, εξάγουμε το DNA από τα δείγματα που θέλουμε να εξετάσουμε. Η διαδικασία περιλαμβάνει λύση των κυττάρων για την απελευθέρωση του DNA, απομάκρυνση πρωτεϊνών, RNA και άλλων ακαθαρσιών μέσω ενζύμων (π.χ. πρωτεϊνάσες) ή χημικών παραγόντων (π.χ. φαινόλη-χλωροφόρμιο) και καθαρισμό του DNA χρησιμοποιώντας στήλες πυριτίου ή με αιθανόλη για την καθίζηση του DNA. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ σημαντική, γιατί η καθαρότητα και η ποιότητα του DNA επηρεάζουν την αποδοτικότητα της PCR. Στη συνέχεια, σχεδιάζουμε μικρές αλληλουχίες DNA, που ονομάζονται εκκινητές (primers), οι οποίες αντιστοιχούν στα δύο άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε. Είναι συνθετικές αλληλουχίες DNA (18-24 νουκλεοτίδια) που είναι συμπληρωματικές προς τα άκρα της περιοχής-στόχου στο DNA. Αυτές οι αλληλουχίες βοηθούν στο να καθοριστεί ποιο κομμάτι DNA θα πολλαπλασιαστεί. Το εκχυλισμένο DNA, μαζί με τους εκκινητές, τοποθετείται σε ένα μικρό σωλήνα (συνήθως Eppendorf) που περιέχει ένα ένζυμο που ονομάζεται DNA πολυμεράση, τα dNTPs (νουκλεοτίδια) που είναι τα «δομικά υλικά» για το νέο DNA, και άλλα απαραίτητα συστατικά. Το μίγμα αυτό τοποθετείται σε μια ειδική συσκευή που ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής, η οποία ρυθμίζει τις αλλαγές θερμοκρασίας που είναι κρίσιμες για την πραγματοποίηση της PCR. (75)

Η PCR βασίζεται σε κύκλους εναλλασσόμενων θερμοκρασιών. Στην αρχή, το μίγμα θερμαίνεται σε πολύ υψηλή θερμοκρασία (συνήθως περίπου 95°C) για να διαχωριστεί το δίκλωνο DNA σε δύο μονόκλωνα (διαδικασία που ονομάζεται αποδιάταξη). Στη συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται (περίπου στους 50-65°C), ώστε οι εκκινητές να βρουν τις συμπληρωματικές θέσεις τους στα μονόκλωνα και να συνδεθούν εκεί. Μετά από αυτό, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, που είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση ξεκινάει την αντιγραφή του DNA από το σημείο που έχουν συνδεθεί οι εκκινητές, δημιουργώντας νέα αντίγραφα του τμήματος του DNA. Αυτός ο κύκλος θερμοκρασιών επαναλαμβάνεται περίπου 25 έως 35 φορές. Κάθε φορά που ολοκληρώνεται ένας κύκλος, διπλασιάζεται ο αριθμός των μορίων DNA. Έτσι, μετά από πολλούς κύκλους, ο αριθμός των αντιγράφων του συγκεκριμένου τμήματος DNA αυξάνεται εκθετικά. (75)

Τέλος, τα προϊόντα της PCR μπορούν να αναλυθούν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Φορτώνονται σε πηκτή αгарόζης και εκτίθενται σε ηλεκτρικό πεδίο, όπου τα μόρια DNA μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο (DNA είναι αρνητικά φορτισμένο). Η ταχύτητα μετακίνησης εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου (μικρότερα μόρια κινούνται πιο γρήγορα). Σε αυτή τη διαδικασία, τα τμήματα DNA ταξινομούνται με βάση το μέγεθός τους, και το μέγεθος των προϊόντων της PCR μπορεί να συγκριθεί με πρότυπους δείκτες μεγέθους για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης. (75)

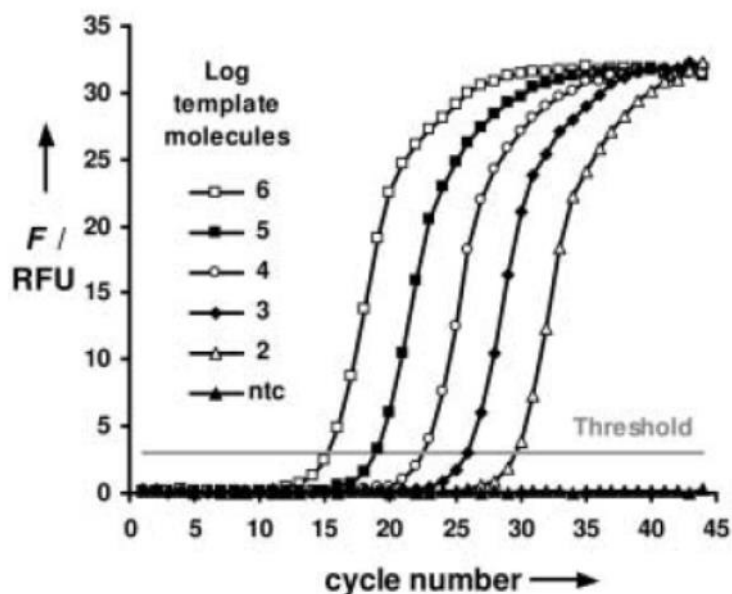
3.2.2. *real-time PCR*

Η real-time PCR είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική, η οποία παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1993 από τον Higuchi, προσφέροντας τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο. Αποτελεί εξέλιξη της παραδοσιακής PCR, συνδυάζοντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με φθορισμομετρικές τεχνικές. (76) Βασίζεται σε μια μέθοδο φθορισμού που μετράει σε πραγματικό χρόνο την πρόοδο της αντίδρασης PCR, δηλαδή τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Αυτό σημαίνει ότι ο πολλαπλασιασμός του DNA και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα μέσα στον ίδιο σωλήνα αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, χρησιμοποιούνται ειδικές χρωστικές και ανιχνευτές που συνδέονται με το παραγόμενο προϊόν DNA και εκπέμπουν φθορισμό. Η ποσότητα του φθορισμού μετριέται σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την παρακολούθηση της αντίδρασης. Οι χρωστικές και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν τη χρωστική SYBR Green I και διάφορους ανιχνευτές όπως οι TaqMan, οι μοριακοί φάροι, οι ανιχνευτές υδρόλυσης και οι σκορπιοί. Η SYBR Green I συνδέεται ειδικά με το δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν δεσμεύεται. Παρότι είναι οικονομική και απλή, μπορεί να συνδεθεί με μη ειδικά προϊόντα PCR, γεγονός που απαιτεί ανάλυση καμπύλης τήξης για επιβεβαίωση. Οι TaqMan περιλαμβάνουν ανιχνευτή υδρόλυσης με φθοριόφορο και συσβεστικό μόριο. Κατά την επέκταση, η Taq DNA πολυμεράση υδρολύει τον ανιχνευτή, απελευθερώνοντας φθορισμό. Οι μοριακοί φάροι (Molecular Beacons) δημιουργούν κλειστή θηλιά που ανοίγει όταν συνδεθούν με την αλληλουχία στόχο, εκπέμποντας φθορισμό. Οι σκορπιοί (Scorpions) περιέχουν ειδική περιοχή ανίχνευσης που υβριδοποιείται με το προϊόν PCR, ενεργοποιώντας το φθοριόφορο. Ο Sunrise και Άλλοι Ανιχνευτές παρέχουν εναλλακτικές δυνατότητες ανίχνευσης, ανάλογα με τη σύνθεση του δείγματος και τις απαιτήσεις της ανάλυσης. (Εικόνα 3.21.) (77)



Εικόνα 3.21. Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην real-time PCR. a) χρωστική SYBR green I, b) ανιχνευτές υδρόλυσης, c) ανιχνευτές Taqman, d) μοριακοί φάροι, e) ανιχνευτές sunrise, f) σκορπιοί. (77)

Καθώς εξελίσσεται η PCR, η αντίδραση φτάνει σε ένα συγκεκριμένο σημείο ή «κατώφλι» (threshold) ανάλογα με την αρχική ποσότητα του DNA. (Εικόνα 3.22) Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση DNA, τόσο λιγότεροι κύκλοι PCR χρειάζονται για να φτάσει η αντίδραση στο σημείο αυτό. Αυτή η μέτρηση επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της αρχικής ποσότητας DNA κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Για την ποσοτική ανάλυση, δημιουργείται μια καμπύλη αναφοράς, η οποία συνδέει τον αριθμό των κύκλων με τον λογάριθμο των αντιγράφων του DNA. Αυτό επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της αρχικής ποσότητας DNA. Στο τέλος της διαδικασίας, γίνεται ανάλυση της καμπύλης τήξης για να επιβεβαιωθεί ότι τα παραγόμενα προϊόντα DNA είναι αυτά που θέλουμε, χωρίς να υπάρχουν μη ειδικές αντιδράσεις. Η real-time PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απόλυτη ποσοτικοποίηση (δηλαδή τον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων του DNA) ή για σχετική ποσοτικοποίηση, όπου η ποσότητα του DNA στόχου συγκρίνεται με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς. (Εικόνα 3.22) (78)



Εικόνα 3.22. Φθορισμός συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων αρχικής ποσότητας DNA που μελετάται 78).

Η real-time PCR έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες μορφές PCR. Είναι πολύ πιο ευαίσθητη, επιτρέποντας τον εντοπισμό ακόμα και πολύ μικρών συγκεντρώσεων DNA. Επιπλέον, απαιτεί λιγότερο χρόνο, καθώς η όλη διαδικασία εκτελείται σε πραγματικό χρόνο, χωρίς να χρειάζεται επιπλέον βήματα ή χειρισμοί μετά την αντίδραση, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο επιμόλυνσης του δείγματος. Τέλος, η τεχνική αυτή είναι πλήρως αυτοματοποιημένη, γεγονός που την καθιστά ιδανική για πολλές εφαρμογές στην έρευνα και τη διάγνωση. Οι περιορισμοί της real-time PCR, είναι η μη ειδική ανίχνευση, για την οποία απαιτείται ανάλυση καμπύλης τήξης για τον αποκλεισμό μη ειδικών προϊόντων, το κόστος, μιας και η συσκευή και τα αντιδραστήρια μπορεί να είναι ακριβά και οι απαιτήσεις εξειδίκευσης, γιατί χρειάζεται προσεκτική σχεδίαση εκκινητών και ανιχνευτών για αποφυγή σφαλμάτων. (78)

3.2.3 Multiplex PCR

Η Multiplex PCR (πολυπλεκτική PCR) είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών αλληλουχιών DNA σε μία μόνο αντίδραση. Αυτό εξοικονομεί σημαντικό χρόνο και κόπο, καθώς επιτρέπει την ανάλυση πολλών διαφορετικών στόχων ταυτόχρονα, κάτι που είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε κλινικές ή ερευνητικές εφαρμογές, όπως στην περίπτωση ανάλυσης νερού. (79)

Για να είναι επιτυχής αυτή η τεχνική, απαιτείται να σχεδιαστούν primers (εκκινητές) που είναι ειδικοί για τις διαφορετικές αλληλουχίες DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε και είναι

κρίσιμο να αποφεύγεται ο σχηματισμός δευτερογενών δομών (π.χ. hairpins) ή αλληλεπιδράσεων μεταξύ εκκινητών (primer-dimers). Ταυτόχρονα πρέπει να λειτουργούν αποτελεσματικά μέσα στο ίδιο μείγμα PCR, κάτω από κοινές συνθήκες αντίδρασης. Μετά την αντίδραση, πρέπει να υπάρχουν μέθοδοι ανάλυσης για να διακρίνουν τα διάφορα προϊόντα ενίσχυσης που παράγονται από τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Η ανάπτυξη μιας επιτυχημένης multiplex PCR απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή και πολλές δοκιμές για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης. Πολλοί παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψη, όπως η σχετική συγκέντρωση των εκκινητών, η σύνθεση του μείγματος αντίδρασης και η ισορροπία μεταξύ χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$) και των δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Επίσης, οι θερμοκρασίες κυκλισμού (διαδοχικές φάσεις θέρμανσης και ψύξης για την αποδιάταξη και την επανασύζευξη των κλώνων του DNA) και η ποσότητα του DNA προτύπου (template DNA) και της DNA πολυμεράσης Taq πρέπει να είναι προσεκτικά ρυθμισμένες. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός θερμοκρασίας σύζευξης και συγκέντρωσης του μείγματος για να εξασφαλιστεί η επιτυχής και ειδική ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου πρέπει να είναι κατάλληλα προσαρμοσμένη στην ποσότητα των dNTPs που χρησιμοποιούνται, ενώ η συγκέντρωση των εκκινητών για κάθε στόχο πρέπει να είναι σωστά ρυθμισμένη για να επιτευχθεί ισόρροπη ενίσχυση όλων των αλληλουχιών. (79)

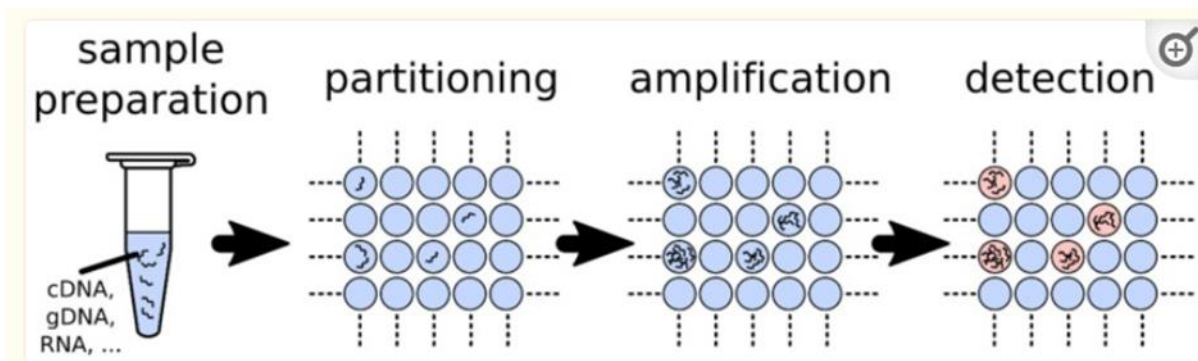
Παρά τη χρησιμότητά της, η multiplex PCR μπορεί να αντιμετωπίσει προβλήματα, όπως η εμφάνιση απροσδόκητων προϊόντων ενίσχυσης, η ανισόμετρη ενίσχυση, όπου μερικοί στόχοι ενισχύονται πιο έντονα από άλλους λόγω διαφορών στη συγκέντρωση εκκινητών ή στην αποτελεσματικότητα των αλληλουχιών, ή η πλήρης αποτυχία ενίσχυσης κάποιων στόχων, και οι δυσκολίες στην αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων. Ωστόσο, η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών αλληλουχιών και εντοπισμού μεταλλάξεων σε μία μόνο αντίδραση εξοικονομεί πολύτιμο χρόνο, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου απαιτούνται άμεσα αποτελέσματα. (79)

3.2.4 Digital PCR (dPCR)

Η Ψηφιακή PCR (dPCR) είναι μια προηγμένη τεχνική PCR που επιτρέπει την απόλυτη ποσοτικοποίηση του DNA χωρίς να απαιτούνται εξωτερικά πρότυπα αναφοράς. Αυτή η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη σε περιπτώσεις όπου πρέπει να ανιχνευθούν ποσότητες DNA από μικροοργανισμούς που μπορεί να είναι σε πολύ μικρό αριθμό αλλά η παρουσία τους στο νερό να είναι απολύτως απαραίτητο να προσδιοριστεί.

Σε αντίθεση με την παραδοσιακή PCR, η dPCR προσφέρει τη δυνατότητα ακριβούς μέτρησης των νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) στο δείγμα, επιλύοντας τα προβλήματα που προκύπτουν από τη χρήση της qPCR (ποσοτικής PCR). (80) Στη dPCR, το αρχικό δείγμα διαιρείται σε πολλές μικρές αντιδράσεις (μικροδιαμερίσματα), όπου κάθε διαμέρισμα μπορεί να περιέχει είτε λίγα μόρια DNA είτε κανένα. Αυτό μειώνει τον ανταγωνισμό μεταξύ διαφορετικών αλληλουχιών DNA. Μετά την PCR, η αναλογία των διαμερισμάτων που παρουσιάζουν θετική ενίσχυση (δηλαδή που περιέχουν το στόχο DNA) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί με στατιστικά ακριβή τρόπο η συγκέντρωση της στοχευμένης αλληλουχίας, με βάση τη στατιστική του Πουασόν. (Εικόνα 3.23.) Αυτό παρέχει μια εξαιρετικά ακριβή μέτρηση της ποσότητας DNA χωρίς την ανάγκη εξωτερικών προτύπων. (81)

Αυτή η διαμερισματοποίηση του δείγματος συγκεντρώνει τις στοχευμένες αλληλουχίες σε απομονωμένους αντιδραστήρες, μειώνοντας τον ανταγωνισμό με άλλα τμήματα DNA. Έτσι, η dPCR μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών σε δείγματα. Επιπλέον, η dPCR μπορεί να είναι πιο ανεκτική σε αναστολείς που υπάρχουν στο δείγμα, καθιστώντας την ιδιαίτερα χρήσιμη σε δύσκολα δείγματα.



Εικόνα 3. 23. Αρχές της digital PCR

Η κύρια διαφορά ανάμεσα στην dPCR και την qPCR είναι στη μέθοδο μέτρησης του DNA. Στην qPCR, η ποσότητα του DNA μετρείται σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, παρακολουθώντας το φθορισμό που παράγεται. Στην dPCR, η ανίχνευση βασίζεται σε τελικές μετρήσεις φθορισμού, όπου μετράται αν τα μικροδιαμερίσματα είναι θετικά (με φθορισμό) ή αρνητικά (χωρίς φθορισμό). Αυτή η προσέγγιση μετατρέπει το αναλογικό σήμα (συνεχές) της qPCR σε δυαδικά αποτελέσματα (0 ή 1), προσφέροντας μεγαλύτερη ακρίβεια χωρίς την ανάγκη βαθμονόμησης με πρότυπα αναφοράς. (82)

Συνοπτικά, η dPCR είναι μια μέθοδος που παρέχει απόλυτη ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων, βασισμένη στην ανίχνευση τελικών φθοριστικών σημάτων και στη χρήση στατιστικών μοντέλων για την ακριβή καταμέτρηση των μορίων DNA στο δείγμα. Η dPCR προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η δυνατότητα ανίχνευσης σπάνιων μεταλλάξεων και η μεγαλύτερη ανοχή σε αναστολείς, γιατί μπορεί να λειτουργεί αποτελεσματικά σε περιβαλλοντικά ή κλινικά δείγματα που περιέχουν αναστολείς της PCR. Είναι κατάλληλη για αναλύσεις όπου απαιτείται υψηλή ακρίβεια, όπως σε δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης DNA. αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις η qPCR μπορεί να παραμένει προτιμότερη λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας της. (83)

Πίνακας 3.2. Διαφορές ανάμεσα σε dPCR και qPCR

Χαρακτηριστικό	qPCR	Dpqr
Μέθοδος Ανίχνευσης	Συνεχής μέτρηση φθορισμού σε κάθε κύκλο PCR.	Τελική μέτρηση φθορισμού σε διαμερίσματα (δυαδικό αποτέλεσμα: θετικό ή αρνητικό).
Ποσοτικοποίηση	Σχετική ή απόλυτη με πρότυπα αναφοράς.	Απόλυτη, χωρίς ανάγκη για πρότυπα αναφοράς.
Ευαισθησία	Υψηλή για γονίδια με μέτριες-υψηλές συγκεντρώσεις.	Πολύ υψηλή για χαμηλές συγκεντρώσεις DNA.
Ακρίβεια σε Αναστολείς	Ευάλωτη σε αναστολείς που επηρεάζουν την PCR.	Μεγαλύτερη ανεκτικότητα σε αναστολείς, λόγω διαμερισματοποίησης.
Αναλογικό vs Δυαδικό Σήμα	Παράγει αναλογικό σήμα που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA.	Παράγει δυαδικό σήμα (0 ή 1), με ακριβή υπολογισμό συγκέντρωσης DNA μέσω στατιστικής.

3.3. Πολιτισμικές Μέθοδοι (Culture-Based Methods)

Οι Πολιτισμικές Μέθοδοι θεωρούνται εξαιρετικά τυποποιημένες τεχνικές, καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της ασφάλειας του νερού (84). Στον πυρήνα των

Πολιτισμικών Μεθόδων βρίσκεται ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία και η ποσότητά τους. Ουσιαστικά, ένα δείγμα νερού τοποθετείται σε ένα μέσο ανάπτυξης, δημιουργώντας συνθήκες που επιτρέπουν στα βακτήρια να πολλαπλασιαστούν με την πάροδο του χρόνου. Αυτά τα βακτήρια στη συνέχεια σχηματίζουν αποικίες που μπορούν να καταμετρηθούν και να ταυτοποιηθούν με τη βοήθεια χρώσης και μικροσκοπίας. (85) Η μικροβιολογία έχει προοδεύσει σημαντικά με την εξέλιξη των μέσων καλλιέργειας, από το υγρό μέσο του Pasteur το 1860 έως το στερεό μέσο του Koch με χρήση άγαρ. (86)

Η χρήση επιλεκτικών μέσων είναι ένα από τα βασικά στοιχεία αυτών των μεθόδων. Τα επιλεκτικά μέσα έχουν σχεδιαστεί ειδικά για να προωθούν την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων, ώστε να εξασφαλίζεται η ακριβής ανίχνευση των στοχευμένων παθογόνων. Για παράδειγμα, η τεχνική μεμβρανικής διήθησης βασίζεται σε αυτή την αρχή. Με τη διήθηση δειγμάτων νερού μέσω πορώδους μεμβράνης, τα βακτήρια συγκρατούνται και στη συνέχεια τοποθετούνται σε επιλεκτικά θρεπτικά μέσα για να αναπτυχθούν τα επιθυμητά παθογόνα και να αναγνωριστούν συγκεκριμένα. Παρόλα αυτά εμφανίζονται προκλήσεις κατά την εργασία με βακτήρια που δεν καλλιεργούνται εύκολα. Αυτοί είναι μικροοργανισμοί με πολύ συγκεκριμένες διατροφικές ή περιβαλλοντικές απαιτήσεις, γεγονός που καθιστά δύσκολη την καλλιέργεια τους σε τυπικά μέσα καλλιέργειας. Απαιτούν ειδικές συνθήκες θρεπτικών ουσιών και ατμόσφαιρας, διαφορετικά μπορεί να απουσιάζουν από τα αποτελέσματα, οδηγώντας σε λανθασμένα ερευνητικά ευρήματα. Αυτό αποτελεί σημαντικό περιορισμό, ιδιαίτερα όταν αυτά τα παθογόνα βακτήρια έχουν περιβαλλοντική σημασία. (16)

Τα σύγχρονα μέσα καλλιέργειας αναπαράγουν τα φυσικά περιβάλλοντα των βακτηρίων, ενσωματώνοντας συγκεκριμένα στοιχεία, επιτρέποντας έτσι την καλλιέργεια βακτηρίων που προηγουμένως ήταν αδύνατον να καλλιεργηθούν. Μια σχετικά γρήγορη μέθοδος καλλιέργειας (72 ώρες) προτάθηκε με φυγοκέντρηση δειγμάτων και τη χρήση τροποποιημένου μέσου Charcoal–Cefoperazone–Deoxycholate agar (που καταστέλλει την ανάπτυξη μικροβίων του υποβάθρου) για την απομόνωση του *Campylobacter* πιο αποτελεσματικά από το πρότυπο ISO 17995 (144 έως 192 ώρες). (87)

Τα πλεονεκτήματα των Πολιτισμικών Μεθόδων είναι ότι μπορούν να παρέχουν σαφή εικόνα των ζώντων βακτηρίων σε ένα δείγμα, καθώς μόνο τα ζώντα κύτταρα θα αναπαραχθούν για να σχηματίσουν αποικίες. Είναι οικονομικές και μπορούν να

πραγματοποιηθούν ακόμη και σε βασικά εργαστήρια, γεγονός που τις καθιστά προσιτές σε πολλούς ερευνητές. Οι μέθοδοι αυτοί (88) έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού σε πόλεις με επίμονες επιδημίες υδατογενών νοσημάτων, ενώ οι μέθοδοι μεμβρανικής διήθησης και καλλιέργειας αναγνωρίζονται από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (US EPA) και θεωρούνται ευρέως ως χρυσές μέθοδοι για την ανίχνευση υδατογενών παθογόνων. (16)

Τα μειονεκτήματα τους είναι ότι είναι χρονοβόρες: Μερικά βακτήρια μπορεί να απαιτούν ημέρες ή εβδομάδες για να σχηματίσουν ορατές αποικίες. Για παράδειγμα, απαιτούνται 4+24 ώρες για την ανάλυση των βακτηρίων E. Coli, 48+4 ώρες για την ανάλυση Enterococcus. 72 ώρες για την ανάλυση αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων. (89) Αυτός ο χρόνος καθυστέρησης θα μπορούσε να είναι προβληματικός όταν χρειάζονται γρήγορα αποτελέσματα για αποφάσεις δημόσιας υγείας. Παρά τους περιορισμούς τους, οι Πολιτισμικές Μέθοδοι παραμένουν κρίσιμα εργαλεία στην ανίχνευση υδατογενών παθογόνων. Οι συνεχιζόμενες εξελίξεις στην καλλιέργεια βακτηρίων αναμένεται να επεκτείνουν την κατανόηση του μικροβιακού φάσματος και να παρέχουν βαθύτερες γνώσεις για την ανίχνευση διαφόρων παθογόνων. (16)

3.4. Μεθοδολογία μεμβρανών φίλτρων

Η τεχνική της Μεμβρανικής Διήθησης βασίζεται στη διήθηση δειγμάτων νερού μέσω μιας πορώδους μεμβράνης. Τα βακτήρια συγκρατούνται στην επιφάνεια της μεμβράνης, η οποία στη συνέχεια μεταφέρεται σε ένα θρεπτικό μέσο για να επιτρέψει την ανάπτυξη και την ανάλυση τους. (16)

Η τεχνική αυτή συμπυκνώνει τους μικροοργανισμούς στη μεμβράνη, διευκολύνοντας την ανίχνευση, επιτρέπει την καταμέτρηση και περαιτέρω ανάλυση, έχει σχετικά μικρότερο χρόνο επώασης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας και είναι κατάλληλη για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε χαμηλή αφθονία. Παρόλα αυτά υπάρχει πιθανότητα απώλειας οργανισμών κατά τη διαδικασία διήθησης και περιορισμένη ευαισθησία για συγκεκριμένα παθογόνα. (16)

Αυτή η μέθοδος αποτελεί έναν από τους "χρυσούς κανόνες" για την ανίχνευση παθογόνων που μεταδίδονται μέσω του νερού και αναγνωρίζεται από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (US EPA). (16)

3.5. Μικροσκοπική ανάλυση

Η μικροσκοπία χρησιμοποιείται κυρίως για την άμεση ανίχνευση μικροοργανισμών, όπως πρωτόζωα και μερικά βακτήρια, στο νερό.

Τεχνικές:

Μικροσκοπία φάσης αντίθεσης: Επιτρέπει την παρατήρηση μη χρωματισμένων μικροοργανισμών χωρίς να χρειάζεται χρώση.

Χρώση κατά Gram: Χρησιμοποιείται για την διαφοροποίηση των βακτηρίων σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά με βάση τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος.

Χρώση φθορισμού: Συγκεκριμένοι φθορίζοντες παράγοντες χρησιμοποιούνται για να εντοπιστούν μικροοργανισμοί. Για παράδειγμα, η χρώση Acridine Orange χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ζωντανών και νεκρών κυττάρων.

Η μικροσκοπία φθορισμού αποτελεί μια τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη τόσο σταθερών όσο και ζωντανών κυττάρων, χρησιμοποιώντας φθορίζουσες χρωστικές για την επισήμανση συγκεκριμένων κυτταρικών δομών ή πρωτεϊνών. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι μικροσκοπίας φθορισμού, όπως:

1. Συμβατική Μικροσκοπία Φθορισμού (Widefield Microscopy, WFM): Φωτίζει ολόκληρο το δείγμα ταυτόχρονα, προσφέροντας μια γενική εικόνα.
2. Συνοπτική Μικροσκοπία (Confocal Microscopy, CFM): Χρησιμοποιεί λέιζερ για στοχευμένο φωτισμό του δείγματος, επιτρέποντας τη λήψη διατομών υψηλής ακρίβειας.
3. Συνοπτική Μικροσκοπία με Περιστρεφόμενο Δίσκο (Spinning Disk Confocal Microscopy): Επιταχύνει τη διαδικασία απεικόνισης με τη χρήση πολλαπλών οπών, κάνοντας τη μέθοδο πιο αποτελεσματική.
4. Μικροσκοπία Υπερ-Ανάλυσης (Super-Resolution Microscopy, SRM): Υπερβαίνει το φυσικό όριο της διάθλασης, χρησιμοποιώντας φακούς ειδικά σχεδιασμένους με αρνητικό δείκτη διάθλασης για μεγαλύτερη λεπτομέρεια. (90)

Πλεονεκτήματα:

Γρήγορη μέθοδος για την ανίχνευση μικροοργανισμών χωρίς καλλιέργεια.

Κατάλληλη για πρωτόζωα και άλλους ευμεγέθεις μικροοργανισμούς.

Μειονεκτήματα:

Δεν παρέχει ακριβείς ποσοτικές πληροφορίες χωρίς εξειδικευμένα εργαλεία.

Περιορισμένη ευαισθησία για μικρούς μικροοργανισμούς.

3.7. Τεχνικές φθορισμού και Immunofluorescence

3.6.1. Τεχνικές Φθορισμού

Οι τεχνικές φθορισμού έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικές για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων που μεταδίδονται μέσω του νερού. Αυτές οι τεχνικές βασίζονται στη χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών που σηματοδοτούν τα μόρια-στόχους, όπως νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες. Το φθορίζον σήμα ανιχνεύεται μέσω φασματοφωτομέτρων ή φθορισμομέτρων. Οι τεχνικές αυτές παρέχουν υψηλή ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων παθογόνων. Χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάλυση πόσιμου νερού, νερού πισίνας και περιβαλλοντικών δειγμάτων. (16)

Οι τεχνικές αυτές πλεονεκτούν ως προς τη γρήγορη ανάλυση και άμεση ταυτοποίηση και την υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, αλλά απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, όπως φασματοφωτόμετρα φθορισμού και υπάρχει πιθανότητα φωτοαλλοίωσης, η οποία μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια της ανάλυσης. (16)

3.6.2. Immunofluorescence (Ανοσοφθορισμός)

Η Immunofluorescence είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος φθορισμού που βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων επισημασμένων με φθορίζοντα μόρια. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση παθογόνων μέσω της ειδικής δέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος. Το σήμα φθορισμού ανιχνεύεται και αναλύεται, παρέχοντας πληροφορίες για την παρουσία και την κατανομή των παθογόνων. Η τεχνική του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται συχνά για την ανίχνευση παθογόνων όπως *Cryptosporidium* και *Legionella* και συνδυάζεται συχνά με μικρορευστομηχανικές τεχνολογίες για ενίσχυση της ακρίβειας. (16)

Η τεχνική πλεονεκτεί λόγω υψηλής ειδικότητας λόγω της χρήσης αντισωμάτων και τη δυνατότητα ανίχνευσης σε σύνθετα δείγματα, όπως δείγματα περιβαλλοντικών υδάτων, αλλά έχει υψηλό κόστος παραγωγής αντισωμάτων και απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμός. (16)

3.7. Ενζυμικές Τεχνικές (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Η Ενζυμική Ανοσοπροσροφητική Δοκιμή (ELISA) είναι μια μέθοδος που βασίζεται σε αντισώματα για την ταυτοποίηση βακτηρίων. Ανιχνεύει τους επιφανειακούς δείκτες των παθογόνων μέσω αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος (91). Η ELISA είναι μια ευρέως αναγνωρισμένη τεχνική για την ανίχνευση παθογόνων. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιεί αντισώματα για να προσδεθούν επιλεκτικά στα αντιγόνα της επιφάνειας των παθογόνων βακτηρίων.

Τα μικροπηγάδια μιας πλάκας καλύπτονται με πρωτογενή αντισώματα που είναι ειδικά για τα αντιγόνα των παθογόνων βακτηρίων που αναλύονται. Στη συνέχεια το δείγμα που θεωρείται ότι περιέχει τα βακτήρια εισάγεται στα πηγαδάκια. Εάν τα παθογόνα βακτήρια είναι παρόντα, τα πρωτογενή αντισώματα θα δεσμευτούν με αυτά, αιχμαλωτίζοντας τα βακτήρια. Στη συνέχεια, προστίθενται δευτερογενή αντισώματα που είναι συζευγμένα με ένα ένζυμο. Τα δευτερογενή αντισώματα δεσμεύονται επίσης στα βακτήρια, σχηματίζοντας ένα "σάντουιτς" αντισώματος-αντιγόνου-αντισώματος. Τέλος, προστίθεται ένα υπόστρωμα που αντιδρά με το ένζυμο, παράγοντας μια ορατή αλλαγή στο χρώμα. Η ένταση αυτής της αλλαγής στο χρώμα είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των παθογόνων βακτηρίων και μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτόμετρο (92).

Οι τεχνικές ELISA διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

1. Άμεση ELISA (Direct ELISA): Τα αντιγόνα του δείγματος συνδέονται με μια στερεή επιφάνεια και ένα συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα εφαρμόζεται για να δεσμευτεί με το αντιγόνο. Το υπόστρωμα προκαλεί αλλαγή στο χρώμα, που μπορεί να μετρηθεί. Είναι απλή μέθοδος αλλά λιγότερο ευαίσθητη λόγω μη ειδικής σύνδεσης.
2. Έμμεση ELISA (Indirect ELISA): Ένα μη συζευγμένο πρωτογενές αντίσωμα δεσμεύεται με το αντιγόνο και στη συνέχεια ένα συζευγμένο δευτερογενές αντίσωμα δεσμεύεται με το πρωτογενές. Αυτή η μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη λόγω της ενίσχυσης του σήματος, αλλά μπορεί να προκαλέσει διασταυρούμενες αντιδράσεις.
3. Sandwich ELISA: Χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα για κάθε αντιγόνο, καθιστώντας την πιο ευαίσθητη μέθοδο. Χρησιμοποιείται συχνά για την ανίχνευση επιβλαβών βακτηρίων σε σύνθετα δείγματα.

4. Ανταγωνιστική ELISA (Competitive ELISA): Χρησιμοποιεί το γνωστό αναλύτη και το άγνωστο δείγμα που ανταγωνίζονται για τις θέσεις σύνδεσης του αντισώματος. Χρησιμοποιείται όταν το αντιγόνο είναι μικρό ή οι θέσεις σύνδεσης του αντισώματος είναι περιορισμένες. (16)

Οι τεχνικές ELISA πλεονεκτούν ως προς το ότι δεν απαιτείται προεπεξεργασία του δείγματος. Έχουν υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία λόγω των αντιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος και είναι αποτελεσματικές μέθοδοι για ταυτόχρονες αναλύσεις πολλών δειγμάτων. Επίσης, είναι ασφαλής και φιλική προς το περιβάλλον, καθώς δεν χρησιμοποιεί ραδιενεργές ουσίες ή μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών. (16)

Αντίθετα μειονεκτούν ως προς το ότι είναι εργαστηριακά απαιτητικές και κοστοβόρες λόγω της ανάγκης παρασκευής αντισωμάτων. Απαιτείται μεγάλος χρόνος επώασης, εκπαιδευμένο προσωπικό και εξειδικευμένο εξοπλισμό. Τέλος μπορεί να προκληθούν ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα λόγω ανεπαρκούς αποκλεισμού της επιφάνειας. (92)

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί αυτοματοποιημένοι και μινιμαλιστικοί ανοσοαισθητήρες για τη βελτίωση της ευαισθησίας και της ταχύτητας. Για παράδειγμα, χάρτινες ELISA: Αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση *E. coli* με χαμηλό κόστος (<1 USD ανά δείγμα) και ταχεία ανίχνευση (<5 ώρες) (93). Παρόμοιες τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση *Salmonella* και άλλων βακτηρίων με μειωμένο κόστος και χρόνο ανίχνευσης (94). Η ELISA παραμένει μια από τις πιο αποδοτικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων, με δυνατότητες βελτίωσης για εφαρμογές στον τομέα της υγειονομικής ασφάλειας νερού.

3.8. Next-Generation Sequencing (NGS) για μικροβιακές κοινότητες

Για την περιβαλλοντική επιτήρηση, η αλληλούχιση DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μικροβίων (βακτηρίων και αρχαίων) που δεν περιλαμβάνονται επί του παρόντος στις συνήθεις δοκιμές, όπως οι δύσκολοι στην καλλιέργεια οργανισμοί, π.χ., *Clostridium* spp. και *Methanobrevibacter* spp.. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ιχνηλάτηση πηγών μικροβιακής μόλυνσης ώστε να εντοπιστούν σημειακές πηγές ρύπανσης και να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα διορθωτικών και ελεγκτικών μέτρων. Πολλές βιομηχανικές διαδικασίες επεξεργασίας αποβλήτων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που εφαρμόζονται στα λύματα, βασίζονται σε πολύπλοκες μικροβιακές ζυμώσεις. Η

αλληλούχιση DNA υψηλής απόδοσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αυτών των διαδικασιών, να παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες για τη βελτιστοποίηση της τεχνολογίας επεξεργασίας λυμάτων (ειδικά αυτών με ιδιόκτητο χαρακτήρα) και να προσφέρει βιολογικές πληροφορίες σχετικά με αποτυχίες στη διαδικασία. (95)

Οι προκλήσεις που σχετίζονται με την εφαρμογή της τεχνολογίας αλληλούχισης DNA για τον χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινοτήτων είναι πολλές και περιλαμβάνουν την ανάπτυξη ανθεκτικών μεθοδολογιών δειγματοληψίας και την εφαρμογή κατάλληλων στατιστικών αναλύσεων. Επιπλέον, μεταξύ της δειγματοληψίας και της στατιστικής ανάλυσης βρίσκεται η απαιτητική επιλογή της σωστής τεχνολογίας αλληλούχισης για την επίτευξη των στόχων παρακολούθησης του νερού και των λυμάτων. Η πληθώρα επιλογών για την επεξεργασία δεδομένων αλληλουχιών μπορεί να είναι αποθαρρυντική για όσους δεν είναι εξοικειωμένοι με τη βιοπληροφορική. (96)

Η SGS περιλαμβάνει την αλληλούχιση εκατομμυρίων μικρών θραυσμάτων DNA (<1000 bp), που συνδέονται με την προέλευσή τους μέσω αλληλουχιών δεικτών. Αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη και ολοκληρωμένη ταυτοποίηση μικροβίων σε σύνθετες κοινότητες, προσφέροντας τη δυνατότητα ταυτοποίησης μη καλλιεργήσιμων οργανισμών, που ενδέχεται να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια ή την επεξεργασία λυμάτων. (96)

Κύριες Τεχνολογίες και Εφαρμογές

3.8.1. 16S rDNA Αλληλούχιση

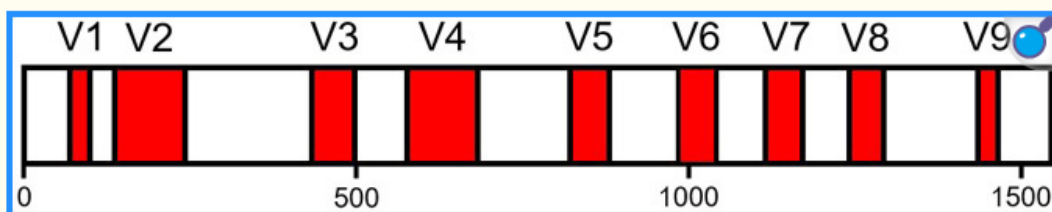
Χρησιμοποιείται κυρίως για τη μοριακή ταυτοποίηση μικροβίων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Αναλύει συγκεκριμένα τμήματα του γονιδίου 16S rDNA που περιλαμβάνουν υπερμεταβλητές περιοχές (HVRs). Αυτές οι περιοχές διαφοροποιούν τις μικροβιακές ταξινομικές ομάδες. Είναι αποτελεσματική για την ταυτοποίηση μικροβιακών γενών, αλλά περιορίζεται στην ακρίβεια του είδους. (96)

Η αλληλούχιση του γονιδίου 16S rDNA αποτελεί την πιο κοινή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μοριακή τεχνική για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα. Εστιάζει σε συγκεκριμένα τμήματα του γονιδίου 16S rDNA, το οποίο κωδικοποιεί τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα RNA των βακτηρίων και των αρχαιοβακτηρίων. Η τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για:

1. Ταυτοποίηση μικροβιακών ειδών.
2. Ανάλυση της μικροβιακής σύνθεσης και ποικιλομορφίας.

Το 16S rDNA περιλαμβάνει συντηρημένες περιοχές, οι οποίες είναι παρόμοιες μεταξύ διαφορετικών μικροοργανισμών, και υπερμεταβλητές περιοχές (V1–V9), που παρουσιάζουν ποικιλομορφία στις αλληλουχίες τους. Οι υπερμεταβλητές αυτές περιοχές χρησιμοποιούνται για την ταξινομική διάκριση μικροβιακών ομάδων. Οι συντηρημένες περιοχές επιτρέπουν τη χρήση καθολικών εκκινητών για την ενίσχυση των HVRs μέσω PCR. Το πλήρες μήκος του γονιδίου 16S rDNA είναι περίπου 1540 bp, αλλά λόγω περιορισμών στις πλατφόρμες SGS, συνήθως ενισχύονται και αλληλουχούνται μόνο τμήματα του 16S rDNA (1–3 HVRs). Οι μικροβιακές ομάδες ταυτοποιούνται με βάση τις αλληλουχίες των HVRs, οι οποίες επιτρέπουν την ταυτοποίηση στο επίπεδο του γένους. Η ακρίβεια για το επίπεδο του είδους είναι χαμηλότερη, εκτός αν υπάρχουν ακριβείς αντιστοιχίες στις βάσεις δεδομένων. (96)

Για τη διαδικασία της 16S rDNA Αλληλούχισης γίνεται δειγματοληψία και Εξαγωγή DNA. Συγκεκριμένα το DNA εξάγεται από μικροβιακά δείγματα νερού, λυμάτων ή άλλων περιβαλλοντικών δειγμάτων και ενισχύεται μέσω PCR με χρήση καθολικών εκκινητών για την ενίσχυση συγκεκριμένων HVRs. Τα ζεύγη εκκινητών ονομάζονται με βάση τη θέση τους στο γονίδιο 16S rDNA του *Escherichia coli* (π.χ., 341f/785r για τις περιοχές V3–V4) (Εικόνα 3.24). Στη συνέχεια, στις ενισχυμένες αλληλουχίες προστίθενται αλληλουχίες δεικτών και συνδέσμων (adapters), που διευκολύνουν τη σύνδεση των δειγμάτων με τις πλατφόρμες αλληλούχισης. (97)



[Open in a new tab](#)

Distribution of V1–V9 hypervariable regions (HVRs) along a linear representation of the *Escherichia coli* 16S rDNA sense strand.

HVRs are shown in red, with widths to scale; white regions represent conserved regions and numbered tick marks indicate nucleotide position.

Εικόνα 3.24. Οι περιοχές HVRs του 16S rDNA του *Escherichia coli* συμβολίζονται με κόκκινο χρώμα. (97)

Οι πλατφόρμες SGS, όπως η Illumina, αλληλουχούν τα τμήματα DNA, παράγοντας εκατομμύρια μικρές αλληλουχίες (reads) και τα δεδομένα περνούν από φιλτράρισμα ποιότητας και ταξινομική ανάθεση. Τα αποτελέσματα ευθυγραμμίζονται με βάσεις δεδομένων όπως οι Greengenes, SILVA και RDP για την ταξινομική τους κατάταξη. (96)

Η 16S rDNA Αλληλούχιση είναι ιδανική για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως νερό, λύματα, έδαφος και τρόφιμα και επιτρέπει την ανίχνευση οργανισμών που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν, προσφέροντας μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της μικροβιακής κοινότητας. Επίσης σε σύγκριση με την WMS, η 16S rDNA αλληλούχιση απαιτεί μικρότερο βάθος αλληλούχισης, με αποτέλεσμα χαμηλότερο κόστος. (96)

Στους περιορισμούς της 16S rDNA Αλληλούχισης εμπεριέχεται η περιορισμένη ανάλυση είδους, μιας και η ταυτοποίηση στο επίπεδο του είδους είναι δύσκολη λόγω έλλειψης διαφορών στις HVRs μεταξύ στελεχών. Επίσης είναι σημαντικό να γίνει σωστή επιλογή εκκινητών, γιατί μπορεί να προκληθεί άνιση ενίσχυση συγκεκριμένων ομάδων μικροβίων (primer bias). (96)

Η 16S rDNA αλληλούχιση είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων, ιδιαίτερα σε περιβαλλοντικά δείγματα. Ενώ έχει περιορισμούς σε επίπεδο είδους και λειτουργικής ανάλυσης, παραμένει η προτιμώμενη μέθοδος για την ταχεία και

οικονομική ταυτοποίηση μικροβίων. Στο πλαίσιο παρακολούθησης της ποιότητας νερού και λυμάτων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτόνομα ή σε συνδυασμό με πιο προηγμένες τεχνικές, όπως η WMS, για πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των μικροβιακών κοινοτήτων. (96)

3.8.2. Ολόκληρη Μεταγονιδιωματική Αλληλούχιση (WMS)

Η ολόκληρη μεταγονιδιωματική αλληλούχιση (WMS) είναι μια τεχνολογία υψηλής ακρίβειας που επιτρέπει την ανάλυση όλων των γονιδιακών αλληλουχιών από μικροβιακές κοινότητες σε ένα δείγμα. Σε αντίθεση με τις στοχευμένες τεχνικές, όπως η 16S rDNA αλληλούχιση, η WMS δεν περιορίζεται σε έναν μόνο γονιδιακό δείκτη, αλλά εξετάζει ολόκληρο το DNA στο δείγμα, παρέχοντας πληροφορίες για τη σύνθεση, τη λειτουργία και την ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων. (96)

Κατά τη διαδικασία της WMS, λαμβάνεται δείγμα και εξάγεται το γονιδιακό DNA. Αυτό περιλαμβάνει DNA από βακτήρια, αρχαία, ιούς, και ευκαρυωτικά κύτταρα. Στη συνέχεια, το DNA κατακερματίζεται τυχαία σε μικρότερα θραύσματα (περίπου 300–600 bp) μέσω μεθόδων όπως νεφελοποίηση ή ενζυματική πέψη και προστίθεται σε αυτά προστίθενται προσαρτήματα (adapters) που διευκολύνουν τη σύνδεση τους στις πλατφόρμες αλληλούχισης. (96)

Η αλληλούχιση πραγματοποιείται σε πλατφόρμες SGS, όπως οι Illumina HiSeq ή NovaSeq, όπου τα θραύσματα αλληλουχούνται σε υψηλό βάθος και τα δεδομένα αλληλουχίας φιλτράρονται για ποιότητα, και τα θραύσματα ευθυγραμμίζονται με βάσεις δεδομένων. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται λογισμικά όπως το MEGAN, Kraken, ή MetaPhlAn για την ταξινομική και λειτουργική ανάλυση. (98)

Στα πλεονεκτήματα της WMS έχουμε την ικανότητά της να ανιχνεύει όλα τα μικρόβια στο δείγμα, ανεξαρτήτως της αφθονίας ή της δυνατότητας καλλιέργειας. Επίσης, παρέχει ανάλυση σε επίπεδο γένους, είδους και υποείδους. Μπορεί να εντοπίσει γονίδια που σχετίζονται με μεταβολικές οδούς, αντοχή σε αντιβιοτικά (ARGs) και λοιμογόνους παράγοντες και επιτρέπει τη μελέτη της μεταβολικής λειτουργίας μικροβιακών κοινοτήτων. Η WMS έχει την ικανότητα ανίχνευσης παθογόνων ή γονιδίων αντοχής που υπάρχουν σε χαμηλή αφθονία και επιτρέπει την ανακάλυψη νέων μικροβιακών ειδών μέσω de novo συναρμολόγησης γονιδιωμάτων. (99) Σε αντίθεση με την 16S rDNA αλληλούχιση, δεν βασίζεται σε εκκινήτες, μειώνοντας την πιθανότητα προκατάληψης (primer bias). (96)

Η WMS είναι ακριβότερη από τις στοχευμένες τεχνικές, λόγω της υψηλής απόδοσης δεδομένων που απαιτείται για την ανάλυση. Επίσης, τα περιβαλλοντικά δείγματα έχουν υψηλή ετερογένεια, και η αλληλούχιση σε χαμηλό βάθος μπορεί να μην ανιχνεύσει οργανισμούς χαμηλής αφθονίας. Η ανάλυση απαιτεί εξειδικευμένα βιοπληροφορικά εργαλεία και μεγάλο υπολογιστικό χρόνο. Τέλος, η WMS δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ DNA από ζώντα και νεκρά κύτταρα, εκτός αν συνδυαστεί με άλλες τεχνικές όπως το RNA-seq. (100)

Η WMS χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων και ιών σε νερό και λύματα και μπορεί να εντοπίσει νέους ή σπάνιους παθογόνους παράγοντες που δεν περιλαμβάνονται στις κλασικές αναλύσεις. Επίσης μπορεί να δώσει πληροφορίες για τα γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά (ARGs) και την εξάπλωση τους μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Τέλος χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση κυανοβακτηριακών ανθίσεων (cHABs), με στόχο την κατανόηση της προσαρμογής τους σε περιβαλλοντικές αλλαγές. (101)

Πίνακας 3.3. Σύγκριση WMS και 16S rDNA

Χαρακτηριστικό	WMS	16S rDNA
Εύρος Ανάλυσης	Ολόκληρο γονιδίωμα	Μόνο 16S rDNA
Λειτουργική Ανάλυση	Ναι	Όχι
Ακρίβεια Είδους	Υψηλή	Μέτρια
Κόστος	Υψηλότερο	Χαμηλότερο
Εφαρμογή σε Παθογόνα	Ανίχνευση και νέων/σπάνιων οργανισμών	Περιορισμένη

Οι πλατφόρμες που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι οι Illumina (π.χ. MiSeq, HiSeq, NovaSeq). Η απόδοση των πλατφορμών διαφέρει ανάλογα με το μοντέλο, με την NovaSeq να έχει τη μεγαλύτερη απόδοση δεδομένων. Κατά την αλληλούχιση 16S rDNA χρησιμοποιούνται εργαλεία όπως το QIIME2, ενώ η DADA2 προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ταξινόμηση μικροβιακών ειδών μέσω ανάλυσης αλληλουχιών. (96)

Η χρήση της 16S rDNA και της WMS δεν είναι ανταγωνιστική αλλά συμπληρωματική: Η 16S rDNA χρησιμοποιείται για την ταχεία ταυτοποίηση δειγμάτων ενδιαφέροντος, ενώ η

WMS εφαρμόζεται για πιο λεπτομερή ανάλυση των δειγμάτων, επιτρέποντας μεγαλύτερη κατανόηση της μικροβιακής κοινότητας και των λειτουργιών της. (102)

Η SGS είναι μια ισχυρή μεθοδολογία για την παρακολούθηση της ποιότητας νερού και λυμάτων. Παρόλο που η εφαρμογή της απαιτεί εξειδίκευση και υψηλό κόστος, οι τεχνολογικές εξελίξεις και η μείωση του κόστους καθιστούν τη SGS όλο και πιο προσιτή. Στο μέλλον, η αυξημένη χρήση της SGS μπορεί να βελτιώσει την κατανόηση των μικροβιακών κοινοτήτων και να ενισχύσει τις τεχνολογίες επεξεργασίας λυμάτων, ιδίως ενόψει των αυξανόμενων προκλήσεων από την κλιματική αλλαγή και την αύξηση του πληθυσμού. (96)

3.9. Ανάλυση με Μικροσυστοιχίες DNA (DNA Microarrays)

Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών, γνωστή και ως εργαστήριο-σε-τσιπ (lab-on-chip) ή τσιπ DNA, είναι ευέλικτη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μικροβίων. Τα εργαστήρια-σε-τσιπ κερδίζουν το όνομά τους επειδή ενσωματώνουν πολλές εργαστηριακές λειτουργίες σε ένα μικρό τσιπ ή υπόστρωμα, επιτρέποντας τη σμίκρυνση των εργαστηριακών διαδικασιών. Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση πολλαπλών στοχευμένων γονιδίων σε μία μόνο ανάλυση. Περιλαμβάνει μια διάταξη υψηλής πυκνότητας νουκλεϊκών οξέων (γονιδιωματικό DNA, συμπληρωματικό DNA ή ολιγονουκλεοτίδια), οργανωμένη σε δισδιάστατη μήτρα. Μέσω της αρχής της υβριδοποίησης, η ειδική ανιχνευτική ουσία που έχει ακινητοποιηθεί στη μικροσυστοιχία αλληλεπιδρά με το συμπληρωματικό γονίδιο-στόχο, οδηγώντας σε ένα φθορίζον σήμα που υποδεικνύει την παρουσία ή την απουσία του στοχευμένου μικροοργανισμού (103). Αυτή η ταυτόχρονη και αποδοτική μέθοδος ανίχνευσης έχει αποδειχθεί πολύτιμη σε διάφορες ερευνητικές εφαρμογές, όπου προσφέρει μια γρήγορη και ολοκληρωμένη εικόνα της μικροβιακής κοινότητας που υπάρχει σε ένα δείγμα. (16)

Οι μικροσυστοιχίες DNA έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες που σχετίζονται με τη μικροβιολογία του νερού. Για παράδειγμα: Χρησιμοποιήθηκε μια μικροσυστοιχία DNA ως εργαλείο διαλογής για την αξιολόγηση της παρουσίας 941 παθογόνων βακτηρίων σε υπόγεια ύδατα. (104) Σε μια άλλη μελέτη, αναπτύχθηκε μια μικροσυστοιχία με πολλαπλά γονίδια-στόχους για την αξιολόγηση της παρουσίας υδατογενών παθογόνων σε μια λεκάνη απορροής μολυσμένη από κόπρανα, αποκαλύπτοντας την παρουσία διαφόρων ιών, βακτηρίων και ευκαρυωτικών οργανισμών (105). Άλλες μελέτες επικεντρώθηκαν στην

ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων σε δείγματα νερού, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών και στελεχών ανθεκτικών σε αντιβιοτικά (106).

Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών προσφέρει το πλεονέκτημα της ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών στόχων και υψηλής κλίμακας προσδιορισμού. Είναι ιδιαίτερα ευέλικτη για την εφαρμογή σε διάφορα ερευνητικά πεδία και επιτρέπει τη γρήγορη και αποτελεσματική αξιολόγηση μικροβιακών κοινοτήτων. Παρόλα αυτά η μη ειδική υβριδοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε υψηλό επίπεδο θορύβου στο παρασκήνιο, μειώνοντας την ειδικότητα. Ο σχεδιασμός αποτελεσματικών ανιχνευτών μπορεί να είναι δύσκολος, ειδικά όταν λείπουν πλήρεις πληροφορίες για τις αλληλουχίες των παθογόνων. Άλλοι περιορισμοί περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος των πειραμάτων, το περιορισμένο εύρος δυναμικής ανίχνευσης και τη σχετικά χαμηλότερη ευαισθησία, ακρίβεια και αξιοπιστία σε σύγκριση με το qPCR (107)

Η άμεση εξέταση υδατογενών παθογόνων με μικροσυστοιχίες μπορεί να είναι δύσκολη λόγω χαμηλών συγκεντρώσεων, γι' αυτό κάποιες προτεινόμενες στρατηγικές περιλαμβάνουν την καλλιέργεια παθογόνων πριν την ανάλυση ή την αύξηση του όγκου των δειγμάτων νερού (108) ή η προ-αντίδραση PCR για εμπλουτισμό των γονιδίων-στόχων, ώστε να βελτιωθεί η ευαισθησία της ανίχνευσης (109).

3.10. Ισοθερμική Ενίσχυση Βρόχου (Loop-Mediated Isothermal Amplification - LAMP)

Η μέθοδος Ισοθερμικής Ενίσχυσης Βρόχου (LAMP) εισήχθη από τον Notomi et al. και επιτυγχάνει την ενίσχυση του DNA σε σταθερή θερμοκρασία, χωρίς τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή. Απαιτεί 4-6 εκκινητές που αναγνωρίζουν 6-8 περιοχές-στόχους DNA, μαζί με μια DNA πολυμεράση που συνθέτει DNA ενώ ταυτόχρονα εκτοπίζει την αλυσίδα. Αυτή η μοναδική διαδικασία δημιουργεί μια δομή βρόχου που επιτρέπει τον εκθετικό πολλαπλασιασμό υπό ισοθερμικές συνθήκες (60–65°C). Η πρόοδος της αντίδρασης μπορεί να παρατηρηθεί μέσω θολότητας ή αλλαγών στη φθορισμό (110).

Στα πλεονεκτήματα της LAMP είναι η απλότητα και αποτελεσματικότητα. Δεν απαιτεί καλλιέργεια βακτηρίων ή περίπλοκη εξαγωγή. Έχει υψηλή ειδικότητα, δηλαδή ανιχνεύει συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχους με ευαισθησία 10 έως λιγότερων μορίων DNA (110). Τα αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν οπτικά χρησιμοποιώντας χαμηλού κόστους αναλυτές θολότητας, διασφαλίζοντας αξιόπιστη ανίχνευση αλληλουχιών DNA στόχου.

Η LAMP εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς όπως στο σχεδιασμό εκκινητών, όπου απαιτούνται 4–6 διαφορετικοί εκκινητές, οι οποίοι πρέπει να σχεδιαστούν προσεκτικά για να διασφαλιστεί η υψηλή ειδικότητα. Η διαδικασία σχεδιασμού μπορεί να είναι χρονοβόρα και παρά την υψηλή ειδικότητα, η LAMP δεν είναι απολύτως απαλλαγμένη από τον κίνδυνο μη ειδικής ενίσχυσης. Η χρήση πολλαπλών εκκινητών μπορεί να ενισχύσει μη-στόχους, οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (111). Συγκεκριμένα η υψηλή αποδοτικότητα ενίσχυσης της LAMP μπορεί να προκαλέσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω επιμόλυνσης.

Η έρευνα σχετικά με τη LAMP έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο, ενσωματώνοντας διάφορες τεχνικές ανίχνευσης, όπως μικρορευστομηχανικές πλατφόρμες και μέθοδοι πιθανότερου αριθμού (MPN). Η προσέγγιση MPN-LAMP χρησιμοποιείται για την άμεση ανίχνευση των *E. coli* και *Enterococcus faecalis*, καταργώντας την ανάγκη για εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να ενισχύσει άμεσα βακτηριακά κύτταρα στους 63°C. (112)

3.11. Νέες Τεχνολογίες Ανίχνευσης (Emerging Detection Technologies)

3.11.1. Ανάπτυξη Μεθόδων με Βιοαισθητήρες

Τα τελευταία χρόνια, υπήρξε επιτάχυνση στην ανάπτυξη τεχνολογιών ανίχνευσης, όπως οι βιοαισθητήρες. Αυτοί παρέχουν μια καινοτόμο λύση για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων, καθώς και για την παρακολούθηση και αξιολόγηση της ποιότητας του νερού. Οι βιοαισθητήρες συνδυάζουν υψηλή ευαισθησία, ταχύτητα απόκρισης και την ικανότητα πραγματικού χρόνου ανάλυσης. Επιπλέον, η ενσωμάτωσή τους με τεχνητή νοημοσύνη (AI) και μηχανική μάθηση (ML) ενισχύει την ικανότητά τους να επεξεργάζονται σύνθετα δεδομένα και να προσφέρουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Οι βιοαισθητήρες βασίζονται σε αναγνωριστικά υλικά, όπως αντισώματα, ένζυμα, νουκλεϊκά οξέα και κύτταρα, τα οποία δεσμεύονται με τους στόχους (π.χ. παθογόνα βακτήρια). Αυτή η βιοαναγνώριση παράγει ένα σήμα, το οποίο μετατρέπεται σε μετρήσιμο ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα από έναν μετατροπέα (113).

Η ανάπτυξη αισθητήρων βασισμένων σε βιολογικές διεργασίες και μικρο- και νανοτεχνολογίες έχει προωθήσει τον τομέα της ανίχνευσης μικροοργανισμών. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πραγματικό χρόνο για την παρακολούθηση

της ποιότητας του νερού και να προσφέρουν φιλικές προς τον χρήστη λύσεις με ευρεία εφαρμογή (114).

Η τεχνητή νοημοσύνη (AI) και η μηχανική μάθηση (ML) έχουν ενσωματωθεί στις τεχνολογίες ανίχνευσης για να βελτιώσουν την ακρίβεια και την ταχύτητα της ανάλυσης δεδομένων. Αυτές οι τεχνολογίες μπορούν να επεξεργάζονται μεγάλες ποσότητες δεδομένων από βιοαισθητήρες και να αναγνωρίζουν μοτίβα, καθιστώντας δυνατή την πρόβλεψη και τον εντοπισμό μικροοργανισμών με μεγαλύτερη ακρίβεια. Για παράδειγμα, το σύστημα Faster R-CNN (region-based convolutional neural networks) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση βακτηρίων *E. coli* που είχαν εκτεθεί σε T7 φάγους, παρέχοντας αποτελέσματα μέσα σε 5.5 ώρες με ακρίβεια 10 CFU/ml (113).

Οι τεχνικές ML χρησιμοποιούνται επίσης για την ανάλυση φασματικών δεδομένων από βιοαισθητήρες, επιτρέποντας την ακριβή αναγνώριση και ποσοτικοποίηση βακτηρίων και άλλων παθογόνων σε υδατικά περιβάλλοντα (115). Η ενσωμάτωση AI και ML όχι μόνο επιταχύνει τη διαδικασία ανίχνευσης, αλλά επίσης μειώνει τα σφάλματα και ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθιστώντας αυτές τις τεχνολογίες ζωτικής σημασίας για τη μελλοντική παρακολούθηση της ποιότητας του νερού.

3.11.2. Βιοαισθητήρες (Biosensors)

Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές συσκευές που μετατρέπουν βιολογικές αντιδράσεις σε μετρήσιμα ηλεκτρικά σήματα. Αποτελούνται από στρώματα βιοαναγνώρισης και μετατροπείς, τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση βιοδεικτών. Τα υλικά αναγνώρισης περιλαμβάνουν αντισώματα, ένζυμα, νουκλεϊκά οξέα, κύτταρα, νανοσωματίδια και άλλες βιομimetικές δομές. Ένας ευαίσθητος μετατροπέας (οπτικός, ηλεκτροχημικός, πιεζοηλεκτρικός) μετατρέπει τη βιοχημική αντίδραση σε ανιχνεύσιμο σήμα (116).

- 1. Οπτικοί Βιοαισθητήρες:** Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση αλλαγών στη φθορισμό, την απορρόφηση φωτός ή άλλες οπτικές ιδιότητες. Παρουσιάζουν υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία, καθώς και ευκολία στη χρήση. Για παράδειγμα, ένας αισθητήρας βασισμένος σε επιφανειακή πλασμονική συντονία (SPR) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση *E. coli*, *Salmonella* και *Staphylococcus* (117). Τα μειονεκτήματα του περιλαμβάνουν τη φωτοαλλοίωση και την περίπλοκη βαθμονόμηση.

2. **Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες:** Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι από τους πιο ανθεκτικούς και συχνά χρησιμοποιούμενους για την ανίχνευση παθογόνων. Η αρχή λειτουργίας βασίζεται σε αλλαγές στην αντίσταση, την αγωγιμότητα ή τη χωρητικότητα, οι οποίες καταγράφονται ως ηλεκτρικά σήματα. Έχουν χαμηλό κόστος και φορητότητα, υψηλή ευαισθησία ακόμη και σε δείγματα με θολότητα και απλή προετοιμασία δείγματος. Παράδειγμα χρήσης έχουμε με ηλεκτρόδια από πολυμερή νανοϋλικά για την ανίχνευση *E. coli* (118).
3. **Πιεζοηλεκτρικοί Βιοαισθητήρες:** Οι πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν κρυσταλλικά υλικά για την ανίχνευση αλλαγών στη συχνότητα ή τη μάζα στην επιφάνεια του αναγνωριστικού στρώματος. Ανιχνεύουν δεσμεύσεις αντιγόνου-αντισώματος μέσω μεταβολών στη μάζα και τη συχνότητα (119). Οι βιοαισθητήρες αυτού πλεονεκτούν στο ότι έχουν χαμηλό κόστος, φιλικότητα προς τον χρήστη και online ανάλυση, αλλά είναι χρονοβόρες οι διαδικασίες αναγέννησης της κρυσταλλικής επιφάνειας και υπάρχει πιθανότητα ψευδών αποτελεσμάτων λόγω ξήρανσης ή επιμολύνσεων.

3.11.3. Εφαρμογές με Νανοσωματίδια και Νανοϋλικά

Η ενσωμάτωση νανοσωματιδίων και άλλων νανοϋλικών στους βιοαισθητήρες έχει ενισχύσει σημαντικά την απόδοση τους, ειδικά στην ανίχνευση υδατογενών παθογόνων.

Εφαρμογή των Νανοσωματιδίων Χρυσού για τον Εντοπισμό Βιομορίων

Η χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) έχει αναδειχθεί ως ένα πολυδύναμο εργαλείο στις βιοεπιστήμες, ιδίως για την ανίχνευση βιομορίων. Αυτά τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται σε διάφορες τεχνικές, όπως στη χρωματογραφική ανίχνευση, όπου ειδικά μόρια πρόσδεσης ή αντισώματα στοχεύουν τα βιομόρια και προκαλούν ορατή αλλαγή χρώματος που μπορεί να ανιχνευθεί με γυμνό μάτι ή φασματοφωτομετρία. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση DNA, πρωτεϊνών και μικρών βιομορίων. (120)

Στην τεχνική επιφανειακής ενισχυμένης σκέδασης Raman, τα AuNPs αυξάνουν το σήμα των μορίων που βρίσκονται στην επιφάνειά τους, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση βιομορίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται για την ανίχνευση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων μικρών μορίων. (121)

Επιπλέον, τα AuNPs ενισχύουν τον φθορισμό φθορίζοντων μορίων, ανάλογα με την απόστασή τους από το νανοσωματίδιο, γεγονός που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία

βιοαισθητήρων βασισμένων στον φθορισμό, όπως για την ανίχνευση DNA. Αντίστροφα, τα AuNPs μπορούν να καταστείλουν τον φθορισμό γειτονικών φθορίζοντων μορίων, μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γενετικού υλικού, όπου η αλλαγή της απόστασης μεταξύ των φθορίζοντων μορίων και των AuNPs μεταβάλλει την ένταση του φθορισμού. (122)

Τα AuNPs χρησιμοποιούνται επίσης σε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες για την ανίχνευση μορίων, όπως η γλυκόζη και η χοληστερόλη, καθώς ενισχύουν την ευαισθησία αυτών των αισθητήρων και προσφέρουν μεγάλη επιφάνεια για την ακινητοποίηση βιομορίων, διευκολύνοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων. (123)

Τέλος, τα AuNPs χρησιμοποιούνται σε τοπικούς αισθητήρες πλασμονίου επιφάνειας, οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στις αλλαγές του τοπικού δείκτη διάθλασης. Αυτό επιτρέπει την παρακολούθηση συνδέσεων, όπως αυτή μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων, σε πραγματικό χρόνο χωρίς να απαιτούνται ετικέτες. (124)

3.11.4. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas) για την Ανίχνευση Παθογόνων Βακτηρίων

Η τεχνολογία Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas) αποτελεί ένα αναδυόμενο εργαλείο μοριακής βιοαισθητήρα για την ανίχνευση DNA, RNA και άλλων βιοδεικτών. Το εργαλείο διαθέτει μοναδικές ιδιότητες ανίχνευσης, όπως αυξημένη εξειδίκευση, ευαισθησία, ανάλυση με ακρίβεια μονοψήφιας βάσης, αντίδραση σε θερμοκρασία δωματίου και επαγόμενη στοχευμένη ανίχνευση (125).

Εκτός από τη μοριακή ανίχνευση, το εργαλείο μπορεί επίσης να ανιχνεύσει μη-μοριακούς ή μη-νουκλεϊνικούς στόχους, όπως πρωτεΐνες, αλλεργιογόνα, εξωτοξίνες, ενδοτοξίνες και DNase. Παρά τα πλεονεκτήματα, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί, όπως είναι οι παρενέργειες εκτός στόχου (off-target effect), οι λάθος τομές του DNA, οι περιορισμοί αλληλουχίας, η αναγκαία προεπεξεργασία δείγματος και οι περιορισμοί δυναμικής περιοχής και πολυπλοκότητα του εξοπλισμού (126).

Οι βιοαισθητήρες που βασίζονται στο CRISPR-Cas έχουν δυνατότητες φθορισμού, χρωματομετρικής, ηλεκτροχημικής, ποιοτικής και ποσοτικής ανίχνευσης μολυσματικών παθογόνων. Επιπλέον, μπορούν να ανιχνεύσουν συγκεκριμένα νουκλεϊκά οξέα και μικρές αλλαγές σε αλληλουχίες με μεγάλη ακρίβεια (127).

Εφαρμογές με Βιοαισθητήρες CRISPR-Cas

CRISPR-Cas12a και Raman Scattering: Συνδυάζοντας CRISPR-Cas12a με ενισχυμένο Raman Scattering και ανάλυση με πολυμεράση ανασυνδυασμού, αναπτύχθηκε υπερ-ευαίσθητη ανίχνευση για *Salmonella typhimurium* με όριο ανίχνευσης 3–4 CFU/ml σε εύρος 1–108 CFU/ml σε 45 λεπτά (128).

CRISPR-Cas12a με Νανοσωματίδια Χρυσού: Σχεδιάστηκε βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της αλληλουχίας *invA* της *Salmonella typhimurium* με συνδυασμό CRISPR-Cas12a και νανοσωματίδια χρυσού. Το όριο ανίχνευσης ήταν 1 CFU/ml με δυναμικό εύρος 1–108 CFU/ml (129).

CRISPR/dCas9 και Silver Nanoclusters (SCENT-Cas): Ενισχυμένη ανίχνευση *E. coli* O157:H7 μέσω του συστήματος SCENT-Cas (130).

Το CHANCE (Cas12a-HCR ενΑΝescent wave fluorescenCE) χρησιμοποιήθηκε για την ταχεία και ευαίσθητη ανίχνευση *E. coli* σε δείγματα πραγματικού περιβάλλοντος. Το όριο ανίχνευσης ήταν 17.4 CFU/ml με εύρος συγκέντρωσης 10 έως 108 CFU/ml σε 50 λεπτά (131).

Πίνακας 3.4. Σύγκριση Τεχνικών Ανίχνευσης Παθογόνων

Μέθοδος	Μηχανισμός Λειτουργίας	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί	Προεπεξεργασία Δείγματος
Καλλιέργεια σε Θρεπτικά Μέσα	Ανάπτυξη βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο.	Απλή και χαμηλού κόστους.	Χρονοβόρα και περιορισμένη σε καλλιεργήσιμα βακτήρια.	Φιλτράρισμα και συμπύκνωση δείγματος αν απαιτείται.
Μεμβρανική Διήθηση	Φιλτράρισμα δείγματος νερού και καλλιέργεια στη μεμβράνη.	Ανίχνευση μικροοργανισμών χαμηλής συγκέντρωσης.	Απώλεια οργανισμών κατά τη διήθηση.	Διήθηση νερού μέσω μεμβράνης κατάλληλου μεγέθους πόρων.
PCR (End-point)	Αντίδραση ενίσχυσης DNA μέσω εκκινητών.	Αξιόπιστη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος.	Δεν παρέχει δεδομένα σε πραγματικό χρόνο.	Εξαγωγή DNA από το δείγμα μέσω λύσης κυττάρων.
qPCR (Ποσοτικό σε Πραγματικό Χρόνο)	Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση DNA με φθορίζοντες ανιχνευτές.	Υψηλή ευαισθησία και ταχύτητα.	Ακριβή αναλώσιμα και εξοπλισμός.	Εξαγωγή και καθαρισμός DNA με κατάλληλες τεχνικές.
dPCR (Digital PCR)	Κατανομή δείγματος σε χιλιάδες αντιδράσεις για απόλυτη ποσοτικοποίηση.	Ακριβής ποσοτικοποίηση χωρίς πρότυπες καμπύλες.	Υψηλό κόστος και περιορισμένη δυναμική εμβέλεια.	Υψηλής ποιότητας εκχύλιση και καθαρισμός DNA.
ddPCR (Droplet Digital PCR)	Κατανομή DNA σε σταγονίδια για μεγαλύτερη ακρίβεια.	Αυξημένη ακρίβεια σε χαμηλές συγκεντρώσεις DNA.	Μακρύτερος χρόνος επεξεργασίας από το qPCR.	Ομοιογενής κατανομή του DNA σε σταγονίδια πριν την αντίδραση PCR.
LAMP (Ισοθερμική Ενίσχυση Βρόχου)	Ενίσχυση DNA σε σταθερή θερμοκρασία.	Γρήγορη, φορητή και οικονομική.	Κίνδυνος ψευδών θετικών λόγω επιμόλυνσης.	Απλή λύση κυττάρων χωρίς εκτεταμένο καθαρισμό DNA.
ELISA	Ανίχνευση αντιγόνων μέσω αντισωμάτων και αλλαγής χρώματος.	Υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία.	Μακροχρόνιες και απαιτητικές διαδικασίες.	Συμπύκνωση πρωτεϊνών και απομόνωση αντιγόνων.

Μικροσυστοιχίες DNA	Υβριδοποίηση DNA/RNA σε μήτρα για ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων.	Ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων.	Υψηλό κόστος και περιορισμένη ειδικότητα.	Εξαγωγή και καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων.
Κυτταρομετρία Ροής	Ανάλυση φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών μικροοργανισμών.	Ταχεία ανάλυση και υψηλή ευαισθησία.	Δεν διακρίνει μεταξύ ζώντων και νεκρών μικροοργανισμών.	Σήμανση κυττάρων με φθορίζοντες δείκτες.
NGS (Αλληλούχιση Νέας Γενιάς)	Μαζική αλληλούχιση DNA για ανάλυση μικροβιοτικής κοινότητας.	Εκτενές προφίλ μικροβιοτικής κοινότητας.	Ακριβός εξοπλισμός και ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό.	Υψηλής ποιότητας εκχύλιση DNA και προετοιμασία βιβλιοθήκης.
Βιοαισθητήρες	Χρήση βιοαναγνώρισης για μετατροπή βιοχημικών σημάτων σε ανιχνεύσιμα σήματα.	Ταχεία, φορητή και οικονομική μέθοδος.	Ευαισθησία σε φυσικοχημικές συνθήκες.	Προετοιμασία δείγματος για αφαίρεση παρεμβατικών ουσιών.

4.Επίλογος

Η εργασία αυτή πραγματεύτηκε διεξοδικά τις μεθόδους ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό, υπογραμμίζοντας τη σημασία τους για την προστασία της δημόσιας υγείας. Το νερό, ως ζωτικής σημασίας φυσικός πόρος, μπορεί να αποτελέσει μέσο μετάδοσης σοβαρών ασθενειών, εάν δεν παρακολουθείται και δεν διασφαλίζεται η ποιότητά του. Γι' αυτό, η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών είναι κρίσιμη, τόσο για την πρόληψη ασθενειών όσο και για τη διατήρηση της περιβαλλοντικής ισορροπίας.

Μέσα από την εργασία, αναδείχθηκαν οι παραδοσιακές τεχνικές ανίχνευσης, όπως οι μέθοδοι καλλιέργειας, οι οποίες αποτελούν τη βάση της μικροβιολογικής ανάλυσης αλλά έχουν περιορισμούς, όπως ο χρόνος και η αδυναμία ανίχνευσης μη καλλιεργήσιμων οργανισμών. Αντίθετα, οι σύγχρονες μοριακές μέθοδοι, όπως η PCR (συμπεριλαμβανομένων παραλλαγών όπως η qPCR και η ψηφιακή PCR), επιτρέπουν την ταχεία, ευαίσθητη και ακριβή ανίχνευση γενετικού υλικού παθογόνων, ανεξάρτητα από την καλλιέργειά τους.

Η ενσωμάτωση προηγμένων τεχνολογιών, όπως η αλληλούχιση DNA (16S rDNA και μεταγονιδιωματική), οι μικροσυστοιχίες DNA και οι βιοαισθητήρες, έχει προσφέρει νέες δυνατότητες ανάλυσης, καθιστώντας εφικτή την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων σε πραγματικό χρόνο. Παράλληλα, οι αναδύμενες τεχνολογίες, όπως οι εφαρμογές CRISPR-Cas και τα νανοϋλικά, διευρύνουν τις προοπτικές για την ανίχνευση παθογόνων, συνδυάζοντας ακρίβεια, ταχύτητα και χαμηλότερο κόστος.

Η εργασία τόνισε, επίσης, την ανάγκη συνδυασμού αυτών των τεχνολογιών με ισχυρά νομοθετικά πλαίσια και προληπτικά μέτρα. Η Ευρωπαϊκή Οδηγία Πλαίσιο για τα Νερά (2000/60/EK) και άλλες εθνικές ρυθμίσεις αποτελούν παραδείγματα για τη συστηματική παρακολούθηση και διαχείριση των υδάτινων πόρων. Αυτές οι πρωτοβουλίες πρέπει να συνδυαστούν με την ενίσχυση της ευαισθητοποίησης του κοινού και τη συμμετοχή των τοπικών κοινωνιών για την καλύτερη κατανόηση και προστασία του νερού.

Η διαχείριση του νερού απαιτεί μια διεπιστημονική προσέγγιση που περιλαμβάνει τη συνεργασία μεταξύ μικροβιολογίας, χημείας, περιβαλλοντικής επιστήμης, μηχανικής και τεχνολογίας. Οι προκλήσεις, όπως η κλιματική αλλαγή, η ρύπανση και η αυξανόμενη

ζήτηση για νερό, καθιστούν αναγκαία τη διαρκή έρευνα και ανάπτυξη νέων εργαλείων και μεθόδων για την εξασφάλιση της ποιότητας του νερού.

Συνοψίζοντας, η ανίχνευση μικροοργανισμών στο νερό δεν είναι μόνο ζήτημα τεχνολογικής και επιστημονικής εξέλιξης, αλλά και κοινωνικής και περιβαλλοντικής ευθύνης. Η διαρκής βελτίωση των τεχνικών, η εφαρμογή καινοτόμων προσεγγίσεων και η θέσπιση αποτελεσματικών στρατηγικών αποτελούν βασικούς πυλώνες για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας και τη βιώσιμη διαχείριση ενός από τους σημαντικότερους φυσικούς μας πόρους.

Βιβλιογραφία

1. Koutsoyiannis, D., Zarkadoulas, N., Angelakis, A., Tchobanoglous, G. Urban water management in Ancient Greece: Legacies and lessons. *Journal of Water Resources Planning and Management* - . . 2008, ASCE, 134 (1), 45–54.
2. De Feo, G., Angelakis, A. N., Antoniou, G. P., El-Gohary, F., Haut, B., Passchier, C. W., Zheng, X. Y. Historical and technical notes on aqueducts from prehistoric to medieval times. *Water*. 2013, 5(4), 1996-2025.
3. Zarkadoulas, N., Koutsoyiannis, D., Manassis, N., Angelakis, A. N. A brief history of Evolution of Water Supply through the Millennia. IWA Publishing,. London, UK, 2012, Ch. 10: 259-270.
4. Longfellow, B. *Roman Imperialism and Civic Patronage: Form, Meaning and Ideology. Monumental Fountain Complexes*. s.l. : s.l. : Cambridge University Press, 2011.
5. Hassan, F. , s.l. Water management and early civilizations: From cooperation to conflict. . *History and future of shared water resources*. s.l. : UNESCO, Paris, France., 2003.
6. Angelakis, A. N., Koutsoyiannis, D., and Tchobanoglous, G. Urban Wastewater and Stormwater Technologies in the Ancient Greece. *Water Research*. 2005, 39(1), 210-220.
7. Björn P. Zietz, Hartmut Dunkelberg. Epidemiological Typing of Legionella pneumophila Serogroup 5 Strains. *Legionella* . 2014, (pp.364-368).
8. Zinn, K. G. Kanonen und Pest: über die Ursprünge der Neuzeit im 14. und 15. Jahrhundert. *Opladen, Westdt. Verl.* 1989.
9. Haeser, H. Lehrbuch der Geschichte der Medicin und der epidemischen Krankheiten. Band 3. *Geschichte der epidemischen Krankheiten*. Jena, G. Fischer. . 1882.
10. . Khan, A.H., Khalil, I.A. and Shah, H. Nutritional Yield and Oil Quality of Canola Cultivars Grown in NWFP. . *Sarhad Journal of Agriculture*. 2004, 20, 287-290.
11. Hays, J. N. Epidemics and pandemics : their impacts on human history . . 2020.
12. Byrne, Joseph P. *Encyclopedia of Pestilence, Pandemics, and Plagues*. s.l. s.l. : σελίδες 175–176., 2008. ISBN 0-313-34102-8..
13. van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EF. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *The New England Journal of Medicine*. January 2006, , 354 (1): 44–53.
14. WHO. Detecting meningococcal meningitis epidemics in highly-endemic African countries. *Weekly Epidemiological Record* . 2003, 78 (33): 294–6.
15. Mitra E., Bolton E. Disease Ontology. 2015.
16. Oon Y.-L., Oon Y.-S., Ayaz M., Deng M., Li L., Song K. Waterborne pathogens detection technologies: advances, challenges, and future perspectives. *Front Microbiol*. 2023 Nov 23, 14:1286923.
17. Ενέργειας, Υπουργείο Περιβάλλοντος και. Οδηγία Πλαίσιο για τα Νερά.
18. Κοινοβούλιο, Ευρωπαϊκό. Πόσιμο νερό στην ΕΕ: βελτίωση της ποιότητας και της πρόσβασης.
19. Υγείας, Υπουργείο. Προστασία νερού Ανθρώπινης κατανάλωσης.
20. Biology, Libretexts. Microorganisms and Water Quality. *National Science Foundation*.

21. **Silva D, Domingues L.** On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015 Mar, 113:400-11.
22. **Savichtcheva, O., Okabe, S.** Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. . *Water Res.* . 2006. , 40,2463–2476.
23. **Bridle, H.** *Waterborne Pathogens: Detection Methods and Applications*, first ed. *Academic Press, Amsterdam.* 2014.
24. **Mendes Silva D., Domingues L.** On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2015, 113 400–411.
25. **Quniston J., Fields P., Tauxe R., and Logsdon J.,.** “Do *Salmonella* carry spare types?”. *Trends in Microbiology.* 2008, pp 142-148. .
26. **Darby J.** “Searching for *Salmonella*”. . 2008.
27. **Todar, K.** *Shigella and Shigellosis.* . *Todar's Online Textbook of Bacteriology.* 2008.
28. **(CDC)., Centers for Disease Control and Prevention.** *Legionella (Legionnaires’ Disease and Pontiac Fever).*
29. **Dey R, Mameri MR, Trajkovic-Bodennec S, Bodennec J, Pernin P.** "Impact of inter-amoebic phagocytosis on the *L. pneumophila* growth". . *FEMS Microbiology Letters.* . September 2020, 367 (18).
30. **Donohue MJ, Pham M, Brown S, Easwaran KM, Vesper S, Mistry JH.** "Water quality influences *Legionella pneumophila* determination". . *Water Research.* (June 2023), 238: 119989.
31. **(WHO)., World Health Organization.** *Legionella and the prevention of legionellosis.* 2007.
32. **Viasus D, Gaia V, Manzur-Barbur C, Carratalà J.** "Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment". . *Infectious Diseases and Therapy.* . June 2022, 11 (3): 973–986.
33. **Canada, Government of.** *Clostridium perfringens: Infectious substances pathogen safety data sheet .*
34. **Rhodehamel J., Harmon S.** *BAM Chapter 16: Clostridium perfringens.* *FDA.* 1998.
35. **Organization, World Health.** *Cholera.*
36. **Παπαπετροπούλου Μ., Μαυρίδου Α.** *Μικροβιολογία του Υδάτος.* 2010.
37. **Montero D., Vidal R., Velasco J., George S., Lucero Y., Gómez L., Carreño L., García-Betancourt R., O’Ryan M.** *Vibrio cholerae*, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development. *Front Med (Lausanne).* 2023 May, 5;10:1155751.
38. **prevention, U.S. center for disease control and.** *About Cholera.*
39. **WHO.** “Guidelines for Drinking-water Quality-4rd Edition”. *The World Health Organisation.* 2008.
40. **prevention, (CDC) U.S. centers for disease control and.** *About Norovirus.*
41. **prevention, (CDC) U.S. centers for disease control and.** *About Norovirus.*
42. **Patel, M.M., και συν.** *Noroviruses: A comprehensive review.* *J. Clin. Virol.* . 2009, 44, 1-8.
43. **R., Goodgame.** *Norovirus gastroenteritis.* *Curr Gastroenterol Rep.* 2006. , Oct;8(5):401-8.

44. **Mouchtouri VA, Bartlett CL, Diskin A, Hadjichristodoulou C.** Water Safety Plan on cruise ships: a promising tool to prevent waterborne diseases. . *Sci Total Environ.* . 2012 , Jul 1;429:199-205. .
45. **MacNeil K., Dodge M., Evans A., Tessier T., Weinberg J., Mymryk J.** Adenoviruses in medicine: innocuous pathogen, predator, or partner. *Trends Mol Med.* 2022 , Nov 4;29(1):4–19.
46. **Khanal S., Ghimire P., Dhamoon A.** The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines.* 2018 , Mar 7;6(1):30.
47. **Martin N., Gonzalez G., Reynolds L., Bennett C., Campbell C, Nolan T., Byrne A., Fennema S., Holohan N., Kuntamukkula S., Sarwar N., Sala-Comorera L., Dean J., Urtasun-Elizari J., Hare D., Liddy E., Joyce E., O'Sullivan J et al.** Adeno-Associated Virus 2 and Human Adenovirus F41 in Wastewater during Outbreak of Severe Acute Hepatitis in Children, Ireland. *Emerg Infect Dis.* 2023 , Apr;29(4):751-760.
48. **J., Cuthbert.** Hepatitis A: Old and New. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001, Vol. 14, No. 1.
49. **Organization, (WHO) World Health.** Hepatitis A. 2023.
50. **Gholizadeh O., Akbarzadeh S., Hashemi M., Gholami M., Amini P., Yekanipour Z., Tabatabaie R., Yasamineh S., Hosseini P., Poortahmasebi V.** Hepatitis A: Viral Structure, Classification, Life Cycle, Clinical Symptoms, Diagnosis Error, and Vaccination. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* . 2023 , Jan 4;2023:4263309.
51. **X. Κουτρομπή, Β.Α. Σεβαστιανός, Γ. Βρυώνη, Α. Τσακρής.** Ηπατίτιδα Ε. *ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE.* 2013, 30(4): 436-448.
52. **R., Adam.** Biology of Giardia lamblia. *Clin Microbiol Rev.* . 2001 , Jul;14(3):447–475.
53. **Hemphill A., Müller N., Müller J.** Comparative Pathobiology of the Intestinal Protozoan Parasites Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, and Cryptosporidium parvum. *Pathogens.* . 2019, Jul 29;8(3):116.
54. **Verweij J, Blangé R., Templeton K., Schinkel J., Brien E., van Rooyen M, van Lieshout L., Polderman A.** Simultaneous Detection of Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, and Cryptosporidium parvum in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004, Mar;42(3):1220–1223.
55. **Verweij, P.E., Brandt, M.E.** Aspergillus, Fusarium and other opportunistic moniliaceous fungi. *P. R. Murray (Ed.), Washington D.C.: ASM Press.* 2007, (9th ed., pp. 1802-1838). .
56. **Stemler J., Többen C., Lass-Flörl C., Steinmann J., Ackermann K., Rath P., Simon M., Cornely O., Koehler P.** Diagnosis and Treatment of Invasive Aspergillosis Caused by Non-fumigatus Aspergillus spp. *J Fungi (Basel).* . 2023, Apr 21;9(4):500.
57. **Araujo, R., Gonçalves Rodrigues, A., & Pina-Vaz, C.** Susceptibility pattern among pathogenic species of Aspergillus to physical and chemical treatments. *Medical Mycology.* 2006, 44(5), 439-443.
58. *Human Pathogens and Toxins Act.* **Canada, Government of.** s.l. : Second Session, Fortieth Parliament, ,, 2009. c. 24. 57-58 Elizabeth II.
59. **Segal, B. H.** Aspergillosis. . *New England Journal of Medicine,* . 2009, 360(18), 1870-1884.
60. **Mayer F., Wilson D., Hube B.** Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence.* . 2013 , Jan 9;4(2):119–128.

61. **Heaney H., Laing J., Paterson L., Walker A., Gow N., Johnson E., MacCallum D., Brown A.** The environmental stress sensitivities of pathogenic *Candida* species, including *Candida auris*, and implications for their spread in the hospital setting. *Medical Mycology*. Volume 58, August 2020, Τόμ. Issue 6, Pages 744–755.
62. **Brinkman N., Haugland R., Wymer L., Byappanahalli M., Whitman R., Vesper S.** Evaluation of a Rapid, Quantitative Real-Time PCR Method for Enumeration of Pathogenic *Candida* Cells in Water. *Appl Environ Microbiol.* . 2003 , Mar;69(3):1775–1782.
63. **Barber C., Crank K., Papp K., Innes G., Schmitz B., Chavez J., Rossi A., Gerrity D.** Community-Scale Wastewater Surveillance of *Candida auris* during an Ongoing Outbreak in Southern Nevada. *Ecotoxicology and Public Health*. January 19, 2023.
64. **Higashi Y., Niimi H., Sakamaki I., Yamamoto Y., Kitajima I.** Rapid Identification of *Candida* Species in Candidemia Directly from Blood Samples Using Imperfect Match Probes. *Scientific Reports*. 02 April 2020.
65. **Sautour M., Lemaître J-P., Ranjard L., Truntzer C., Basmaciyan L., Depret G., Hartmann A., Dalle F.** Detection and survival of *Candida albicans* in soils. *Wiley*. 19 July 2021.
66. **Organization, (WHO) World Health.** *Toxic cyanobacteria in water - Second edition*. 28 February 2021.
67. **Castro Leal A., Carmo Pereira Soares M.** [Hepatotoxicity of the microcystin cyanotoxin]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004, 37 Suppl 2:84-9.
68. **Agency, United States Environmental Protection.** HARMFUL ALGAL BLOOMS AND DRINKING WATER.
69. **Al-Tebrineh J., Kaan Mihali T., Pomati F., Neilan B.** Detection of saxitoxin-producing cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in environmental water blooms by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2010 , Dec;76(23):7836-42.
70. **WHO.** MANAGEMENT OF CYANOBACTERIA IN DRINKING-WATER SUPPLIES:Information for regulators and water suppliers.
71. **Falconer I., Runnegar M., Buckley T., Huyn V.** Using Activated Carbon to Remove Toxicity From Drinking Water Containing Cyanobacterial Blooms. *American Water Works Association*. February 1989, 81(2):102-105.
72. **Billington E, Phang S, Gregson D, Pitout J, Ross T, Church D, Laupland K, Parkins M.** Incidence, risk factors, and outcomes for *Enterococcus* spp. blood stream infections: a population-based study. *Int J Infect Dis*. 2014 , Sep;26:76-82.
73. **Qin Sh., Xiao W., Zhou Ch., Pu Q., Deng X., Lan L., Liang H., Song X., Wu M.** *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 , Jun 25;7(1):199.
74. **K., McKinnon.** Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 , Τόμ. Feb 21, 120:5.1.1-5.1.11.
75. **T., Lorenz.** Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp*. 2012, (63): 3998.
76. **Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993, Sep;11(9):, 1026-30.
77. **Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J.** Real-time PCR detection chemistry. . *Clin Chim Acta*. 2015, Τόμ. Jan 15, 439:231-50.

78. **Wilhelm J, Pingoud A.n.** Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*. 2003, Nov 7;4(11):1120-8.
79. **Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M.** Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002, 16(1):47-51.
80. **Vogelstein B., Kinzler K.W.** Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999, 96:9236–9241.
81. **Dube S., Qin J., Ramakrishnan R.** Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device. *PLoS ONE*. 2008, 3:e2876.
82. **Svec D., Tichopad A., Novosadova V., Pfaffl M.W., Kubista M.** How Good Is a PCR Efficiency Estimate: Recommendations for Precise and Robust qPCR Efficiency Assessments. *Biomol. Detect. Quantif*. 2015, 3:9–16.
83. **Quan Ph., Sauzade M., Brouzes E.** dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*. 2018 Apr, 18(4): 1271.
84. **Tiwari A., Oliver D. M., Bivins A., Sherchan S. P., Pitkänen T.** Bathing water quality monitoring practices in europe and the United States. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021, 18:5513.
85. **Zulu N., Idris A. O., Orimolade B. O., Nkambule T. T. I., Mamba B. B., Feleni U.** Approaches for the detection of Escherichia coli in wastewater: A short review. *Chem. Select*. 2023, 8:e202200598.
86. **Bonnet M., Lagier J. C., Raoult D., Khelaifia S.** Bacterial culture through selective and non-selective conditions: The evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.*. 2020, 34:100622. 10.1016.
87. **Strakova N., Korena K., Gelbicova T., Kulich P., Karpiskova R.** A rapid culture method for the detection of campylobacter from water environments. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021, 18:6098.
88. **[APHA], American Public Health Association.** Standard methods for the examination of water and wastewater. *Washington, DC: American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation, 1368*. 2005, 21st Edn.
89. **Nienie A. B., Sivalingam P., Laffite A., Ngelinkoto P., Otamonga J. P., Matand A., et al.** Microbiological quality of water in a city with persistent and recurrent waterborne diseases under tropical sub-rural conditions: The case of Kikwit City, Democratic Republic of the Congo. *De. Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2017, 220 820–828.
90. **Mavragani I., Nikitaki Z., Kalospyros S., Georgakilas A.** Ionizing Radiation and Complex DNA Damage: From Prediction to Detection Challenges and Biological Significance. *Cancers*. 2019, 11(11), 1789.
91. **Campbell V. R., Carson M. S., Lao A., Maran K., Yang E. J., Kamei D. T.** Point-of-need diagnostics for foodborne pathogen screening. *SLAS Technol.*. 2021, 26 55–79.
92. **Yadav N., Chhillar A. K., Rana J. S.** Detection of pathogenic bacteria with special emphasis to biosensors integrated with AuNPs. *Sens. Int.*. 2020, 1:100028.
93. **Shih C. M., Chang C. L., Hsu M. Y., Lin J. Y., Kuan C. M., Wang H. K., et al.** Paper-based ELISA to rapidly detect Escherichia coli. *Talanta*. 2015, 145 2–5.
94. **Deshmukh R. A., Joshi K., Bhand S., Roy U.** Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: A retrospective minireview. *Microbiologyopen*. 2016, 5 901–922.

95. **Pore SD, Shetty D, Arora P, et al.** Metagenome changes in the biogas producing community during anaerobic digestion of rice straw. *Bioresour Technol*. 2016, 213: 50–53.
96. **Chan A., Naphtali J., Schellhorn H.** High-throughput DNA sequencing technologies for water and wastewater analysis. *Sci Prog*. 2019 Oct 15, 102(4):351–376.
97. **Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al.** Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013, 41(1).
98. **Segata N, Waldron L, Ballarini A, et al.** Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat Methods*. 2012, 9(8): 811–814.
99. **Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, et al.** Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotechnol*. 2013, 31(6): 533–538.
100. **Lennon JT, Muscarella ME, Placella SA, et al.** How, when, and where relic DNA affects microbial diversity. *MBio*. 2018, 9(3): e00637.
101. **Li Q, Lin F, Yang C, et al.** A large-scale comparative metagenomic study reveals the functional interactions in six bloom-forming *Microcystis*-Epibiont communities. *Front Microbiol*. 2018, 9: 746.
102. **Tickle TL, Segata N, Waldron L, et al.** Two-stage microbial community experimental design. *ISME J*. 2013, 7(12): 2330–2339.
103. **Zhang S., Li X., Wu J., Coin L., O'Brien J., Hai F., et al.** Molecular methods for pathogenic bacteria detection and recent advances in wastewater analysis. *Water*. 2021, 13:3551.
104. **Inoue D., Hinoura T., Suzuki N., Pang J., Malla R., Shrestha S., et al.** High-throughput DNA microarray detection of pathogenic bacteria in shallow well groundwater in the Kathmandu Valley, Nepal. *Curr. Microbiol.* . 2015, 70 43–50.
105. **Weidhaas J., Anderson A., Jamal R.** Elucidating waterborne pathogen presence and aiding source apportionment in an impaired stream. *Appl. Environ. Microbiol*. 2018, 84 e2510–e2517.
106. **Bartley P. S., Domitrovic T. N., Moretto V. T., Santos C. S., Ponce-Terashima R., Reis M. G., et al.** Antibiotic resistance in enterobacteriaceae from surface waters in Urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2019, 100 1369–1377.
107. **A., Sezer.** A Review on Microarray technology in molecular diagnostics. *Bioeng. Stud*. . 2021, 2 7–11. 10.37868.
108. **Gomes M., Vieira H., Vale F. F.** Regular paper-field biotechnology title characterization, validation and application of a DNA microarray for the detection of mandatory and other waterborne pathogen. *J. Biochem*. 2015, 158 393–401.
109. **Kostić T., Sessitsch A.** Microbial diagnostic microarrays for the detection and typing of food- and water-borne (bacterial) pathogens. *Microarrays* . 2011, 1 3–24.
110. **Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., et al.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* . 2000, 28:E63.
111. **Martzy R., Kolm C., Brunner K., Mach R. L., Krska R., Šinkovec H., et al.** A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus* spp. in water. *Water Res*. 2017, 122 62–69.

112. **Ahmad R., Ahn M.-S., Hahn Y.-B.** ZnO nanorods array based field-effect transistor biosensor for phosphate detection. . *J. Colloid Interface Sci.* 2017, 498 292–297.
113. **Yi J., Wisuthiphaet N., Raja P., Nitin N., Earles J. M.** AI-enabled biosensing for rapid pathogen detection: From liquid food to agricultural water. . *Water Res.* . 2023, 242:120258.
114. **Petronella F., De Biase D., Zaccagnini F., Verrina V., Lim S.-I., Jeong K.-U., et al.** Label-free and reusable antibody-functionalized gold nanorod arrays for the rapid detection of *Escherichia coli* cells in a water dispersion. . *Environ. Sci. Nano.* 2022, 9 3343–3360.
115. **Song D., Han X., Xu W., Liu J., Zhuo Y., Zhu A., et al.** Target nucleic acid amplification-free detection of *Escherichia coli* O157: H7 by CRISPR/Cas12a and hybridization chain reaction based on an evanescent wave fluorescence biosensor. *Actuators B Chem.* 2023, 376.
116. **Nikhil B., Pawan J., Nello F., Pedro E.** Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* . 2016, 60 1–8. .
117. **ingh A., Verma H., Arora K.** Surface plasmon resonance based label-free detection of *Salmonella* using DNA self assembly. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015 , 175 1330–1343.
118. **Xu M., Wang R., Li Y.** An electrochemical biosensor for rapid detection of *E. coli* O157: H7 with highly efficient bi-functional glucose oxidase-polydopamine nanocomposites and Prussian blue modified screen-printed interdigitated electrodes. *Analyst.* 2016, 141 5441–5449.
119. **Babacan S., Pivarnik P., Letcher S., Rand A. G.** Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. . *Biosens. Bioelectron.* . 2000, 15 615–621.
120. **Baptista, P. V., Doria, G., Henriques, D., Pereira, E., & Franco, R.** Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of Biotechnology.* 2005, 119(2), 111-117.
121. **Grubisha, D. S., Lipert, R. J., Park, H. Y., Driskell, J., & Porter, M. D.** Femtomolar detection of prostate-specific antigen: An immunoassay based on surfaceenhanced Raman scattering and immunogold labels. *Analytical Chemistry.* 2003, 75(21),5936-5943.
122. **Dubertret, B., Calame, M., & Libchaber, A. J.** Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature Biotechnology.* 2001, 19(4), 365-370.
123. **Wang, J., Liu, G., & Jan, M. R.** Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: Carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. *Journal of the American Chemical Society.* 2004, 126(10), 3010-3011.
124. **Mayer, K. M., & Hafner, J. H.** Localized surface plasmon resonance sensors. *Chemical Reviews.* . 2011, 111(6), 3828-3857.
125. **Yin L., Man S., Ye S., Liu G., Ma L.** CRISPR-Cas based virus detection: Recent advances and perspectives. *Biosens. Bioelectron.* 2021, 193: 113541.
126. **Li Y., Man S., Ye S., Liu G., Ma L.** CRISPR-Cas-based detection for food safety problems: Current status, challenges, and opportunities. . *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* . 2022, 21 3770–3798.
127. **Mao Z., Chen R., Wang X., Zhou Z., Peng Y., Li S., et al.** CRISPR/Cas12a-based technology: A powerful tool for biosensing in food safety. *Trends Food Sci. Technol.* . 2022, 122 211–222.

128. **Zhuang J., Zhao Z., Lian K., Yin L., Wang J., Man S., et al.** SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods. . *Biosens. Bioelectron.* 2022, 207.
129. **Ma L., Wang J., Li Y., Liao D., Zhang W., Han X., et al.** A ratiometric fluorescent biosensing platform for ultrasensitive detection of *Salmonella typhimurium* via CRISPR/Cas12a and silver nanoclusters. *J. Hazard. Mater.* 2023, 443.
130. **Li Y., Qiao J., Zhao Z., Zhang Q., Zhang W., Man S., et al.** A CRISPR/dCas9-enabled, on-site, visual, and bimodal biosensing strategy for ultrasensitive and self-validating detection of foodborne pathogenic bacteria. *J. Food Front.* . 2023, 1–11.
131. **Song D., Han X., Xu W., Liu J., Zhuo Y., Zhu A., et al.** Target nucleic acid amplification-free detection of *Escherichia coli* O157: H7 by CRISPR/Cas12a and hybridization chain reaction based on an evanescent wave fluorescence biosensor. *Actuators B Chem.* 2023.
132. **Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., ... & Quaresma, P.** Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2008, 391(3), 943-950.
133. **Yadav N., Chhillar A. K., Rana J. S.** Detection of pathogenic bacteria with special emphasis to biosensors integrated with AuNPs. . *Sens. Int.* 2020, 1:100028.
134. **R., Dolin.** Noroviruses - challenges to control. *N Engl J Med.* 2007, 357:1072- 1073.

Υπέθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν. 1599/1986 και τα άρθρα 2,4,6 παρ. 3 του Ν. 1256/1982, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής εργασίας και δεν προσβάλλει κάθε μορφής πνευματικά δικαιώματα τρίτων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.