



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική»

Διπλωματική Εργασία:

«Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παράσιτων *Cryptosporidium parvum* και *Giardia lamblia* σε επιφανειακά ύδατα του Νομού Χανίων»



Εκπόνηση εργασίας: Μποζιάρη Ελένη – Μαρίνα (Α.Μ. 2010057213)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δρ. Βενιέρη Δανάη

Χανιά
Μάρτιος 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο Πρόγραμμα «Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική» του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του ως άνω Τμήματος, με επιβλέπουσα Καθηγήτρια την Δρ. Βενιέρη Δανάη, την οποία θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος της εργασίας, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κ. Γουνάκη Ιωσηφίνα, υπεύθυνη του εργαστηρίου, για την εξαιρετική συνεργασία, την ουσιαστική βοήθεια και την ακούραστη καθοδήγηση και συμπαράσταση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τους Καθηγητές κ.κ. Διαμαντόπουλο Ευάγγελο και Νικολαΐδη Νικόλαο για το χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε δείγματα από επιφανειακά νερά της ευρύτερης περιοχής του Νομού Χανίων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση, με μοριακές τεχνικές, των παθογόνων παράσιτων *Cryptosporidium parvum* και *Giardia lamblia*. Τα νερά που ελέγχθηκαν χρησιμοποιούνται για την κάλυψη υδρευτικών και αρδευτικών αναγκών. Με δεδομένο ότι η παρουσία των ως άνω παράσιτων στα νερά αυτά εγκυμονεί κινδύνους για τη δημόσια υγεία, καθίσταται επιβεβλημένη η ανάγκη εύρεσης μιας έγκυρης πειραματικής διαδικασίας για το συστηματικό έλεγχό τους.

Μέσα σε αυτά τα πλαίσια, εφαρμόστηκαν η Μέθοδος 1623 της E.P.A. στο στάδιο της δειγματοληψίας, δύο (2) διαφορετικά πρωτόκολλα απομόνωσης γενετικού υλικού και οι μοριακές τεχνικές SYBR Green και TaqMan Real-time PCR. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση σε δείγματα νερών που σχετίζονται με τον έλεγχο των εν λόγω παράσιτων ως προς τους τρεις (3) βακτηριακούς δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης, όπως αυτοί υποδεικνύονται από την ισχύουσα νομοθεσία, με σκοπό τη μελέτη της συσχέτισής τους με την παρουσία των παράσιτων.

Από την ανάλυση των δειγμάτων και τα εξαγόμενα αποτελέσματα προτείνεται μια ενδεδειγμένη μεθοδολογία ανίχνευσης των *C. parvum* και *G. lamblia* για τον έγκυρο και ακριβή έλεγχο των υδάτων που προορίζονται για ύδρευση και άρδευση, με σκοπό τη μέγιστη δυνατή διασφάλιση και προστασία της δημόσιας υγείας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Το νερό στη γη	6
1.2 Μόλυνση επιφανειακών νερών	7
1.3 Υδατογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί	8
1.4 Παρασιτικά πρωτόζωα	11
1.4.1 Κρυπτοσπορίδιο (<i>Cryptosporidium</i>)	11
1.4.2 Γιάρδια (<i>Giardia lamblia</i>)	14
1.5 Επιδημιολογικά στοιχεία Κρυπτοσποριδίωσης και Γιαρδίασης στις ΗΠΑ....	17
1.6 Μέθοδοι απολύμανσης για <i>Cryptosporidium</i> και <i>Giardia</i>	22
1.7 Νομοθεσία για την ποιότητα του πόσιμου νερού.....	24
1.8 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των <i>Cryptosporidium</i> και <i>Giardia</i>	25
1.8.1 Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) - Αρχή λειτουργίας	25
1.8.2 Η Real-time PCR	28
1.8.3 Real-time PCR (SYBR Green, TaqMan).....	33
1.9 Σκοπός εργασίας.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	37
2.1 Υλικά	37
2.1.1 Θρεπτικά υλικά	37
2.1.2 Χημικά υλικά	37
2.1.3 Χημικά Διαλύματα.....	38
2.1.4 Εξοπλισμός δειγματοληψίας.....	38
2.1.5 Εργαστηριακός εξοπλισμός	39
2.1.6 Πρότυπα στελέχη <i>Cryptosporidium</i> και <i>Giardia</i>	39
2.1.7 Real-time PCR: Εκκινητές & Ιχνηθέτες	39
2.2 Μεθοδολογία για ανίχνευση δεικτών	41
2.2.1 Ολικά κολοβακτηριοειδή	41
2.2.2 Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (<i>E. coli</i>)	42
2.2.3 Κοπρανώδεις εντερόκοκκοι	42
2.3 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των <i>Cryptosporidium</i> και <i>Giardia</i>	43
2.3.1 Δειγματοληψία	43
2.3.2 Έκλυση φίλτρων	46
2.3.3 "Συμπύκνωση" δείγματος (Sample Concentration)	47
2.3.4 "Καθαρισμός" δείγματος (Sample Purification)	48
2.3.5 Απομόνωση DNA από Κρυπτοσπορίδιο – Γιάρδια.....	50
2.4 Φωτομέτρηση DNA	52
2.5 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση με Real-time PCR	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
3.1 Μικροβιολογική ανάλυση νερών (Δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης)	55
3.2 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση <i>Cryptosporidium</i> και <i>Giardia</i>	58

3.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού	58
3.2.2 Ανίχνευση <i>Cryptosporidium</i> με TaqMan Real-time PCR	61
3.2.3 Ανίχνευση <i>Cryptosporidium</i> με SYBR Green Real-time PCR.....	62
3.2.4 Ανίχνευση <i>Cryptosporidium</i> με Real-time PCR Kit.....	65
3.2.5 Ανίχνευση <i>Giardia</i> με TaqMan Real-time PCR.....	67
3.2.6 Ανίχνευση <i>Giardia</i> με SYBR Green Real-time PCR	69
3.2.7 Έλεγχος συσχέτισης των παράσιτων με τους βακτηριακούς δείκτες	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	76
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	77
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78
ΣΕΛΙΔΕΣ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ	82

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το νερό στη γη

Οι ανάγκες για νερό αυξάνονται σταθερά τα τελευταία χρόνια, καθώς αυξάνεται ο παγκόσμιος πληθυσμός και τα κοινωνικά πρότυπα των ανεπτυγμένων κυρίως χωρών ταυτίζουν την ευτυχία με την υπερκατανάλωση που συνεπάγεται περαιτέρω αύξηση στην κατανάλωση νερού. Από την άλλη, μειώνονται τα εκμεταλλεύσιμα αποθέματά του λόγω ρύπανσης ή/και μόλυνσης, αλλά και γιατί πρόκειται για έναν περιορισμένο φυσικό πόρο, αφού η ποσότητα του γλυκού νερού στη γη αποτελεί περίπου το 2,5% της συνολικής ποσότητάς του (βλ. Πίνακα 1.1).

Πίνακας 1.1. Κατανομή του νερού στη γη (Κουτάντου, 2006).

Τύπος νερού	Όγκος (10^6 km^3)	Ποσοστό %
Κατανομή του νερού στη γη		
Ωκεανοί & Θάλασσες	1351	97,5
Γλυκό νερό	35	2,5
Συνολική ποσότητα νερού	1386	100,0
Κατανομή γλυκού νερού στη γη		
Πάγος	24,4	69,7
Επιφανειακά νερά	0,1	0,3
Υπόγεια νερά	10,5	30,0
Συνολική ποσότητα γλυκού νερού	35,0	100,0

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι σχεδόν το 70% της συνολικής ποσότητας γλυκού νερού στη γη είναι πάγοι. Πρόκειται για μια τεράστια ποσότητα που όμως είναι μη εκμεταλλεύσιμη βάσει της υφιστάμενης τεχνολογίας. Συνεπώς, οι ολοένα αυξανόμενες ανάγκες για νερό καλύπτονται από επιφανειακά και υπόγεια νερά, με περίπου το 1/3 του γλυκού νερού που χρησιμοποιείται παγκοσμίως να προέρχεται από τους υπόγειους υδροφορείς.

1.2 Μόλυνση επιφανειακών νερών

Τόσο τα επιφανειακά όσο και τα υπόγεια νερά σχηματίζονται και τροφοδοτούνται από τα ατμοσφαιρικά κατακρημνίσματα (βροχή, χιόνι, χαλάζι) που είτε ρέουν επιφανειακά καταλήγοντας σε κάποιον υδάτινο αποδέκτη είτε κατεισδύουν προς τα βαθύτερα στρώματα του υπεδάφους φθάνοντας στους υδροφόρους ορίζοντες.

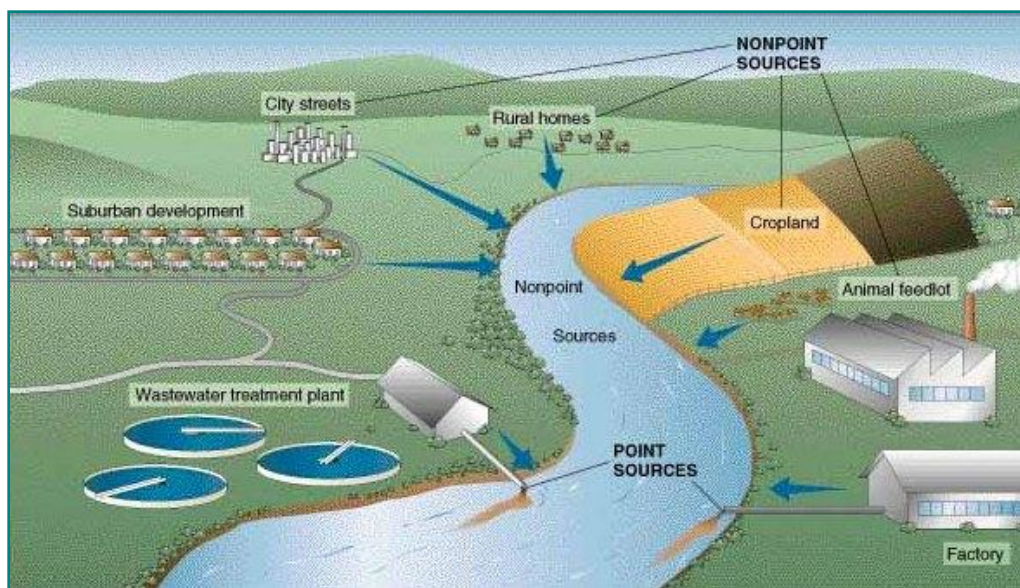
Τα επιφανειακά νερά που χρησιμοποιούνται για την κάλυψη των ανθρώπινων αναγκών σε γλυκό νερό είναι τα υδατορεύματα (ποτάμια, ρυάκια), οι φυσικές λίμνες και οι ταμιευτήρες. Το βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι εκτίθενται άμεσα στις ανθρωπογενείς δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του εδάφους και προκαλούν την υποβάθμισή τους, μέσω ρύπανσης ή/και μόλυνσης.

Η μόλυνση των επιφανειακών νερών οφείλεται στην παρουσία αλλόχθονων κοπρανώδους προέλευσης παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά. Η κοπρανώδης μόλυνση των επιφανειακών υδάτων προέρχεται κυρίως από τις λεγόμενες **σημειακές πηγές**, όπως είναι:

- Η απευθείας διάθεση σε αυτά ανεπεξέργαστων αστικών λυμάτων μέσω παντοροϊκού ή/και χωριστικού αποχετευτικού δικτύου.
- Η διάθεση μη κατάλληλα επεξεργασμένων εκροών από εγκαταστάσεις βιολογικού καθαρισμού.

Μπορεί, όμως, να μεταφέρεται από διάφορες πηγές μέσω της επιφανειακής απορροής (**μη σημειακές**). Σε αυτήν την περίπτωση, προέρχεται από:

- Διαρροές διασταλλαγμάτων από χώρους υγειονομικής ταφής ή εναπόθεσης απορριμμάτων.
- Απόβλητα σταβλικών εγκαταστάσεων και βοσκότοπους.
- Χώρους αποθήκευσης κοπριάς.
- Απορροή από καλλιεργήσιμες εκτάσεις όπου έχει χρησιμοποιηθεί κοπριά ως λίπασμα.
- Περιττώματα άγριων και οικόσιτων ζώων (Εικ. 1.1).



Εικόνα 1.1. Πηγές μόλυνσης των επιφανειακών υδάτων

(<http://www.isaveearth.org/Waterpollutionsources.htm>)

Μέσα από την επιφανειακή απορροή και την κατείσδυση του νερού στο υπέδαφος, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν εύκολα να μεταφερθούν σε επιφανειακά νερά και σε υπόγειους υδροφορείς, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια ή και μετά από περιόδους έντονης βροχόπτωσης (Williams et al., 2008). Αυτό συμβαίνει γιατί οι κόκκοι του εδάφους στην ακόρεστη ζώνη κινητοποιούνται μετά από μια καταιγίδα και λειτουργούν ως μεταφορικό μέσο των παθογόνων μικροοργανισμών που κατά κανόνα προέρχονται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες στην επιφάνεια της γης (Pronk et al., 2009).

1.3 Υδατογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί

Το νερό που προορίζεται για πόση και γενικότερα για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι ακίνδυνο από κάθε πλευρά που σημαίνει ότι δεν πρέπει να περιέχει παθογόνα μικρόβια και χημικές ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που συνιστούν πιθανό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Εντούτοις, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό

Υγείας, κάθε χρόνο πεθαίνουν περίπου 3,3 εκατ. άνθρωποι εξαιτίας λοιμώξεων από υδατογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι περισσότεροι από τους θανάτους αυτούς συμβαίνουν σε αναπτυσσόμενες χώρες. Ωστόσο, αυτοί οι μικροοργανισμοί αποτελούν τη σημαντικότερη αιτία πρόκλησης διάρροιας και άλλων γαστρεντερικών διαταραχών τόσο σε αναπτυγμένες όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες. Στις ΗΠΑ έχει υπολογιστεί ότι ένα εκατομμύριο ασθένειες και περίπου 1000 θάνατοι ετησίως προκαλούνται από την κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού (Coffey et al., 2007).

Η μικροβιολογική εξέταση του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης είναι πρωταρχικής σημασίας για την πρόληψη των υδατογενών λοιμώξεων που προκαλούνται από την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών κοπρανώδους προέλευσης σε αυτό. Επειδή ο έλεγχος για την ανίχνευση όλων των παθογόνων μικροβίων που προέρχονται από το γαστρεντερικό σύστημα των θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων απαιτεί πολύπλοκες, χρονοβόρες και πολυέξοδες αναλύσεις, επικράτησε η ιδέα της ανίχνευσης μικροβίων - δεικτών που να είναι ενδεικτικοί ακόμη και της παρουσίας λυμάτων στο νερό.

Οι μικροβιακοί δείκτες είναι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί που εισέρχονται σταδιακά στο υδάτινο περιβάλλον και προέρχονται συνήθως από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Η ανίχνευσή τους σε εξεταζόμενο δείγμα νερού δηλώνει την παρουσία και άλλων εντερικών παθογόνων, ενώ για την επιλογή τους θα πρέπει να πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις, όπως:

- Να είναι μετρήσιμοι σε περιβαλλοντικά δείγματα με εύκολες, μη δαπανηρές, ακριβείς και επαναλήψιμες τεχνικές.
- Να είναι ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές πιέσεις.
- Να έχουν σταθερά χαρακτηριστικά.
- Να έχουν σταθερή και αποκλειστική σχέση με την πηγή των παθογόνων.
- Να υπάρχουν σε ικανό αριθμό στα περιβαλλοντικά δείγματα χωρίς να πολλαπλασιάζονται ή να υφίστανται σημαντικές γενετικές αλλαγές ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν ικανοποιητικά (Βενιέρη Δ., 2011).

Οι κυριότερες μικροβιολογικές παράμετροι που προβλέπεται από την ισχύουσα νομοθεσία να εξετάζονται ως δείκτες ποιότητας του πόσιμου νερού είναι:

- Τα **Ολικά κολοβακτηριοειδή**.
- Τα **Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή** (*Escherichia coli*).
- Οι **Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι** (εντερόκοκκοι).

Η σημασία της ανεύρεσης καθενός από τους παραπάνω δείκτες έγκειται στο ότι παρέχει με αρκετή σιγουριά πληροφορίες αφενός για το είδος της μόλυνσης του νερού από το οποίο λήφθηκε το εξεταζόμενο δείγμα και αφετέρου για την παρουσία και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Έτσι, λοιπόν:

- Τα **Ολικά κολοβακτηριοειδή** (Total coliforms) περιλαμβάνουν όλα τα gram-αρνητικά αερόβια και δυνητικά αναερόβια βακτήρια που είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση. Ακριβώς επειδή δεν προέρχονται μόνον από το γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων, ο δείκτης αυτός έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση από αρκετούς ερευνητές που δεν τον χρησιμοποιούν πλέον για τον έλεγχο της κοπρανώδους μόλυνσης των νερών.
- Τα **Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή** (Fecal coliforms) βρίσκονται κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων και αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Η παρουσία τους στο νερό δηλώνει πρόσφατη μόλυνση κοπρανώδους προέλευσης που πιθανώς συνοδεύεται και από άλλα εντερικά παθογόνα. Το συχνότερο και πιο αντιπροσωπευτικό μέλος αυτής της ομάδας βακτηρίων είναι η *Escherichia coli* (*E. coli*).
- Οι **Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι** (Fecal streptococci) αποτελούν μια ομάδα βακτηρίων που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων. Συνεπώς, η ύπαρξή τους στο νερό δηλώνει ξεκάθαρα μόλυνση κοπρανώδους προέλευσης και πιο συγκεκριμένα τα είδη *S. faecalis* και *S. faecium* δείχνουν μόλυνση από ανθρώπινα κόπρανα (Βενιέρη Δ., 2011).

1.4 Παρασιτικά πρωτόζωα

Τα παρασιτικά πρωτόζωα αποτελούν μια ειδική κατηγορία υδατογενών παθογόνων μικροοργανισμών που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία, καθώς λίγες μελέτες έχουν συγκρίνει τη συχνότητα εμφάνισής τους με εκείνη των δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης. Οι πιο κοινές παρασιτικές γαστρεντερικές ασθένειες στον άνθρωπο είναι η **Κρυπτοσποριδίωση** και η **Γιαρδίαση** που προκαλούνται από τα παράσιτα του γένους *Cryptosporidium* και *Giardia*, αντίστοιχα.

1.4.1 Κρυπτοσπορίδιο (*Cryptosporidium*)

Τα είδη του γένους *Cryptosporidium* αποτελούν μια ομάδα παρασιτικών πρωτόζωων που χαρακτηρίζονται ως παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Περισσότερα από 40 είδη θηλαστικών, μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος, φιλοξενούν αυτά τα παθογόνα. Τα ονόματά τους προέρχονταν αρχικά από το είδος του ξενιστή που τα φιλοξενούσε (Xiao et al., 2004).

Οι πιο πρόσφατες μελέτες με μοριακές εργαστηριακές μεθόδους έχουν δείξει ότι τα είδη που προσβάλλουν περισσότερο τον άνθρωπο είναι το *C. hominis* (προσφάτως γνωστό και ως *C. parvum* genotype I) και το *C. parvum* (γνωστό και ως *C. parvum* genotype II) (Yoder et al., 2010). Στις αναπτυσσόμενες χώρες, το 70% των λοιμώξεων από *Cryptosporidium* προκαλούνται από το *C. hominis* που μαζί με το *C. parvum* είναι τα βασικά είδη που αναφέρονται και στις αναπτυγμένες χώρες (Xiao, 2010). Σε μικρότερη έκταση, ο άνθρωπος μολύνεται και από τα είδη *C. felis* (γάτες), *C. canis* (σκυλιά), *C. meleagridis* (πουλιά), *C. suis* (γουρούνια), *C. muris* (τροκτικά), *C. andersoni*, *C. baileyi* και *C. corvine* (διάφορα ζώα) (Fayer, 2010; Yoder et al., 2010). Τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το είδος του παράσιτου που έχει μολύνει τον ανθρώπινο οργανισμό (Cama et al., 2008).

Το κρυπτοσπορίδιο βρίσκεται παντού στο περιβάλλον με τη μορφή των ανθεκτικών του ωοκύστεων, ενώ Κρυπτοσποριδίωση είναι η διαρροϊκή ασθένεια που προκαλείται στον άνθρωπο από την τυχαία κατάποσή τους. Αρχικά, τη θεωρούσαν ως μια νόσο των ζώων

και μόλις το 1976 διαγνώσθηκε για πρώτη φορά ως ανθρώπινη ασθένεια που μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο μέσω πολλαπλών οδών (Fayer, 1997). Παρόλο που θεωρείται πιθανή και η αερογενής μετάδοση των ωοκύστεων *Cryptosporidium*, μέσω της εισπνοής, ο πιο συνηθισμένος τρόπος μετάδοσης είναι η κατάποση. Αυτός περιλαμβάνει τη μετάδοση από άτομο σε άτομο και την κατάποση μολυσμένου πόσιμου νερού ή νερού αναψυχής (κολύμβηση) ή μολυσμένης τροφής (Sunderland et al., 2007).

Οι ωοκύστες (oocysts) του κρυπτοσποριδίου έχουν μέγεθος 4-6 μm (Εικ. 1.2) και μετά την κατάποσή τους αποικίζουν το λεπτό έντερο του ανθρώπου. Εκεί απελευθερώνουν τα σποροζώδια (sporozoites) που αποτελούν τις λοιμογόνες μορφές του πρωτόζωου (Εικ. 1.3). Τα σποροζώδια εισέρχονται κινούμενα στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου (το προτιμώμενο σημείο της λοίμωξης είναι ο ειλεός του λεπτού εντέρου), τα οποία και καταστρέφουν, ενώ μετατρέπονται στα επίσης κινούμενα μεροζώδια (merozoites) που με τη σειρά τους εισέρχονται σε άλλα κύτταρα του εντέρου.

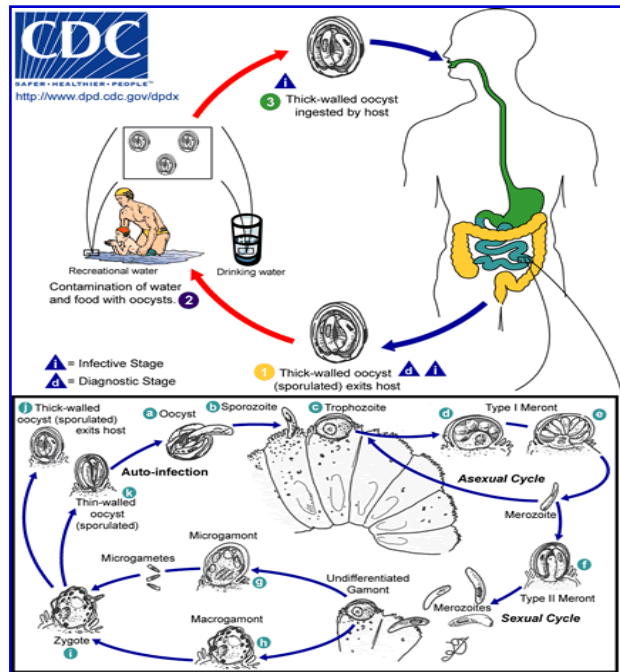


Εικόνα 1.2. Ωοκύστες κρυπτοσποριδίου
(<http://www.marvistavet.com/html/cryptosporidium.html>)



Εικόνα 1.3. Σποροζώδια κρυπτοσποριδίου
(http://www.waterfilterreview.com/info_h2o/contaminants/)

Στη συνέχεια, μέσα στα εντερικά κύτταρα, τα κινούμενα μεροζώδια εξελίσσονται σε θηλυκούς και αρσενικούς μικρογαμέτες που ενώνονται και σχηματίζονται εκ νέου οι ωοκύστες. Οι τελευταίες εξέρχονται με τα κόπρανα στο περιβάλλον, ωριμάζουν και ο ως άνω περιγραφόμενος κύκλος ζωής του κρυπτοσποριδίου επαναλαμβάνεται, μετά την κατάποσή τους από κάποιον νέο ξενιστή (Εικ. 1.4).



Εικόνα 1.4. Ο κύκλος ζωής του κρυπτοσποριδίου στον ανθρώπινο οργανισμό
(<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Cryptosporidiosis.htm>)

Η μολυσματική δόση για να νοσήσει ο άνθρωπος είναι μικρή. Κάποιες μελέτες κάνουν λόγο για 10 ωκύστες *Cryptosporidium* (Castro-Hermida et al., 2009) και κάποιες άλλες αναφέρουν ότι αρκούν 10-30 ωκύστες για να νοσήσει ένα υγιές άτομο (Yoder et al., 2010). Ο χρόνος επώασης, δηλ. το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την κατάποσή τους μέχρι την εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου, είναι 2 - 10 ημέρες. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται αρχικά είναι απώλεια της όρεξης, ναυτία και κοιλιακό άλγος. Ακολουθούν συνήθως διάρροια, εμετοί (ιδιαίτερα στα παιδιά), κόπωση, αξιοσημείωτη απώλεια βάρους, ενώ ενδέχεται να παρουσιαστεί και πυρετός. Παρόμοια συμπτώματα εμφανίζουν συνήθως και τα μολυσμένα ζώα.

Η Κρυπτοσποριδίωση είναι μια λοίμωξη που διαρκεί περίπου δύο (2) εβδομάδες σε άτομα με υγιές ανοσοποιητικό σύστημα. Εντούτοις, μπορεί να απειλήσει τη ζωή των ανοσοκατεσταλμένων ατόμων (μικρά παιδιά, ηλικιωμένοι, καρκινοπαθείς, ασθενείς με AIDS, ασθενείς με μόσχευμα), δεδομένου ότι δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία

(Fayer, 2004). Τα άτομα που έχουν προσβληθεί από *Cryptosporidium* συνεχίζουν να αποβάλλουν ωοκύστες μέσω των κοπράνων μέχρι και 50 ημέρες αφού σταματήσει η διάρροια, ενώ με μια μόνο σύσπαση του εντέρου μπορούν να αποβληθούν 10^8 - 10^9 ωοκύστες που είναι άμεσα μολυσματικές (Boak and Packman, 2001).

Οι ωοκύστες του κρυπτοσποριδίου στα επιφανειακά νερά προέρχονται κυρίως από τα κόπρανα θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων, ενώ μπορούν να επιβιώσουν σε αυτά για μεγάλες χρονικές περιόδους. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι μπορούν να επιβιώσουν σε τεχνητό θαλασσινό νερό για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους σε θερμοκρασία 4 °C (Castro-Hermida et al., 2009). Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στις συνήθεις δόσεις χλωρίου που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση του πόσιμου νερού και των νερών αναψυχής (κολυμβητικές πισίνες). Εξαιτίας αυτών των χαρακτηριστικών, η υδατογενής μετάδοση του κρυπτοσποριδίου (ιδιαίτερα του *C. parvum*) αποτελεί ένα από τα πιο ανησυχητικά ζητήματα της δημόσιας υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η μεγαλύτερη επιδημία υδατογενούς Κρυπτοσποριδίωσης καταγράφηκε την άνοιξη του 1993 στο Milwaukee των Η.Π.Α., όπου 403.000 κάτοικοι αρρώστησαν και πάνω από 100 πέθαναν εξαιτίας της κατανάλωσης μολυσμένου πόσιμου νερού. Στην Ευρώπη, το πρώτο καταγεγραμμένο κρούσμα εκδηλώθηκε στο Midland της Ιρλανδίας, τον Απρίλιο του 2002 (πόσιμο νερό). Το Μάρτιο του 2007, το παράσιτο ανιχνεύθηκε στο δίκτυο ύδρευσης του Galway της Ιρλανδίας, με αποτέλεσμα να νοσήσουν περισσότεροι από 5.000 άνθρωποι. Πιο πρόσφατα, το Νοέμβριο του 2010, περίπου 12.400 κρούσματα της νόσου αναφέρθηκαν στο Östersund της Σουηδίας (πόσιμο νερό) (Coffey, 2007).

1.4.2 Γιάρδια (*Giardia lamblia*)

Η *Giardia lamblia* (ή αλλιώς *Giardia duodenalis* και *Giardia intestinalis*) είναι το πιο κοινό εντερικό παράσιτο στον άνθρωπο. Προκαλεί τη διαρροϊκή ασθένεια **Γιαρδίαση** ή **Λαμβλίαση** που εκδηλώνεται συνήθως με διάρροιες, κοιλιακές κράμπες, φούσκωμα και απώλεια βάρους. Σε παγκόσμιο επίπεδο, είναι το παράσιτο που σχετίζεται περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο με τις επιδημίες υδατογενών ασθενειών (Karanis et al., 2007).

Μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί συνολικά έξι (6) είδη *Giardia*: Η *G. agilis* από αμφίβια, οι *G. ardeae* και *G. psittaci* από πουλιά, η *G. muris* από ποντίκια, η *G. microti* από αρουραίους και η *G. duodenalis* από μια πληθώρα άλλων θηλαστικών ζώων (Plutzer et al., 2010).

Οι πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή επιδημιολογία έχουν επιτρέψει την αναγνώριση εξειδικευμένων γενετικών ομάδων του παράσιτου. Έχει βρεθεί, λοιπόν, ότι τα συμπλέγματα A και B της *G. lamblia* προσβάλλουν κυρίως τους ανθρώπους και τα ανώτερα θηλαστικά, τα συμπλέγματα C και D τα σκυλιά, το σύμπλεγμα F τις γάτες και το G τα τρωκτικά. Αυτό δείχνει ότι το επίπεδο μετάδοσης της νόσου από τα ζώα στον άνθρωπο δεν είναι τόσο υψηλό όσο θεωρείτο αρχικά (Yoder et al., 2010).

Ο κύκλος ζωής της *G. lamblia* περιλαμβάνει τις κύστες (cysts) και τα τροφοζώidia (trophozoites) (Εικ. 1.5 & 1.6). Οι κύστες έχουν σχήμα οβάλ και μήκος περίπου 7-10 μm. Είναι ανθεκτικές στο περιβάλλον και ευθύνονται για τη μετάδοση της Γιαρδίασης. Μπορούν να επιβιώσουν ακόμη και στις συνηθισμένες δόσεις χλωρίου που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση του πόσιμου νερού.



Εικόνα 1.5. Κύστες γιάρδιας
(http://www.epa.gov/microbes/gda_seq1.html)

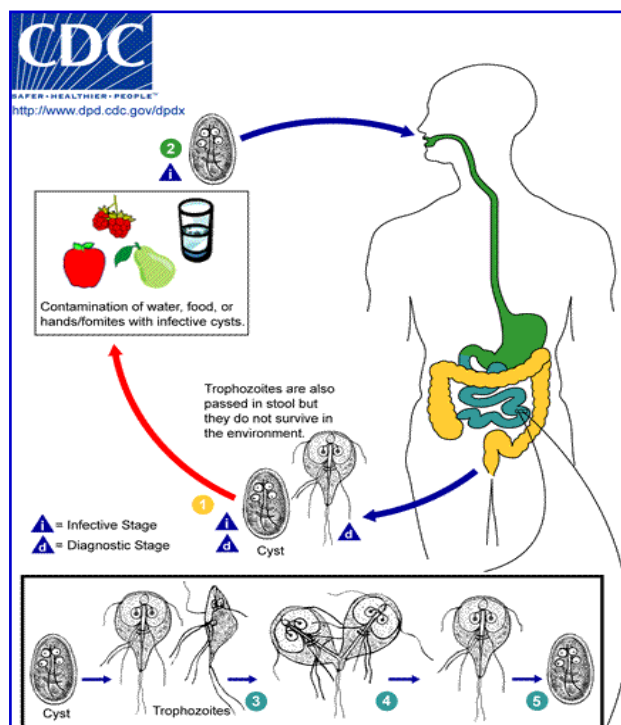


Εικόνα 1.6. Τροφοζώδιο γιάρδιας
(<http://www.biotech-weblog.com>)

Η μόλυνση λαμβάνει χώρα μετά την κατάποση των κύστεων που σηματοδοτεί και την έναρξη του κύκλου ζωής της γιάρδιας. Η μολυσματική δόση που χρειάζεται να καταναλώσει ο άνθρωπος για να νοσήσει εκτιμάται σε 10 κύστεις (Castro-Hermida et al., 2009). Για όσο διαρκούν τα συμπτώματα της νόσου, το μολυσμένο άτομο μπορεί να αποβάλλει με τα κόπρανα 10^8 - 10^9 κύστεις ημερησίως. Η αποβολή, όμως, κύστεων συνεχίζεται ακόμη και για μήνες μετά την υποχώρηση των συμπτωμάτων.

Στον κύκλο ζωής της γιάρδιας (Εικ. 1.7), οι ώριμες κύστεις που επιβιώνουν από την έκθεσή τους στο γαστρικό υγρό απελευθερώνουν στο λεπτό έντερο τα τροφοζώδια. Τα τελευταία που ευθύνονται για την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων της Γιαρδίασης στους ανθρώπους έχουν το σχήμα κουταλιού και το μήκος τους είναι περίπου 12-15 μm . Αποικίζουν το λεπτό έντερο, πολλαπλασιάζονται με διαμήκη δυαδική σχάση και καθώς κινούνται προς το χοντρό έντερο μετατρέπονται και πάλι σε κύστεις που αποβάλλονται στο περιβάλλον με τα κόπρανα και είναι άμεσα μολυσματικές (Plutzer et al., 2010).

Παρόλο που οι τρόποι μετάδοσής της στον άνθρωπο είναι παρόμοιοι με εκείνους του *Cryptosporidium*, η *G. lamblia* είναι πιο διαδεδομένη στο περιβάλλον (επιφανειακά νερά, έδαφος). Οι κύστεις γιάρδιας μπορούν να επιβιώσουν στο νερό για περισσότερο από 2 μήνες ($<8^\circ\text{C}$), καταστρέφονται όμως με βρασμό, ξήρανση, κύκλους ψύξης/απόψυξης και με θέρμανση (Robertson & Gjerde, 2004).

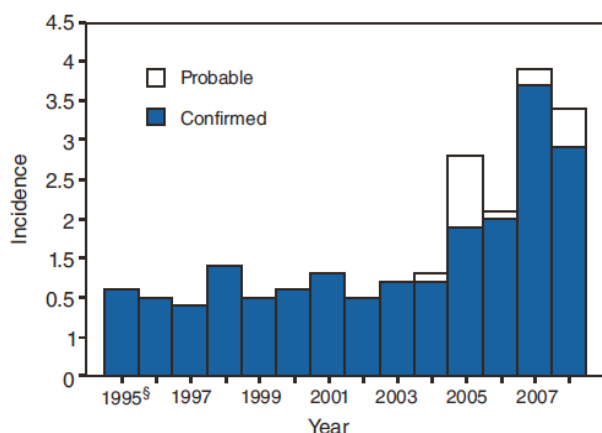


Εικόνα 1.7. Ο κύκλος ζωής της γιάρδιας
(<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Giardiasis.htm>)

Στην Ευρώπη, η μεγαλύτερη επιδημία Γιαρδίασης καταγράφηκε το 2004 στη Νορβηγία. Η μόλυνση προκλήθηκε από την κατανάλωση μολυσμένου με *G. duodenalis* πόσιμου νερού, με αποτέλεσμα να νοσήσουν περίπου 1500 άτομα. Η μη ή η ελλιπής επεξεργασία του πόσιμου νερού είναι οι πιο συχνές αιτίες της εμφάνισης κρουσμάτων Γιαρδίασης. Οι διεργασίες διήθησης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στην απομάκρυνση των κύστεων γιάρδιας (Plutzer et al., 2010).

1.5 Επιδημιολογικά στοιχεία Κρυπτοσποριδίου και Γιαρδίασης στις ΗΠΑ

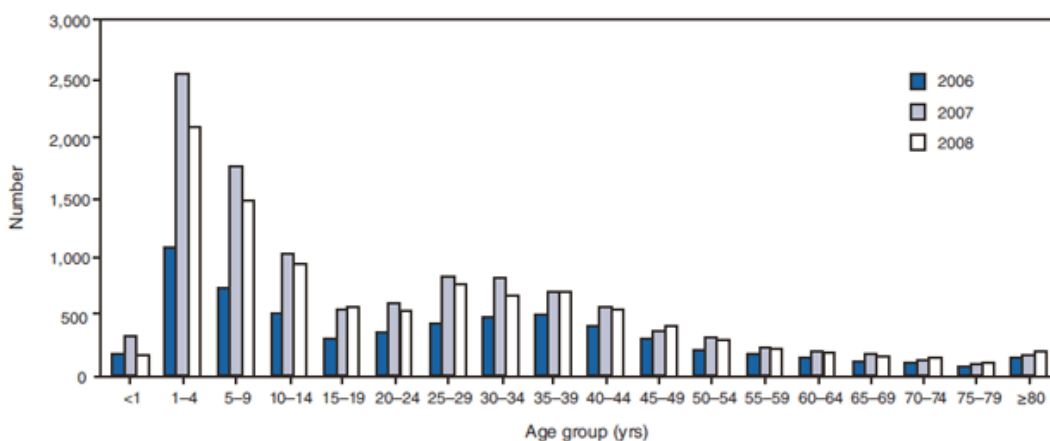
Σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου Ασθενειών (CDC) των ΗΠΑ, η συχνότητα εμφάνισης της Κρυπτοσποριδίου ήταν σχετικά σταθερή από το 1995 μέχρι το 2004 και αυξήθηκε δραματικά από το 2005 μέχρι το 2008 (Εικ. 1.8).



- Per 100,000 population.
- N = 68,907.
- § First full year of national reporting.

Εικόνα 1.8. Συχνότητα εμφάνισης Κρυπτοσποριδίωσης ανά έτος στις ΗΠΑ για τη χρονική περίοδο 1995-2008 (Yoder et al., 2010).

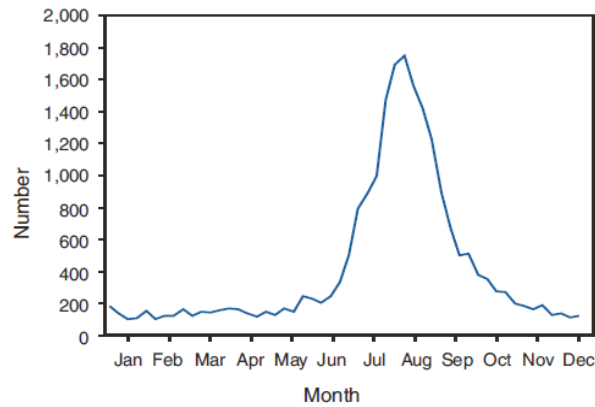
Η Κρυπτοσποριδίωση φαίνεται πως προσβάλλει κυρίως παιδιά (1-9 ετών) και νεότερους ενήλικες (25-39 ετών), ενώ είναι λιγότερο συχνή σε βρέφη κάτω των 6 μηνών και σε ενήλικες άνω των 45 ετών (Εικ. 1.9).



* N = 28,636; age for 332 case-patients was unknown.

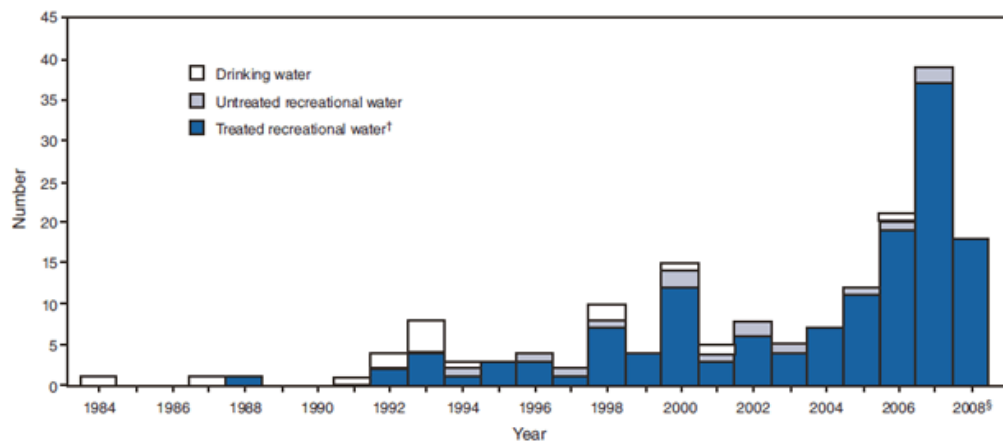
Εικόνα 1.9. Αριθμός αναφερόμενων κρουσμάτων Κρυπτοσποριδίωσης ανά ηλικιακή ομάδα στις ΗΠΑ, 2006-2008 (Yoder et al., 2010).

Η δραματική αύξηση των κρουσμάτων Κρυπτοσποριδίωσης κατά τους θερινούς μήνες σχετίζεται με τις αυξημένες δραστηριότητες κολύμβησης και αντανάκλα τη συμβολή των νερών αναψυχής στη μετάδοση του παράσιτου (Εικ. 1.10 & 1.11).



* N = 28,636; date of onset for 7,017 case-patients was unknown.

Εικόνα 1.10. Αριθμός αναφερόμενων κρουσμάτων Κρυπτοσποριδίωσης ανά ημερομηνία έναρξης της νόσου στις ΗΠΑ, 2006-2008 (Yoder et al., 2010).

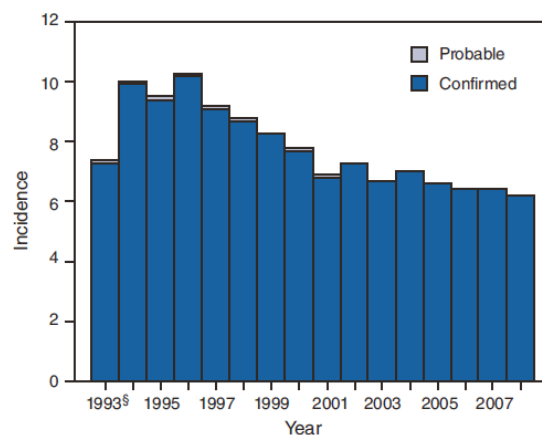


- N = 172.
- † Water that has undergone a treatment process (e.g., chlorination and filtration) to make it safe for recreation.
- § Data for 2007 and 2008 are provisional.

Εικόνα 1.11. Αριθμός υδατογενών επιδημιών Κρυπτοσποριδίωσης ανά τύπο νερού στις ΗΠΑ, 1988-2008 (Yoder et al., 2010).

Η νόσος μπορεί να μεταδοθεί σπανιότερα και με την τροφή. Οι ωοκύστες του *Cryptosporidium* έχουν ανιχνευθεί σε λαχανικά στην αγορά, τα οποία μολύνθηκαν πιθανότητα από το νερό άρδευσης ή από κόπρανα ζώων με πρόσβαση στις καλλιέργειες (Chaidez et al., 2005). Εν κατακλείδι, αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης αντιμετωπίζουν όσοι έχουν στενή επαφή με μολυσμένα άτομα ή/και ζώα, όσοι καταπίνουν μολυσμένο πόσιμο νερό ή νερό αναψυχής και όσοι ταξιδεύουν σε περιοχές όπου ενδημεί η νόσος (Roy et al., 2004; Yoder et al., 2010).

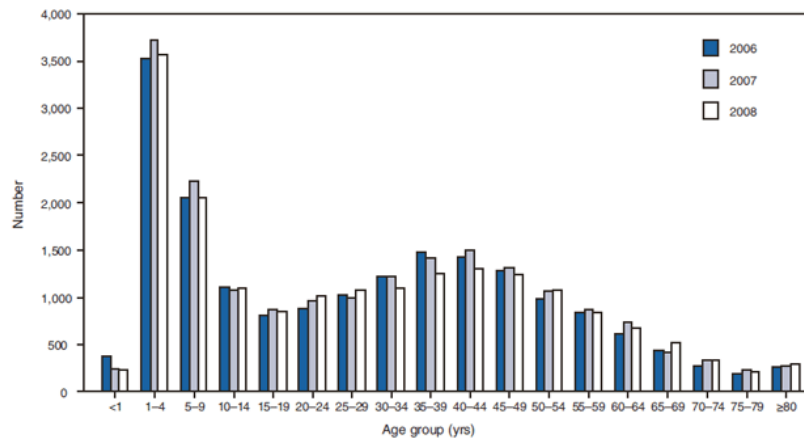
Η συχνότητα εμφάνισης της Γιαρδίασης στις ΗΠΑ για τη χρονική περίοδο 1993-2008 φαίνεται πως μειώνεται σταδιακά από το 1996 μέχρι το 2001, ενώ από το 2002 μέχρι το 2008 παραμένει σχεδόν σταθερή (Εικ. 1.12).



- Per 100,000 population.
- N = 354,385.
- § First year with use of assigned reporting number.

Εικόνα 1.12. Συχνότητα εμφάνισης Γιαρδίασης ανά έτος στις ΗΠΑ για τη χρονική περίοδο 1993-2008 (Yoder et al., 2010).

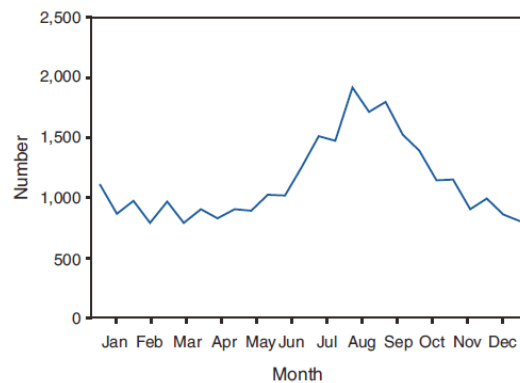
Η νόσος προσβάλλει κυρίως παιδιά ηλικίας 1-9 ετών και ενήλικες 35-44 ετών (Εικ. 1.13).



* N = 58,186; age group unknown for 1,083 cases.

Εικόνα 1.13. Αριθμός αναφερόμενων κρουσμάτων Γιαρδίασης ανά ηλικιακή ομάδα στις ΗΠΑ, 2006-2008 (Yoder et al., 2010).

Η αύξηση των κρουσμάτων της νόσου από την αρχή του καλοκαιριού μέχρι τους πρώτους φθινοπωρινούς μήνες είναι αναμενόμενη, δεδομένου ότι αυτό το χρονικό διάστημα εντείνονται οι υπαίθριες δραστηριότητες, όπως κολύμβηση, camping κ.ά.λ. (Εικ. 1.14).



* N = 58,186; onset date was unknown for 28,650 cases.

Εικόνα 1.14. Αριθμός αναφερόμενων κρουσμάτων Γιαρδίασης ανά ημερομηνία έναρξης της νόσου στις ΗΠΑ, 2006-2008 (Yoder et al., 2010).

Η μετάδοση της νόσου μέσω των επιφανειακών νερών αναψυχής (λίμνες, ποτάμια), κατά τους θερινούς μήνες, διευκολύνεται και από το γεγονός ότι το υποκείμενο ιζήμα μπορεί να περιέχει μέχρι και 1000 φορές περισσότερα κοπρανώδη παθογόνα σε σχέση με το υπερκείμενο υγρό. Η ανατάραξη αυτού του ιζήματος προκαλεί την επαναιώρηση των παθογόνων και την επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσής τους στο νερό. Μάλιστα, πρόσφατη μελέτη των Sunderland et al. (2007) έχει δείξει ότι οι συγκεντρώσεις των ωοκύστεων *C. parvum*, των κύστεων *G. lamblia* και η θολότητα είναι αξιοσημείωτα υψηλές τα Σαββατοκύριακα της θερινής περιόδου, όπου ο αριθμός των λουόμενων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τις καθημερινές. Εν κατακλείδι, ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου για λοίμωξη από *Giardia* είναι η επαφή είτε άμεση μέσω της στοματικής οδού είτε έμμεση μέσω της κατάποσης μολυσμένου νερού με κόπρανα μολυσμένου ατόμου (Hoque et al., 2002).

1.6 Μέθοδοι απολύμανσης για *Cryptosporidium* και *Giardia*

Το πόσιμο νερό και τα νερά αναψυχής αποτελούν ιδανικά μέσα μετάδοσης τόσο του *Cryptosporidium* όσο και της *Giardia* που εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στο απολυμαντικό χλώριο και επιβιώνουν στο νερό για αρκετούς μήνες. Εξαιτίας αυτών των χαρακτηριστικών, τα δύο αυτά παθογόνα παράσιτα συνιστούν σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία, ενώ πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την ευαισθησία τους σε διάφορα απολυμαντικά μέσα.

Σε πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε η αδρανοποίηση που επιτυγχάνεται στα εν λόγω παράσιτα με τη χρήση διοξειδίου του χλωρίου (ClO_2) για την απολύμανση πόσιμου νερού (Li et al., 2011). Βρέθηκε ότι η αύξηση του χρόνου επαφής και των δόσεων του απολυμαντικού συνεπάγεται αύξηση του ποσοστού αδρανοποίησης των ωοκύστεων *Cryptosporidium* και των κύστεων *Giardia*. Συγκεκριμένα, για χρόνο επαφής 240 min και $\text{ClO}_2 = 2 \text{ mg/L}$, το ποσοστό αδρανοποίησης ήταν 99,3% για το *Cryptosporidium* και 99,9% για την *Giardia*. Με την αύξηση της θολότητας του νερού, μειώθηκαν και τα

ποσοστά αδρανοποίησης που φαίνεται να ευνοούνται καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία από 5 σε 35 °C και σε όξινο παρά σε αλκαλικό περιβάλλον.

Οι διεργασίες διήθησης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στην απομάκρυνση των ωοκύστεων *Cryptosporidium* και των κύστεων *Giardia* από το πόσιμο νερό. Κι ενώ είναι γνωστό ότι οι κύστεις είναι ευαίσθητες στην υπεριώδη UV ακτινοβολία, οι Li et al. (2008) τονίζουν ότι κάποια τροφοζώδια του είδους *G. duodenalis* είναι δυνατόν να επιβιώσουν ή να επανεργοποιηθούν μετά από έκθεση σε UV 10 mJ/cm², ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία για επιβίωση ή επανεργοποίηση σε UV 100 mJ/cm². Η απολύμανση του πόσιμου νερού με UV ακτινοβολία ενδείκνυται για την αποφυγή σχηματισμού τοξικών παραπροϊόντων από την αντίδραση των χημικών απολυμαντικών με διάφορα συστατικά του νερού (π.χ. τριαλομεθάνια από χλώριο, νιτρικά από χλωραμίνες).

Το όζον είναι το πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό μέσο ενάντια στα πρωτόζωα, παρόλο που σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται η αποτελεσματικότητά του και αυξάνονται οι απαιτούμενοι χρόνοι επαφής. Σημαντικά ποσοστά αδρανοποίησης επιτυγχάνονται όταν η συγκέντρωσή του είναι πάνω από 3,0 mg/L και ο χρόνος επαφής έως 7 min. Με την αύξηση της θολότητας και της οργανικής ύλης, τα ποσοστά αδρανοποίησης μειώνονται, ενώ βελτιώνονται όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 5 - 25 °C και η απολύμανση γίνεται σε όξινο παρά σε αλκαλικό περιβάλλον. Επιπλέον, η κυτταρική μορφολογία του *Cryptosporidium* ποικίλει σε διαφορετικούς χρόνους επαφής. Σε μηδέν χρόνο επαφής, τα κύτταρα διατηρούν τη στρογγυλότητα και σφαιρικότητά τους, στα 60 sec αρχίζει η συρρίκνωση της κυτταρικής τους μεμβράνης και στα 480 sec επέρχεται η ολοκληρωτική διάλυσή της (Ran et al., 2010).

Πάντως, έχει αποδειχθεί πως η έκθεση των παράσιτων σε πολλαπλά απολυμαντικά μέσα, κατά την επεξεργασία του πόσιμου νερού, είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με τη δράση ενός μεμονωμένου απολυμαντικού, καθώς τα πολλαπλά σοκ που υφίστανται μπορεί να περιορίσουν τη μολυσματικότητά τους (Medema et al., 2006).

1.7 Νομοθεσία για την ποιότητα του πόσιμου νερού

Σε εθνικό επίπεδο, το θέμα της ποιότητας του πόσιμου νερού ρυθμίζεται από την **KYA Y2/2600/2001**, όπως έχει τροποποιηθεί με την Υ.Α.38295/2007. Σύμφωνα με αυτή, το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης πρέπει να είναι απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς και από παράσιτα, σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία (άρθρο 4, §1). Ως παραμετρική τιμή (αριθμός/100 mL) τόσο για τους δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης του νερού (κολοβακτηριοειδή, *E. coli*, εντερόκοκκοι) όσο και για τους παρασιτικούς οργανισμούς **Κρυπτοσπορίδιο** και ***G. lamblia*** ορίζεται το μηδέν (Παραρτήματα I & II).

Στη βρετανική νομοθεσία, η μέγιστη τιμή (αριθμός/100 mL) των μικροβιολογικών δεικτών ποιότητας του πόσιμου νερού (Coliform bacteria, *E. coli*, Enterococci) είναι μηδέν (0), ενώ ο αριθμός των ωοκύστεων *Cryptosporidium* πρέπει να είναι μικρότερος από 1 ανά 10 L νερού (WSRs 2000 SI No.3184; www.dwi.gov.uk). Οι εταιρείες ύδρευσης στο Ηνωμένο Βασίλειο πραγματοποιούν τακτικούς ελέγχους για την ανίχνευση παράσιτων στο πόσιμο νερό.

Στις ΗΠΑ, η νομοθεσία για το πόσιμο νερό (40CFR141.52) ορίζει το μηδέν (zero) ως μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή συγκέντρωσης (**Maximum Contaminant Level Goal**, mg/L) των μικροβιολογικών παραμέτρων: *G. lamblia*, *Cryptosporidium*, Total coliforms, Fecal coliforms και *E. coli*. Η πρώτη αναφορά στα παράσιτα γίνεται στη γενική οδηγία για την επεξεργασία των επιφανειακών νερών που προορίζονται για πόση (SWTR 6/89), όπου ορίζεται ως MCLG για την ***G. lamblia*** το μηδέν (zero). Περίπου 10 χρόνια αργότερα, τίθεται σε ισχύ μια ακόμη οδηγία (IESWTR 12/98), με σκοπό τη βελτίωση του ελέγχου για το ***Cryptosporidium***, όπου ως MCLG θεσπίζεται το μηδέν (zero) και ως ελάχιστη απαίτηση απομάκρυνσής του μέσω διήθησης το 99% (2-log).

1.8 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των *Cryptosporidium* και *Giardia*

Για τον εντοπισμό των υδατογενών παράσιτων *Cryptosporidium* και *Giardia* σε επιφανειακά νερά, εφαρμόζεται η **Μέθοδος 1623** (EPA Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA) σε ό,τι αφορά τη δειγματοληψία με τη χρήση ειδικού φίλτρου, την έκλυση του φίλτρου και τη "συμπύκνωση" του προϊόντος της έκλυσης με φυγοκέντρηση.

Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση, μετά το στάδιο της "συμπύκνωσης", μπορούν να γίνουν είτε με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων (π.χ. PCR), αφού προηγηθεί απομόνωση του γενετικού υλικού, είτε με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού μετά από χρώση (Μέθοδος 1623).

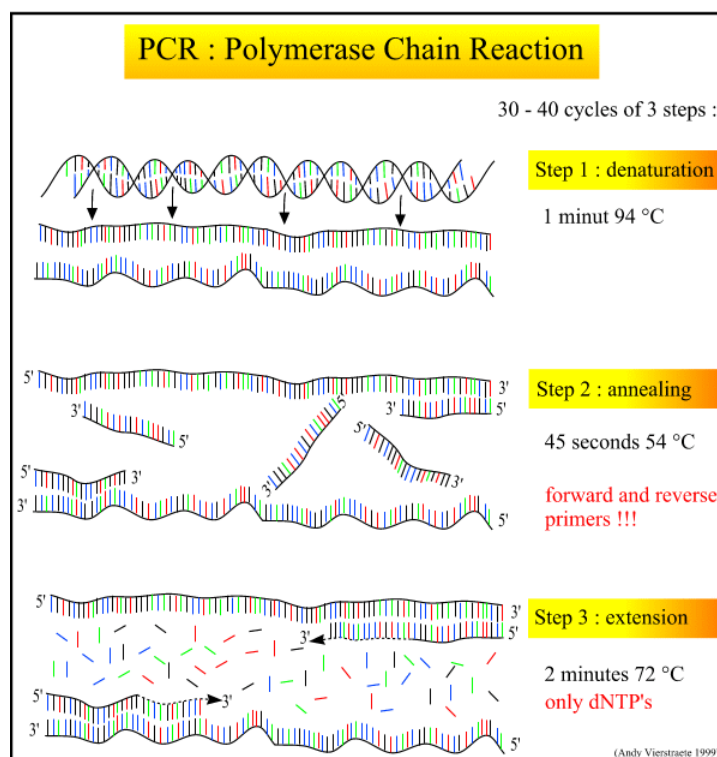
1.8.1 Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) - Αρχή λειτουργίας

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) είναι μία από τις πιο σημαντικές τεχνολογίες της μοριακής βιολογίας που επιτρέπει την αντιγραφή μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (τμήμα γονιδίου) από πολλές χιλιάδες μέχρι εκατομμύρια φορές, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Εφευρέθηκε το 1984 από τον Kerry Mullis που τιμήθηκε για την εφεύρεσή του αυτή το 1993 με το βραβείο Νόμπελ.

Η PCR βασίζεται στην επανάληψη ενός κύκλου που περιλαμβάνει τα παρακάτω τρία (3) διαδοχικά στάδια (steps) (Εικ. 1.15):

1. Το δείγμα επωάζεται συνήθως στους 94 °C, όπου λαμβάνει χώρα η αποδιάταξη (**Denaturation**) των αλυσίδων του δίκλωνου τμήματος DNA-στόχου.
2. Το δείγμα ψύχεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών (συνήθως στους 50-60 °C), ώστε να λάβει χώρα η ένωσή τους με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες κάθε κλώνου (**Annealing**).
3. Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 70-72 °C προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Έτσι, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων με την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των εκκινητών (**Extension**). Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων από την DNA

πολυμεράση γίνεται με ρυθμό έως και 100 βάσεις ανά δευτερόλεπτο (www.invitrogen.com/qPCR Handbook).



Εικόνα 1.15. Τα τρία διαδοχικά στάδια (steps) της PCR
(<http://q-pcr.blogspot.com>)

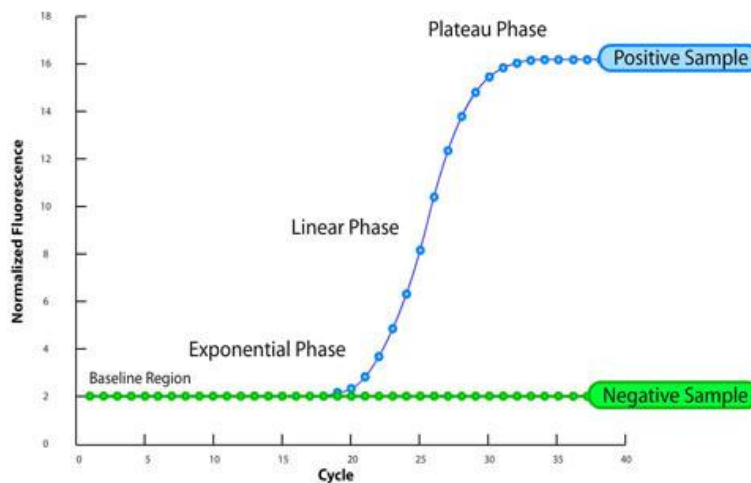
Οι εκκινητές (**primers**) είναι ολιγονουκλεοτίδια που έχουν μήκος 15-20 νουκλεοτίδια ο καθένας και είναι συμπληρωματικοί των αλληλουχιών στα άκρα κάθε κλώνου (**Forward & Reverse primers**). Η DNA πολυμεράση (**Taq polymerase**) είναι ένα ένζυμο που απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και βοηθάει στη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου.

Μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης PCR, εκτός από τους εκκινητές, την πολυμεράση και το προς αντιγραφή τμήμα γονιδίου, υπάρχουν και τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTP's) που είναι τα απαραίτητα για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων νουκλεοτίδια, ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) που απαιτούνται για την ενίσχυση της ενζυμικής δραστηριότητας της

DNA πολυμεράσης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.0 (Λαζανάκη, 2010).

Η αντίδραση της PCR χωρίζεται στις εξής τρεις (3) φάσεις (Εικ. 1.16):

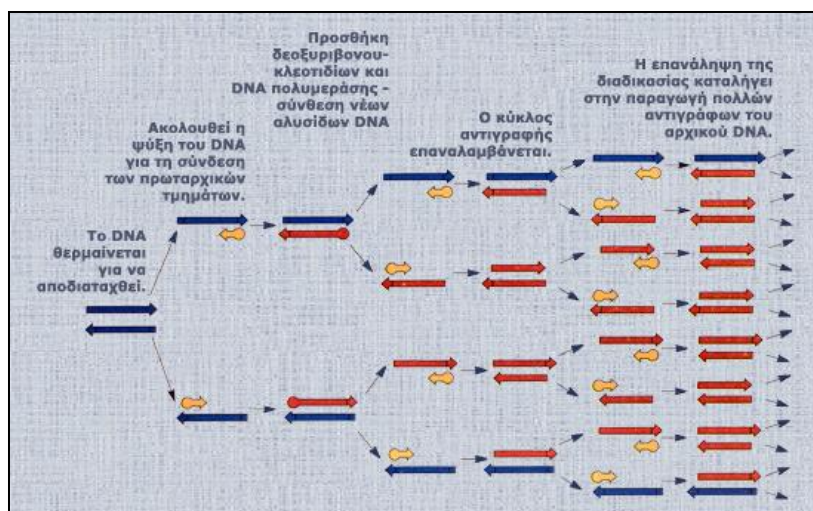
- Εκθετική φάση (**Exponential**): η αντιγραφή της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA είναι πολύ αποτελεσματική.
- Γραμμική φάση (**Linear**): παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων του γονιδίου-στόχου λόγω μείωσης των αντιδραστηρίων.
- **Plateau** φάση: έχει σταματήσει η αντίδραση και παραγωγή νέων αντιγράφων λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων.



Εικόνα 1.16. Οι τρεις φάσεις της αντίδρασης PCR

(<http://www.abbottmolecular.com/us/technologies/real-time-pcr>)

Η αντίδραση της PCR ολοκληρώνεται συνήθως μετά από 30-40 κύκλους που είναι αρκετοί για τη σύνθεση εκατομμυρίων αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA. Σε κάθε κύκλο λαμβάνει χώρα ο διπλασιασμός του αριθμού των αντιγράφων του επιλεγμένου γονιδίου και τα νέα αντίγραφα χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο (Εικ. 1.17).



Εικόνα 1.17. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας της PCR

(<http://kpe-kastor.kas.sch.gr>)

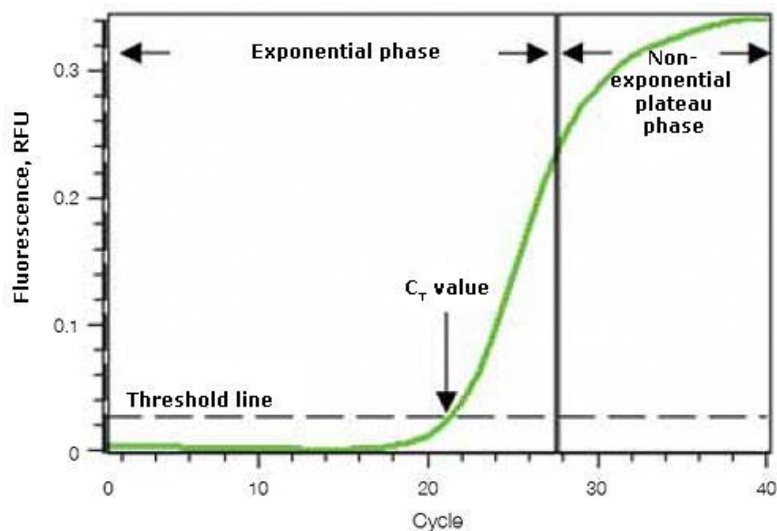
1.8.2 Η Real-time PCR

Η **Real-time PCR** αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Συχνά αναφέρεται και ως quantitative Real-time PCR (**q-PCR**). Η αρχή λειτουργίας της είναι παρόμοια με αυτή της συμβατικής PCR, με τη διαφορά ότι η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετριέται σε κάθε κύκλο, ενώ στη συμβατική PCR η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας-στόχου λαμβάνει χώρα μετά την ολοκλήρωση του τελευταίου κύκλου.

Το διάλυμα για την Real-time PCR περιέχει τα ίδια αντιδραστήρια με αυτό της συμβατικής μεθόδου και επιπλέον κάποιες χρωστικές για την ανίχνευση του γονιδίου-στόχου. Έτσι, η μέτρηση της ποσότητας DNA που παράγεται μετά από κάθε κύκλο γίνεται μέσω σήμανσης των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια ή ιχνηθέτες (**probes**) που έχουν ενσωματωθεί στο τελικό προϊόν. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των παραγόμενων αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης.

Η προετοιμασία του διαλύματος (master mix) που θα περιέχει όλα τα αντιδρώντα συστατικά της Real-time PCR στις σωστές αναλογίες είναι ιδιαίτερης σημασίας για την επιτυχία της μεθόδου, καθώς και ο καλός σχεδιασμός των εκκινήτων που θα χρησιμοποιηθούν ώστε να ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένη κάθε φορά αλληλουχία-στόχο. Σε γενικές γραμμές, οι εκκινήτες θα πρέπει να έχουν μήκος 18-24 νουκλεοτίδια, ενώ μία τελική συγκέντρωση 200 nM για καθέναν θεωρείται ικανοποιητική για τις περισσότερες αντιδράσεις. Επίσης, σε κάθε Real-time PCR θα πρέπει να χρησιμοποιούνται από 10 έως 1.000 αντίγραφα του πρότυπου νουκλεϊκού οξέος. Αυτό αντιστοιχεί περίπου σε 100 pg έως 1 μg γονιδιακού DNA ([www.invitrogen.com/Basic principles of real-time PCR](http://www.invitrogen.com/Basicprinciplesofreal-timePCR)).

Σε ένα διάγραμμα q-PCR, η γραμμή Threshold (**Threshold line**) διέρχεται από το σημείο όπου το φθορίζον σήμα των προϊόντων ξεχωρίζει έντονα από το φόντο, ενώ ο κύκλος που αντιστοιχεί σε αυτό το σημείο λέγεται **Threshold cycle** ή **C_t** (Εικ. 1.18). Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, τόσο πιο νωρίς θα εμφανιστεί στο διάγραμμα η τιμή C_t που αντιστοιχεί στο δείγμα αυτό (μικρότερη τιμή C_t).



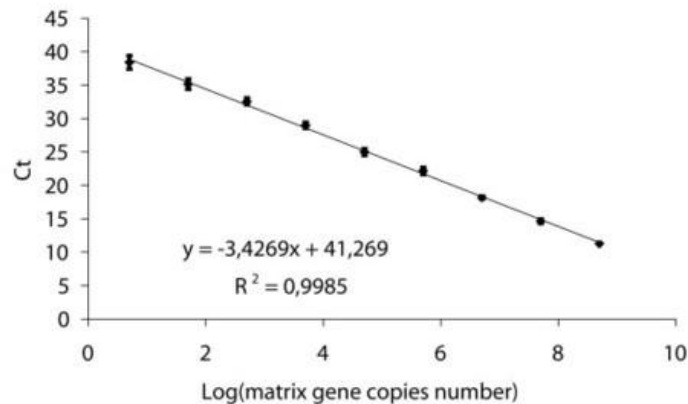
Εικόνα 1.18. Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός διαγράμματος q-PCR (Threshold line, C_t value) (<http://www3.bio-rad.com>).

Στην Real-time PCR, υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης του προεπιλεγμένου γονιδίου:

- Η Απόλυτη ποσοτικοποίηση (**Absolute quantification**) που χρησιμοποιείται όταν πρέπει να μετρηθεί με ακρίβεια η ποσότητα του γονιδίου-στόχου στο δείγμα.
- Η Σχετική ποσοτικοποίηση (**Relative quantification**) που είναι πιο απλή και εύκολη στην εφαρμογή της και χρησιμοποιείται όταν δεν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί με ακρίβεια η αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα (Λαζανάκη, 2010).

Η μέθοδος της Απόλυτης ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία βασίζεται στη δημιουργία και στη χρήση μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς (**Standard curve**), με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για την δημιουργία αυτής της καμπύλης, επιλέγεται μια γνωστή συγκέντρωση του γονιδίου-στόχου ("μάρτυρας") που υφίσταται στη συνέχεια διαδοχικές αραιώσεις. Απαιτούνται τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστές συγκεντρώσεις) που να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Τα αραιωμένα δείγματα συμμετέχουν μαζί με τα προς ανάλυση στην Real-time PCR.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει, για κάθε αραιώση, τον αριθμό των αντιγράφων του γνωστής συγκέντρωσης γονιδίου συναρτήσει των τιμών C_t (Εικ. 1.19). Στη συνέχεια, γίνεται σύγκριση των τιμών C_t των υπό μελέτη δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίησή τους.



Εικόνα 1.19. Διάγραμμα καμπύλης αναφοράς (standard curve)

(<http://www.springerimages.com>)

Ο συντελεστής συσχέτισης (**Correlation coefficient, R^2**) αποτελεί ένα μέτρο του πόσο καλά ταιριάζουν κάθε φορά τα δεδομένα στην καμπύλη αναφοράς. Επί της ουσίας, η τιμή του R^2 εκφράζει την γραμμικότητα της καμπύλης και στην ιδανική περίπτωση είναι $R^2=1$, ενώ στην πραγματικότητα η μέγιστη τιμή του είναι 0,999.

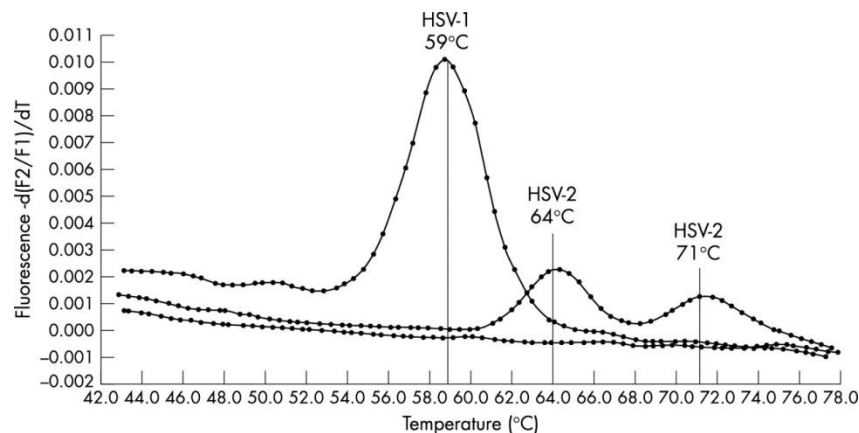
Η αποτελεσματικότητα (**Efficiency, E**) της Real-time PCR πρέπει να είναι όσο πιο κοντά γίνεται στο 100%, για την εξασφάλιση αξιόπιστων και αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται, όταν η τιμή της κλίσης (slope) της πρότυπης καμπύλης είναι -3,32, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Η ιδανική τιμή $E=100\%$ δείχνει ότι το γονίδιο-στόχος διπλασιάζεται μετά από κάθε κύκλο, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης. Κάποιοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την αποτελεσματικότητα ($E < 90\%$) είναι η χρήση μη κατάλληλων συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων, η ποιότητα του ενζύμου, καθώς και η ίδια η δυναμική της αντίδρασης. Τιμές E μεταξύ 90-110% που αντιστοιχούν σε τιμές

κλίσης από -3,58 έως -3,10 υποδεικνύουν μια καλή αντίδραση ([www.invitrogen.com/Basic principles of real-time PCR](http://www.invitrogen.com/Basic%20principles%20of%20real-time%20PCR)).

Μια ακόμη δυνατότητα της Real-time PCR είναι η κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης (**Melting curve**), με την οποία μπορεί να γίνει αξιολόγηση των προϊόντων της αντίδρασης, εάν δηλ. πρόκειται για τα επιθυμητά ή όχι. Η κατασκευή αυτής της καμπύλης βασίζεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature, T_m) των προϊόντων της αντίδρασης. Η T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία αποδιατάσσεται το κάθε τμήμα DNA και εξαρτάται από το μέγεθός του. Γίνεται, λοιπόν, φανερό ότι κάθε τμήμα γονιδίου έχει τη δική του θερμοκρασία αποδιάταξης. Τα προϊόντα της PCR πρέπει να έχουν την ίδια T_m , εκτός εάν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ των εκκινητών (primer-dimers). Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια T_m , τότε στην καμπύλη θα εμφανιστεί μία μόνον κορυφή, ενώ εάν στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους, τότε θα εμφανιστούν και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές T_m (Εικ. 1.20).



Εικόνα 1.20. Καμπύλη αποδιάταξης με τρεις διαφορετικές κορυφές (T_m)
(<http://sti.bmj.com>)

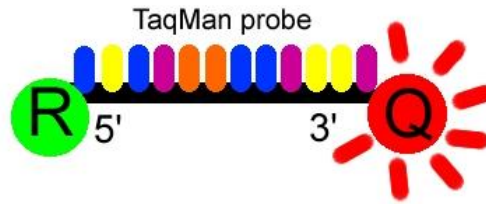
Η μεθοδολογία της αντίδρασης Real-time PCR περιλαμβάνει και αρνητικά δείγματα (χωρίς DNA) μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα. Τα αρνητικά δείγματα περιέχουν όλα τα υλικά του διαλύματος αντίδρασης, εκτός του DNA (συνήθως χρησιμοποιείται νερό

αντί του αντίστοιχου όγκου DNA) και χρησιμοποιούνται για την εξέταση της περίπτωσης επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης με DNA άλλου οργανισμού (Λαζανάκη, 2010).

1.8.3 Real-time PCR (SYBR Green, TaqMan)

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ανίχνευσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σήμανση των προϊόντων της Real-time PCR. Η μία μέθοδος βασίζεται στη χρήση χρωστικών ουσιών (π.χ. SYBR Green I) που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA και η άλλη βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηθετών (π.χ. TaqMan probes).

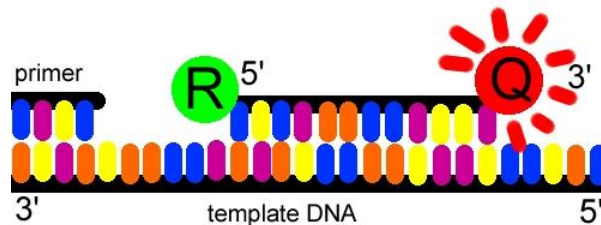
- Η χρωστική **SYBR Green I** φθορίζει έντονο πράσινο χρώμα, όταν ενσωματώνεται σε δίκλωνο DNA, ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα εμφανίζει χαμηλό φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται συναρτησίως της συγκέντρωσης του DNA στο διάλυμα. Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη στη χρήση της και έχει χαμηλό κόστος, γι' αυτό και προτιμάται από τους ερευνητές. Το μοναδικό μειονέκτημά της είναι ότι δεν παρουσιάζει εξειδίκευση, καθώς η χρωστική μπορεί να δεθεί με ένα οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA, ακόμα και με τμήμα που προήλθε από την ένωση των εκκινητών μεταξύ τους. Έτσι, όμως, δεν μπορεί να πιστοποιηθεί ότι το φθορίζον σήμα αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των αντιγράφων της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA (Λαζανάκη, 2010).
- Οι TaqMan γραμμικοί ιχνηθέτες (**TaqMan probes**) είναι ολιγονουκλεοτίδια 20-30 βάσεων που φέρουν στο 5' άκρο τους μια φθορίζουσα χρωστική (**Reporter fluorophore**) μικρού μήκους κύματος (πράσινη) και στο 3' άκρο τους μια χρωστική απόσβεσης του φθορισμού (**Quencher fluorophore**) μεγάλου μήκους κύματος (κόκκινη) (Εικ. 1.21).



Εικόνα 1.21. Σχηματική απεικόνιση ενός TaqMan ιχνηθέτη
(<http://www.bio.davidson.edu>)

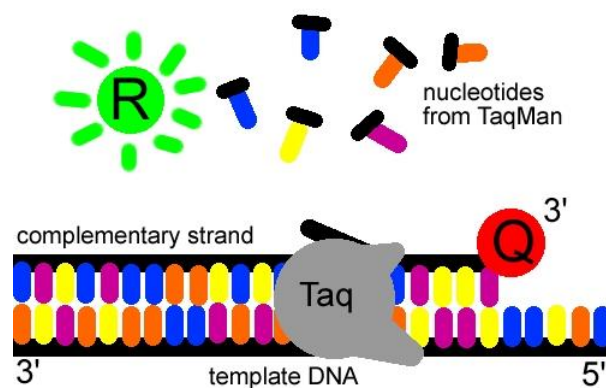
Στην παραπάνω απεικόνιση, ο κόκκινος κύκλος (Q) αντιπροσωπεύει την χρωστική απόσβεσης που αναστέλλει την εκπομπή σήματος από την φθορίζουσα πράσινη χρωστική (R). Αυτό συμβαίνει για όσο διάστημα παραμένουν ενωμένοι με τον ιχνηθέτη, δηλαδή βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους.

Ο TaqMan ιχνηθέτης συνδέεται με συγκεκριμένο τμήμα του πρότυπου DNA, ενώ στο 2^ο στάδιο της αντίδρασης (annealing) λαμβάνει χώρα και η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες κάθε κλώνου (Εικ. 1.22).



Εικόνα 1.22. Σύνδεση TaqMan ιχνηθέτη και primer με το πρότυπο DNA
(<http://www.bio.davidson.edu>)

Μετά την ένωση του εκκινητή, η πολυμεράση αρχίζει να προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του και απομακρύνει τον ιχνηθέτη από το πρότυπο DNA για τη δημιουργία του συμπληρωματικού κλώνου (Εικ. 1.23). Αυτό προκαλεί την απομάκρυνση της φθορίζουσας χρωστικής R από τον αποσβέστη Q και επιτρέπει την εκπομπή φθορίζοντος σήματος από την πρώτη που ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται με τη χρήση υπολογιστή.



Εικόνα 1.23. Σύνθεση συμπληρωματικού κλώνου από την Taq πολυμεράση
(<http://www.bio.davidson.edu>)

Όσες περισσότερες φορές λαμβάνει χώρα η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA-στόχου και η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων, τόσες περισσότερες ευκαιρίες υπάρχουν για τον TaqMan ιχνηθέτη να συνδεθεί και κατά συνέπεια τόσο μεγαλύτερο εκπεμπόμενο σήμα ανιχνεύεται.

Η μέθοδος TaqMan Real-time PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια και εξειδίκευση σε σχέση με τη SYBR Green I, καθώς ο εκάστοτε ιχνηθέτης σχεδιάζεται με βάση συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου-στόχου και υβριδοποιείται μόνον όταν την εντοπίσει μέσα στο διάλυμα, διαφορετικά δεν φθορίζει καθόλου. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή παρέχει τη δυνατότητα σήμανσης των ιχνηθετών με διαφορετικές χρωστικές. Έτσι, καθίσταται δυνατό σε μία μόνον αντίδραση να ανιχνευτούν περισσότερες από μία αλληλουχίες, ενώ βασικά μειονεκτήματά της είναι το υψηλό της κόστος και η δυσκολία σχεδιασμού των ιχνηθετών (Λαζανάκη, 2010).

1.9 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

- Ο έλεγχος των επιφανειακών υδάτων της ευρύτερης περιοχής του Νομού Χανίων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παράσιτων *Cryptosporidium parvum* και *Giardia lamblia*, με εφαρμογή της Μεθόδου 1623 σε ό,τι αφορά τη δειγματοληψία, την έκλυση των φίλτρων και τη "συμπύκνωση" του προϊόντος έκλυσης.
- Η σύγκριση διαφορετικών μεθοδολογιών σε ό,τι αφορά την απομόνωση του γενετικού υλικού των εν λόγω παράσιτων και την ανίχνευση και ποσοτικοποίησή τους με μοριακές τεχνικές (SYBR Green, TaqMan Real-time PCR).
- Η ανάδειξη της κατάλληλης μεθοδολογίας για τον έγκυρο και ακριβή έλεγχο των υδάτων που προορίζονται για ύδρευση και άρδευση, με σκοπό τη μέγιστη δυνατή διασφάλιση και προστασία της δημόσιας υγείας.
- Η μελέτη συσχέτισης της παρουσίας των ως άνω παράσιτων με τους τρεις (3) βακτηριακούς δείκτες ποιότητας του πόσιμου νερού (κολοβακτηριοειδή, *E. coli*, εντερόκοκκοι), όπως αυτοί υποδεικνύονται από την ισχύουσα νομοθεσία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ταξινομούνται ως εξής:

2.1.1 Θρεπτικά υλικά

- HiCrome E.coli Agar — HiMedia REF M1295I-500G.
- m-Les Endo Agar Medium — Biolife REF 4015932.
- Slanetz and Bartley Medium — HiMedia REF M612-500G.
- Bile Aesculin Agar — LAB 207.

2.1.2 Χημικά υλικά

- Antifoam Y-30 Emulsion — Sigma-Aldrich A5758-100 mL.
- Ethanol 70% — Merck.
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA), 99+% — Sigma-Aldrich E5134-250G.
- Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) — Sigma-Aldrich 52365-50G.
- Laureth-12 — Pall Corporation PN 4820.
- N-Lauroylsarcosine sodium salt — Sigma-Aldrich L9150-50G.
- Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol 25:24:1 — Sigma-Aldrich 77617.
- Phosphate Buffered Saline (PBS) — Sigma-Aldrich P4417-100TAB.
- Proteinase K – Solution — AppliChem A4392 (20 mg/ml).
- Sodium chloride — Sigma-Aldrich 31434.
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) — Sigma-Aldrich 71725-100G.
- Sucrose, 99+% — Sigma-Aldrich S0389-1KG.

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, ACS Reagenz, $\geq 99,8\%$ — Sigma-Aldrich Cat.:25,285-9.
- Trizma® hydrochloride (Tris HCl) — Sigma-Aldrich T3253-500G.
- Tween® 80 — Sigma-Aldrich P1754-500 mL.
- 2-Propanol p.a. — Merck.

2.1.3 Χημικά Διαλύματα

- Διάλυμα έκλουσης φίλτρων δειγματοληψίας (Elution Buffer):
 1. Laureth-12.
 2. 1 M Tris, pH 7.4.
 3. 0.5 M EDTA, 2 Na, pH 8.0.
 4. Antifoam Y-30 Emulsion.

10 mL Laureth-12 + 10 mL 1 M Tris (pH 7.4) + 2 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0) + 150 μ L Antifoam Y-30 → αραίωση με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1000 mL (U.S.E.P.A. Method 1623).

- Διάλυμα 2.5 M σουκρόζης (Sucrose Solution).
- Διάλυμα 50 mM TrisHCl – 20 mM EDTA (pH 8.0) που περιέχει 2 mg Prot K / mL και 0.5% Sarcosyl.
- Διάλυμα 50 mM TrisHCl – 20 mM EDTA (pH 8.0) και προσθήκη 0.5% SDS.
- Διάλυμα NaCl 5 M.

2.1.4 Εξοπλισμός δειγματοληψίας

- Φίλτρο Envirochek — Pall Corporation PN 12110, 1.0 μ m Sampling Capsule.

Ένα φίλτρο Envirochek ανά δείγμα (τα φίλτρα δεν επαναχρησιμοποιούνται).

- Φορτιζόμενη ηλεκτρική αντλία υπαίθρου με δυνατότητα ρύθμισης της ροής.
- Επαναφορτιζόμενες μπαταρίες.

- Εύκαμπτο HDPE λάστιχο άντλησης.
- Φορητό ψυγείο με παγοκύστες.

2.1.5 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Αναδευτήρας με βραχίονες για την ανακίνηση των φίλτρων δειγματοληψίας, Bibby Scientific Ltd. Stuart Flask Shaker SF1.
- Ψυχόμενη εργαστηριακή φυγόκεντρος, Refrigerated Centrifuge — Sigma 4-16 K (from Serial No 128012).
- Swinging bucket — Heraeus Labofuge 400.
- Applied Biosystems StepOnePlus™ — Real-Time PCR System.
- Θερμομπλόκ (block heater).
- Καταψύκτης (-80 °C).
- Αναλυτική ζυγαριά εργαστηρίου ικανή να ζυγίζει 0.1 mg.
- Συσκευή vortex mixer.
- Πεχάμετρο (pH meter).

2.1.6 Πρότυπα στελέχη *Cryptosporidium* και *Giardia*

Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα στελέχη των *Cryptosporidium parvum* και *Giardia lamblia* από την Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας (ΕΣΔΥ) και πρότυπο στέλεχος του *Cryptosporidium* από το *Cryptosporidium* Real Time PCR kit (Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd, Cat. No.: DD-0168-02).

2.1.7 Real-time PCR: Εκκινητές & Ιχνηθέτες

Η επιλογή των εκκινητών και ιχνηθετών για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των *Cryptosporidium* και *Giardia*, με τη χρήση της Real-time PCR, έγινε βάσει γονιδίων που έχουν απομονωθεί σε στελέχη από κόπρανα μολυσμένων ανθρώπων. Για την ανίχνευση του *C. parvum* (genotype 1 & 2) επιλέχθηκε το γονίδιο COWP (**C**ryptosporidium **O**ocyst **W**all **P**rotein, GenBank no. AF248743). Για την ανίχνευση της *G. lamblia* (assemblage

A) επιλέχθηκε το γονίδιο β-giardin (GenBank no. M36728). Βάσει αυτών των γονιδίων έγινε και η επιλογή των αντίστοιχων εκκινητών και ιχνηθετών, ως εξής:

Για το *C. parvum* (Guy et al., 2003):

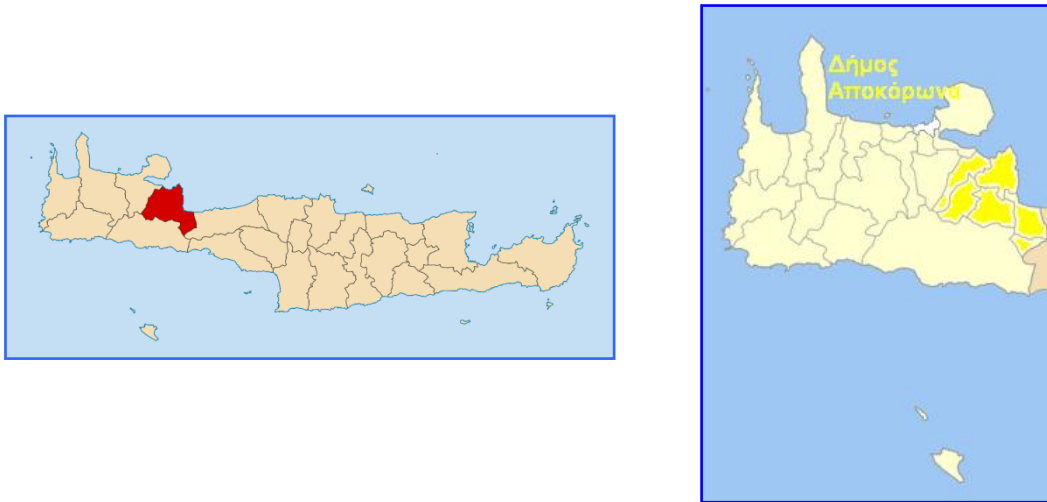
Τύπος εκκινητή-ιχνηθέτη	Αλληλουχία 5'-3'	Γονίδιο	Νουκλεοτιδική θέση	Μέγεθος προϊόντος PCR
Εμπρόσθιος εκκινητής (P702 F)	CAAATTGATACCGTTTGTCTTCTG	COWP	583-607	151-bp
Αντίστροφος εκκινητής (P702 R)	GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT	COWP	711-733	
TaqMan ιχνηθέτης (P702 PROBE)	HEX/TGCCATACATTGTTGTCCTG ACAAATTGAAT/TAMRA	COWP	672-702	

Για τη *G. lamblia* (Guy et al., 2003):

Τύπος εκκινητή-ιχνηθέτη	Αλληλουχία 5'-3'	Γονίδιο	Νουκλεοτιδική θέση	Μέγεθος προϊόντος PCR
Εμπρόσθιος εκκινητής (P241 F)	CATCCGCGAGGAGGTCAA	β-giardin	222-239	74-bp
Αντίστροφος εκκινητής (P241 R)	GCAGCCATGGTGTCTGATCT	β-giardin	278-296	
TaqMan ιχνηθέτης (P241 PROBE)	FAM/AAGTCCGCCGACAACATGTA CCTAACGA/TAMRA	β-giardin	241-268	

2.2 Μεθοδολογία για ανίχνευση δεικτών

Η ανίχνευση των δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης έγινε με τη μέθοδο της διήθησης μέσω μεμβράνης και με τη χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων. Ελήφθησαν δείγματα νερού άρδευσης και ύδρευσης οικισμών στην ευρύτερη περιοχή του Δ. Αποκορώνου του Νομού Χανίων (Εικ. 2.1).



Εικόνα 2.1. Χάρτης Δήμου Αποκορώνου Ν. Χανίων Κρήτης.

Ο Δήμος Αποκορώνου με έδρα τις Βρύσες προέκυψε από τη συνένωση των προϋπαρχόντων Δήμων Αρμένων, Βάμου, Φρε, Κρυονερίδας, Γεωργιούπολης και της κοινότητας Ασή Γωνιάς.

2.2.1 Ολικά κολοβακτηριοειδή

- Διήθηση 100 mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0.45 μm .
- Τοποθέτηση της μεμβράνης στο θρεπτικό υλικό m-Les Endo Agar.
- Επώαση στους 36 ± 2 °C για 21 ± 3 ώρες.

- Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (στο θρεπτικό υλικό m-Les Endo Agar, τα κολοβακτηριοειδή εμφανίζουν αποικίες σκούρου κόκκινου χρώματος με χρυσοπράσινη μεταλλική χροιά).

2.2.2 Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (*E. coli*)

- Διήθηση 100 mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0.45 μm .
- Τοποθέτηση της μεμβράνης στο θρεπτικό υλικό HiCrome E.coli Agar.
- Επώαση στους 37 °C για 24 ώρες.
- Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (στο θρεπτικό υλικό HiCrome E.coli Agar, οι τυπικές αποικίες της *E. coli* είναι πράσινου-μπλε χρώματος).

2.2.3 Κοπρανώδεις εντερόκοκκοι

- Διήθηση 100 mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0.45 μm .
- Τοποθέτηση της μεμβράνης στο θρεπτικό υλικό Slanetz and Bartley Medium.
- Επώαση στους 36 ± 2 °C για 44 ± 4 ώρες.
- Μετά την επώαση και εφόσον έχουν αναπτυχθεί τυπικές αποικίες (καφέ, κόκκινου ή ροζ χρώματος), η μεμβράνη διήθησης μεταφέρεται στο θρεπτικό υλικό Bile Aesculin Agar που έχει προθερμανθεί στους 44 ± 0.5 °C.
- Επώαση στους 44 ± 0.5 °C για 2 ώρες.
- Καταμέτρηση των αποικιών που εμφανίζουν μαύρο χρώμα στο θρεπτικό υλικό (οι αποικίες αυτές λαμβάνονται ως κοπρανώδεις εντερόκοκκοι).

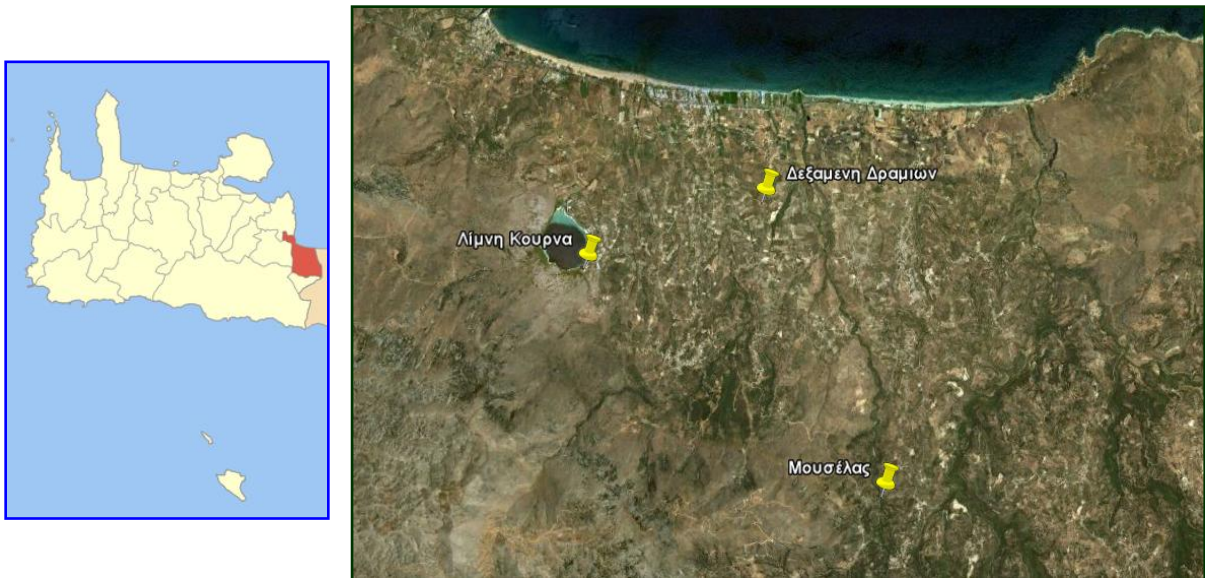
2.3 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των *Cryptosporidium* και *Giardia*

2.3.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα των επιφανειακών νερών για τον έλεγχο της παρουσίας των παράσιτων *Cryptosporidium* και *Giardia* σε αυτά ελήφθησαν από:

- τη λίμνη Κουρνά (10/5/2011),
- το ποτάμι Μουσέλας (18/5/2011 & 2/6/2011) και
- τη δεξαμενή Δραμίων (2/6/2011)

που υπάρχουν στην ευρύτερη περιοχή της Γεωργιούπολης, με τον ποταμό Μουσέλα να αποτελεί το φυσικό όριο μεταξύ των Νομών Χανίων και Ρεθύμνου (Εικ. 2.2).



Εικόνα 2.2. Σημεία δειγματοληψίας για τα παράσιτα.

Η συνδεσμολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή καθενός από τα παραπάνω δείγματα φαίνεται στις Εικόνες 2.3 & 2.4.



Εικόνα 2.3



Εικόνα 2.4

Συνδεσμολογία συλλογής δείγματος επιφανειακού νερού με χρήση του Envirochek φίλτρου στο Μουσέλα.

Αποτελείται από ένα Envirochek φίλτρο, ένα εύκαμπτο HDPE λάστιχο άντλησης, μια αντλία πεδίου που τροφοδοτείται με ρεύμα από επαναφορτιζόμενη μπαταρία και φέρει διακόπτη για τη ρύθμιση της ροής του νερού. Το φίλτρο συνδέεται μέσω του λάστιχου με την αντλία και η παροχή ρυθμίζεται να είναι περίπου 2 L/min, σύμφωνα με τη Μέθοδο 1623. Η άντληση για κάθε δείγμα διήρκεσε περίπου 1 h προκειμένου να διέλθει μέσα από το φίλτρο ποσότητα νερού περίπου ίση με 100 L.

Πριν τη σύνδεση του φίλτρου με το σύστημα άντλησης, τίθεται σε λειτουργία η αντλία επιτρέποντας τη διέλευση ικανοποιητικής ποσότητας από το νερό-δείγμα προκειμένου να ξεπλυθεί το λάστιχο. Κατόπιν, διακόπτεται η λειτουργία της και γίνεται η σύνδεση του φίλτρου με το λάστιχο, έτσι ώστε η ροή του νερού να ακολουθεί τη φορά κίνησης που σημειώνεται με βελάκι πάνω στο φίλτρο από τον κατασκευαστή (Εικ. 2.5). Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην υπάρχει διαρροή νερού στο σημείο σύνδεσης του λάστιχου με το πάνω στόμιο του φίλτρου.



Εικόνα 2.5. Ροή νερού μέσω του Envirochek φίλτρου.

Τίθεται σε λειτουργία η αντλία και ξεκινάει η ροή του νερού στο φίλτρο. Σε αυτή τη φάση, είναι καλό να γίνεται εξαέρωση του φίλτρου, περιστρέφοντας αριστερόστροφα την άσπρη βαλβίδα που βρίσκεται στο πάνω μέρος του, δίπλα στο στόμιο εισόδου. Όταν το εσωτερικό του φίλτρου γεμίσει με νερό, η βαλβίδα εξαέρωσης πρέπει να κλείσει αμέσως. Κατά τη διάρκεια της ροής του νερού στο φίλτρο, καλό είναι αυτό να τοποθετείται σε κατακόρυφη θέση, ώστε η στάθμη του νερού στο εσωτερικό του να υπερκαλύπτει το άσπρο πτυχωτό μέρος του.

Μετά τη συλλογή του δείγματος, διακόπτεται η λειτουργία της αντλίας και επέρχεται σταδιακή πτώση της πίεσης μέχρι να σταματήσει εντελώς η ροή. Αποσυνδέεται το στόμιο εισόδου του φίλτρου με το λάστιχο, προσέχοντας να μη χυθεί το νερό που παραμένει στο πάνω μέρος του φίλτρου, καθώς αποτελεί και αυτό μέρος του δείγματος που θα αναλυθεί. Σφραγίζεται πρώτα το στόμιο εισόδου και μετά το κάτω στόμιο εξόδου του φίλτρου που τοποθετείται σε φορητό ψυγείο με παγοκύστες για τη μεταφορά του στο εργαστήριο. Είναι σημαντικό να διασφαλίζεται ότι η θερμοκρασία του νερού των περιβαλλοντικών δειγμάτων, κατά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, δεν θα ξεπεράσει την αρχική της τιμή (1 - 10°C) για να μην επηρεάζεται η βιολογική δραστηριότητα.

2.3.2 Έκλυση φίλτρων

Η έκλυση πρέπει να ξεκινήσει το αργότερο μέσα σε 96 ώρες από τη συλλογή του δείγματος. Κατά τη συναρμολόγηση στο εργαστήριο του ειδικού για την έκλυση των Envirochek φίλτρων αναδευτήρα (shaker), οι σφιγκτήρες στερεώνονται κάθετα στους οριζόντιους βραχίονες του shaker, ώστε η τοποθέτηση των φίλτρων να γίνεται στην οριζόντια διεύθυνση.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το νερό που παραμένει στο πάνω μέρος του φίλτρου μετά τη δειγματοληψία αποτελεί μέρος του δείγματος και αδειάζεται σε κωνική φιάλη, πριν ξεκινήσει η ανακίνηση. Έχοντας προς τα πάνω το στόμιο εισόδου του φίλτρου, αφαιρείται το καπάκι του και προστίθενται περίπου 120 mL από το διάλυμα έκλυσης, ώστε να καλυφθεί το άσπρο πτυχωτό μέρος του κατά 13 mm περίπου. Το υγρό αφήνεται να ηρεμήσει μέχρι να σταθεροποιηθεί η στάθμη του και επανατοποθετείται το καπάκι.

Η έκλυση των φίλτρων ξεκινά με τη στερέωσή τους στους σφιγκτήρες του shaker κατά τρόπο ώστε η βαλβίδα εξαέρωσής τους να βρίσκεται στη θέση 12 ο' clock (Εικ. 2.6). Επιλέγεται η μέγιστη ταχύτητα ανακίνησης (800 osc/min) και το shaker τίθεται σε λειτουργία για 20 min.



Εικόνα 2.6. Τοποθέτηση φίλτρων στη θέση 12 ο' clock.

Μόλις τελειώσει η ανακίνηση σε αυτήν τη θέση, το κάθε φίλτρο απομακρύνεται από το shaker και το περιεχόμενό του αδειάζεται στην αντίστοιχη κωνική φιάλη. Προστίθεται εκ νέου διάλυμα έκλουσης (περίπου 120 mL) και τα φίλτρα επανατοποθετούνται στο shaker με τη βαλβίδα εξαέρωσης αυτήν τη φορά στη θέση 4 ο' clock, ενώ το shaker τίθεται σε λειτουργία (800 osc/min) για άλλα 20 min (Εικ. 2.7). Μόλις παρέλθει και αυτός ο χρόνος, διακόπτεται η λειτουργία του shaker και ξεσφίγγονται λίγο οι σφιγκτήρες, χωρίς όμως να απομακρυνθούν τα φίλτρα από το shaker και να αδειάσει το περιεχόμενό τους. Απλώς, περιστρέφονται μέσα στους σφιγκτήρες μέχρι η βαλβίδα εξαέρωσης να βρεθεί αυτήν τη φορά στη θέση 8 ο' clock (Εικ. 2.8).



Εικόνα 2.7. Ανακίνηση φίλτρων στη θέση 4 ο' clock.



Εικόνα 2.8. Ανακίνηση φίλτρων στη θέση 8 ο' clock.

Οι σφιγκτήρες βιδώνονται και το shaker τίθεται σε λειτουργία (800 osc/min) για άλλα 20 min. Κατόπιν, τα φίλτρα απομακρύνονται από το shaker και το περιεχόμενο του καθενός αδειάζεται στην κωνική φιάλη που του αντιστοιχεί.

2.3.3 "Συμπύκνωση" δείγματος (Sample Concentration)

- Το προϊόν έκλουσης από κάθε φίλτρο κατανέμεται ισόποσα σε σωληνάκια φυγοκέντρησης και "συμπυκνώνεται" με φυγοκέντρωση στα 2000 x g για 15 min, χωρίς τη χρήση φρένου.

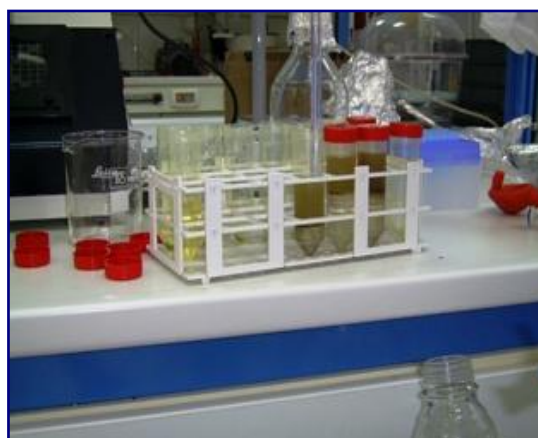
- Γίνεται αναρρόφηση και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μη διαταραχθεί το ίζημα (pellet) στη βάση κάθε σωλήνα, γιατί είναι αυτό που μπορεί να περιέχει τις ωοκύστες κρυπτοσποριδίου ή/και κύστες γιάρδιας.
- Προστίθενται 200 μ L Tween 80 και περίπου 1 mL διαλύματος έκλουσης για να διευκολυνθεί η ανάδευση του ιζήματος. Όλα τα διαλυμένα ιζήματα που προέρχονται από το ίδιο δείγμα μεταφέρονται στο ίδιο σωληνάκι και μπορούν να διατηρηθούν σε αυτό το στάδιο στους -20°C .

2.3.4 "Καθαρισμός" δείγματος (Sample Purification)

- Εάν στο τέλος του προηγούμενου σταδίου εκτιμάται ότι ο συνολικός όγκος του διαλυμένου ιζήματος σε κάθε σωληνάκι είναι μεγαλύτερος από 0.5 mL, τότε ο όγκος αυτός μοιράζεται ισόποσα σε σωληνάκια φυγοκέντρησης, έτσι ώστε να μην υπερβαίνει τα 0.5 mL σε καθένα από αυτά.
- Προσθήκη διαλύματος έκλουσης (μέχρι τελικό όγκο 20 mL) και 30 mL δ/τος σουκρόζης 2.5 M (κάτω από τη φάση του ιζήματος), οπότε σχηματίζονται 3 ευδιάκριτες φάσεις (Εικ. 2.9 & 2.10).



Εικόνα 2.9



Εικόνα 2.10

Προσθήκη διαλύματος σουκρόζης και διαχωρισμός φάσεων σε κάθε σωληνάκι.

- Φυγοκέντρωση στα 1100 x g για 10 min, χωρίς τη χρήση φρένου.
- Απομακρύνονται τα πρώτα 20 mL της επάνω φάσης, η διαχωριστική επιφάνεια και 5 mL της κάτω φάσης της σουκρόζης και τοποθετούνται σε νέο σωληνάκι φυγοκέντρωσης.
- Προσθήκη διαλύματος έκλουσης μέχρι τελικό όγκο 50 mL.
- Φυγοκέντρωση στα 1100 x g για 10 min, χωρίς τη χρήση φρένου.
- Αναρρόφηση και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού ώστε να παραμείνει σε κάθε σωληνάκι συνολικός όγκος $\approx$ 5 mL μαζί με το ίζημα.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με vortex και προσθήκη διαλύματος έκλουσης μέχρι τελικό όγκο 50 mL.
- Φυγοκέντρωση στα 1100 x g για 10 min, χωρίς φρένο.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 mL PBS (Εικ. 2.11).
- Φύλαξη στους -20°C .



Εικόνα 2.11. Το δείγμα μετά την 3^η κατά σειρά φυγοκέντρωση της διαδικασίας "καθαρισμού" του.

2.3.5 Απομόνωση DNA από Κρυπτοσπορίδιο – Γιάρδια

Στην παρούσα εργασία, η απομόνωση του γενετικού υλικού από τα παράσιτα *Cryptosporidium* και *Giardia* έγινε εφαρμόζοντας δύο πρωτόκολλα για σύγκριση της αποτελεσματικότητάς τους. Το πρώτο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Φυγοκέντρωση δείγματος (100-500 μ L) στα 1400 x g για 5 min, στους 4 °C.
2. Απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 400-500 μ L lysis buffer: 50 mM Tris HCl + 20 mM EDTA (pH 8) + 0.5% Sarcosyl + 2 mg Prot K/mL.
3. Επώαση (block heater) στους 56 °C για 90 min.
4. Προσθήκη δ/τος NaCl 5 M μέχρι τελική συγκέντρωση 1 M.
5. Προσθήκη CTAB μέχρι τελική συγκέντρωση 1%.
6. Επώαση στους 65 °C για 3 min.
7. Τοποθέτηση εναλλάξ στους -80 °C για 5 min και στους 65 °C για 5 min (5 κύκλοι) και μετά τον τελευταίο κύκλο επώαση στους 95 °C για 5 min.
8. Προσθήκη 750 μ L δ/τος φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης και έντονη ανάδευση με vortex.
9. Φυγοκέντρωση στα 6000 x g για 10 min.
10. Λήψη πάνω υδατικής φάσης (3 φάσεις μετά τη φυγοκέντρωση) και μεταφορά της σε νέο σωληνάκι.
11. Προσθήκη 500 μ L ισοπροπανόλης με ταυτόχρονη ανάδευση.

12. Φύλαξη στους -20°C για μια νύχτα.
13. Την επόμενη μέρα, γίνεται φυγοκέντρωση στα $10000 \times g$ για 20 min (4°C).
14. Απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού και καθαρισμός του γενετικού υλικού με προσθήκη 500 μL αιθανόλης 70%.
15. Φυγοκέντρωση στα $10000 \times g$ για 10 min (4°C).
16. Απόρριψη αιθανόλης και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 500 μL αιθανόλης 70%.
17. Ξανά φυγοκέντρωση στα $10000 \times g$ για 10 min (4°C).
18. Λήψη ιζήματος και επώαση στους 37°C μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη.
19. Επαναδιάλυση του γενετικού υλικού σε 50 μL υπερκάθαρου νερού (milliQ H_2O).
20. Φύλαξη του απομονωμένου γενετικού υλικού στους -20°C .

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε και το πρωτόκολλο freeze-thaw των Nichols et al. (2003):

1. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων (500 μL) στα $3000 \times g$ για 10 min.
2. Απομάκρυνση του υπερκείμενου με πιπέττα.
3. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 500 μL lysis buffer: 50 mM Tris HCl + 20 mM EDTA (pH 8) + 0.5% SDS.

4. Πραγματοποίηση 15 κύκλων Freeze (στους -80°C για 3 min) – Thaw (στους 65°C για 3 min) για τη μέγιστη δυνατή εκχύλιση γενετικού υλικού από τις κύστες/ωοκύστες.
5. Απλή φυγοκέντρωση (spin).
6. Προσθήκη proteinase K με τελική συγκέντρωση $200\text{ }\mu\text{g/mL}$.
7. Επώαση στους 55°C για 3 h.
8. Επώαση στους 90°C για 20 min.
9. Παραμονή στον πάγο για 1 min.
10. Φυγοκέντρωση στα $14000 \times g$ για 5 min.
11. Λήψη υπερκείμενου και φύλαξη στους -20°C .

2.4 Φωτομέτρηση DNA

Η φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο έγινε για μια πρώτη εκτίμηση της παρουσίας ή όχι γενετικού υλικού στα δείγματα, μετά το στάδιο της απομόνωσης και με τις δύο μεθόδους. Πραγματοποιείται στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, ενώ η οπτική απορρόφηση (OD) στα 260 nm επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του νουκλεϊκού οξέος στο υπό εξέταση δείγμα. Είναι γνωστό ότι σε $\text{OD}_{260} = 1$ αντιστοιχούν $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ δίκλωνου DNA, $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ μονόκλωνου DNA & RNA και περίπου $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Η τιμή του λόγου των οπτικών απορροφήσεων στα δύο μήκη κύματος 260 nm και 280 nm αποτελεί ένα δείκτη της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος. Όταν $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} = 1.8 - 2.0$, τότε το γενετικό υλικό χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα.

2.5 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση με Real-time PCR

Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παράσιτων *Cryptosporidium* και *Giardia* εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι TaqMan και SYBR Green της Real-time PCR, με τους primers και probes της § 2.1.7 του παρόντος κεφαλαίου. Για κάθε δείγμα, η αντίδραση PCR επαναλήφθηκε δύο (2) φορές και οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων υλικών ήταν:

Για την TaqMan Real-time PCR

Το μίγμα αντίδρασης (25 µL) περιείχε:

Για το <i>C. parvum</i> :		Για τη <i>G. lamblia</i> :	
Master mix	2.0X	Master mix	2.0X
P702 F	600 nM	P241 F	600 nM
P702 R	600 nM	P241 R	600 nM
P702 PROBE	200 nM	P241 PROBE	200 nM
DNA	10.0X	DNA	10.0X

Οι εναλλαγές των θερμοκρασιών διαμορφώθηκαν ως εξής:

- για το *C. parvum* (40 κύκλοι) → αρχική επώαση στους 50 °C για 2 min και 95 °C για 10 min και σε κάθε κύκλο: 95 °C για 15 sec και 60 °C για 60 sec.
- για την *G. lamblia* (40 κύκλοι) → αρχική επώαση στους 50 °C για 2 min και 95 °C για 10 min και σε κάθε κύκλο: 95 °C για 15 sec και 60 °C για 60 sec.

Για το *Cryptosporidium* Real-Time PCR kit

Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του *Cryptosporidium* χρησιμοποιήθηκε και το *Cryptosporidium* Real Time PCR kit (Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd), όπου το μίγμα αντίδρασης (25 µL) περιείχε:

Για το <i>C. parvum</i> (kit):	
Master mix (Reaction mix, Enzyme mix, Internal Control)	2.0X
DNA	10.0X

Την αρχική επώαση στους 37 °C για 2 min ακολούθησαν 40 κύκλοι αντίδρασης με: 94 °C για 2 min, 93 °C για 15 sec και 60 °C για 60 sec σε καθέναν.

Για την SYBR Green Real-time PCR

Το μίγμα αντίδρασης (20 μ L) περιείχε:

Για το <i>C. parvum</i>:		Για τη <i>G. lamblia</i>:	
Master mix	2.0X	Master mix	2.0X
P702 F	500 nM	P241 F	500 nM
P702 R	500 nM	P241 R	500 nM
DNA	10.0X	DNA	10.0X

Οι εναλλαγές των θερμοκρασιών σε κάθε κύκλο αντίδρασης ήταν:

- για το *C. parvum* (45 κύκλοι) → αρχική επώαση στους 95 °C για 10 min και σε κάθε κύκλο: 95 °C για 30 sec, 60 °C για 60 sec και 72 °C για 30 sec.
- για την *G. lamblia* (40 κύκλοι) → αρχική επώαση στους 95 °C για 10 min και σε κάθε κύκλο: 95 °C για 15 sec, 60 °C για 30 sec και 72 °C για 10 sec.

Για την κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης εφαρμόστηκαν τα παρακάτω προφίλ θερμοκρασιών:

- για το *C. parvum* (45 κύκλοι) → 95 °C για 15 sec, 60 °C για 60 sec και 95 °C για 15 sec.
- για την *G. lamblia* (40 κύκλοι) → 95 °C για 15 sec, 60 °C για 30 sec και 95 °C για 15 sec.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Μικροβιολογική ανάλυση νερών (Δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης)

Οι τιμές των δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης (Total Coliforms: T.C., Fecal Coliforms: F.C., Fecal Streptococci: F.S.) προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της διήθησης μέσω μεμβράνης σε δείγματα νερών που σχετίζονται με τον έλεγχο των παράσιτων. Τα δείγματα του Πίνακα 3.1 ελήφθησαν από διάφορα σημεία κατά μήκος του αρδευτικού δικτύου στην ευρύτερη περιοχή της Γεωργιούπολης, όπου το νερό άρδευσης προέρχεται από τη δεξαμενή Δραμίων.

Πίνακας 3.1. Δειγματοληψία από αρδευτικό δίκτυο περιοχής Γεωργιούπολης – 22/2/2011

<i>α/α</i>	<i>Τοποθεσία</i>	<i>T.C.</i>	<i>F.C.</i>	<i>F.S.</i>
1	Βάνα Υ120	180	0	0
2	Βάνα Υ100	150	0	0
3	Λίμνη Κουρνά (μάτι)	149	2	5
4	Βάνα Υ5Α (πριν δεξαμενή Παλιομέτοχο)	170	1	0
5	Δεξαμενή Παλιομέτοχο (Υ5Α μετά)	220	0	1
6	Βάνα Υ22	205	1	5
7	Βάνα Υ38	143	0	4
8	Βάνα Υ14	217	0	2
9	Πριν δεξαμενή Δραμίων (νερά Αργυρούπολης)	200	0	4
10	Δεξαμενή Δραμίων (νερά Αργυρούπολης)	78	1	1

Η δεξαμενή στα Δράμια τροφοδοτείται από τις πηγές της Αργυρούπολης, καθόλη τη διάρκεια του έτους, ενώ το καλοκαίρι δέχεται νερό και από τη λίμνη Κουρνά. Το νερό της τους θερινούς μήνες, εκτός από την άρδευση, χρησιμοποιείται και για την ύδρευση κάποιων οικισμών της περιοχής, αφού προηγουμένως υποστεί χλωρίωση. Το μεγάλο μικροβιακό φορτίο των ως άνω δειγμάτων μπορεί εν μέρει να σχετίζεται με διαρροές κατά μήκος του αρδευτικού δικτύου.

Ο οικισμός της Ασή Γωνιάς υδρεύεται από τις ομώνυμες πηγές του, με πολύ καλή ποιότητα νερού, όπως φαίνεται και από τις τιμές των μικροβιολογικών δεικτών στον Πίνακα 3.2. Η έντονη, όμως, κτηνοτροφική δραστηριότητα που παρατηρείται σε αυτόν έχει ενοχοποιηθεί για το μεγάλο μικροβιακό φορτίο του κατάντη προσκείμενου ποταμού Μουσέλα, ο οποίος τροφοδοτείται με νερά από τις πηγές της Ασή Γωνιάς και της Αργυρούπολης.

Πίνακας 3.2. Δειγματοληψία από οικισμό Ασή Γωνιάς – 4/3/2011

<i>α/α</i>	<i>Τοποθεσία</i>	<i>T.C.</i>	<i>F.C.</i>	<i>F.S.</i>
1	Πηγή	0	0	0
2	Δεξαμενή ύδρευσης	4	1	0
3	Νερό βρύσης (καφενείο)	1	2	0

Ταυτόχρονα με τη δειγματοληψία για την ανίχνευση των παράσιτων στα επιφανειακά νερά της λίμνης Κουρνά (10/5/11), του Μουσέλα (18/5/11 & 2/6/11) και της δεξαμενής Δραμίων (2/6/11), ελήφθησαν και δείγματα νερού για τον έλεγχο των δεικτών κοπρανώδους προέλευσης (Πιν. 3.3, 3.4 & 3.5).

Πίνακας 3.3. Δειγματοληψία από λίμνη Κουρνά (τοποθεσία "μάτι") – 10/5/2011

<i>α/α</i>	<i>Τοποθεσία</i>	<i>T.C.</i>	<i>F.C.</i>	<i>F.S.</i>
1	Λίμνη Κουρνά (μάτι)	32	5	2

Η ποιότητα του νερού της λίμνης Κουρνά ("μάτι") φαίνεται πως είναι καλύτερη το μήνα Μάιο σε σχέση με το Φεβρουάριο (Πίν. 3.1). Αυτό οφείλεται ενδεχομένως στον εμπλουτισμό της με βρόχινο νερό καθώς και με νερά από το λιώσιμο του χιονιού στα βουνά που την περιβάλλουν, κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος-Μάιος. Πάντως, για το μικροβιακό της φορτίο δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να ενοχοποιηθεί το υπόγειο νερό που την τροφοδοτεί, γιατί τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα Δεκέμβριος 2007 - Δεκέμβριος 2008 οι αναλύσεις σε δείγματά του έδειξαν μηδενικές τιμές των δεικτών *E. coli* και στρεπτόκοκκων. Γι' αυτό, ευθύνονται αφενός οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες (καφέ, εστιατόρια) που αναπτύσσονται κυρίως στην ανατολική πλευρά της και αφετέρου

τα ζωικά απόβλητα που καταλήγουν σε αυτή μέσω της έκπλυσης του εδάφους (Stavroulakis et al., 2010).

Πίνακας 3.4. Δειγματοληψία από ποταμό Μουσέλα – 18/5/2011

<i>α/α</i>	<i>Τοποθεσία</i>	<i>T.C.</i>	<i>F.C.</i>	<i>F.S.</i>
1	Ποτάμι Μουσέλας	TMTC*	190	TMTC

*Too Much To Count

Πίνακας 3.5. Δειγματοληψία από Μουσέλα & δεξαμενή Δραμίων – 2/6/2011

<i>α/α</i>	<i>Τοποθεσία</i>	<i>T.C.</i>	<i>F.C.</i>	<i>F.S.</i>
1	Δεξαμενή Δραμίων	35	0	3
2	Ποτάμι Μουσέλας	TMTC	99	103

Από τις τιμές των μικροβιολογικών δεικτών στα δείγματα του Μουσέλα (Πίν. 3.4 & 3.5) προκύπτει ξεκάθαρα το μεγάλο μικροβιακό του φορτίο ως αποτέλεσμα της έντονης κτηνοτροφικής δραστηριότητας στον ανάντη οικισμό της Ασή Γωνιάς. Η δεξαμενή Δραμίων στις 2/6/11 (Πίν. 3.5) δεχόταν νερό από τις πηγές Αργυρούπολης και από τη λίμνη Κουρνά.

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης του νερού ύδρευσης σε οικισμούς στην ευρύτερη περιοχή Γεωργιούπολης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. Οι οικισμοί αυτοί υδρεύονται από τις πηγές της Αργυρούπολης, μέσω της δεξαμενής στα Δράμια και από τη λίμνη Κουρνά, μέσω αντλιοστασίου και δεξαμενής χλωρίωσης.

Πίνακας 3.6. Δειγματοληψία από Δ.Ε. Γεωργιούπολης (ύδρευση) – 17/5/2011

<i>a/a</i>	<i>Τοποθεσία</i>	<i>T.C.</i>	<i>F.C.</i>	<i>F.S.</i>
1	ΚΑΒΑΛΛΟΣ (μετά τη δεξαμενή) – λ. Κουρνά	0	0	0
2	ΚΟΥΡΝΑΣ (οικισμός) – λ. Κουρνά	0	0	0
3	ΚΑΣΤΕΛΛΟΣ (οικισμός) – δεξ. Δράμια	35	1	10
4	ΦΥΛΑΚΗ (οικισμός) – δεξ. Δράμια	0	0	0
5	ΔΡΑΜΙΑ (πριν δεξ. χλωρίωσης, χλωριωτής off)	130	18	13
6	ΚΑΒΡΟΣ (Δημαρχείο) – δεξ. Δράμια	0	0	0
7	ΛΙΜΝΗ ΚΟΥΡΝΑ (πριν δεξ. χλωρίωσης)	2	0	0
8	ΔΕΞ. ΚΑΝΤΟΥΝΑΣ (χλωρ. νερό από λ. Κουρνά)	0	0	0
9	ΓΕΩΡΓΙΟΥΠΟΛΗ (Αστ. Τμήμα) – δεξ. Δράμια	0	0	0
10	ΓΕΩΡΓΙΟΥΠΟΛΗ (PILOT) – δεξ. Δράμια	0	0	0

Από τις τιμές των μικροβιολογικών δεικτών στον ως άνω πίνακα προκύπτει πως είναι αναγκαία η χλωρίωση του πόσιμου νερού είτε προέρχεται από τη λίμνη Κουρνά είτε από τη δεξαμενή Δραμίων.

3.2 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση *Cryptosporidium* και *Giardia*

3.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

Μια βασική προϋπόθεση για την επίτευξη της μέγιστης αποτελεσματικότητας στην ανίχνευση των παράσιτων σε περιβαλλοντικά δείγματα με μοριακές τεχνικές είναι η ικανότητα εκχύλισης όλου του DNA από τις κύστες και τις ωοκύστες. Γι' αυτό και η απομόνωση του γενετικού υλικού είναι ένα στάδιο με ιδιαίτερη βαρύτητα και στην παρούσα εργασία έγινε εφαρμόζοντας δύο πρωτόκολλα προκειμένου να εκτιμηθεί και να συγκριθεί η αποτελεσματικότητά τους. Αυτό που ενδιαφέρει δεν είναι μόνον η ποσότητα, αλλά και η καλύτερη δυνατή ποιότητα του DNA που εκχυλίζεται (Guy et al., 2003). Το τελευταίο ισοδυναμεί με την καθαρότητα του γενετικού υλικού.

Μια πρώτη εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων απομόνωσης γίνεται με τη φωτομέτρηση στα 260 nm και 280 nm. Εάν η τιμή του λόγου των δύο οπτικών απορροφήσεων (OD_{260}/OD_{280}) είναι μεταξύ 1.8 – 2.0, τότε το γενετικό υλικό

χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα και το αντίστοιχο πρωτόκολλο απομόνωσης από μεγάλη αποτελεσματικότητα. Στον Πίνακα 3.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των δειγμάτων μετά το 1^ο πρωτόκολλο απομόνωσης, όπου η προσθήκη της πρωτεΐνης K στο lysis buffer γινόταν εξ αρχής και ακολουθούσαν οι 5 freeze-thaw κύκλοι, ενώ στο τέλος το γενετικό υλικό καθαριζόταν με την προσθήκη αιθανόλης 70%.

Πίνακας 3.7. Φωτομέτρηση δειγμάτων από 1^ο πρωτόκολλο απομόνωσης

<i>Δείγματα</i>	<i>OD₂₆₀</i>	<i>OD₂₈₀</i>	<i>OD₂₆₀ / OD₂₈₀</i>	<i>Ποσότητα γεν. υλικού (ng/μL)</i>
Λίμνη Κουρνά (10/5/11)	0,3587	0,3423	1,05	1.255,45
Μουσέλας (18/5/11)	0,0311	0,0262	1,18	108,85
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	0,0174	0,0122	1,42	60,90
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	0,0319	0,0213	1,50	111,65
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	0,0580	0,0431	1,35	203,00
Μουσέλας (2/6/11)	0,0260	0,0200	1,30	91,00
Μουσέλας (2/6/11)	0,0102	0,0083	1,23	35,70
Μουσέλας (2/6/11)	0,0570	0,0486	1,17	199,50

Στο στάδιο του "καθαρισμού", το δείγμα από τη δεξαμενή στα Δράμια (2/6/11) χωρίστηκε σε τρία (3) υποδείγματα, γιατί περιείχε μεγάλη ποσότητα διαλυμένου ιζήματος (> 0.5 mL) που μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά την περαιτέρω διαδικασία και να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Το ίδιο συνέβη και με το δείγμα από Μουσέλα (2/6/11).

Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης των δειγμάτων μετά το 2^ο πρωτόκολλο απομόνωσης, όπου η προσθήκη της πρωτεΐνης K στο lysis buffer γινόταν μετά τους 15 freeze-thaw κύκλους.

Πίνακας 3.8. Φωτομέτρηση δειγμάτων από 2^ο πρωτόκολλο απομόνωσης

<i>Δείγματα</i>	<i>OD₂₆₀</i>	<i>OD₂₈₀</i>	<i>OD₂₆₀ / OD₂₈₀</i>	<i>Ποσότητα γεν. υλικού (ng/μL)</i>
Λίμνη Κουρνά (10/5/11)	0,0170	0,0032	5,31	59,50
Μουσέλας (18/5/11)	0,0271	0,0039	6,98	94,85
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	0,0565	0,0078	7,28	197,75
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	0,0238	0,0060	4,00	83,30
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	0,0379	0,0103	3,67	132,65
Μουσέλας (2/6/11)	0,0479	0,0169	2,84	167,65
Μουσέλας (2/6/11)	0,0475	0,0125	3,80	166,25
Μουσέλας (2/6/11)	0,2233	0,1382	1,61	781,55

Σε γενικές γραμμές, στο στάδιο απομόνωσης του γενετικού υλικού των παράσιτων, μέσω των διαδοχικών κύκλων ψύξης-απόψυξης, επιχειρείται αρχικά το σπάσιμο των εξωτερικών σκληρών περιβλημάτων που τα προστατεύουν από τις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος. Εν συνεχεία, με τη χρήση διάφορων διαλυμάτων στις κατάλληλες θερμοκρασίες γίνεται ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και εκχύλιση του γενετικού υλικού που βρίσκεται στον πυρήνα των ευκαρυωτικών τους κυττάρων. Συγκρίνοντας, λοιπόν, τις τιμές των λόγων OD_{260}/OD_{280} στους Πίνακες 3.8 & 3.9 φαίνεται πως η απομόνωση με το 1^ο πρωτόκολλο είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με το 2^ο, καθώς οι μικρότερες τιμές υποδεικνύουν μεγαλύτερη καθαρότητα νουκλεϊκού οξέος.

Επειδή πρόκειται για περιβαλλοντικά δείγματα, είναι δεδομένο ότι θα συνυπάρχουν διάφοροι οργανισμοί, ουσίες και υλικά που αν δεν απομονωθούν εγκαίρως, ενδέχεται να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την εξέτασή τους για ωοκύστες *Cryptosporidium* και κύστες *Giardia* προκαλώντας παρεμβολές, με αποτέλεσμα την εξαγωγή ψευδών αποτελεσμάτων. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία προκύπτει ότι το απομονωμένο γενετικό υλικό "καθαρίζεται" καλύτερα από τις διάφορες αλλότριες προσμίξεις με την εφαρμογή του 1^{ου} πρωτοκόλλου απομόνωσης.

3.2.2 Ανίχνευση *Cryptosporidium* με TaqMan Real-time PCR

Το γονίδιο COWP που επιλέχθηκε για την ανίχνευση του *C. parvum* απαντάται μόνον σε αυτόν το μικροοργανισμό και κατά συνέπεια η ανίχνευσή του αποτελεί αδιάψευστο μάρτυρα της παρουσίας του εν λόγω παράσιτου σε ένα δείγμα. Ευθύνεται για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης που παίζει βασικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του εξωτερικού τοιχώματος των ωοκύστεων, ώστε το παράσιτο να μπορεί να ανταπεξέρχεται στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος, μέχρι να εισβάλλει σε κάποιον νέο ξενιστή (Guy et al., 2003).

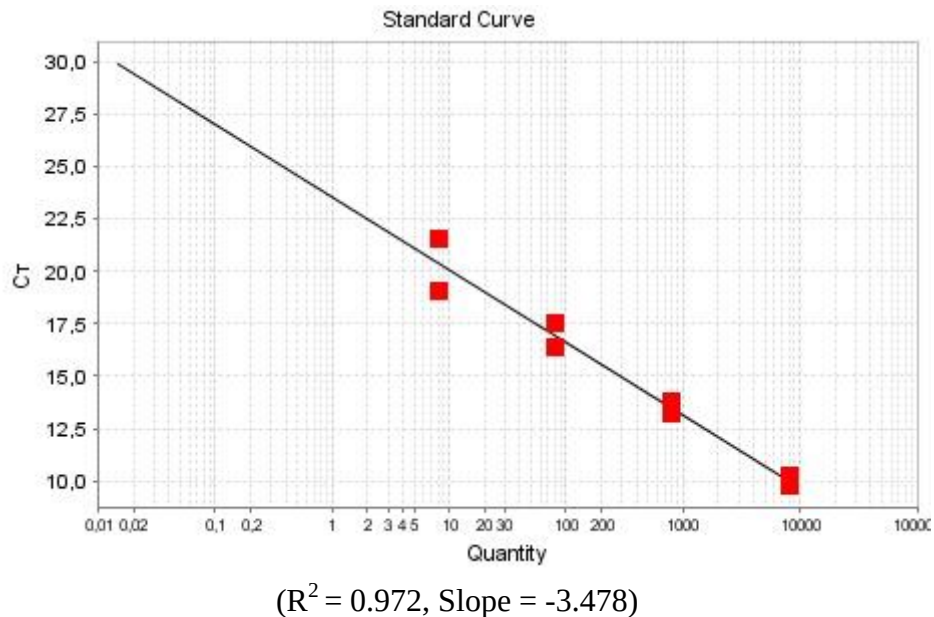
Η ανίχνευση του *Cryptosporidium* με την εφαρμογή της μεθόδου TaqMan Real-time PCR και του αντίστοιχου σετ εκκινήτων-ιχνηθέτη (P702 F, P702 R - P702 PROBE) δεν κατέστη δυνατή, ακολουθώντας το συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε ό,τι αφορά την εναλλαγή των θερμοκρασιών της PCR. Τα χαμηλά επίπεδα παρουσίας του παράσιτου στα δείγματα σε συνδυασμό με το μέγεθος του προϊόντος της PCR (151-bp), ενδεχομένως να οδήγησαν σε αυτό το αποτέλεσμα. Έχει βρεθεί ότι το μέγεθος του γονιδίου-στόχου επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης PCR. Έτσι, είναι πιο πιθανό κατά τη διάρκεια ενός κύκλου να οδηγείται σε πλήρη σύνθεση ένα τμήμα γονιδίου με μέγεθος 100 bp, σε σχέση με κάποιο άλλο 1200 bp. Γι' αυτό και τα μεγέθη των προεπιλεγμένων αλληλουχιών στις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης κυμαίνονται συνήθως μεταξύ 60-200 bp (www.invitrogen.com/Basic principles of real-time PCR).

Επίσης, διάφορες μελέτες έχουν επισημάνει και τη σημασία μεγέθους του ιχνηθέτη που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Η επιλογή ιχνηθετών ακόμη και με ελάχιστα πιο μικρό μήκος βελτιώνει πολύ την ευαισθησία της μεθόδου στα όρια ανίχνευσης (πιο χαμηλά όρια). Αυτό συμβαίνει, μεταξύ άλλων, γιατί όσο πιο μικρή είναι η απόσταση μεταξύ των δύο χρωστικών (Quencher, Reporter) στον ιχνηθέτη, τόσο πιο ενισχυμένο εμφανίζεται το επίπεδο της απόσβεσης και κατά συνέπεια τόσο πιο έντονο και βελτιωμένο είναι το εκπεμπόμενο σήμα (Mackay et al., 2007; Alonso et al., 2011).

Επιπλέον, επισημαίνεται ότι στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν περιβαλλοντικά δείγματα, τα οποία χρήζουν ιδιαίτερου χειρισμού λόγω των πολλών προσμίξεων που περιέχουν. Οι προσμίξεις αυτές προκαλούν παρεμβολές και παίζουν το ρόλο των αναστολέων, κατά την εφαρμογή μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση διάφορων μικροοργανισμών. Έτσι, μπορούν πολύ εύκολα να οδηγήσουν σε σημαντική μείωση της ευαισθησίας ή ακόμη και σε αναστολή της αντίδρασης PCR (Alonso et al., 2011).

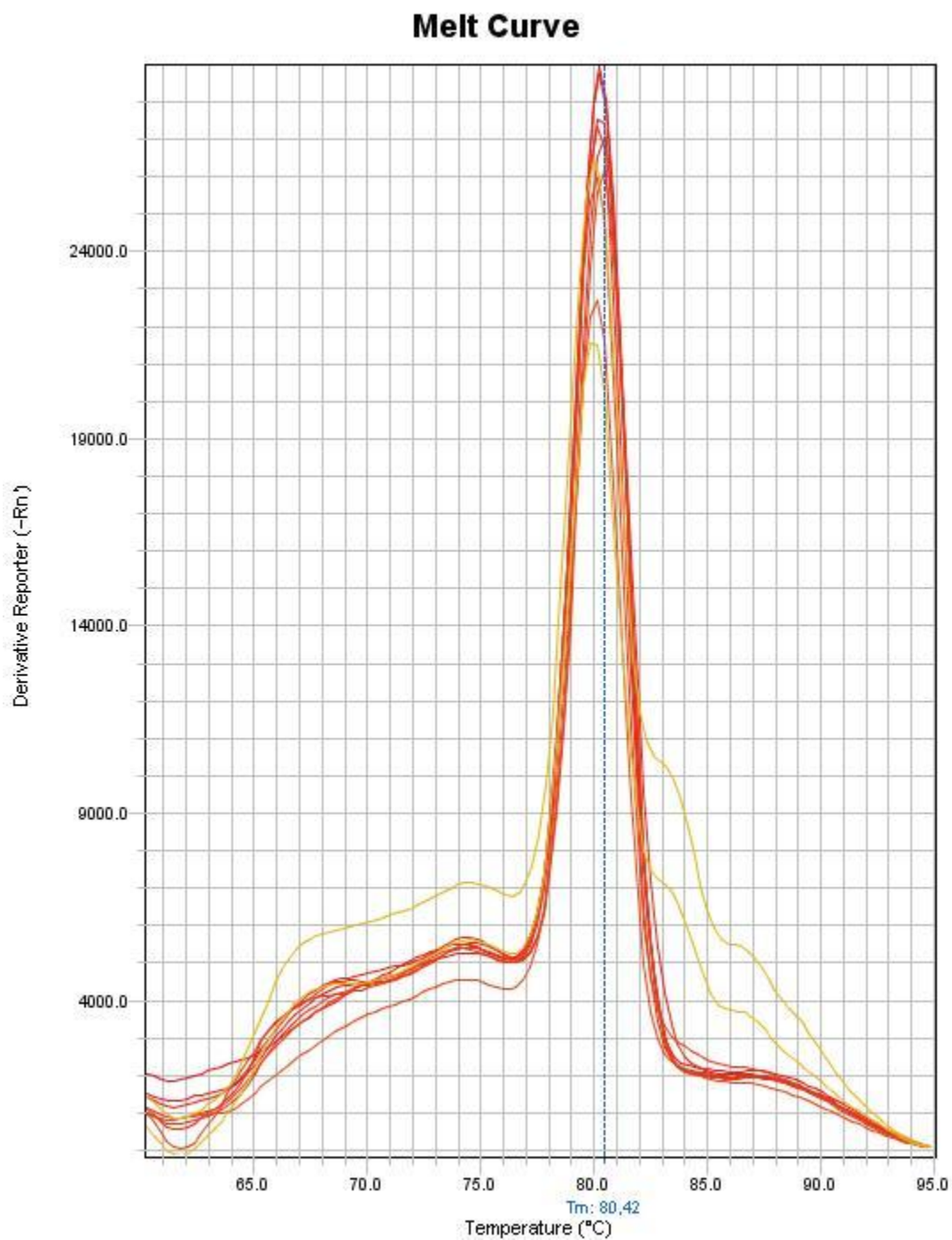
3.2.3 Ανίχνευση *Cryptosporidium* με SYBR Green Real-time PCR

Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε για το *Cryptosporidium* με την εφαρμογή της SYBR Green Real-time PCR φαίνεται στο Διάγραμμα 3.1. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (0.972) και της κλίσης (-3.478) υποδεικνύουν μια καλή αντίδραση.



Διάγραμμα 3.1. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το *Cryptosporidium* (SYBR Green Real-time PCR).

Στο Διάγραμμα 3.2 φαίνεται η σχηματιζόμενη καμπύλη αποδιάταξης και η αντίστοιχη θερμοκρασία αποδιάταξης ($T_m=80,42\text{ }^{\circ}\text{C}$) του προϊόντος της αντίδρασης.



Διάγραμμα 3.2. Η καμπύλη αποδιάταξης για το *Cryptosporidium* (SYBR Green Real-time PCR).

Παρατηρείται ότι στην ως άνω καμπύλη αποδιάταξης εμφανίζεται μία μόνον κορυφή που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία $T_m=80,42\text{ }^{\circ}\text{C}$ και σε συγκεκριμένο προϊόν της PCR καθότι η θερμοκρασία αποδιάταξης είναι χαρακτηριστική για κάθε τμήμα γονιδίου και εξαρτάται από το μέγεθός του. Έτσι, διασφαλίζεται ότι δεν παράγονται διμερή εκκινητών ή άλλα παραπροϊόντα από την αντίδραση, γιατί τότε θα εμφανίζονταν περισσότερες κορυφές που θα αντιστοιχούσαν στα διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA. Με τον τρόπο αυτό πιστοποιείται ότι το φθορίζον σήμα που ανιχνεύεται αντιστοιχεί στη συγκέντρωση αντιγράφων του προεπιλεγμένου τμήματος γονιδίου.

Τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά στο παράσιτο ήταν από τον ποταμό Μουσέλα (18/5/11 & 2/6/11) και από τη δεξαμενή στα Δράμια (2/6/11), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.9 που ακολουθεί. Η απομόνωση έγινε με το 1^ο πρωτόκολλο.

Πίνακας 3.9. Αποτελέσματα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του *Cryptosporidium* με την SYBR Green Real-time PCR.

<i>Δείγμα</i>	<i>Ωοκύστεις Cryptosporidium</i>	
	<i>Αντίγραφα γονιδίου/L</i>	<i>parvum/L*</i>
Λ. Κουρνά (10/5/11)	0	0
Μουσέλας (18/5/11)	$29,47 \pm 2,32$	7 ± 1
Μουσέλας (2/6/11)	$31,11 \pm 1,02$	8 ± 1
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	$79,30 \pm 12,29$	20 ± 3

*Κάθε ωοκύστη περιέχει 4 αντίγραφα του COWP γονιδίου (Guy et al., 2003).

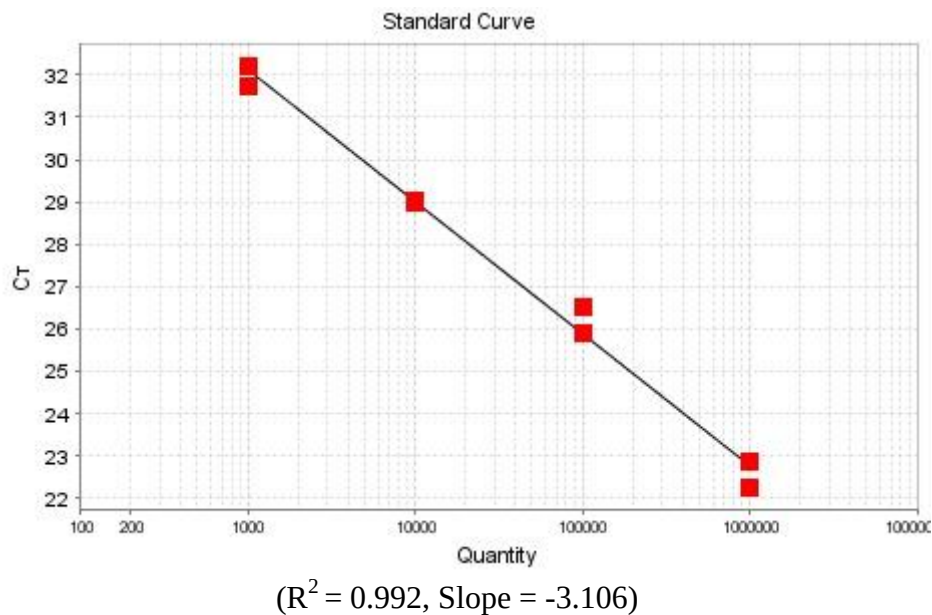
Η ανίχνευση του παράσιτου στον ποταμό Μουσέλα δεν προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία, εφόσον τα νερά του δεν προορίζονται για πόση. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν δεν είναι αμελητέες, αν τις συγκρίνει κανείς με τη μεγαλύτερη για την ελληνική επικράτεια συγκέντρωση του *Cryptosporidium* που έχει μετρηθεί από τους Karanis et al. (2005) στον ποταμό Μαυρονέρι της Πιερίας στη Βόρεια Ελλάδα (40,8 ωοκύστεις/100 L).

Παρόλο που η συγκέντρωση του παράσιτου στο δείγμα της δεξαμενής Δραμίων δεν είναι μεγάλη, καθιστά αναγκαία την εφαρμογή κάποιας επιπλέον μεθόδου για την

απομάκρυνση των ωοκύστεων, δεδομένου ότι η ισχύουσα νομοθεσία για το πόσιμο νερό ορίζει ως παραμετρική τιμή για το *Cryptosporidium* το μηδέν (αριθμός ωοκύστεων/100 mL).

3.2.4 Ανίχνευση *Cryptosporidium* με Real-time PCR Kit

Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε από την ανίχνευση του *Cryptosporidium* με το Real-time PCR Kit φαίνεται στο Διάγραμμα 3.3. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (0.992) και της κλίσης (-3.106) πιστοποιούν μια καλή και αποτελεσματική αντίδραση.



Διάγραμμα 3.3. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το *Cryptosporidium* (Real-time PCR Kit).

Το παράσιτο ανιχνεύθηκε κι εδώ στα δείγματα από τον ποταμό Μουσέλα και από τη δεξαμενή στα Δράμια, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.10. Η απομόνωση του γενετικού υλικού έγινε με το 1^ο πρωτόκολλο.

Πίνακας 3.10. Αποτελέσματα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του *Cryptosporidium* με το Real-time PCR Kit.

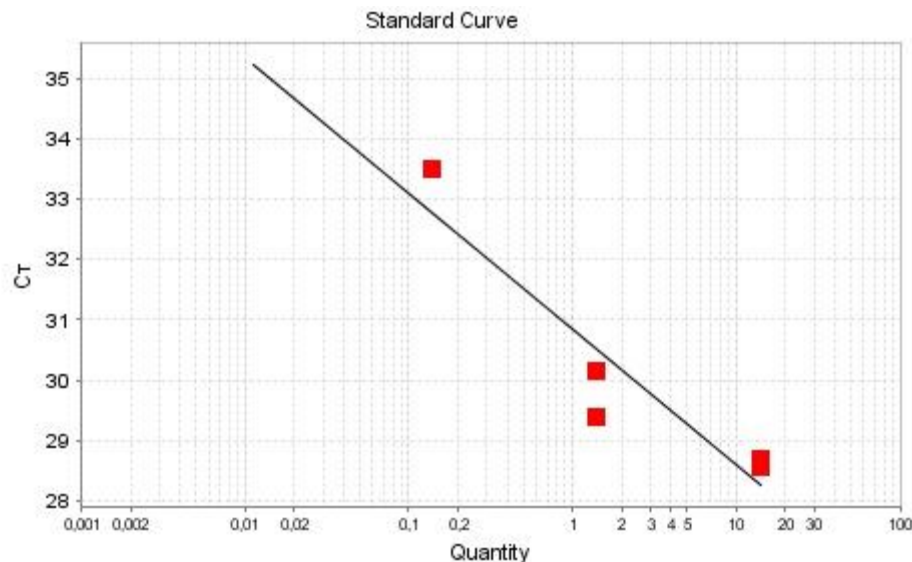
<i>Δείγμα</i>	<i>Ωοκύστες Cryptosporidium</i>	
	<i>Αντίγραφα γονιδίου/L</i>	<i>parvum/L</i>
Λ. Κουρνά (10/5/11)	0	
Μουσέλας (18/5/11)	343,51 ± 161,28	Αδυναμία υπολογισμού των ωοκύστεων.
Μουσέλας (2/6/11)	338,54 ± 39,32	
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	224,35 ± 31,86	

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του *Cryptosporidium* με το συγκεκριμένο kit είναι πολύ αποτελεσματική και εύκολη. Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται το σχετικά μεγάλο κόστος αγοράς του και το ότι δεν είναι γνωστό το γονίδιο βάσει του οποίου έγινε η ανίχνευση. Το τελευταίο έχει ως αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός του αριθμού των ωοκύστεων στα εξεταζόμενα δείγματα νερού. Παρ' όλα αυτά, δεδομένου ότι η νομοθεσία υπαγορεύει την ανίχνευση του συγκεκριμένου παράσιτου στο νερό, το kit αρκεί για την καταγραφή των «θετικών» και «αρνητικών» δειγμάτων και την εκτίμηση της καταλληλότητάς τους.

3.2.5 Ανίχνευση *Giardia* με TaqMan Real-time PCR

Το β-giardin γονίδιο που επιλέχθηκε για την ανίχνευση της *G. lamblia* απαντάται μόνον σε αυτόν το μικροοργανισμό και ευθύνεται για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης, η οποία παίζει βασικό ρόλο στην προσκόλληση των τροφοζωιδίων της Γιάρδιας στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου του ξενιστή (Guy et al., 2003).

Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε από την ανίχνευση της *Giardia* με τη χρήση της TaqMan Real-time PCR φαίνεται στο Διάγραμμα 3.4. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (0.869) και της κλίσης (-2.255) υποδεικνύουν μια όχι ιδιαίτερα καλή αντίδραση.



$$(R^2 = 0.869, \text{Slope} = -2.255)$$

Διάγραμμα 3.4. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την *Giardia* (TaqMan Real-time PCR).

Η απομόνωση του γενετικού υλικού στα δείγματα έγινε με το 2^ο πρωτόκολλο. Επειδή σε κάποια δείγματα η τιμή του λόγου των οπτικών απορροφήσεων στη φωτομέτρηση ήταν > 4, έγινε καθαρισμός τους για την απομάκρυνση διάφορων προσμίξεων που δρουν

ανασταλτικά στην αντίδραση της PCR. Θετικά στο παράσιτο βρέθηκαν όλα τα δείγματα, πλην αυτού από τη λίμνη Κουρνά (Πίν. 3.11).

Πίνακας 3.11. Αποτελέσματα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της *Giardia* με την TaqMan Real-time PCR.

<i>Δείγμα</i>	<i>Αντίγραφα γονιδίου/L</i>	<i>Κύστεις Giardia lamblia/L*</i>
Λ. Κουρνά (10/5/11)	0	0
Μουσέλας (18/5/11)	142,31 ± 33,46	9 ± 2
Μουσέλας (2/6/11)	172,25 ± 29,07	10 ± 1
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	156,89 ± 19,03	9 ± 1

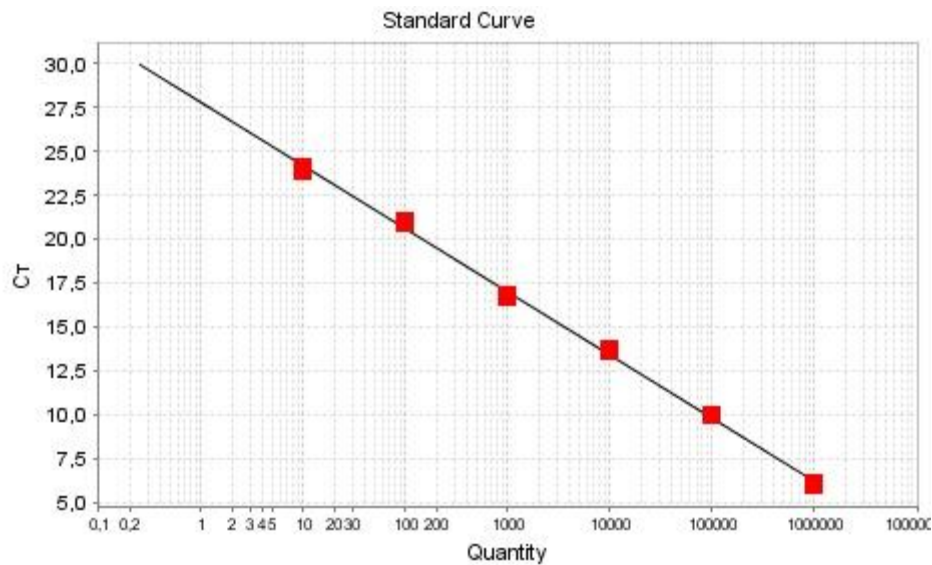
*Κάθε κύστη περιέχει 16 αντίγραφα του β-giardin γονιδίου (Guy et al., 2003).

Οι συγκεντρώσεις της *Giardia* που μετρήθηκαν στο Μουσέλα είναι σχετικά χαμηλές, δεδομένου ότι το παράσιτο αυτό είναι πιο διαδεδομένο στο περιβάλλον σε σχέση με το *Cryptosporidium* και θα περίμενε κανείς υψηλότερες συγκεντρώσεις (Diallo et al., 2009). Στην Ελλάδα, η υψηλότερη συγκέντρωση (3205 κύστεις/100 L) έχει μετρηθεί στον Πηνειό, σε σημείο δειγματοληψίας στο κέντρο της Λάρισας, από τους Karanis et al. (2005).

Η συγκέντρωση του παράσιτου στο δείγμα της δεξαμενής Δραμίων είναι χαμηλή. Ωστόσο, σε συνδυασμό με την παρουσία του *Cryptosporidium* καθιστά αναγκαία τη λήψη πρόσθετων μέτρων επεξεργασίας του νερού που προορίζεται για πόση. Η παρουσία του στα νερά που χρησιμοποιούνται για την άρδευση καλλιεργήσιμων εκτάσεων δεν συνιστά εξακριβωμένο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, καθώς παρά την πιθανότητα μόλυνσης στο στάδιο της παραγωγής, η σχέση ανάμεσα στην ανίχνευσή του στα παραγόμενα προϊόντα και στη μόλυνση του ανθρώπου δεν είναι απολύτως κατανοητή. Κι αυτό γιατί υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση ωμών λαχανικών είναι ένας προστατευτικός παράγοντας ενάντια στις λοιμώξεις από το *Cryptosporidium* και τη *Giardia* (Yoder et al., 2010).

3.2.6 Ανίχνευση *Giardia* με SYBR Green Real-time PCR

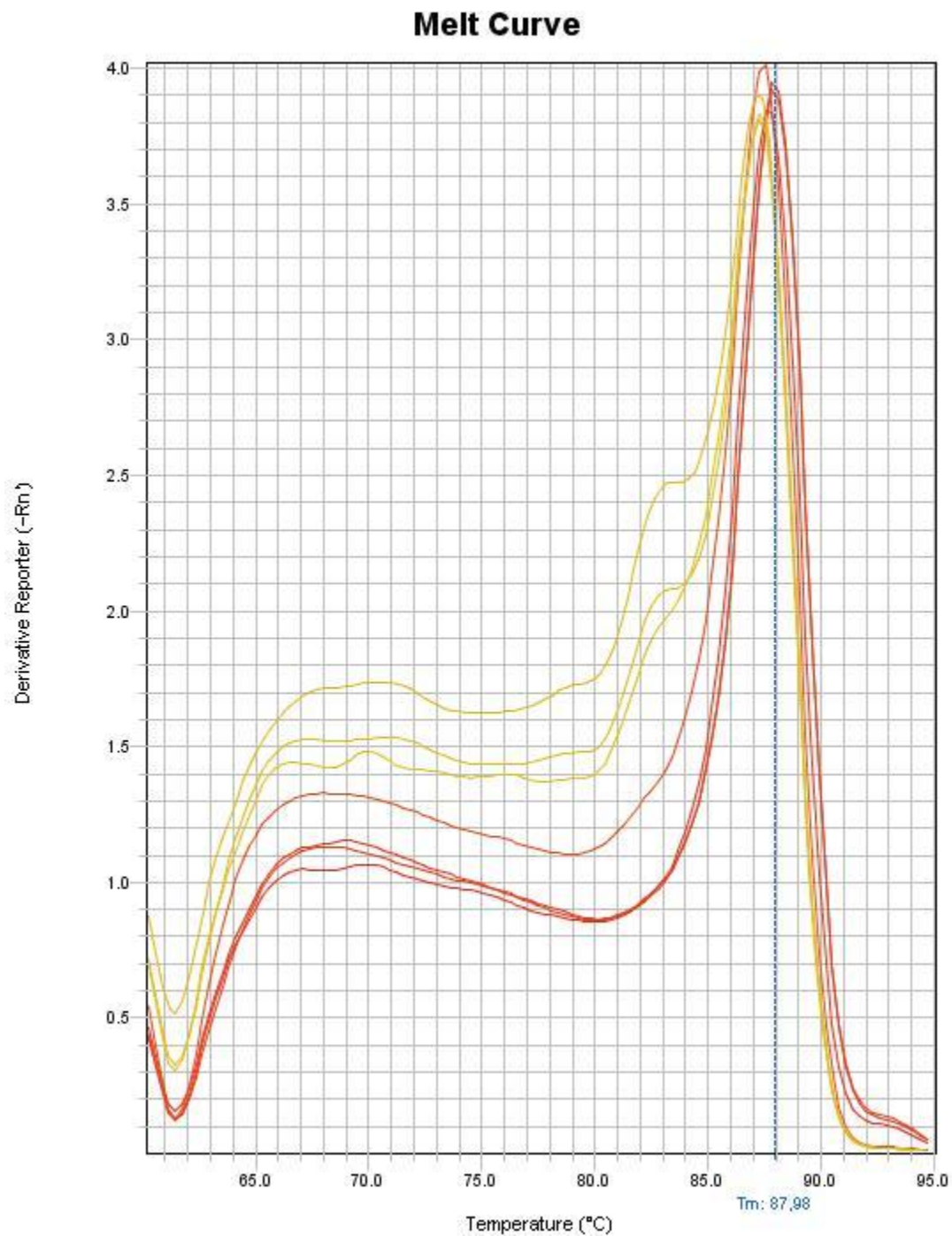
Η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε από την ανίχνευση της *Giardia* με τη χρήση της SYBR Green Real-time PCR φαίνεται στο Διάγραμμα 3.5. Εμφανίζει μια εξαιρετική γραμμικότητα με τιμή του συντελεστή συσχέτισης (0.998) που αγγίζει το ιδανικό, ενώ η αποτελεσματικότητά της κυμαίνεται σε ποσοστό 90% (slope = -3.596). Πρόκειται, λοιπόν, για μια πολύ καλή αντίδραση.



$$(R^2 = 0.998, \text{Slope} = -3.596)$$

Διάγραμμα 3.5. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την *Giardia* (SYBR Green Real-time PCR).

Στο Διάγραμμα 3.6 φαίνεται η σχηματιζόμενη καμπύλη αποδιάταξης και η αντίστοιχη θερμοκρασία αποδιάταξης ($T_m=87,98\text{ }^{\circ}\text{C}$) του προϊόντος της αντίδρασης.



Διάγραμμα 3.6. Η καμπύλη αποδιάταξης για την *Giardia* (SYBR Green Real-time PCR).

Κι εδώ, εμφανίζεται μία μόνον κορυφή στην καμπύλη αποδιάταξης που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο προϊόν της PCR, δηλ. στην προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA. Τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά στο παράσιτο ήταν από τον ποταμό Μουσέλα (18/5/11 & 2/6/11) και από τη δεξαμενή στα Δράμια (2/6/11), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.12 που ακολουθεί.

Πίνακας 3.12. Αποτελέσματα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της *Giardia* με την SYBR Green Real-time PCR.

<i>Δείγμα</i>	<i>Αντίγραφα γονιδίου/L</i>	<i>Κύστεις Giardia lamblia/L</i>
Λ. Κουρνά (10/5/11)	0	0
Μουσέλας (18/5/11)	102,49 ± 8,26	6 ± 1
Μουσέλας (2/6/11)	117,90 ± 22,93	7 ± 1
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	117,34 ± 21,58	7 ± 1

Οι μετρούμενες συγκεντρώσεις είναι σχεδόν παρόμοιες με εκείνες που προέκυψαν από την εφαρμογή της TaqMan για την ανίχνευση της *Giardia*. Ωστόσο, η αντίδραση της PCR με τη χρήση της SYBR Green κρίνεται πολύ πιο καλή και αποτελεσματική, βάσει των χαρακτηριστικών της πρότυπης καμπύλης αναφοράς (R^2 , Slope).

Στον επόμενο Πίνακα 3.13 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του *Cryptosporidium* και της *Giardia* στα τέσσερα (4) δείγματα νερού με τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 3.13. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των παράσιτων.

<i>Δείγμα</i>	<u><i>Ωοκύστεις Cryptosporidium parvum/L</i></u>			<u><i>Κύστεις Giardia lamblia/L</i></u>	
	<i>TaqMan</i>	<i>SYBR Green</i>	<i>Kit</i>	<i>TaqMan</i>	<i>SYBR Green</i>
Λ. Κουρνά (10/5/11)	-	0	0	0	0
Μουσέλας (18/5/11)	-	7 ± 1	Αδυναμία υπολογισμού	9 ± 2	6 ± 1
Μουσέλας (2/6/11)	-	8 ± 1	»	10 ± 1	7 ± 1
Δεξ. Δράμια (2/6/11)	-	20 ± 3	»	9 ± 1	7 ± 1

Στον Πίνακα 3.14 που ακολουθεί, γίνεται μια σύγκριση των μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της παρούσας εργασίας, βάσει των τιμών του συντελεστή συσχέτισης και της κλίσης της πρότυπης καμπύλης. Τιμές αποτελεσματικότητας μεταξύ 90-110% που αντιστοιχούν σε τιμές κλίσης από -3,58 έως -3,10 υποδεικνύουν μια καλή αντίδραση (www.invitrogen.com/Basic principles of real-time PCR).

Πίνακας 3.14. Σύγκριση των μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Παράγοντας	<u><i>Cryptosporidium parvum</i></u>			<u><i>Giardia lamblia</i></u>	
	TaqMan	S. Green	Kit	TaqMan	S. Green
Συντελεστής συσχέτισης (R^2)	-	0,972	0,992	0,869	0,998
Κλίση (Slope)	-	-3,478	-3,106	-2,255	-3,596
Αποτελεσματικότητα	-	94%	110%	178%	90%

Σε ό,τι αφορά την ανίχνευση του *Cryptosporidium*, τόσο η SYBR Green όσο και το kit φαίνεται πως δούλεψαν. Ωστόσο, το μεγάλο κόστος αγοράς του τελευταίου και το γεγονός ότι δεν προσδιορίζεται το γονίδιο βάσει του οποίου έγινε η ανίχνευση, δεν το καθιστούν πρώτη επιλογή στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Η SYBR Green απέδωσε πολύ πιο αξιόπιστα αποτελέσματα σε σχέση με την TaqMan και στην ανίχνευση της *Giardia*. Άλλωστε, είναι πολύ πιο απλή στη χρήση της και λιγότερο δαπανηρή από τους TaqMan ιχνηθέτες, γι' αυτό και προτιμάται από τους ερευνητές (Mackay et al., 2002). Το βασικό της μειονέκτημα, δηλαδή η εν δυνάμει ένωση της χρωστικής με ένα οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA, ξεπερνιέται με την κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης. Έτσι, διασφαλίζεται ότι το εκπεμπόμενο σήμα αντιστοιχεί στη συγκέντρωση αντιγράφων της προεπιλεγμένης αλληλουχίας και επιτυγχάνονται αξιόπιστα αποτελέσματα.

Οι οικισμοί που υδρεύονται από τα νερά της λίμνης Κουρνά στην τοποθεσία "μάτι" δεν διατρέχουν κίνδυνο μόλυνσης από το *Cryptosporidium* και την *Giardia*, καθώς το αντίστοιχο δείγμα βρέθηκε αρνητικό στα εν λόγω παράσιτα. Συνεπώς, μια απλή χλωρίωση αρκεί για την απολύμανση του πόσιμου νερού που προέρχεται από αυτήν την

τοποθεσία. Αντιθέτως, η κολύμβηση ή διάφορες άλλες δραστηριότητες αναψυχής στον ποταμό Μουσέλα χρειάζεται να γίνονται με προσοχή, καθώς συνιστούν κίνδυνο για μόλυνση από τα παράσιτα, μέσω της τυχαίας κατάποσης νερού και με δεδομένο τη χαμηλή μολυσματική δόση.

Με δεδομένο ότι η ισχύουσα νομοθεσία για το πόσιμο νερό ορίζει ως παραμετρική τιμή για το *Cryptosporidium* και την *Giardia* το μηδέν (0), η ανίχνευση και των δύο αυτών παρασίτων στα νερά της δεξαμενής Δραμίων που υδροδοτούν κάποιους οικισμούς τους θερινούς μήνες, επιβάλλει τη λήψη πρόσθετων μέτρων επεξεργασίας για την απομάκρυνσή τους από το πόσιμο νερό.

Την υψηλότερη αποτελεσματικότητα έναντι των παρασίτων παρουσιάζει η χρήση του όζοντος, με την οποία αποφεύγεται και ο σχηματισμός των επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία παραπροϊόντων της χλωρίωσης (π.χ. τριαλομεθάνια). Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός δράσης του δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος, φαίνεται ότι προκαλεί ρωγμές στα εξωτερικά περιβλήματα των κύστεων/ωοκύστεων, καθιστώντας τα διαπερατά και εν συνεχεία επιδρά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων τους (Liberti et al., 2000). Ωστόσο, το υψηλό του κόστος το καθιστά απαγορευτικό τις περισσότερες φορές, με αποτέλεσμα να αναζητούνται πιο οικονομικές λύσεις, όπως είναι διάφορα συμβατικά ή μηχανικά συστήματα διήθησης του νερού.

Με τα συμβατικά συστήματα αργής διήθησης σε άμμο που χρησιμοποιούνται ευρέως, επιτυγχάνεται μέχρι και 99% απομάκρυνση των κύστεων/ωοκύστεων (SWTRs 10/2011). Στα συστήματα αυτά απαιτείται πολύ τακτικό πλύσιμο της άμμου, ώστε να μη μειώνεται η ικανότητά της να συγκρατεί τους εν λόγω μικροοργανισμούς. Ευρεία είναι και η χρήση της μηχανικής διήθησης με ειδικές μεμβράνες που έχουν μέγεθος πόρων μικρότερο από αυτό των κύστεων/ωοκύστεων.

3.2.7 Έλεγχος συσχέτισης των παράσιτων με τους βακτηριακούς δείκτες

Προκειμένου να διερευνηθεί η συσχέτιση μεταξύ των υπό μελέτη παράσιτων και των αντίστοιχων βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης, έγινε ο υπολογισμός των τιμών του συντελεστή συσχέτισης Pearson (Πίν. 3.15).

Πίνακας 3.15. Αποτελέσματα συσχέτισης κατά Pearson μεταξύ των δεικτών που αναλύθηκαν στα δείγματα νερού.

		Correlations				
		T.C.	F.C.	F.S.	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
T.C.	Pearson Correlation	1	,968*	,975*	,044	,774
	Sig. (1-tailed)		,016	,013	,478	,113
	N	27	27	27	27	27
F.C.	Pearson Correlation	,968*	1	,999**	-,159	,633
	Sig. (1-tailed)	,016		,001	,421	,184
	N	27	27	27	27	27
F.S.	Pearson Correlation	,975*	,999**	1	-,154	,637
	Sig. (1-tailed)	,013	,001		,423	,181
	N	27	27	27	27	27
<i>Cryptosporidium</i>	Pearson Correlation	,044	-,159	-,154	1	,663
	Sig. (1-tailed)	,478	,421	,423		,168
	N	27	27	27	27	27
<i>Giardia</i>	Pearson Correlation	,774	,633	,637	,663	1
	Sig. (1-tailed)	,113	,184	,181	,168	
	N	27	27	27	27	27

*. Correlation is significant at the 0.05 level (1-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει πως υπάρχει μια πολύ ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των τριών (3) δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης (T.C., F.C., F.S.). Η *Giardia* φαίνεται να συσχετίζεται καλύτερα με τα T.C. (0,774) σε σχέση με τους άλλους δύο δείκτες (0,633 & 0,637), ενώ δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του *Cryptosporidium* και των τριών (3) δεικτών. Ακόμη και τα δύο παράσιτα συσχετίζονται μέτρια μεταξύ τους (0,663).

Προκύπτει, λοιπόν, πως η παρουσία των τριών (3) βακτηριακών δεικτών σε δείγμα νερού δεν συνεπάγεται και την παρουσία των υπό μελέτη παράσιτων, παρόλο που πρόκειται για ανταγωνιστικούς πληθυσμούς. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από πολλές άλλες μελέτες που δεν έχουν καταφέρει να αποδείξουν μια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα πρωτόζωα παράσιτα και τους μικροβιολογικούς δείκτες που ελέγχονται βάσει νομοθεσίας (Diallo et al., 2009). Αυτό σημαίνει πως τα επιφανειακά νερά που προορίζονται για πόση πρέπει να ελέγχονται για τα πρωτόζωα ανεξάρτητα από τους δείκτες, ώστε να διασφαλίζεται στο μέγιστο δυνατό βαθμό η προστασία της δημόσιας υγείας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε δείγματα από επιφανειακά νερά της ευρύτερης περιοχής του Νομού Χανίων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση, με μοριακές τεχνικές, των παθογόνων παράσιτων *Cryptosporidium parvum* και *Giardia lamblia*. Μέσα σε αυτά τα πλαίσια, εφαρμόστηκαν η Μέθοδος 1623 της Ε.Ρ.Α. στο στάδιο της δειγματοληψίας, δύο (2) διαφορετικά πρωτόκολλα απομόνωσης γενετικού υλικού και οι μοριακές τεχνικές SYBR Green και TaqMan Real-time PCR. Ταυτόχρονα, έγινε ανάλυση των τριών (3) βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης, όπως αυτοί ορίζονται από την ισχύουσα νομοθεσία, με σκοπό τη μελέτη της συσχέτισής τους με την παρουσία των εν λόγω παράσιτων.

Από την ανάλυση των δειγμάτων και τα εξαγόμενα αποτελέσματα, συμπερασματικά προκύπτουν τα εξής:

- Η επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου απομόνωσης γενετικού υλικού είναι βαρύνουσας σημασίας για την ανίχνευση των παράσιτων *C. parvum* και *G. lamblia* με μοριακές τεχνικές. Στην παρούσα εργασία, η απομόνωση με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου, όπου η προσθήκη της πρωτεΐνης Κ στο lysis buffer γινόταν εξαρχής και ακολουθούσαν οι freeze-thaw κύκλοι, απέδωσε υψηλότερη καθαρότητα νουκλεϊκού οξέος.
- Η SYBR Green προτείνεται ως μια ενδεδειγμένη μεθοδολογία ανίχνευσης των *C. parvum* και *G. lamblia* σε δείγματα επιφανειακών νερών που προορίζονται για πόση, με σκοπό τον ακριβή και έγκυρο έλεγχο τους για τη μέγιστη δυνατή διασφάλιση και προστασία της δημόσιας υγείας.
- Τα δείγματα από τον ποταμό Μουσέλα και τη δεξαμενή Δραμίων βρέθηκαν θετικά στα υπό μελέτη παράσιτα.
- Για την απομάκρυνση των κύστεων/ωοκύστεων από τα νερά της δεξαμενής Δραμίων που υδροδοτούν κάποιους οικισμούς το καλοκαίρι, προτείνεται συμπληρωματικά της συμβατικής χλωρίωσης η αργή διήθηση μέσω άμμου.
- Η παρουσία των εν λόγω παράσιτων σε επιφανειακά νερά δεν συσχετίζεται με εκείνη των βακτηριακών δεικτών. Επιβάλλεται, λοιπόν, ξεχωριστός έλεγχος των νερών για ανίχνευση των παράσιτων.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βενιέρη Δ. (2011). Παρουσιάσεις μεταπτυχιακού μαθήματος: "Δημόσια Υγεία & Περιβάλλον". Β' εξάμηνο σπουδών ακ. έτους 2011-12.
2. Κουτάντου Π. (2006). Καρστικοί Υδροφορείς – Αναχαίτιση του φαινομένου της υφαλμύρωσης στην περιοχή της Χερσονήσου Ηρακλείου Κρήτης προσομοιώνοντας τη μέθοδο του τεχνητού εμπλουτισμού. Μεταπτυχιακή Εργασία Πολυτεχνείου Κρήτης. Χανιά.
3. ΚΥΑ Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ Β' 892/11.07.2001) «Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης», σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης της 3^{ης} Νοεμβρίου 1998.
4. Λαζανάκη Β. (2010). Η χρήση της Real Time PCR (RT- PCR) για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων στελεχών βακτηρίου (*Escherichia coli*)». Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής παραγωγής, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο.
5. Υ.Α. ΔΥΓ2/Γ.Π. οικ 38295/2007 - Τροποποίηση της Υγειονομικής Διάταξης κοινής υπουργικής απόφασης Υ2/2600/2001 «Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης», σε συμμόρφωση προς την οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης της 3ης Νοεμβρίου 1998.

ΕΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Boak R.A. and Packman M.J. (2001). A methodology for the assessment of risk of *Cryptosporidium* contamination of groundwater. *Quarterly J Engineering Geology Hydrogeology*, 34:187–194.
2. Cama V.A., Bern C., and Roberts J. (2008). *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis* 14:1567–74.
3. Castro-Hermida G.A., García-Presedo I., Almeida A., González-Warleta M., Correia Da Costa J.M., and Mezo M. (2009). Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. *Water Research*, 43:4133-4142.
4. Chaidez C., Soto M., Gortares P., and Mena K. (2005). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. *Int J Environ Health Res* 15:339–45.
5. Code of Federal Regulations, Title 40, Vol. 22, Part 141: National Primary Drinking Water Regulations, Sec. 141.52, Revised as of July 1, 2010.
6. Code of Federal Regulations, Title 40, Vol. 54, Parts 141 and 142: Drinking Water; National Primary Drinking Water Regulations; Filtration, Disinfection; Turbidity, *Giardia* *Lamblia*, Viruses, *Legionella*, and Heterotrophic bacteria; Final Rule, June 29, 1989.
7. Code of Federal Regulations, Title 40, Vol. 63, Parts 9, 141, and 142: National Primary Drinking Water Regulations: Interim Enhanced Surface Water Treatment; Final Rule, December 16, 1998.
8. Coffey R., Cummins E., Cormican M., Flaherty V.O., and Kelly S. (2007). Microbial Exposure Assessment of Waterborne Pathogens. *Human and Ecological Risk Assessment*, 13:1313-1351.
9. Fayer R. (1997). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press Boston, MA, USA.
10. Fayer R. (2004). *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126 (1-2 SPEC. ISS.):37–56.

11. Fayer R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol*, 124:90–97.
12. Hoque M.E., Hope V.T., Kjellström T., Scragg R., and Lay-Yee R. (2002). Risk of giardiasis in Aucklanders: a case-control study. *Int J Infect Dis* 6:191–7.
13. Karanis P., Kourenti C., and Smith H. (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*, 5:1–38.
14. Li D., Craik S.A., Smith D.W., and Belosevic M. (2008). Survival of *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to UV light. *FEMS Microbiol. Lett.*, 278:56–61.
15. Li S., Ran Z., Cui C., and Yuan Y. (2011). Study on the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* by chlorine dioxide in water. *Proceedings - International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring*, CDCIEM (art. no. 5748173):1819-1822.
16. Liberti L., Notarnicola M., & Lopez A. (2000). Advanced Treatment For Municipal Wastewater Reuse In Agriculture. III – Ozone. *The Journal of the International Ozone Association*, 22:151-166.
17. Medema G., Teunis P., Blokker M., Deere D., Davison A., Charles P., and Loret J.F. (2006). WHO Guidelines for Drinking Water Quality Environmental Health Criteria, *Cryptosporidium*, Draft 2.
18. Plutzer J., Ongerth J., and Karanis P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213:321-333.
19. Pronk M., Goldscheider N., Zopfi J., and Zwahlen F. (2009). Percolation and Particle Transport in the Unsaturated Zone of a Karst Aquifer. *Ground Water*, 47:361-369.
20. Ran Z., Li S., Huang J., Yuan Y., Cui C., and Williams C.D. (2010). Inactivation of *Cryptosporidium* by ozone and cell ultrastructures. *Journal of Env. Sciences*, 22:1954-1959.

21. Robertson L.J. and Gjerde B.K. (2004). Effects of the Norwegian winter environment on *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Microb. Ecol.*, 47:359–365.
22. Roy S.L., DeLong S.M., Stenzel S., et al. (2004). Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *J Clin Microbiol* 42:2944–51.
23. Sunderland D., Graczyk T.K., Tamang L., and Breysse P.N. (2007). Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water Research*, 41:3483-3489.
24. The Water Supply (Water Quality) (England and Wales) Regulations 2000 SI No.3184.
25. USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. Office of Ground Water and Drinking Water, Technical Support Center, Cincinnati, Ohio.
26. Williams A.P., Gordon H., Jones D.L., Strachan N.J.C., Avery L.M., and Killham K. (2008). Leaching of bioluminescent *Escherichia coli* O157:H7 from sheep and cattle faeces during simulated rainstorm events. *Journal of Applied Microbiology*, 105:1452–1460.
27. Xiao L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*, 124:80–89.
28. Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 17:72–97.
29. Yoder J.S., Harral C., and Beach M.J. (2010). Centers for Disease Control and Prevention. Cryptosporidiosis Surveillance - United States, 2006-2008 and Giardiasis Surveillance - United States, 2006-2008. Surveillance Summaries. *MMWR*, 59:No.SS-6.
30. Alonso J.L., Amorós I., and Canigral I. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. *Appl. Microb. Biotechnol.* 89: 1203-1211.

31. Guy R.A., Payment P., Krull U.J., and Horgen P.A. (2003). Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. *App. & Env. Microbiology*, 69:5178-5185.
32. Nichols R.A., Campell B.M., and Smith H.V. (2003). Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified nested PCR-restriction fragment length polymorphism assay. *Appl. & Env. Microbiol.*, 69: 4183-4189.
33. Stavroulakis G., Papafilippaki A. and Kalderis D. (2010). WATER POLLUTION LEVEL OF THE GROUNDWATER AND SURFACE WATER IN THE LAKE KOURNAS, CRETE-GREECE. Proceedings of the “Protection and Restoration of the Environment X” 05-09/7/2010, Corfu.
34. Mackay I.M., Mackay J.F., Nissen M.D., and Sloots T.P. (2007). Real-Time PCR: History and fluorogenic chemistries. In: Mackay I.M. (ed) *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
35. Mackay I.M., Arden K.E., and Nitsche A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.*, 30:1292–1305
36. Karanis P., Chronis I., Zakas G., Kourenti C., Sotiriadou I., and Papadopoulou C. (2005). A Preliminary Survey of the Level of Microbiological Pollution of Major Rivers in Northern Greece. *Acta Hydrochimica and Hydrobiologica*, 33:346-354.
37. Diallo M. B. C., Ancero A. J., Tawatsupa B., Tripathi N. K., Wangsuphachart V., and Shipin O. V. (2009). GIS-based analysis of the fate of waste-related pathogens *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* in a tropical canal network. *Journal of Water and Health*, 7:133-143.
38. Surface Water Treatment Rules: What do they mean to you? Office of Water (4606M), EPA 816-R-11-009, October 2011.

ΣΕΛΙΔΕΣ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

<http://www.abbottmolecular.com/us/technologies/real-time-pcr>

<http://www.bio.davidson.edu>

<http://www.biotech-weblog.com>

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Cryptosporidiosis.htm>

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Giardiasis.htm>

<http://www.dwi.gov.uk>

http://www.epa.gov/microbes/gda_seq1.html

[http://www.invitrogen.com/Basic principles of real-time PCR\)](http://www.invitrogen.com/Basic principles of real-time PCR)

<http://www.isaveearth.org/Waterpollutionsources.htm>

<http://www.kpe-kastor.kas.sch.gr>

<http://www.marvistavet.com/html/cryptosporidium.html>

<http://www.q-pcr.blogspot.com>

<http://www.springerimages.com>

<http://www.sti.bmj.com>

http://www.waterfilterreview.com/info_h2o/contaminants/

<http://www3.bio-rad.com>