



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία
Κατεύθυνση: Λοιμώδη Νοσήματα και Εργαστηριακή Δημόσια Υγεία

ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΟ ΕΤΟΣ 2021-2023

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Ανάλυση μικροβιακού πληθυσμού σε θαλασσινό νερό: *Escherichia coli*»

ΑΝΔΡΙΟΠΟΥΛΟΥ ΘΕΑΝΩ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: mdy21049

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF PUBLIC HEALTH
DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH POLICY

Postgraduate Program in Public Health
Specialization: Infectious Diseases – Public Health Laboratories

ACADEMIC YEAR 2021-2023

MASTER THESIS

«**Microbiome in sea water samples: *Escherichia coli*** »

ANDRIOPOULOU THEANO

VETERINARIAN

REGISTRATION NUMBER: mdy21049

SUPERVISOR: APOSTOLOS BELOUKAS

ATHENS 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία
Κατεύθυνση: Λοιμώδη Νοσήματα και Εργαστηριακή Δημόσια Υγεία

ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΟ ΕΤΟΣ 2021-2023

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ανάλυση μικροβιακού πληθυσμού σε θαλασινό νερό: *Escherichia coli*»

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Επιβλέποντα

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/a	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΡΓΑΦΗ
1	Απόστολος Μπελούκας	Αναπληρωτής Καθηγητής	
2	Γεωργία (Τζωρτζίνα) Τζανακάκη	Καθηγήτρια	
3	Παναγιώτα Γιακκούπη	Επίκουρη Καθηγήτρια	

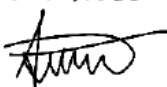
Δήλωση Συγγραφέα Διπλωματικής Εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Θεανώ Ανδριοπούλου του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου mdy21049 του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

**Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.*

Ο/Η Δηλών/ούσα

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα


Theano Andriopoulou


** Εάν κάποιος επιθυμεί απαγόρευση πρόσβασης στην εργασία για χρονικό διάστημα 6-12 μηνών (embargo), θα πρέπει να υπογράψει ψηφιακά ο/η Επιβλέπων/ουσα Καθηγητής/τρια, για να γνωστοποιεί ότι είναι ενημερωμένος/η και συναινεί. Οι λόγοι χρονικού αποκλεισμού πρόσβασης περιγράφονται αναλυτικά στις πολιτικές του I.A. (σελ. 6).*

Copyright © , Θεανώ Ανδριοπούλου, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η έγκρισή της δεν υποδηλώνει απαραίτητως και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας. Βεβαιώνω ότι η παρούσα Διπλωματική Εργασία είναι αποτέλεσμα προσωπικής μου εργασίας και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές που αναφέρω έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά όπου απαιτείται και έχω παραθέσει τις πηγές τους στο σχετικό τμήμα της βιβλιογραφίας.

Theano Andriopoulou


Υπογραφή:.....

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Θερμές ευχαριστίες στον κ. Μπελούκα Απόστολο, Αναπληρωτή Καθηγητή, που δέχθηκε να γίνει επιβλέπων στη διπλωματική εργασία, με εμπιστεύθηκε με τη διεκπεραίωση αυτής και μου έδωσε πρόσβαση στο εργαστήριο της σχολής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την υποψήφια διδάκτορα κ. Διολή Χρυσούλα για τη διαρκή υποστήριξη τόσο σε πρακτικό όσο και θεωρητικό επίπεδο, και τη συνεχή παροχή εμπειριστατωμένης γνώσης και καθοδήγησης. Η συνδρομή της ήταν καταλυτική και πολύτιμη.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις κυρίες Γεωργία (Τζωρτζίνα) Τζανακάκη και Παναγιώτα Γιακκούπη για την καθοδήγησή τους σε όλη την φοιτητική μου πορεία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που είναι δίπλα μου σε κάθε μου επιλογή και με στηρίζει.

Περίληψη

Η θάλασσα είναι συνυφασμένη με τη ζωή του ανθρώπου, αφού αποτελεί για αυτόν μέρος αναψυχής και φιλοξενεί πολυάριθμα ζωικά είδη, εκ των οποίων ορισμένα καταναλώνονται από αυτόν. Ωστόσο η θάλασσα εγκυμονεί αρκετούς κινδύνους, καθώς αποτελεί δεξαμενή ευκαιριακά παθογόνων μικροοργανισμών που μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη λοιμώξεων. Ένα άλλο ζήτημα που έχει προκύψει είναι η ύπαρξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών στο θαλάσσιο οικοσύστημα. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται στην αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών σε ποικίλους τομείς, υπολείμματα των οποίων μέσω διάφορων οδών, όπως υδάτινων απορροών, λυμάτων και λοιπών ανθρωπογενών δραστηριοτήτων καταλήγουν σε υδάτινα σώματα συμπεριλαμβανομένων των θαλασσών. Η παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία εξέτασε την παρουσία του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E. coli*), το οποίο είναι καθιερωμένος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, σε δείγματα θαλασσινού νερού. Ακόμα μελέτησε την αντιμικροβιακή αντοχή και τις φυλογενετικές ομάδες των απομονωθέντων στελεχών. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε πολυπληθή κολυμβητικής ακτή του Πειραιά κατά τη διάρκεια δύο δειγματοληψιών της κολυμβητικής περιόδου, τον Μάιο και τον Ιούλιο του 2023. Βάσει των αποτελεσμάτων η συγκεκριμένη κολυμβητική ακτή δεν συνίσταται για κολύμβηση, καθώς σε κάθε δειγματοληψία καταμετρήθηκαν >500cfu/100ml. Συνολικά, απομονώθηκαν 107 στελέχη (66 από την πρώτη και 41 από τη δεύτερη δειγματοληψία), εκ των οποίων τα 87 ταυτοποιήθηκαν ως *E. coli* και μελετήθηκαν περαιτέρω. Η ανάλυση της αντιμικροβιακής αντοχής έδειξε ότι τα περισσότερα στελέχη ήταν ευαίσθητα σε όλα τα υπό μελέτη αντιβιοτικά (53%, 46/87). Επίσης αρκετά συχνή ήταν η ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών (47%, 41/87) αλλά κανένα δεν εμφάνισε πολυανθεκτικότητα. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φυλογενετικής τυποποίησης, η πλειοψηφία των στελεχών κατατάχθηκε στην ομάδα B2 (34%, 30/87) και ακολούθησαν οι ομάδες B1 (31%, 27/87), A (29%, 25/87) και D (6%, 5/87). Ακόμα, η ομάδα B2 ήταν η πιο συχνή μεταξύ των ανθεκτικών πληθυσμών ενώ η B1 μεταξύ των ευαίσθητων. Παρά το γεγονός ότι το πλήθος των ανθεκτικών στελεχών που ανευρέθηκαν ήταν μικρός αριθμός, τα ευρήματα υπογραμμίζουν την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση της ποιότητας του θαλασσινού νερού και της αντιμικροβιακής αντοχής σε αυτά τα ενδιαιτήματα, καθώς και την ανάπτυξη στρατηγικών για τον περιορισμό της διασποράς ανθεκτικών βακτηρίων.

Λέξεις – κλειδιά: *Escherichia coli*, Θαλασσινό νερό, Αντιμικροβιακή αντοχή, Δημόσια υγεία

Abstract

The sea is deeply intertwined with the human life, serving as a source of recreation and hosting numerous animal species, some of which are consumed by humans. However, the sea also poses significant risks, as it acts as a reservoir for opportunistic pathogenic microorganisms that can lead to infections. Another emerging concern is the presence of antibiotic-resistant microorganisms within the marine ecosystem. This phenomenon is largely attributed to the indiscriminate use of antibiotics across various sectors, with residues entering the aquatic bodies, including the sea, through different pathways such as water runoff, sewage, and other human activities. This research thesis investigated the presence of the bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*), a well-established indicator of fecal contamination, in seawater samples. It also studied the antimicrobial resistance and phylogenetic groups of the isolated strains. The research was conducted on a populous swimming beach in Piraeus during two sampling timepoints in the swimming season, May and July 2023. Based on the results, the specific beach is not recommended for swimming, as each sample exceeded 500 cfu/100ml. A total of 107 strains were isolated (66 from the first sampling and 41 from the second), of which 87 were identified as *E. coli* and further analyzed. The antimicrobial resistance analysis revealed that most strains were sensitive to all tested antibiotics (53%, 46/87). Additionally, a considerable proportion of resistant strains (47%, 41/87) was detected, although none exhibited multi-drug resistance. Furthermore, according to the results of the phylogenetic typing, the majority of strains were classified in group B2 (34%, 30/87), followed by groups B1 (31%, 27/87), A (29%, 25/87), and D (6%, 5/87). Notably, group B2 was the most frequent among the resistant populations, while B1 was predominant among the sensitive ones. Despite the relatively small number of resistant strains found, the findings underline the need for continuous monitoring of the seawater quality and antimicrobial resistance in these environments, as well as the development of strategies to limit the spread of resistant bacteria.

Keywords: *Escherichia coli*, Seawater, Antimicrobial resistance, Public health

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	I
Abstract	II
Κεφάλαιο 1: Γενικό Μέρος	1
Εισαγωγή.....	2
1.1 Ύδατα κολύμβησης και πιθανοί κίνδυνοι δημόσιας υγείας.....	3
1.2 Νομοθεσία περί υδάτων κολύμβησης/ μικροβιολογικός έλεγχος υδάτων κολύμβησης.....	4
1.2.1 Νομοθεσία περί υδάτων κολύμβησης.....	4
1.2.2 Μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης υδάτων.....	8
1.3 Χαρακτηριστικά <i>E. coli</i>	9
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά του <i>E.coli</i>	9
1.3.2. Φυλογενετικές ομάδες του <i>E. coli</i>	12
1.4 Αντιβιοτικά και αντοχή στα αντιβιοτικά.....	14
1.5 Αντοχή στα αντιβιοτικά στο υδάτινο οικοσύστημα.....	15
1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μόλυνση των θαλάσσιων οικοσυστημάτων από <i>e. Coli</i>	16
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος_ Υλικά & Μέθοδοι	18
2.1 Σκοπός.....	19
2.2 Δειγματοληψία.....	19
2.3 Επεξεργασία δειγμάτων.....	22
2.4 Απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών <i>e.coli</i>	22
2.5 Μοριακή ταυτοποίηση.....	23
2.6 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	23
2.7 Φυλογενετική τυποποίηση (phylogrouping) των στελεχών <i>e. Coli</i>	25
Κεφάλαιο 3: Πειραματικό Μέρος_ Αποτελέσματα	26
3.1 Αποτελέσματα διήθησης.....	27
3.2 Αποτελέσματα απομόνωσης και ταυτοποίησης.....	29
3.3 Αποτελέσματα του ελέγχου των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	31
3.4 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (phylogrouping).....	40
Συζήτηση	48
Βιβλιογραφία	53

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1.1 Όρια cfu/ 100mL για Ενετερόκοκκους και Κολοβακτηρίδια στα παράκτια και μεταβατικά ύδατα, σύμφωνα με το Παράρτημα I της Οδηγίας 2006/7/EK.....	7
Εικόνα 1.2 Οι φυλογενετικές ομάδες του <i>E. coli</i>	13
Εικόνα 2.1 Δελτίο Δειγματοληψίας Νερού Ακτής Κολύμβησης για Μικροβιολογική Ανάλυση» σύμφωνα με την ΚΥΑ 8600/416/Ε103/2009 (ΦΕΚ 356/Β/2009),	20
Εικόνα 2.2 Δελτίο Δειγματοληψίας Νερού Ακτής Κολύμβησης για Μικροβιολογική Ανάλυση» σύμφωνα με την ΚΥΑ 8600/416/Ε103/2009 (ΦΕΚ 356/Β/2009).	21
Εικόνα 2.3 Καθορισμός φυλογενετικής ομάδας.....	25
Εικόνα 3.1 Ανάπτυξη αποικιών σε CCA.....	28
Εικόνα 3.2 Ανάπτυξη αποικιών σε CCA-AMP.....	28
Εικόνα 3.3 Αποικίες Gram-αρνητικών σε MacConkey Νο3.....	29
Εικόνα 3.4 Βιοχημική δοκιμασία ινδόλης.....	30
Εικόνα 3.5 Βιοχημική δοκιμασία κιτρικών.....	30
Εικόνα 3.6 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν στην 1 ^η δειγματοληψία.....	36
Εικόνα 3.7 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν στην 2 ^η δειγματοληψία.....	36
Εικόνα 3.8 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν συνολικά.....	37
Εικόνα 3.9 Συχνότητα εμφάνισης των προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) των στελεχών <i>E. coli</i> της 1 ^{ης} δειγματοληψίας, της 2 ^{ης} δειγματοληψίας και συνολικά.....	37
Εικόνα 3.10 Συχνότητα εμφάνισης αντοχής (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό μεταξύ των ανθεκτικών(R) στελεχών της 1 ^{ης} δειγματοληψίας.....	38
Εικόνα 3.11 Συχνότητα εμφάνισης αντοχής (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό μεταξύ των ανθεκτικών(R) στελεχών της 2 ^{ης} δειγματοληψίας.....	38
Εικόνα 3.12 Συχνότητα εμφάνισης αντοχής (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό μεταξύ των ολικών ανθεκτικών(R) στελεχών, 1 ^{ης} και 2 ^{ης} δειγματοληψίας.....	39
Εικόνα 3.13 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης- Phylogrouping.....	44
Εικόνα 3.14 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών <i>E. coli</i> της 1 ^{ης} δειγματοληψίας.....	45
Εικόνα 3.15 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών <i>E. coli</i> της 2 ^{ης} δειγματοληψίας.....	45
Εικόνα 3.16 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών <i>E. coli</i> που απομονώθηκαν συνολικά από τα δείγματα θαλασσινού νερού.....	46
Εικόνα 3.17 Συγκεντρωτικό διάγραμμα των συχνοτήτων εμφάνισης των φυλογενετικών ομάδων μεταξύ των στελεχών της 1ης και 2ης δειγματοληψίας ξεχωριστά αλλά και στο σύνολο τους.....	46
Εικόνα 3.18 Συσχέτιση φυλογενετικών ομάδων και προφίλ αντοχής των στελεχών <i>E. coli</i>	47

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 2.1 Δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν	23
Πίνακας 3.1 Αποικίες που καταμετρήθηκαν στην 1η δειγματοληψία	26
Πίνακας 3.2 Αποικίες που καταμετρήθηκαν στη 2η δειγματοληψία	26
Πίνακας 3.3 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα θαλασσινού νερού.	30
Πίνακας 3.4 Χαρακτηριστικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα θαλασσινού νερού.	39

Κεφάλαιο 1

Γενικό Μέρος

Εισαγωγή

Το θαλασσινό νερό αποτελεί έναν από τους κυριότερους φυσικούς πόρους αναψυχής για τον άνθρωπο, παρέχοντας δυνατότητες για κολύμβηση, άθληση, θαλάσσια σπορ, διασκέδαση και χαλάρωση. Η σημασία του όμως δεν περιορίζεται μόνο στην αναψυχή, καθώς αποτελεί βασική πηγή για την αλιεία και τη βιομηχανία τροφίμων, επηρεάζοντας την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων (θαλασσινών όπως ψάρια, οστρακοειδή, μαλάκια) που είτε καταναλώνονται άμεσα από τον άνθρωπο είτε χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζωοτροφών καταλήγοντας πάλι στην τροφική αλυσίδα (**World Health Organization, 2017**).

Ωστόσο παρά τα οφέλη του, η χρήση του θαλασσινού νερού μπορεί να εκθέσει τον άνθρωπο σε μία πληθώρα κινδύνων υγείας, όπως αυτών που οφείλονται σε ευκαιριακά παθογόνους ή/και παθογόνους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται στο νερό (**Cabral, 2010**).

Έτσι, η ασφάλεια του θαλασσινού νερού κρίνεται απαραίτητη για την προστασία της δημόσιας υγείας (**World Health Organization, 2017**) και για αυτό το λόγο η ποιότητα του θαλασσινού νερού υπόκειται σε αυστηρό μικροβιακό έλεγχο. Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, στα πρωτόκολλα, που αφορούν το μικροβιολογικό και το χημικό έλεγχο των νερών αυτών, εξετάζονται συγκεκριμένες μικροβιολογικές και χημικές παράμετροι και καθορίζονται συγκεκριμένα όρια έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η ασφάλεια των κολυμβητών και των καταναλωτών θαλασσινών προϊόντων (**Ελληνική Δημοκρατία, 2017**). Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) αποτελεί μία από τις βασικότερες μικροβιολογικές παραμέτρους που ελέγχονται κατά την ανάλυση της ποιότητας του νερού. Η παρουσία του υποδεικνύει πρόσφατη κοπρανώδη μόλυνση των υδάτων, πιθανώς από αποχετευτικά συστήματα, αστικά λύματα ή απόβλητα ζώων, και συνεπώς την ύπαρξη και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (**Ashbolt & Bruno, 2003**).

Επιπρόσθετα, το υδάτινο οικοσύστημα, συμπεριλαμβανομένων των θαλασσών, έχει αποδειχθεί μια σημαντική δεξαμενή ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών, εκθέτοντας έτσι σε επιπλέον κίνδυνο την δημόσια υγεία. Η αντοχή στα αντιμικροβιακά δεν αφορά μόνο το νοσοκομειακό περιβάλλον και την κλινική πράξη, αφού η ταχεία εξάπλωση του φαινομένου μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, καθιστά επιβλητική την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά σε ποικίλα ενδιαιτήματα και οικοσυστήματα, όπως το έδαφος, οι γεωργικές καλλιέργειες, η ζωική παραγωγή, οι ιχθυοκαλλιέργειες, οι υδάτινες απορροές, τα επιφανειακά ύδατα και κατ'

επέκταση τα θαλάσσια οικοσυστήματα, που αποτελούν δεξαμενή των υδάτινων απορροών του πλανήτη. Συνεπώς, τα στοιχεία που λαμβάνονται από το θαλάσσιο περιβάλλον περιέχουν πλήθος δεδομένων για την κατάσταση του φαινομένου «αντιμικροβιακή αντοχή» και των πιθανών επιπτώσεων και κινδύνων για τη δημόσια και ενιαία υγεία (**Dasi et al., 2024; Martínez, 2009**).

1.1 Ύδατα κολύμβησης και πιθανοί κίνδυνοι δημόσιας υγείας

Τα ύδατα κολύμβησης εγκυμονούν πολλούς και διαφορετικούς κινδύνους. Εκτός των κινδύνων πνιγμού, τραυματισμού, υποθερμίας, τα ύδατα κολύμβησης σχετίζονται και με τον κίνδυνο ανάπτυξης υδατογενών λοιμώξεων που οφείλονται σε ευκαιριακούς ή/και παθογόνους, μικροοργανισμούς του νερού, που μπορεί να είναι υπεύθυνοι για ασθένειες όπως γαστρεντερίτιδα, ηπατίτιδα, δερματικές παθήσεις και προβλήματα του αναπνευστικού (**Landrigan et al., 2020**). Οι πιο συχνοί μικροοργανισμοί που συναντώνται στο θαλασσινό νερό και θέτουν σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία προκαλώντας σοβαρές γαστρεντερίτιδες είναι τα βακτηριακά είδη και γένη *E.coli*, *Enterococci spp.*, *Vibrio spp.*, ενώ συχνά απαντούμενα παράσιτα είναι τα *Cryptosporidium spp.* και *Giardia spp.*. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναφέρει ότι οι υδατογενείς ασθένειες προκαλούν εκατομμύρια θανάτους ετησίως, ιδιαίτερα σε αναπτυσσόμενες περιοχές (**Wang et al., 2023; World Health Organization, 2017**). Η αξιολόγηση της μικροβιακής ποιότητας του νερού περιλαμβάνει την παρακολούθηση δεικτών όπως το *E. coli* και οι εντερόκοκκοι. Πρόσφατες εξελίξεις στις μεθόδους ανίχνευσης, όπως οι ταχείες διαγνωστικές δοκιμές και οι μοριακές τεχνικές, έχουν βελτιώσει την ικανότητα ταυτοποίησης των πηγών μόλυνσης και την εκτίμηση των κινδύνων (**Le et al., 2023; Sharma & Sumithra, 2023**).

Παράλληλα, η χρήση αντιβιοτικών στην ιχθυοκαλλιέργεια έχει συμβάλει στη διάδοση των ανθεκτικών βακτηρίων στα θαλάσσια περιβάλλοντα, ενώ οι μελέτες έχουν τεκμηριώσει την παρουσία πολυανθεκτικών στελεχών στα παράκτια νερά, προκαλώντας ανησυχίες για τη δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων αντοχής σε ακόμη περισσότερους παθογόνους μικροοργανισμούς επικίνδυνους για τον άνθρωπο. Επομένως, η μόλυνση του θαλάσσιου νερού μπορεί να λειτουργήσει ως δεξαμενή ανθεκτικών παθογόνων, αυξάνοντας την πιθανότητα έκθεσης μέσω δραστηριοτήτων όπως κολύμβηση, ψάρεμα και κατανάλωση οστρακοειδών (**Bazzoni et al., 2022; Dioli et al., 2023; Pandiscia et al., 2024; Pellicano et al., 2023**). Οι παράκτιες κοινότητες και οι βιομηχανίες που εξαρτώνται από θαλάσσιους πόρους αντιμετωπίζουν ιδιαίτερη ανησυχία εξαιτίας αυτών των βακτηρίων, λόγω συνεχούς

κινδύνου για οικονομική ζημία, ιδιαίτερα στην Ελλάδα που ο τουρισμός αποτελεί θεμελιώδη λίθο της οικονομίας. Η έκθεση σε παθογόνους/ ευκαιριακούς παθογόνους μικροοργανισμούς του θαλασσινού νερού μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων οδών, όπως μέσω κατάποσης μολυσμένων σταγονιδίων ή εισπνοής αερολυμάτων κατά τη διάρκεια δραστηριοτήτων (είτε επαγγελματικών είτε ψυχαγωγικών) καθώς και μέσω κατανάλωσης μολυσμένων θαλασσινών. Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά *E. coli* μπορούν να έχουν σοβαρές συνέπειες υγείας, ειδικά για ευάλωτες ομάδες όπως οι ηλικιωμένοι, οι ανοσοκατασταλαμένοι και τα μικρά παιδιά (Cordeiro-Moura et al., 2022; Jeamsripong et al., 2022; Mavroidi, Froukala & Tsakris, 2024). Ακόμη, η φυσική σύνδεση διαφόρων πηγών νερού περιπλέκει την κατάσταση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στα θαλάσσια περιβάλλοντα, με έρευνες να έχουν αναδείξει την επικράτηση ανθεκτικών *E. coli* σε δημόσιες και ιδιωτικές πηγές πόσιμου νερού, τονίζοντας την ανάγκη για ολοκληρωμένες στρατηγικές διαχείρισης των υδάτων (Daly et al. 2023). Συνεπώς, η μόλυνση δεν περιορίζεται στα παράκτια ύδατα αλλά μπορεί να επεκταθεί σε άλλα υδάτινα συστήματα, με πιθανά καταστροφικές και ανεξέλεγκτες συνέπειες.

1.2 Νομοθεσία περί υδάτων κολύμβησης/ Μικροβιολογικός έλεγχος υδάτων κολύμβησης

1.2.1 Νομοθεσία περί υδάτων κολύμβησης

Σύμφωνα με το Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας, η ποιότητα των υδάτων κολύμβησης στην Ελλάδα παρακολουθείται με συνέπεια από το 1988 με βάση την **Οδηγία 76/160/ΕΟΚ** «περί της ποιότητας υδάτων κολύμβησης». Από το 2010, η παρακολούθηση αυτή πραγματοποιείται σύμφωνα με τη διάδοχη Οδηγία 2006/7/ΕΚ «σχετικά με τη διαχείριση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης», όπως αυτή ενσωματώθηκε στην Ελληνική νομοθεσία με την **ΚΥΑ 8600/416/Ε103/2009 (ΦΕΚ Β' 356)** στο πλαίσιο του «Προγράμματος Παρακολούθησης της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης της χώρας» (ή απλούστερα «Πρόγραμμα»), που έχει ως βασικούς στόχους την προστασία του θαλάσσιου περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας των λουόμενων, καθώς και τον εντοπισμό και τη διαχείριση προβληματικών περιοχών. Η νέα αυτή Οδηγία αντικατέστησε σταδιακά την προηγούμενη, θέτοντας αυστηρότερα κριτήρια και διαδικασίες για τη διαχείριση και αξιολόγηση των υδάτων κολύμβησης και τη δειγματοληψία και ανάλυση του νερού από

καθορισμένες περιοχές κολύμβησης κατά την κολυμβητική περίοδο (Μάιος έως Οκτώβριος).

Η ενημέρωση των πολιτών και των κρατών-μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με την ποιότητα των υδάτων κολύμβησης επιτυγχάνεται μέσω της κοινοποίησης των αποτελεσμάτων, με στόχο την ευαισθητοποίηση της κοινής γνώμης, τη διαφάνεια και τη συμμετοχή του κοινού στη διαχείριση των υδάτων κολύμβησης αλλά και τη διεθνή προβολή της Ελλάδας, με δεδομένο τον τεράστιο ρόλο του τουρισμού στην ελληνική οικονομία. Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύτιμα και για τους ίδιους τους κατοίκους της Ελλάδας που διαμένουν, για παράδειγμα, σε παραλιακές περιοχές κοντά σε αστικά κέντρα (**Προφίλ Υδάτων Κολύμβησης Ελλάδας, 2024; Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας, 2024**).

Μετά τη συλλογή των δεδομένων αυτών, την αξιολόγηση και ταξινόμηση των υδάτων κολύμβησης, ακολουθεί η σύνταξη της ετήσιας έκθεσης παρακολούθησης, η οποία υποβάλλεται κάθε χρόνο, έως τις 31 Δεκεμβρίου, στο Κεντρικό Αποθετήριο Δεδομένων του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Περιβάλλοντος, σύμφωνα με τις διατάξεις της Οδηγίας 2006/7/EK και τις κατευθύνσεις της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Παράλληλα, τα αποτελέσματα του «Προγράμματος» συμβάλλουν στην κατάρτιση, αναθεώρηση και επικαιροποίηση των ταυτοτήτων των υδάτων κολύμβησης, σύμφωνα με το άρθρο 6 της Οδηγίας 2006/7/EK και το Παράρτημα ΙΙΙ αυτής. Οι ταυτότητες αυτές περιλαμβάνουν πληροφορίες για τα κύρια χαρακτηριστικά των ακτών, τις πηγές ρύπανσης και τα μέτρα που λαμβάνονται για τη διασφάλιση της ποιότητάς τους.

Μέσω αυτού του ολοκληρωμένου προγράμματος παρακολούθησης, η Ελλάδα διασφαλίζει την προστασία της δημόσιας υγείας, τη διατήρηση του φυσικού περιβάλλοντος και την ενίσχυση της τουριστικής της εικόνας, ενώ παράλληλα συμμορφώνεται με τις ευρωπαϊκές οδηγίες και κανονισμούς.

Οι ποιοτικές παράμετροι που ελέγχονται έχουν επιλεγεί σύμφωνα με την Οδηγία 2006/7/EK και διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

1. Μικροβιολογικές παράμετροι: Περιλαμβάνουν τα «Κολοβακτηρίδια» (*Escherichia coli*) και τους «Έντερόκοκκους» (*Intestinal enterococci*), οι οποίοι αποτελούν δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης και αναλύονται με τις εργαστηριακές μεθόδους που περιγράφονται στο Παράρτημα Ι της Οδηγίας 2006/7/EK.
2. Οπτικά παρακολουθούμενες παράμετροι: περιλαμβάνουν κατάλοιπα πίσσας, γυαλιά, πλαστικά, καουτσούκ ή οποιαδήποτε άλλα απορρίμματα.

Οι κατευθυντήριες γραμμές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) για την ποιότητα των υδάτων κολύμβησης ενημερώνονται τακτικά με νέα δεδομένα και μεθόδους, με τις πιο πρόσφατες κατευθυντήριες γραμμές του WHO να προτείνουν τη χρήση των εντερόκοκκων ως κύριους δείκτες για την εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης, λόγω της καλύτερης συσχέτισής τους με την εμφάνιση γαστρεντερικών ασθενειών στους χρήστες των υδάτων αυτών (**World Health Organization, 2017**).

Η δειγματοληψία των υδάτων κολύμβησης οφείλει να γίνεται σε βάθος τουλάχιστον 30 εκατοστών κάτω από την επιφάνεια και σε νερά βάθους τουλάχιστον 1 μέτρου, ενώ οι φιάλες δειγματοληψίας πρέπει να αποστειρώνονται και να είναι κατάλληλες για την ανάλυση των παραμέτρων. Οι δειγματοληψίες πρέπει να ξεκινούν δύο εβδομάδες πριν από την έναρξη της κολυμβητικής περιόδου (Μάιος έως Οκτώβριος) και να συνεχίζονται σε τακτά διαστήματα καθ' όλη τη διάρκειά της.

Τα μικροβιολογικά δείγματα αναλύονται σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στο Παράρτημα I της Οδηγίας 2006/7/EK. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν την καλλιέργεια των βακτηρίων σε ειδικά θρεπτικά υλικά και την καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύσσονται.

Λαμβάνοντας και αξιολογώντας τα αποτελέσματα, τα ύδατα κολύμβησης ταξινομούνται ως «εξαιρετικής», «καλής», «επαρκούς» ή «ανεπαρκούς» ποιότητας, ανάλογα με τις μικροβιολογικές και οπτικές παραμέτρους. Ειδικά μέτρα λαμβάνονται σε περιπτώσεις βραχυπρόθεσμης ρύπανσης, με στόχο την προστασία των λουόμενων και τη διασφάλιση της ποιότητας των υδάτων.

1.2.1.a. Όρια των μικροβιολογικών παραμέτρων- δεικτών

Σύμφωνα με την **Οδηγία 2006/7/EK** και τις κατευθυντήριες γραμμές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.1**, τα όρια για το βακτήριο ***E. coli*** στα παράκτια ύδατα είναι τα εξής:

- Εξαιρετική ποιότητα: ≤ 250 cfu/100 mL (colonies forming units per 100 milliliters)
- Καλή ποιότητα: ≤ 500 cfu/100 mL (βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95ο εκατοστημόριο - βλέπε παράρτημα II)
- Επαρκής ποιότητα: ≤ 500 cfu/100 mL (βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 90ό εκατοστημόριο - βλέπε παράρτημα II)

Τα παραπάνω όρια βασίζονται στην καταμέτρηση αποικιών βακτηρίων (cfu) ανά 100 mL δείγματος νερού και χρησιμεύουν για την κατηγοριοποίηση της ποιότητας των θαλάσσιων

υδάτων κολύμβησης. Τα δείγματα που υπερβαίνουν τα 500 cfu/100 mL θεωρούνται ότι δεν πληρούν τα πρότυπα ασφαλείας για τα ύδατα κολύμβησης, χαρακτηρίζονται ως «ανεπαρκούς ποιότητας» και απαιτούν άμεση δράση για την προστασία της δημόσιας υγείας. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα όρια των μικροβιακών δεικτών, όπως βρίσκονται

Για τα παράκτια ύδατα και τα μεταβατικά ύδατα

	A	B	Γ	Δ	E
	Παράμετρος	Εξαιρετική ποιότητα	Καλή ποιότητα	Επαρκής ποιότητα	Μέθοδοι ανάλυσης αναφοράς
1	Εντερόκοκκοι (cfu/100 ml)	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 ή ISO 7899-2
2	Κολοβακτηρίδια (cfu/100 ml)	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 ή ISO 9308-1

(*) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα II.

(**) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 90ό εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα II.

στην Οδηγία 2006/7/ΕΚ.

Εικόνα 1.1 Όρια cfu/ 100mL για Εντερόκοκκους και Κολοβακτηρίδια στα παράκτια και μεταβατικά ύδατα, σύμφωνα με το Παράρτημα I της Οδηγίας 2006/7/ΕΚ.

1.2.1.β. Διαχείριση ρύπανσης και δημόσια ευαισθητοποίηση

Η Ελλάδα έχει θέσει σε εφαρμογή κατευθυντήριες γραμμές για τη διαχείριση και τη μείωση των πηγών ρύπανσης που συμβάλλουν στη μικροβιακή μόλυνση του θαλασσινού νερού. Αυτά περιλαμβάνουν την επεξεργασία λυμάτων για τη μείωση της απόρριψης ρυπαντικών ουσιών και την προώθηση βέλτιστων γεωργικών πρακτικών για τη μείωση της απορροής. Παράλληλα, πραγματοποιούνται εκστρατείες ευαισθητοποίησης του κοινού, ενημερώνοντας τις κοινότητες για τη σημασία της διατήρησης της ποιότητας του νερού και της μείωσης της ρύπανσης, ενισχύοντας τις συλλογικές προσπάθειες για την προστασία των θαλάσσιων οικοσυστημάτων.

Σύμφωνα με την **Οδηγία 2006/7/ΕΚ** ως «διαχειριστικά μέτρα» νοούνται τα ακόλουθα μέτρα που λαμβάνονται για τα ύδατα κολύμβησης:

- Καθορισμός και διατήρηση ταυτότητας για τα ύδατα κολύμβησης
- Καθορισμός χρονοδιαγράμματος παρακολούθησης

- Παρακολούθηση των υδάτων κολύμβησης
- Αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης
- Ταξινόμηση των υδάτων κολύμβησης
- Εντοπισμός και αξιολόγηση των αιτίων ρύπανσης που ενδέχεται να επηρεάζουν τα ύδατα κολύμβησης και να βλάπτουν την υγεία των λουόμενων
- Παροχή πληροφοριών στο κοινό
- Ανάλυση δράσης για την πρόληψη της έκθεσης των λουόμενων στη ρύπανση
- Ανάλυση δράσης για τη μείωση του κινδύνου ρύπανσης

1.2.2 Μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης υδάτων

Η ακριβής και έγκαιρη ανίχνευση μικροβίων που εντοπίζονται στο θαλασσινό νερό είναι ζωτικής σημασίας για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού και τη μείωση των κινδύνων για τη δημόσια υγεία.

Για αυτό τον λόγο, για τον μικροβιολογικό έλεγχο των υδάτων έχουν σχεδιαστεί διάφορα πρωτόκολλα, τα οποία βασίζονται τόσο σε παραδοσιακές καλλιεργητικές μεθόδους όσο και σε νεότερες προηγμένης τεχνολογίας τεχνικές όπως αυτή της ανάλυσης του μικροβιώματος.

1.2.2.α. Παραδοσιακές τεχνικές/ καλλιεργητικές μέθοδοι

Οι παραδοσιακές καλλιεργητικές μέθοδοι που εφαρμόζονται κυρίως για ανίχνευση βακτηρίων στο νερό, περιλαμβάνουν τη συλλογή δειγμάτων νερού, τη διήθηση μέσα από ειδικά σχεδιασμένες μεμβράνες και τη καλλιέργεια σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση και την απαρίθμηση των αποικιών. Η μέθοδος διήθησης δειγμάτων νερού μέσα από μεμβράνες είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη και αρκετά αποτελεσματική στην ανίχνευση βακτηρίων όπως των ολικών κολοβακτηριοειδών και *Escherichia coli*, εντερόκοκκων και άλλων (Clermont, Bonacorsi & Bingen, 2000). Ωστόσο, οι παραδοσιακές καλλιεργητικές τεχνικές μειονεκτούν επειδή α) είναι χρονοβόρες, λόγω των πολύωρων επώασεων που χρειάζονται, β) απαιτούν τη χρήση πολλών διαφορετικών θρεπτικών υλικών, προκειμένου να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί το εκάστοτε βακτηριακό είδος, γ) είναι αποτελεσματικές κυρίως στην ανίχνευση βακτηρίων με χαμηλές θρεπτικές απαιτήσεις και δ) δεν επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών μικροοργανισμών.

1.2.2.β. Σύγχρονες μοριακές τεχνικές και ανάλυση μικροβιώματος

Οι μοριακές τεχνικές, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), έχουν αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία και την ειδικότητα της ανίχνευσης των διάφορων μικροοργανισμών, τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα. Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την ταχεία ταυτοποίηση των διαφορετικών μικροβιακών ειδών στοχεύοντας σε συντηρημένες γενετικές περιοχές ή γονίδια μέσω της χρήσης ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Επιπλέον, οι μοριακές τεχνικές πλεονεκτούν έναντι των καλλιεργητικών διότι, εκτός από το ότι είναι πιο γρήγορες, μπορούν να ανιχνεύσουν ζωντανά αλλά και νεκρά μικροβιακά κυττάρων, προσφέροντας έτσι μια πληρέστερη εικόνα της μικροβιακής παρουσίας (Kotsiri et al., 2019; Zgouridou et al., 2021).

Πλέον, έχουν αναπτυχθεί ταχύτερες και πιο εξελιγμένες τεχνικές, που στηρίζονται στην αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome sequencing, WGS), οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή και στον μικροβιολογικό έλεγχο των υδάτων (Berrazeg et al., 2019). Η ανάλυση του μικροβιώματος (δηλαδή του συνόλου των γονιδιωμάτων όλων των μικροοργανισμών που επιζούν σε ένα δεδομένο περιβάλλον) είναι μία τεχνική βασιζόμενη στο WGS που πλέον χρησιμοποιείται ευρέως κατά τον ποιοτικό έλεγχο των υδάτων. Η τεχνική αυτή παρέχει την πλήρη απεικόνιση της μικροβιολογικής σύστασης των υδάτων και χαρίζει τη δυνατότητα μελέτης τους χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας και απομόνωσης (Jeamsripong et al., 2022).

1.3 Χαρακτηριστικά *E. coli*

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά του *E. coli*

Το μικρόβιο *Escherichia coli* (*E. coli*) είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*, το οποίο μπορεί να είναι ελυτροφόρο ή μη, ενώ διαθέτει μαστίγια που του επιτρέπουν την κίνηση. Πολλά από τα στελέχη του *E. coli* είναι αβλαβή ή ακόμα και επωφελή, καθώς αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων. Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες, το *E. coli* μπορεί να προκαλέσει ευκαιριακές λοιμώξεις, οπότε κατατάσσεται στα δυνητικά παθογόνα βακτήρια (Basavaraju & Gunashree, 2023; Mueller & Tainter, 2023).

Το *E. coli* είναι ευρέως διαδεδομένο στο περιβάλλον και μπορεί να εντοπιστεί στο έδαφος, σε λύματα, και στα υδάτινα συστήματα. Σύμφωνα με τη διεθνή νομοθεσία,

χρησιμοποιείται ως βασικός δείκτης κοπρανόδους μόλυνσης κατά την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού (Şahin et al., 2021). Είναι υπεύθυνο για το 70-95% των ουρολοιμώξεων της κοινότητας και πολλές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, ενώ αποτελεί κύρια αιτία γαστρεντερίτιδας στις αναπτυσσόμενες χώρες (Wolska et al., 2022). Η μετάδοσή του μπορεί να γίνει μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων ή νερού, επαφής με περιττώματα, καθώς και κατάποσης μολυσμένου νερού από θάλασσες, λίμνες και κολυμβητικές δεξαμενές (Mellou et al., 2014).

Τα παθογόνα στελέχη του *E. coli* κατατάσσονται σε έξι κύριες κατηγορίες:

- Εντεροαιμορραγικό *E. coli* (Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC): Αυτά τα στελέχη παράγουν τοξίνες (βεροτοξίνες ή τοξίνες τύπου Shiga) και προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο.
- Εντεροπαθογόνο *E. coli* (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC): Αυτά τα στελέχη προκαλούν εντερίτιδα στα βρέφη.
- Εντεροτοξινογόνο *E. coli* (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC): Η λοιμογονικότητα των στελεχών αυτών οφείλεται στις παραγόμενες τοξίνες που οδηγούν σε διάρροια και αποτελούν το συχνότερο αίτιο διάρροιας των ταξιδιωτών.
- Εντεροδιεισδυτικό *E. coli* (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC): Τα στελέχη αυτής της κατηγορίας έχουν την ικανότητα εισβολής στα κύτταρα του επιθηλιακού ιστού του εντέρου και προκαλούν δυσεντερία.
- Εντεροσυσσωρευτικό *E. coli* (Enteroadherent *E. coli*, EAEC): Αυτά τα στελέχη ευθύνονται για χρόνια διαρροϊκή νόσο, κυρίως σε βρέφη και παιδιά.
- Diffusely adherent *E. coli* (DAEC): Τα στελέχη αυτής της κατηγορίας ευθύνονται για διάρροια σε νεαρά άτομα 1-5 ετών.

Η ικανότητά του *E. coli* να επιβιώνει σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως το έδαφος και το νερό, υπογραμμίζει την οικολογική του ευελιξία, και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ηλιοφάνεια, οι συνθήκες που επικρατούν στο νερό, η αλατότητα, η παρουσία οργανικής ύλης, το διαλυμένο οξυγόνο, η χημική σύσταση του νερού, η συχνότητα βροχοπτώσεων και η ανθρώπινη δραστηριότητα κοντά ή μέσα στο νερό (Papastergiou et al., 2009; Pellicano et al., 2023). Ακόμη, η ύπαρξη του μικροβίου αυτού στο νερό της βροχής είναι δύσκολο να εκτιμηθεί αλλά υπολογίζεται ότι κυμαίνεται στις χίλιες με είκοσι χιλιάδες αποικίες στα 100mL ύδατος (Horakova, Mlejnkova & Mlejnek, 2008; Landrigan et al., 2020; Pandiscia et al., 2024; Wongtawan et al., 2022; Wolska et al., 2022).

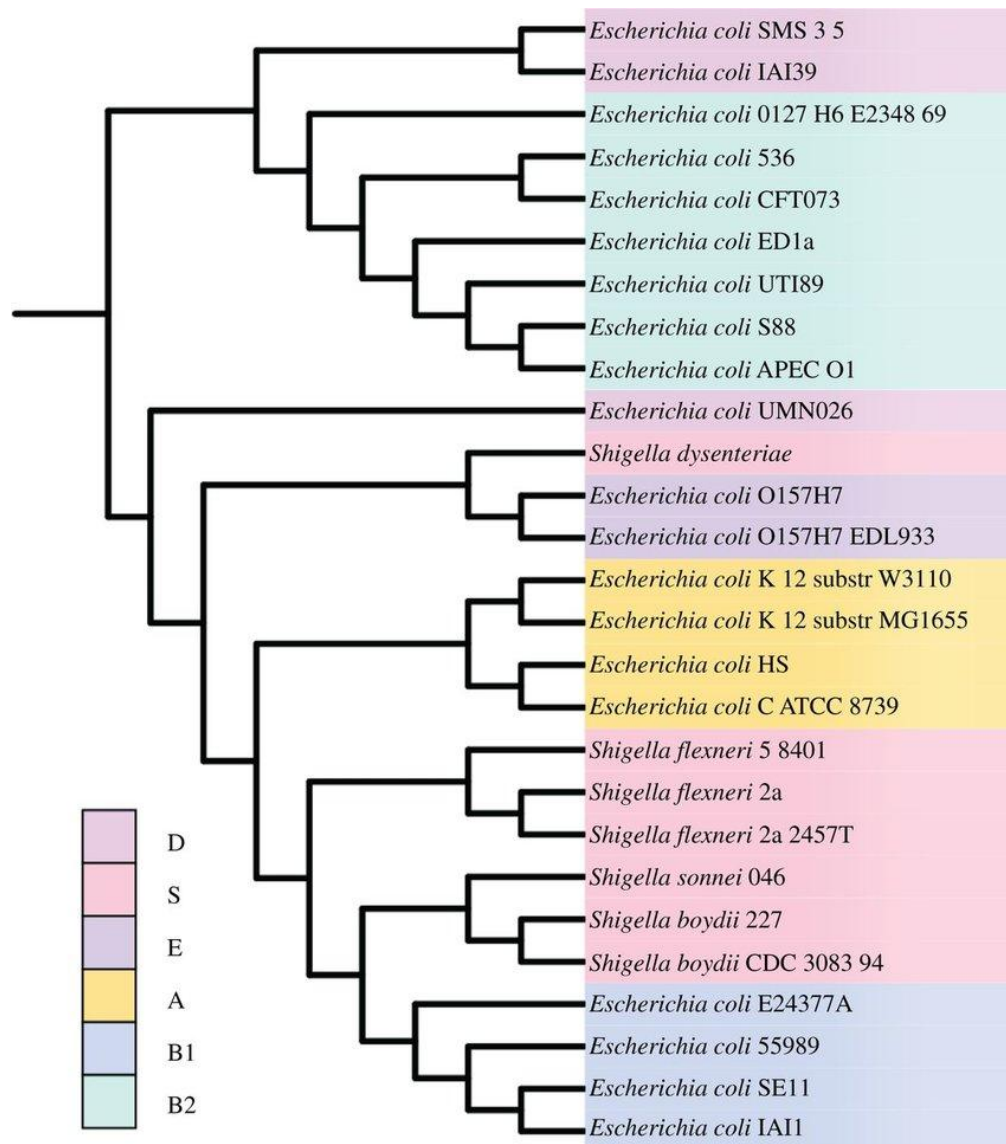
Επιπλέον, το βακτήριο αυτό, παρόλο που δεν διαθέτει κανένα εγγενή μηχανισμό αντοχής σε αντιβιοτικά, πλέον συχνά εντοπίζονται ανθεκτικά ακόμα και πολυανθεκτικά στελέχη. Αυτό οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς αντοχής που έχει αναπτύξει ανά τα χρόνια. Ο πιο διαδεδομένος και πιο σημαντικός μηχανισμός αντοχής που διαθέτει είναι η παραγωγή ενζύμων β-λακταμασών που διασπών τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, όπως πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες. Τα γονίδια που εκφράζουν αυτά τα ένζυμα συνήθως εδράζονται σε συζευκτικά πλασμίδια τα οποία μπορούν να μεταφερθούν εύκολα μεταξύ των βακτηρίων (Mehrotra et al., 2023).

1.3.2. Φυλογενετικές ομάδες του *E. coli*

Με φυλογενετική ανάλυση ή phylogrouping, το *E. coli* κατατάσσεται σε διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες βάσει των γενετικών χαρακτηριστικών του, οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς την παθογένεια, την οικολογία και την αντοχή στα αντιβιοτικά. Τα παθογόνα στελέχη ανήκουν κυρίως στις ομάδες B2 και D (**Clermont, Bonacorsi & Bingen, 2000**).

Παρακάτω αναφέρονται οι διαφορετικές φυλογενετικές ομάδες (**Εικόνα 1.2**), ενώ στην εικόνα βλέπουμε τη γενετική συγγένεια διαφόρων στελεχών του *E.coli* καθώς και την φυλογενετική ομάδα στην οποία ανήκουν.

- Ομάδα A: Περιλαμβάνει κυρίως μη παθογόνα στελέχη που αποτελούν μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας υγιών ατόμων.
- Ομάδα B1: Περιλαμβάνει στελέχη που συναντώνται στο έντερο των ζώων και μπορεί να είναι υπεύθυνα για ζωνοσους.
- Ομάδα B2: Περιλαμβάνει πολλά παθογόνα στελέχη που είναι υπεύθυνα για εξωεντερικές λοιμώξεις, όπως ουρολοίμωξη, σηψαιμία και μηνιγγίτιδα, καθώς επίσης συναντάται συχνά σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις και ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς.
- Ομάδα D: Περιλαμβάνει στελέχη που μπορούν να προκαλέσουν εξωεντερικές λοιμώξεις, αλλά είναι λιγότερο παθογόνα από την ομάδα B2.
- Ομάδα E και F: Περιλαμβάνουν στελέχη που συναντώνται λιγότερο συχνά και έχουν ποικίλα παθογενετικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 1.2 Οι φυλογενετικές ομάδες του *E. coli* και η σχετική τους θέση σε ένα φυλογενετικό δέντρο, βοηθώντας στην οπτικοποίηση της γενετικής ποικιλομορφίας και της εξελικτικής σχέσης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων (Skipington & Ragan, 2012).

1.4 Αντιβιοτικά και αντοχή στα αντιβιοτικά

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών αποτέλεσε σταθμό στην ιστορία της σύγχρονης ιατρικής, καθιστώντας δυνατή την πρόληψη και θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Τα αντιβιοτικά μπορεί να είναι φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές ουσίες, και με κριτήριο τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται σε βακτηριοστατικά, τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, και σε βακτηριοκτόνα, που οδηγούν στο θάνατο των βακτηρίων (**Morier, 2024**). Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως όχι μόνο στην ιατρική, αλλά και στην κτηνιατρική, την κτηνοτροφία, τη γεωργία και τις υδατοκαλλιέργειες (**Joddha et al., 2023; Peng et al., 2022**).

Τα τελευταία χρόνια η ευεργετική δράση των αντιβιοτικών απειλείται από το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά. Η αντιμικροβιακή αντοχή (Antimicrobial Resistance - AMR) είναι η ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται παρουσία αντιβιοτικού. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και σε φυσικά ενδιαιτήματα, συμπεριλαμβανομένου του υδάτινου οικοσυστήματος. Η αντιμικροβιακή αντοχή μπορεί να είναι φυσική ή επίκτητη. Η φυσική αντοχή είναι η έμφυτη ικανότητα του μικροοργανισμού να αντιστέκεται σε κάποιες κατηγορίες αντιβιοτικών, η οποία είναι γνωστή και προκαθορισμένη. Η επίκτητη αντοχή προκύπτει έπειτα από μεταλλάξεις ή από την απόκτηση εξωγενών γενετικών στοιχείων (όπως τα πλασμίδια), προσδίδοντας νέα χαρακτηριστικά στο μικροοργανισμό που αλλάζουν το φαινότυπό του (**Morier, 2024**).

Η αντιμικροβιακή αντοχή είναι ένα φαινόμενο που υπήρχε ανέκαθεν λόγω των μηχανισμών προσαρμογής των βακτηρίων στη φύση με στόχο την επιβίωσή τους. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει ενταθεί λόγω της συνεχούς και αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών. Η υπέρμετρη χρήση των αντιβιοτικών ασκεί εξελικτική πίεση στους βακτηριακούς πληθυσμούς, ευνοώντας την επιβίωση και την εξάπλωση των ανθεκτικών στελεχών. Η κατανάλωση αντιβιοτικών παγκοσμίως αυξήθηκε περισσότερο από 60% μόνο στο διάστημα μεταξύ 2000 και 2015 (**Jeamsripong et al., 2022**). Η παγκόσμια υγεία πλήττεται και οι λοιμώξεις που προκαλούνται από ανθεκτικά βακτήρια οδηγούν στον θάνατο ενός μεγάλου αριθμού ατόμων ετησίως. Εκτιμάται ότι εντός των επόμενων 30 ετών, οι ετήσιοι θάνατοι που οφείλονται σε λοιμώξεις από ανθεκτικά βακτήρια θα αγγίζουν τα 10 εκατομμύρια, ξεπερνώντας σε αριθμό τους θανάτους που προκαλούνται από καρκίνο (**de Kraker, Stewardson & Harbarth, 2016**).

1.5 Αντοχή στα αντιβιοτικά στο υδάτινο οικοσύστημα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το υδάτινο οικοσύστημα αποτελεί σημαντική δεξαμενή ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών, καθώς είναι ο τελικός αποδέκτης υδάτινων απορροών από γεωργικές καλλιέργειες, λυμάτων (τόσο αστικών όσο και νοσοκομειακών) και αποβλήτων από μονάδες ζωικής εκτροφής, τα οποία βρίθουν ανθεκτικών μικροοργανισμών και υπολειμμάτων αντιβιοτικού. Επίσης μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικού στη θάλασσα προέρχονται από τη χρήση τους στις υδατοκαλλιέργειες. Παράλληλα, στο υδάτινο οικοσύστημα ευνοείται η οριζόντια μεταφορά αντιμικροβιακής αντοχής, μέσω ανταλλαγής γενετικού υλικού, από το ένα μικροβιακό είδος στο άλλο, γεγονός που αποτελεί το κομβικό σημείο εξάπλωσης της αντοχής στα διάφορα οικοσυστήματα (Martínez, J. L., 2009; Walsh, 2010; Baquero & Coque, 2014).

Ένα βακτήριο το οποίο εντοπίζεται συνεχώς στα υδάτινα ενδιαιτήματα, είναι το *E. coli*. Το βακτήριο αυτό αντιπροσωπεύει ένα βασικό υποδοχέα γονιδίων αντοχής, τα οποία δύναται να μεταφερθούν οριζοντίως (Martínez, J. L., 2009; Walsh, 2010; Carattoli, 2013). Επιπλέον, το *E. coli* μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως δότης όσο και ως δέκτης γονιδίων αντοχής. Η μετάδοση παθογόνων και συνάμα ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών *E. coli* από το υδάτινο οικοσύστημα στον άνθρωπο μέσω άμεσης επαφής με το νερό ή μέσω της τροφικής αλυσίδας, αποτελεί σοβαρή ανησυχία για τη δημόσια υγεία (Baquero & Coque, 2014).

Για όλους τους παραπάνω λόγους το *E. coli* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της μικροβιακής αντοχής στο υδάτινο οικοσύστημα (Alves et al., 2014; Perestrelo et al., 2023). Επομένως, η διερεύνηση των επιπέδων αντοχής, των γονιδίων αντοχής και του γενετικού υποβάθρου αυτών σε στελέχη *E. coli* που προέρχονται από θαλασσινό νερό γίνεται ολοένα και πιο σημαντικό πεδίο μελέτης (Dasí et al., 2024; Martínez, 2009).

Συχνότερα συναντάται ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, τη στρεπτομυκίνη, τις σουλφοναμίδες και την τετρακυκλίνη. Επίσης, ένα σημαντικό ποσοστό των περιβαλλοντικών στελεχών *E. coli*, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που ανευρίσκονται στα ύδατα αναψυχής, παρουσιάζει πολυανθεκτικότητα (MDR), δηλαδή αντοχή σε τουλάχιστον τρεις ομάδες αντιβιοτικών (Mehrotra et al., 2023).

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με μελέτες σε νερό θάλασσας έχουν εντοπιστεί στελέχη *E. coli* που φέρουν το πλασμιδιακό γονίδιο *mcr-1* (mobilized colistin resistance), το οποίο προσδίδει αντοχή στην κολιστίνη (Drali et al., 2018; Anyanwu, Jaja & Nwobi, 2020; Kumar & Brahma, 2023). Η κολιστίνη είναι ένα αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται για τη

θεραπεία πολυανθεκτικών λοιμώξεων όταν δεν υπάρχουν άλλες θεραπευτικές επιλογές. Η εμφάνιση αντοχής στην κολιστίνη που έχει λάβει παγκόσμιες διαστάσεις, οφείλεται κυρίως στην εκτεταμένη χρήση της στην κτηνοτροφία. Οι μηχανισμοί αντοχής σε αυτό το αντιβιοτικό εκτός από πλασμιδιακοί (*mcr* γονίδια), μπορεί να είναι και χρωμοσωμικοί, όπως χρωμοσωμικές μεταλλάξεις στα γονίδια *pmrCAB*, *pmrE*, και *arnBCADTEF* (Kim et al., 2019). Η εμφάνιση αντοχής στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό καθιστά δύσκολη έως και αδύνατη τη διαχείριση και θεραπεία των λοιμώξεων (Anyanwu, Jaja & Nwobi, 2020; Kumar & Brahma, 2023). Επομένως, ο εντοπισμός ανθεκτικών στελεχών του *E. coli* στην κολιστίνη σε θαλασσινό νερό και κολυμβητικές ακτές απειλεί σοβαρά τη δημόσια υγεία.

Συμπερασματικά η ανάγκη για αποτελεσματικές στρατηγικές παρακολούθησης και διαχείρισης της αντιμικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά κρίνεται επιτακτική (Mellou et al., 2014; Okoye et al., 2022).

1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μόλυνση των θαλάσσιων οικοσυστημάτων από *E. coli*

Η επιβίωση και η διάδοση των ανθεκτικών στελεχών *E. coli* σε θαλάσσια περιβάλλοντα επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως:

- Θερμοκρασία του Νερού: Οι υψηλότερες θερμοκρασίες ενισχύουν τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροβίων και συνεπώς και του *E. coli*. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Wolska et al., 2022).
- Κλιματική Αλλαγή: Οι αλλαγές στη θερμοκρασία και τα πρότυπα βροχοπτώσεων επηρεάζουν το μικροβιακό φορτίο και τη διανομή των παθογόνων στα παράκτια ύδατα (Landrigan et al., 2020; Zgouridou et al., 2021).
- Αλατότητα: Διαφορετικά επίπεδα αλατότητας μπορούν να επηρεάσουν τις μεταβολικές δραστηριότητες και τις αντιδράσεις των βακτηρίων στο stress (Nikolakopoulou et al., 2008; Pandiscia et al., 2024).
- Ρύπανση: Ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως η απόρριψη ακατέργαστων λυμάτων και η γεωργική απορροή, δημιουργούν επιλεκτική πίεση που διευκολύνει την πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στελεχών (Landrigan et al., 2020; Poey et al., 2024).

- Αλληλεπιδράσεις με άλλες μικροβιακές κοινότητες: Η μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ των βακτηρίων, λόγω οριζόντιας μεταφοράς πλασμιδίων μέσω της σύζευξης ή του μετασχηματισμού, συμβάλει στην διασπορά της αντοχής (Cordeiro-Moura et al., 2022; Dioli et al. 2023).

Ακόμη, το *E. coli* έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ. Τα βιοφίλμ προσφέρουν προστασία έναντι περιβαλλοντικών πιέσεων και αντιμικροβιακών παραγόντων, ενισχύοντας την ανθεκτικότητα της *E. coli* σε αντίξοες συνθήκες, καθιστώντας την αντιμετώπιση του μικροβίου αυτού ως μία πρόκληση. Η ικανότητα αυτή σχηματισμού βιοφίλμ μελετάται για τη συσχέτισή της με την επίμονη παρουσία του *E. coli* στο νερό (Moreira et al., 2012).

Επιπλέον, η μόλυνση με *E. coli* είναι ένα συνεχές πρόβλημα στις ελληνικές ακτές λόγω ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (Alexopoulos et al., 2011; Economides & Arvanitides, 1989; Kotsiri et al., 2019; Nikolakopoulou et al., 2008; Papastergiou et al., 2009; Vantarakis et al., 2005; Zgouridou et al., 2021). Η παρουσία του *E. coli* στο θαλασσίνο νερό επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η αστικοποίηση, η ρύπανση και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (Zgouridou et al., 2021). Οι ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως η απόρριψη ακατέργαστων λυμάτων, η μη ελεγχόμενη απόρριψη ζωικών αποβλήτων, η γεωργική απορροή, συμβάλλουν σημαντικά στη μόλυνση των παράκτιων υδάτων με *E. coli*, ενώ οι αυξημένες θερμοκρασίες της επιφάνειας της θάλασσας λόγω της κλιματικής αλλαγής και φυσικά φαινόμενα όπως οι παλίρροιες, μπορούν επίσης να επιταχύνουν τη μόλυνση από παθογόνα (Landrigan et al., 2020; Zgouridou et al., 2021).

Ακόμη, η γενετική προσαρμοστικότητα του *E. coli* στα θαλάσσια περιβάλλοντα είναι σημαντική για την κατανόηση της επίμονης παρουσίας του και δύσκολης αντιμετώπισής του. Ενδεικτικά αναφέρεται μια μελέτη για τα στελέχη της *E. coli* σε θαλάσσιο οικοσύστημα με ιστορικό ρύπανσης από βαρέα μέταλλα, η οποία αποκάλυψε την παρουσία γονιδίων αντοχής σε βαρέα μέταλλα και αντιβιοτικά ταυτοχρόνως. Αυτή η διπλή αντοχή διευκολύνει την επιμονή και τη διάδοση του *E. coli* στο μολυσμένο θαλασσίνο νερό, με πιθανή μεταφορά γονιδίων αντοχής σε άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς (Landrigan et al., 2020).

Κεφάλαιο 2
Πειραματικό Μέρος
Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Σκοπός


Σκοπός της ερευνητικής αυτής διπλωματικής εργασίας ήταν:

- Η μικροβιολογική ανάλυση για την παρουσία του βακτηρίου *E. coli* σε δείγματα θαλασσινού ύδατος, που ελήφθησαν από κολυμβητική ακτή εντός του νομού Αττικής, και η αξιολόγηση της καταλληλότητας των συγκεκριμένων υδάτων αναψυχής
- Η απομόνωση και η ταυτοποίηση (βιοχημική και μοριακή), των ύποπτων αποικιών *E. coli*
- Ο έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας/ αντοχής σε ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά όλων των επιβεβαιωμένων στελεχών *E. coli*
- Η ταξινόμηση όλων των επιβεβαιωμένων στελεχών *E. coli* σε φυλογενετικές ομάδες εφαρμόζοντας την μοριακή μέθοδο τυποποίησης triplex PCR-phylogrouping

2.2 Δειγματοληψία

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κατά τη διάρκεια του έτους 2023. Η πρώτη ολοκληρώθηκε τον Μάιο 2023 (αρχή της κολυμβητικής περιόδου) και η δεύτερη τον Ιούλιο 2023 (περίοδος αιχμής κολυμβητικής περιόδου). Η συγκεκριμένη κολυμβητική ακτή όπου έλαβε μέρος η δειγματοληψία βρίσκεται στην περιοχή Καστέλλα του Πειραιά και καθημερινά φιλοξενεί αρκετούς λουόμενους πάσης ηλικίας, τόσο για κολύμβηση, όσο και για θαλάσσια σπορ. Σε κάθε δειγματοληψία, συλλέχθηκαν δείγματα θαλασσινού νερού 30 εκατοστά κάτω από την επιφάνεια του ύδατος και σε ύδατα βάθους τουλάχιστον 1 μέτρο, με κατεύθυνση κίνησης της φιάλης από την ακτή προς τα μέσα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε σκουρόχρωμα αποστειρωμένα γυάλινα μπουκάλια όγκου 500ml (2 δείγματα ανά δειγματοληψία), τοποθετήθηκαν στον πάγο και αναλύθηκαν εντός 4 ωρών μετά τη δειγματοληψία. Επίσης συμπληρώθηκαν τα «Δελτία Δειγματοληψίας Νερού Ακτής Κολύμβησης για Μικροβιολογική Ανάλυση» σύμφωνα με το πρότυπο του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας Ε.Ο.Δ.Υ. σύμφωνα με την ΚΥΑ 8600/416/Ε103/2009 (ΦΕΚ 356/Β/2009), όπως φαίνονται στις **Εικόνα 2.1** και **Εικόνα 2.2**, ώστε να αξιολογηθούν παράγοντες όπως πιθανές βροχοπτώσεις και ανάδευση των επιφανειακών υδάτων, ή η φορά του ανέμου, που μπορεί να επηρεάσει δημιουργώντας κυματισμούς ή

ρεύματα του νερού, αραιώνοντας το νερό μεγάλης περιεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς, με το «καθαρό» νερό βαθύτερου σημείου.



**ΕΘΝΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ
ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ**
ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

Ταχ. Διεύθυνση : Αλεξάνδρου Φλέμινγκ 34
 Ταχ. Κώδικας : 166-72
 Τηλέφωνο : 210-8921056 210-8921009
 Τηλεομοιοτυπία / fax : 210-8921057
 Ηλεκτρ. Διεύθυνση / e-mail : waterlab@eody.gov.gr
 Αρ. Κ.Π. εισ. εγγράφου :
 Α/Α δείγματος εργαστηρίου :

ΔΕΛΤΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΝΕΡΟΥ ΑΚΤΗΣ ΚΟΛΥΜΒΗΣΗΣ
ΓΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
[Σύμφωνα με την ΚΥΑ 8600/416/Ε103/2009 (ΦΕΚ 356/Β/2009)]

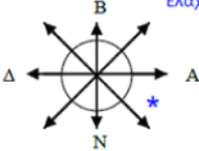
Υπηρεσία Δειγματοληψίας:
Διεύθυνση:
Αρ. πρωτ. / Ημερ.:

Όνομασία Αντικειμένου Υγειονομικού Ενδιαφέροντος:
Κωδικός δειγματοληψίας: **Κωδικός Αντικειμένου:**
Όνομασία Αντικειμένου: **Διεύθυνση:** **Τηλ.:**
Δήμος/Δ.Δ./Κοινότητα:
Όνοματεπώνυμο υπεύθυνου ατόμου:

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ 1
 • **Ημερομηνία δειγματοληψίας:** 18/05/2023 **Ωρα:** 17:00
 • **Αριθμός λουόμενων τη στιγμή της δειγματοληψίας:** 1

• **Κατάσταση θάλασσας:** Ήρεμη Ελαφρά τρικυμιώδης Πολύ κυματώδης
 • **Βροχόπτωση ημέρα δειγματοληψίας:** Ναι Όχι **Βροχόπτωση προηγούμενη ημέρα:** Ναι Όχι
 • **Ελάχιστες σταγόνες**

Διεύθυνση ανέμου (2):



Η μεταφορά του δείγματος έγινε με: Ισόθερμο δοχείο υπό ψύξη Άλλο, προσδιορίστε:

ΟΔΗΓΙΕΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΛΤΙΟΥ

1. Να συμπληρωθεί ένα ξεχωριστό Δελτίο για κάθε Ακτή Κολύμβησης
2. Να σημειωθεί με βέλος στον κύκλο η διεύθυνση του ανέμου, π.χ. για ΝΔ σημειώστε
3. Η επιφάνεια της θάλασσας και η ακτή εξετάζονται μακροσκοπικά (οπτικά) για την ύπαρξη των παραμέτρων αυτών. Η ποσότητα κάθε παραμέτρου χαρακτηρίζεται με τα παρακάτω σύμβολα, που αναγράφονται στην ανάλογη θέση του πίνακα:
 0: Δεν παρατηρείται
 1: Παρατηρείται σε μικρή ποσότητα
 2: Παρατηρείται μέτρια ποσότητα
 3: Παρατηρείται μεγάλη ποσότητα
4. Να σημειωθεί (N) για κάθε φυσιολογικό χρώμα. Σε αντίθετη περίπτωση (O). Επίσης να αναφερθεί στις παρατηρήσεις η αιτία για κάθε ασυνήθιστη αλλαγή χρώματος, π.χ. καφέ-κίτρινο μετά από βροχόπτωση, κόκκινο κατά την ανάπτυξη «μυλουμι πλαγκτόν» και γενικότερα οποιοδήποτε άλλο χρώμα παρατηρείται σε περίπτωση εξαιρετικών γεωγραφικών, μετεωρολογικών ή άλλων συνθηκών.
5. Η παρουσία τους γίνεται αντιληπτή από την ύπαρξη χαρακτηριστικής οσμής.
6. Η παρουσία τους γίνεται αντιληπτή από την ύπαρξη (μόνημου) αφρισμού.
7. Να αναφερθεί επιπλέον στις παρατηρήσεις αναλυτικά η κατηγορία στην οποία ανήκουν: ξύλα, φιάλες γυάλινες ή πλαστικές, σκουπίδια, ναύαγια, δοχεία μεταλλικά ή πλαστικά, ελαστικά κ.τ.λ.



Εικόνα 2.1 Δελτίο Δειγματοληψίας Νερού Ακτής Κολύμβησης για Μικροβιολογική Ανάλυση» σύμφωνα με το πρότυπο του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας Ε.Ο.Δ.Υ. σύμφωνα με την ΚΥΑ 8600/416/Ε103/2009 (ΦΕΚ 356/Β/2009), Δειγματοληψία νο1 τον Μάιο 2023. Νοτιανατολικοί άνεμοι με ελαφρά τρικυμιώδη θάλασσα και ελαφρά βροχόπτωση την ίδια ημέρα.



ΕΘΝΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ
ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

Ταχ. Διεύθυνση : Αλεξάνδρου Φλέμιγκ 34
Ταχ. Κώδικας : 166-72
Τηλέφωνο : 210-8921056 210-8921009
Τηλεομοιοτυπία / fax : 210-8921057
Ηλεκτρ. Διεύθυνση / e-mail : waterlab@eody.gov.gr
Αρ. Κ.Π. εισ. εγγράφου :
Α/Α δείγματος εργαστηρίου :

**ΔΕΛΤΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΝΕΡΟΥ ΑΚΤΗΣ ΚΟΛΥΜΒΗΣΗΣ
ΓΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

[Σύμφωνα με την ΚΥΑ 8600/416/Ε103/2009 (ΦΕΚ 356/Β/2009)]

Υπηρεσία Δειγματοληψίας:

Διεύθυνση:

Αρ. πρωτ. / Ημερ.:

Όνομασία Αντικειμένου Υγειονομικού Ενδιαφέροντος:

Κωδικός δειγματοληψίας:

Κωδικός Αντικειμένου:

Όνομασία Αντικειμένου:

Διεύθυνση:

Τηλ.:

Δήμος/Δ.Δ./Κοινότητα:

Όνοματεπώνυμο υπεύθυνου ατόμου:

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ 2

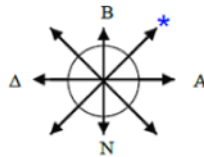
• Ημερομηνία δειγματοληψίας: 19/07/2023 Ωρα: 20:05

• Αριθμός λουόμενων τη στιγμή της δειγματοληψίας: 1

• Κατάσταση θάλασσας: Ήρεμη Ελαφρά τρικυμώδης Πολύ κυματώδης

• Βροχόπτωση ημέρα δειγματοληψίας: Ναι Όχι Βροχόπτωση προηγούμενη ημέρα: Ναι Όχι

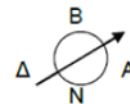
Διεύθυνση ανέμου (2):



Η μεταφορά του δείγματος έγινε με: Ισόθερμο δοχείο υπό ψύξη Άλλο, προσδιορίστε:

ΟΔΗΓΙΕΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΛΤΙΟΥ

1. Να συμπληρωθεί ένα ξεχωριστό Δελτίο για κάθε Ακτή Κολύμβησης
2. Να σημειωθεί με βέλος στον κύκλο η διεύθυνση του ανέμου, π.χ. για ΝΔ σημειώστε
3. Η επιφάνεια της θάλασσας και η ακτή εξετάζονται μακροσκοπικά (οπτικά) για την ύπαρξη των παραμέτρων αυτών. Η ποσότητα κάθε παραμέτρου χαρακτηρίζεται με τα παρακάτω σύμβολα, που αναγράφονται στην ανάλογη θέση του πίνακα:
0: Δεν παρατηρείται
1: Παρατηρείται σε μικρή ποσότητα
2: Παρατηρείται μέτρια ποσότητα
3: Παρατηρείται μεγάλη ποσότητα
4. Να σημειωθεί (N) για κάθε φυσιολογικό χρώμα. Σε αντίθετη περίπτωση (O). Επίσης να αναφερθεί στις παρατηρήσεις η αιτία για κάθε ασυνήθιστη αλλαγή χρώματος, π.χ. καφέ-κίτρινο μετά από βροχόπτωση, κόκκινο κατά την ανάπτυξη «μυλούμι πλαγκτόν» και γενικότερα οποιοδήποτε άλλο χρώμα παρατηρείται σε περίπτωση εξαιρετικών γεωγραφικών, μετεωρολογικών ή άλλων συνθηκών.
5. Η παρουσία τους γίνεται αντιληπτή από την ύπαρξη χαρακτηριστικής οσμής.
6. Η παρουσία τους γίνεται αντιληπτή από την ύπαρξη (μόνιμου) αφρισμού.
7. Να αναφερθεί επιπλέον στις παρατηρήσεις αναλυτικά η κατηγορία στην οποίαν ανήκουν: ξύλα, φιάλες γυάλινες ή πλαστικές, σκουπίδια, ναυάγια, δοχεία μεταλλικά ή πλαστικά, ελαστικά κ.τ.λ.



Εικόνα 2.2 Δελτίο Δειγματοληψίας Νερού Ακτής Κολύμβησης για Μικροβιολογική Ανάλυση» σύμφωνα με το πρότυπο του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας Ε.Ο.Δ.Υ. σύμφωνα με την ΚΥΑ 8600/416/Ε103/2009 (ΦΕΚ 356/Β/2009), Δειγματοληψία νο2 τον Ιούλιο 2023. Βορειανατολικοί άνεμοι με ήρεμη θάλασσα.

2.3 Επεξεργασία δειγμάτων

Τα δείγματα νερού επεξεργάστηκαν σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο διήθησης από μεμβράνες, για την ανίχνευση και καταμέτρηση αποικιών *E. coli* βάσει του **ISO 9308.01-1: 2017**. Η διήθηση γινόταν σε κατάλληλη διηθητική συσκευή μέσω μεμβράνης Whatman, Schleicher and Schuell διαμέτρου 47 mm και μεγέθους πόρου 0.45 μm. Η διαδικασία περιλάμβανε τη διήθηση πολλαπλών όγκων (1mL, 10mL, 150ml, 400ml) από κάθε δείγμα. Αμέσως μετά οι μεμβράνες τοποθετούνταν στο εκλεκτικό χρωμογόνο θρεπτικό υπόστρωμα chromogenic coliform agar-CCA. Έπειτα ακολουθούσε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες.

2.4 Απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών *E.coli*

Μετά την επώαση, οι αποικίες με θετική αντίδραση β-D-γαλακτοσιδάσης και β-D-γλυκουρονιδάσης, δηλαδή αυτές που στο CCA είχαν σκούρο μπλε έως βιολετί χρώμα (**ISO 9308.01-1:2017**), καταμετρήθηκαν ως ύποπτες αποικίες *E. coli*.

Στη συνέχεια, οι ύποπτες αυτές αποικίες απομονώθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό MacConkey agar No.3 που χρησιμοποιείται για την εκλεκτική απομόνωση των Gram- αρνητικών βακτηρίων. Στο MacConkey No3, επειδή περιέχει λακτόζη και το δείκτη pH ουδέτερο του ερυθρού, οι αποικίες των Gram- αρνητικών βακτηρίων που διασπούν τη λακτόζη, όπως το *E. coli*, αποκτούν κόκκινο- ροζ χρώμα (**Σκεπαστιανός & Καραμητρούσης, 2015**).

Μετά την αξιολόγηση των αποικιών στο MacConkey No3, οι αποικίες μεταφέρθηκαν στο γενικό θρεπτικό υλικό Nutrient agar ώστε να υποβληθούν σε περαιτέρω βιοχημικές δοκιμασίες (**Σκεπαστιανός & Καραμητρούσης 2015, Dioli et al. 2023**).

Για την βιοχημική ταυτοποίηση των ύποπτων αποικιών *E. coli* εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες παραγωγής ινδόλης και κιτρικών (**Odonkor & Ampofo, 2013**).

Η δοκιμασία ινδόλης βασίζεται στο ότι ορισμένα βακτήρια, όπως το *E. coli*, έχουν ικανότητα διάσπασης του αμινοξέος τρυπτοφάνη, από την οποία παράγεται ινδόλη. Σκοπός της δοκιμασίας είναι η διαφοροποίηση του *E. coli* από άλλα gram- αρνητικά βακτήρια, όπως *Klebsiella pneumoniae/ Enterobacter spp.* που δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, οι αποικίες ενοφθαλμίζονται σε υγρό θρεπτικό μέσο πλούσιο σε τρυπτοφάνη, Tryptophan broth ή Trypton water. Μετά από ολονύκτια επώαση στους 37°C προστίθεται το αντιδραστήριο Kovac's (περιέχει την χημική ένωση παρα-διμεθυλαμινο-βενζαλδεΐδη), μέσω του οποίου γίνεται η ανίχνευση της ινδόλης. Σε θετική

αντίδραση σχηματίζεται εντός 30" δακτύλιος κόκκινου-κερασί χρώματος στην επιφάνεια του μέσου.

Η δοκιμασία κιτρικών στηρίζεται στην ικανότητα των βακτηρίων να χρησιμοποιούν τα κιτρικά άλατα ως μοναδική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη τους, με αποτέλεσμα την αλκαλοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος. Σκοπός της δοκιμασίας είναι η διαφοροποίηση μεταξύ *E. coli* (δίνει αρνητικό αποτέλεσμα) και *Klebsiella spp./ Enterobacter spp./ Proteus spp.* (δίνουν θετικό αποτέλεσμα). Για την δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Simmon's. Σε θετικό αποτέλεσμα το υλικό από πράσινο γίνεται σκούρο μπλε, ενώ σε αρνητικό αποτέλεσμα το αρχικό πράσινο χρώμα του μέσου διατηρείται.

2.5 Μοριακή ταυτοποίηση

Η μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών *E. coli* βασίστηκε στην ανίχνευση του συντηρημένου (housekeeping) γονιδίου της β-γλυκουρονιδάσης, *uidA* με την μοριακή μέθοδο της PCR (Bej et al. 1991, Dioli et al. 2023).

2.6 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (μέθοδος Kirby Bauer). Τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 21 ευρέως χρησιμοποιούμενα στην κλινική πράξη αντιβιοτικά, 7 διαφορετικών τάξεων: πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονομπακτάμες, αμινογλυκοσίδες, κινολόνες-φθοριοκινολόνες και ο συνδυασμός τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (**Πίνακας 2.1**). Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και ο χαρακτηρισμός των στελεχών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες του EUCAST/ECOFFS (Dioli et al. 2023; EUCAST, 2024; Pappa et al., 2016).

Σύμφωνα με τις οδηγίες αυτές, χαρακτηρίστηκαν ως:

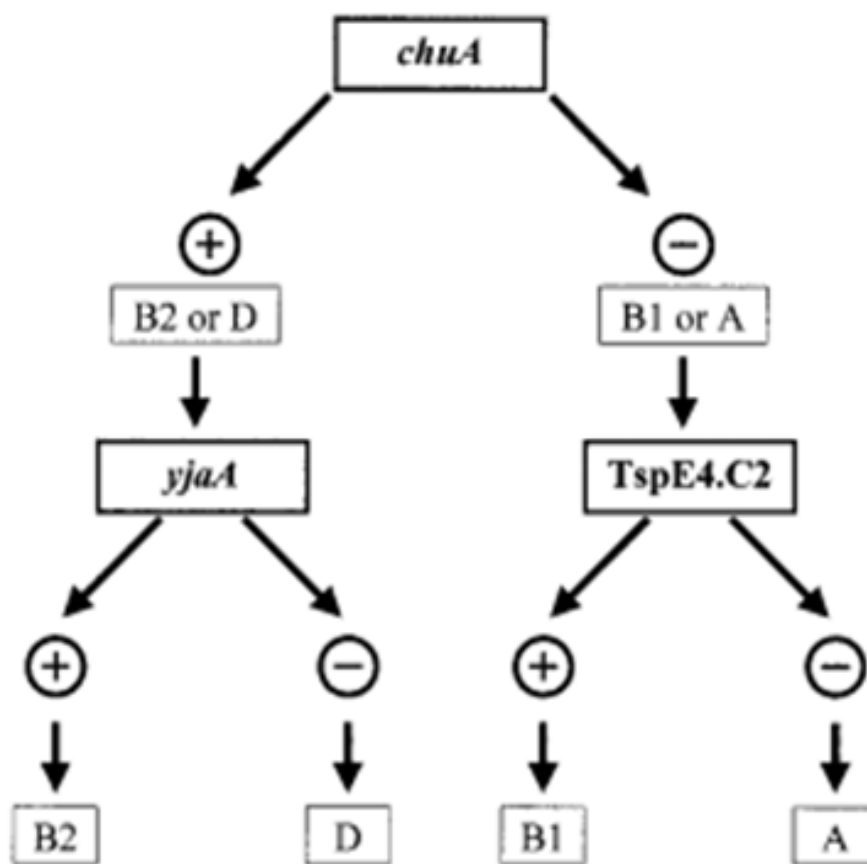
- Ευαίσθητα/ άγριου τύπου (wild type, WT): δεν παρουσιάζουν αντοχή σε καμία κατηγορία αντιβιοτικών,
- Ανθεκτικά (resistant, R): παρουσιάζουν αντοχή σε τουλάχιστον μια κατηγορία αντιβιοτικών,
- Πολυανθεκτικά (multi-drug resistant, MDR): παρουσιάζουν αντοχή σε τουλάχιστον τρεις κατηγορίες αντιβιοτικών.

Πίνακας 2.1 Δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ	ΔΙΣΚΟΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΑ ΔΙΣΚΙΟ	ΌΡΙΑ
Πενικιλίνες	Αμπικιλίνη (AMP)	10μg	WT: ≥ 13
	Αμοξικιλίνη+Κλαβουλανικό οξύ (AMC)	30μg	WT: ≥ 15
	Τικαρκιλίνη (TIC)	75μg	-
	Τικαρκιλίνη+Κλαβουλανικό οξύ (TCC)	85μg	S: ≥ 23, R: < 20
	Πιπερακιλλίνη (PIP)	30μg	S: ≥ 20
	Πιπερακιλλίνη+Ταζομπακτάμη (TZP)	36μg	WT: ≥ 18
Κεφαλοσπορίνες	Κεφουροξίμη (CXM)	30μg	WT: ≥ 16
	Κεφταζιδίμη (CAZ)	10μg	WT: ≥ 21
	Κεφοταξίμη (CTX)	5μg	WT: ≥ 22
	Κεφτριαξόνη (CRO)	30μg	S: ≥ 25, R: < 22
	Κεφεπίμη (FEP)	30μg	WT: ≥ 28
	Κεφοξιτίνη (FOX)	30μg	WT: ≥ 18
Μονοβακτάμες	Αζτρεονάμη (ATM)	30μg	WT: ≥ 25
Καρβαπενέμες	Μεροπενέμη (MEM)	10μg	WT: ≥ 26
	Ιμιπενέμη (IPM)	10μg	WT: ≥ 24
Αμινογλυκοσίδες	Αμικασίνη (AN)	30μg	WT: ≥ 16
	Γενταμικίνη (GN)	10μg	WT: ≥ 15
	Τομπραμυκίνη (TOB)	10μg	WT: ≥ 14
Κινολόνες	Ναλιδιξικό οξύ (NAL)	30μg	WT: ≥ 19
Φθοροκινολόνες	Σιπροφλοξασίνη (CIP)	5μg	WT: ≥ 25
Ανάμεικτος Παράγοντας	Σουλφαμεθαξάζολη+Τριμεθοπρίμη (STX)	25μg	WT: ≥ 21

2.7 Φυλογενετική τυποποίηση (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli*

Η κατάταξη των στελεχών σε φυλογενετικές ομάδες βασίστηκε στη μέθοδο triplex PCR-phylogrouping βάσει δημοσιευμένου πρωτοκόλλου (Clermont, Bonacorsi & Bingen, 2000). Με την μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η παρουσία ή απουσία δύο γονιδίων των *chuA*, *yjaA* και ενός γενετικού τόπου άγνωστης λειτουργίας του TSPE4.C2. Η τεχνική αυτή βοηθά στην ταξινόμηση των στελεχών στις τέσσερις κύριες φυλογενετικές ομάδες (A, B1, B2 και D) σύμφωνα με το διάγραμμα της **Εικόνας 2.3**.



Εικόνα 2.3 Καθορισμός φυλογενετικής ομάδας (Clermont, Bonacorsi & Bingen, 2000)

Κεφάλαιο 3
Πειραματικό Μέρος
Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα Διήθησης

Στους παρακάτω πίνακες (**Πίνακας 3.1** και **Πίνακας 3.2**) παρουσιάζεται ο αριθμός των ύποπτων αποικιών *E.coli*, που καταμετρήθηκαν σε διαφορετικούς όγκους, με και χωρίς προσθήκη του αντιβιοτικού αμπικιλίνη (AMP), στις διαφορετικές χρονικές στιγμές.

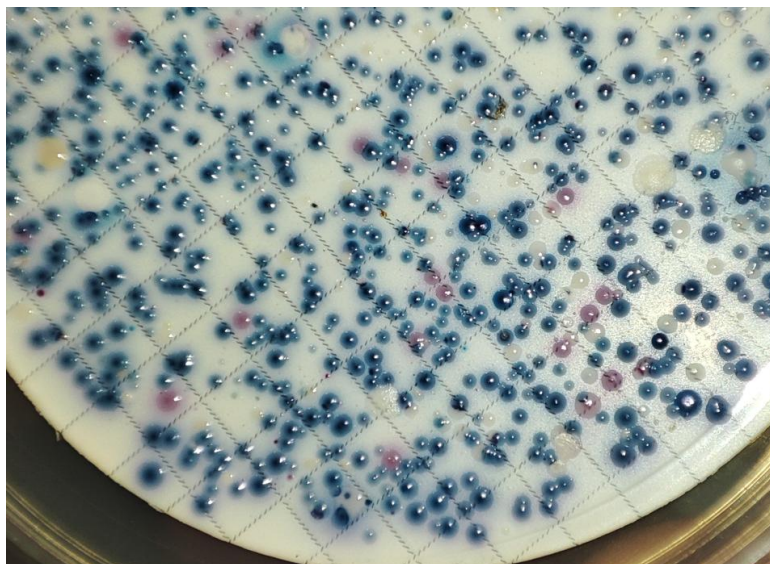
Πίνακας 3.1 Αποικίες που καταμετρήθηκαν στην 1^η δειγματοληψία

Θρεπτικό υλικό	Διηθούμενος όγκος νερού (ml)	Αριθμός αποικιών (cfu)
CCA	400	Συρροή
	150	Συρροή
	10	96
	1	30
CCA-AMP	500	0

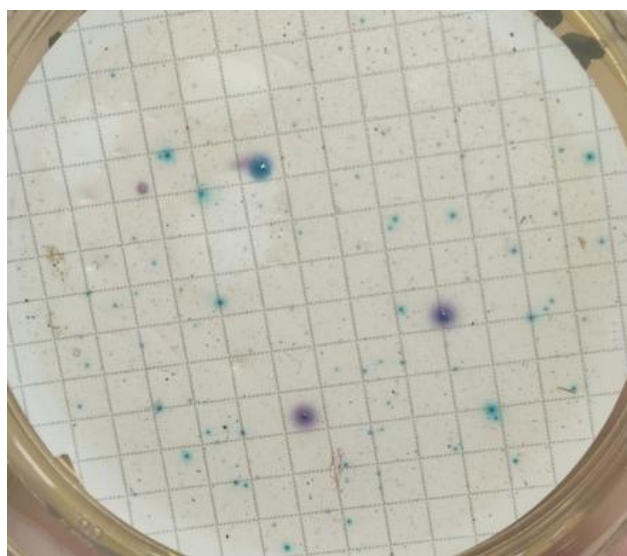
Πίνακας 3.2 Αποικίες που καταμετρήθηκαν στη 2^η δειγματοληψία

Θρεπτικό υλικό	Διηθούμενος όγκος νερού (ml)	Αριθμός αποικιών (cfu)
CCA	400	Συρροή
	150	Συρροή
	10	87
	1	19
CCA-AMP	500	3

Στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 3.1** και **Εικόνα 3.2**) απεικονίζονται οι αποικίες που αναπτύχθηκαν σε CCA και σε CCA-AMP από το δείγμα νερού που συλλέχθηκε. Σε υψηλούς όγκους διήθησης στο CCA παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός ύποπτων αποικιών *E. coli* (μπλε/ βιολετί αποικίες), ενώ στο CCA-AMP οι αποικίες ήταν πολύ λιγότερες και ευδιάκριτες, δίνοντας μία αρχική εντύπωση ότι τα περισσότερα στελέχη του δείγματος δεν παρουσιάζουν αντοχή στην αμπικιλίνη, και συνεπώς στις β-λακτάμες (**Dioli et al., 2023**). Επίσης, με βάση την νομοθεσία που έχει παρατεθεί παραπάνω (Παράρτημα I της Οδηγίας 2006/7/EK) και τον αριθμό των αποικιών που καταμετρήθηκαν από τα δείγματα των δύο δειγματοληψιών προέκυψαν τα εξής: α) στην πρώτη, το θαλασσίνο νερό χαρακτηρίστηκε ως ανεπαρκούς ποιότητας, καθώς στα 100ml ανευρέθηκαν 960 cfu, δηλαδή >500 cfu/100ml, β) στη δεύτερη, η ποιότητα χαρακτηρίστηκε ξανά ως ανεπαρκής, καθώς στα 100ml ανευρέθηκαν 870 cfu, δηλαδή >500 cfu/100 ml.



Εικόνα 3.1 Ανάπτυξη αποικιών σε CCA.



Εικόνα 3.2 Ανάπτυξη αποικιών σε CCA-AMP.

3.2 Αποτελέσματα απομόνωσης και ταυτοποίησης

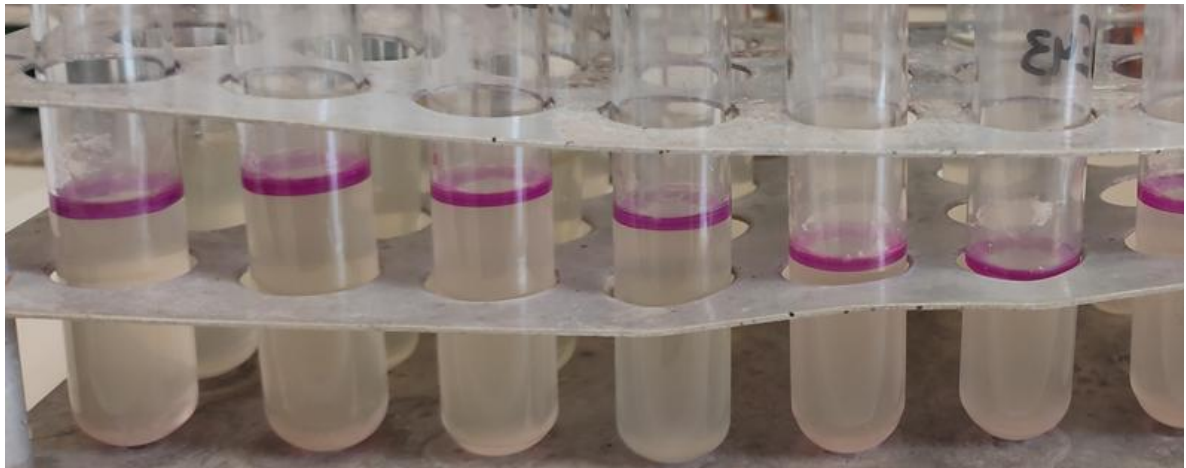
Από τις αποικίες που καταμετρήθηκαν, απομονώθηκαν συνολικά 107 στελέχη, εκ των οποίων 66 στελέχη συλλέχθηκαν από την πρώτη δειγματοληψία και 41 στελέχη από τη δεύτερη.

Βάσει των αποτελεσμάτων των ταυτοποιητικών μεθόδων, ως *E.coli* ταυτοποιήθηκαν τα 87 στελέχη, εκ των οποίων τα 65 προήλθαν από την πρώτη δειγματοληψία και τα 22 από τη δεύτερη.

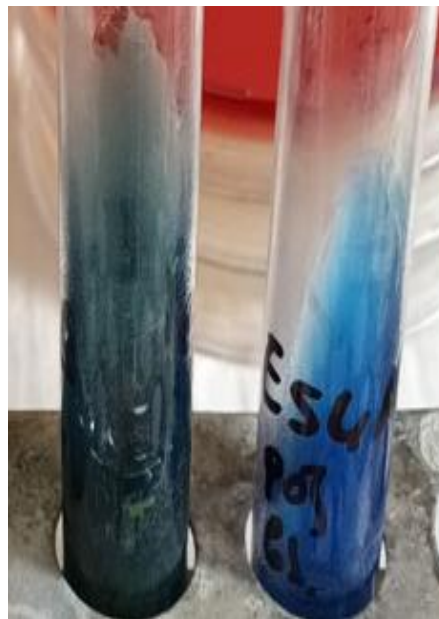
Τα υπόλοιπα απορρίφθηκαν λόγω άχρωμων αποικιών στο υλικό MacConkey (**Εικόνα 3.3**), αρνητικού τεστ ινδόλης (**Εικόνα 3.4**) ή θετικού Simmon's (**Εικόνα 3.5**) ή, απουσίας γονιδίου uidA, στο τελικό επιβεβαιωτικό στάδιο.



Εικόνα 3.3 Διάσπαση λακτόζης και χαρακτηριστικές ροζ-κόκκινες αποικίες Gram(-) αριστερά, και άχρωμες αποικίες δεξιά, σε MacConkey Νο3.



Εικόνα 3.4 Θετική δοκιμασία ινδόλης. Σχηματισμός δακτυλίου στην επιφάνεια της υγρής καλλιέργειας.



Εικόνα 3.5 Θετική (δεξιά) και αρνητική (αριστερά) δοκιμασία κιτρικών.

3.3 Αποτελέσματα του ελέγχου των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Βάσει των αποτελεσμάτων από τα αντιβιογράμματα και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του EUCAST/ECOFFS προέκυψαν τα εξής:

Στην πρώτη δειγματοληψία από τα 65 επιβεβαιωμένα στελέχη *E. coli* τα 27 (41.5%, 27/65) χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά (resistant, R), ενώ τα 38 (58.5%, 38/65) ως άγριου τύπου/ευαίσθητα (wild type, WT) (**Εικόνα 3.6**).

Στη δεύτερη δειγματοληψία από τα 22 επιβεβαιωμένα στελέχη *E. coli* τα 14 (63.6%, 14/22) χαρακτηρίστηκαν ως R, ενώ τα υπόλοιπα 8 (36.4%, 8/22) ως WT (**Εικόνα 3.7**).

Σε καμία από τις δύο δειγματοληψίες δεν εντοπίστηκε πολυανθεκτικό (multidrug resistant, MDR) στέλεχος.

Από το πλήθος όλων των στελεχών που απομονώθηκαν από τις δυο δειγματοληψίες (n=87), η πλειοψηφία χαρακτηρίστηκε ως WT (52.9%, 46/87) ενώ το 47.1% (41/87) ως R (**Εικόνα 3.8**). Στην **Εικόνα 3.9** παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης του κάθε προφίλ αντοχής μεταξύ των στελεχών της 1^{ης} και 2^{ης} δειγματοληψίας ξεχωριστά αλλά και στο σύνολο τους.

Μεταξύ των R στελεχών τόσο της 1^{ης} (n=27) όσο και της 2^{ης} (n=14), η αντοχή στην αμπικιλίνη (AMP) ήταν η πιο συχνά εμφανιζόμενη με ποσοστό 96.3% (26/27) (**Εικόνα 3.10**) και 100% (14/14) (**Εικόνα 3.11**), αντίστοιχα. Επίσης μεταξύ των R στελεχών της 1^{ης} δειγματοληψίας αρκετά συχνή ήταν και η αντοχή σε άλλες πενικιλίνες, όπως σε πιπερακιλλίνη (PIP) και σε τικαρκιλλίνη (TIC) με ποσοστά 93% (25/27) και 81% (22/27), αντίστοιχα.

Στην **Εικόνα 3.12** παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης αντοχής ανά αντιβιοτικό παράγοντα μεταξύ των συνολικών R (n=41) στελεχών που απομονώθηκαν από τις δυο δειγματοληψίες. Γενικά, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.12** μεταξύ των R στελεχών που απομονώθηκαν συνολικά, η συχνότητα εμφάνισης αντοχής στην AMP ήταν η πιο συχνή με ποσοστό 98% (40/41). Άλλες συχνά παρατηρούμενες αντοχές ήταν στα αντιβιοτικά PIP με συχνότητα εμφάνισης 66% (27/41), στο TIC με 59% (24/41), στο συνδυασμό τικαρκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ (TCC) με 27% (11/41) και τέλος στον συνδυασμό σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη (SXT) με 12% (5/41).

Στον **Πίνακα 3.3** παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στελεχών από τα δείγματα νερού θάλασσας.

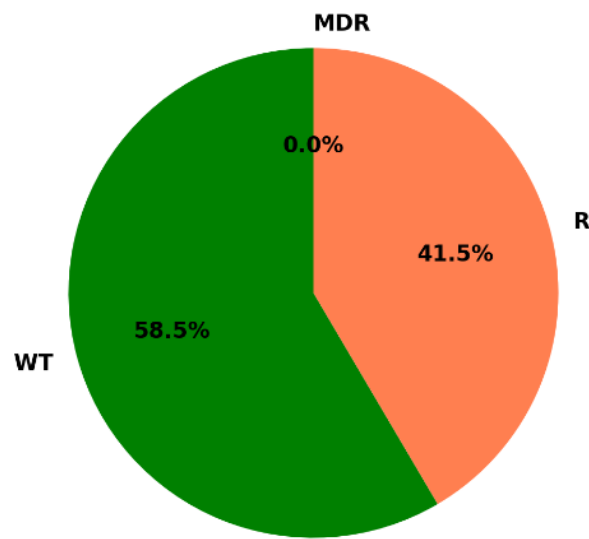
Πίνακας 3.3 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα θαλασσινού νερού.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ	ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΤΟΧΗΣ
E1	18/05/2023		WT
E2	18/05/2023		WT
E3	18/05/2023		WT
E4	18/05/2023		WT
E5	18/05/2023		WT
E6	18/05/2023		WT
E7	18/05/2023		WT
E8	18/05/2023		WT
E9	18/05/2023		WT
E10	18/05/2023	AMP, TIC, PIP, SXT	R
E11	18/05/2023		WT
E12	18/05/2023		WT
E14	18/05/2023		WT
E15	18/05/2023		WT
E16	18/05/2023		WT
E17	18/05/2023		WT
E18	18/05/2023		WT
E19	18/05/2023		WT
E20	18/05/2023		WT
E21	18/05/2023		WT
E22	18/05/2023	AMP, TIC, SXT, CIP, NAL	R
E23	18/05/2023		WT
E24	18/05/2023		WT
E25	18/05/2023		WT
E26	18/05/2023		WT

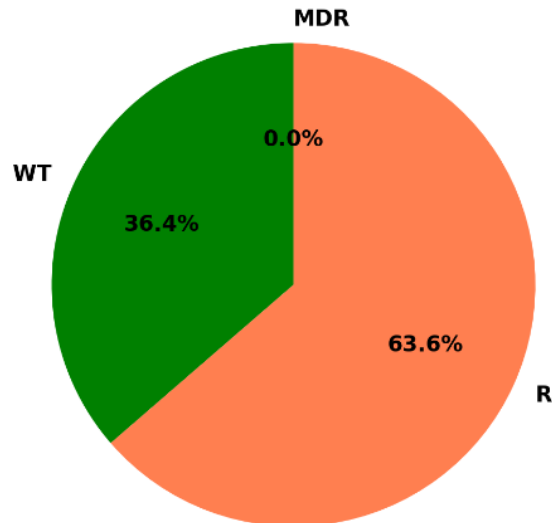
E27	18/05/2023		WT
E28	18/05/2023		WT
E29	18/05/2023		WT
E30	18/05/2023		WT
E31	18/05/2023		WT
E32	18/05/2023		WT
E33	18/05/2023		WT
E34	18/05/2023		WT
E35	18/05/2023		WT
E36	18/05/2023		WT
E37	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E38	18/05/2023		WT
E39	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E40	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E41	18/05/2023		WT
E42	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E43	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E44	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E45	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E46	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E47	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E48	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E49	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E50	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E51	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E52	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E53	18/05/2023		R
E54	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E55	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R

E56	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E57	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E58	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E59	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E60	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E61	18/05/2023		WT
E62	18/05/2023	AMP, TIC, PIP	R
E63	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E64	18/05/2023		WT
E65	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E66	18/05/2023	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E68	19/07/2023	AMP, TIC, TCC, PIP, SXT, CIP, NAL	R
E69	19/07/2023	AMP, TIC, TCC, PIP, SXT	R
E70	19/07/2023		WT
E71	19/07/2023		WT
E72	19/07/2023		WT
E73	19/07/2023		WT
E74	19/07/2023		WT
E75	19/07/2023		WT
E76	19/07/2023		WT
E77	19/07/2023		WT
E78	19/07/2023	AMP	R
E79	19/07/2023	AMP	R
E80	19/07/2023	AMP	R
E81	19/07/2023	AMP	R
E82	19/07/2023	AMP	R
E83	19/07/2023	AMP	R
E84	19/07/2023	AMP	R

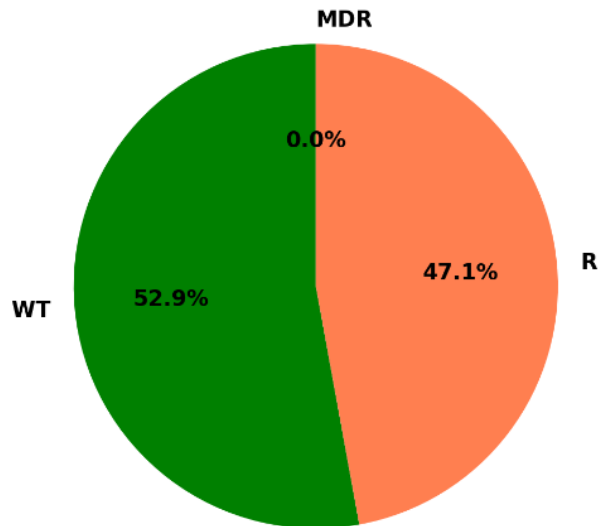
E85	19/07/2023	AMP	R
E87	19/07/2023	AMP	R
E89	19/07/2023	AMP, SXT	R
E90	19/07/2023	AMP	R
E91	19/07/2023	AMP	R



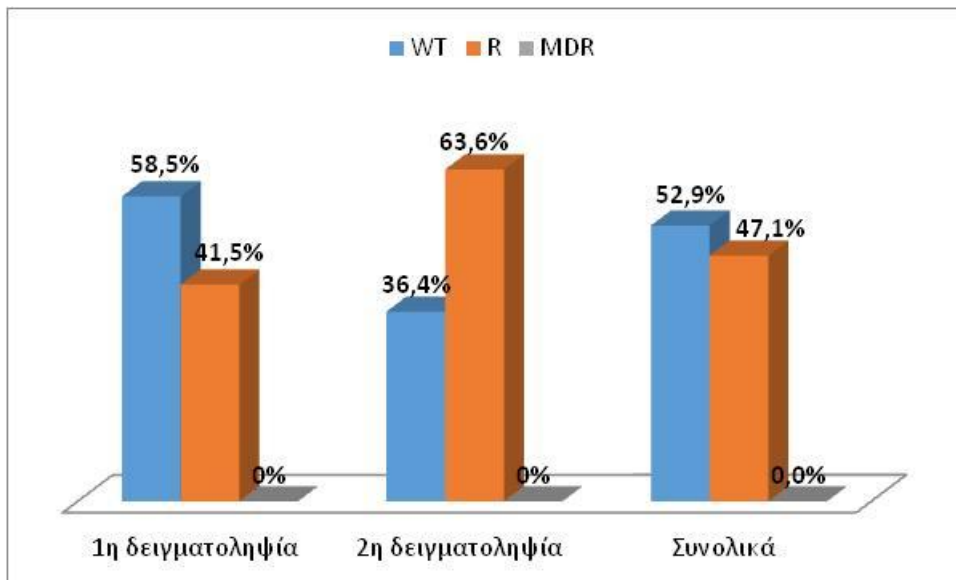
Εικόνα 3.6 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν στην 1^η δειγματοληψία.



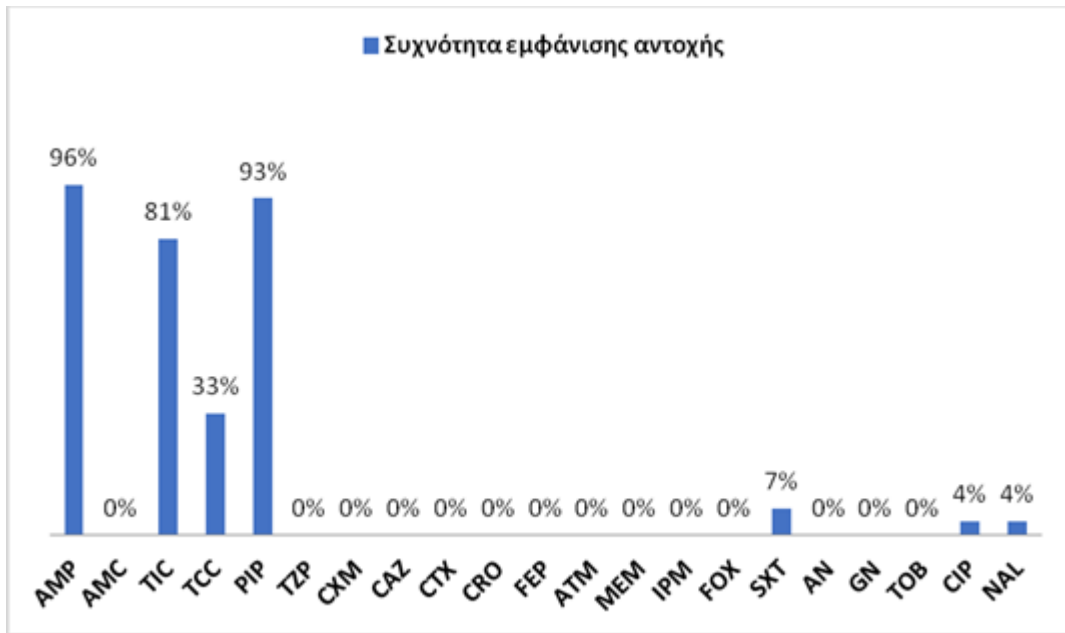
Εικόνα 3.7 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν στην 2^η δειγματοληψία.



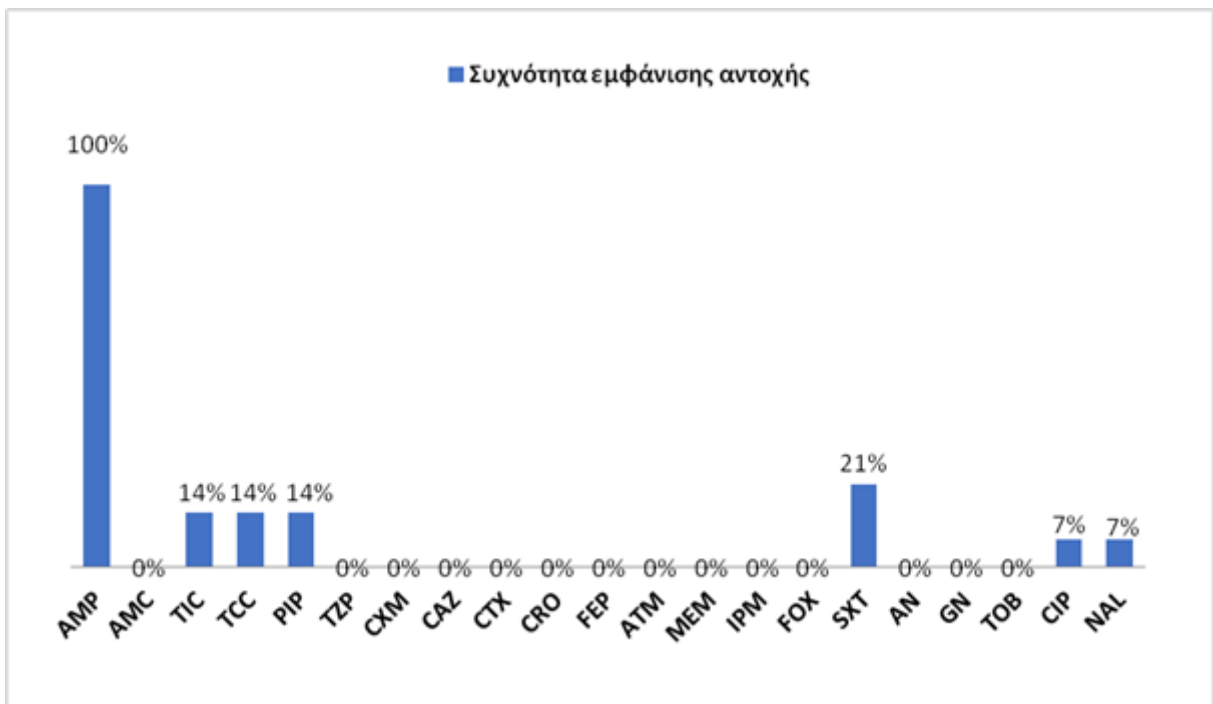
Εικόνα 3.8 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν συνολικά.



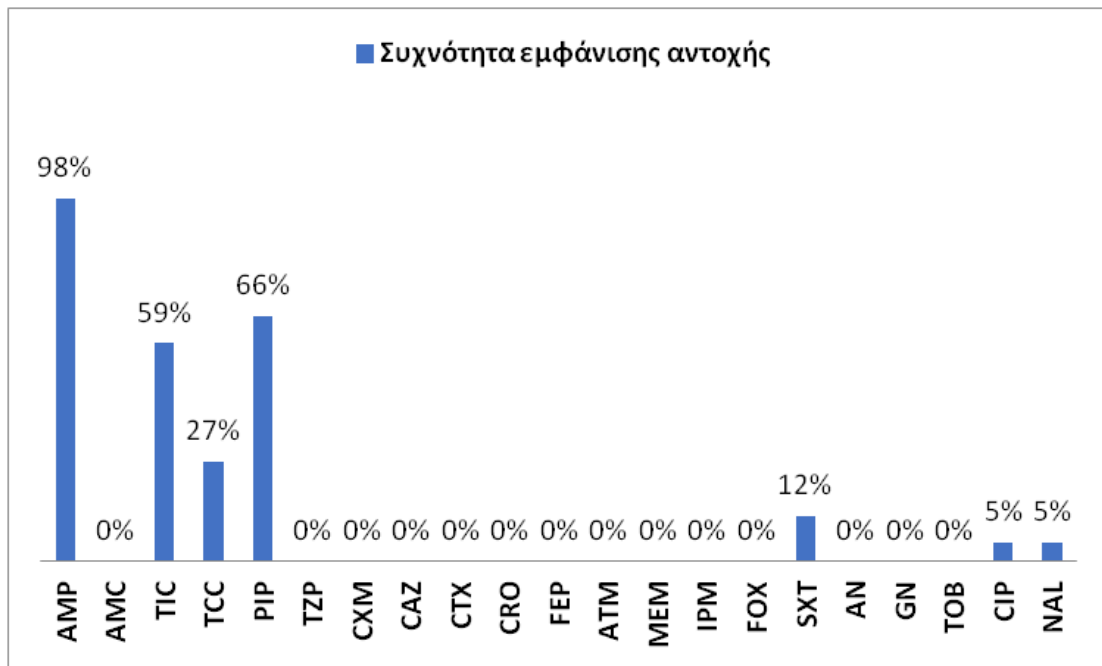
Εικόνα 3.9 Συγκεντρωτικό διάγραμμα: παρουσίαση της συχνότητας εμφάνισης των προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) των στελεχών E. coli της 1^{ης} δειγματοληψίας, της 2^{ης} δειγματοληψίας και συνολικά



Εικόνα 3.10 Συχνότητα εμφάνισης αντοχής (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό μεταξύ των ανθεκτικών(R) στελεχών της 1^{ης} δειγματοληψίας



Εικόνα 3.11 Συχνότητα εμφάνισης αντοχής (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό μεταξύ των ανθεκτικών(R) στελεχών της 2^{ης} δειγματοληψίας



Εικόνα 3.12 Συχνότητα εμφάνισης αντοχής (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό μεταξύ των ολικών ανθεκτικών(R) στελεχών, 1^{ης} και 2^{ης} δειγματοληψίας

3.4 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping)

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου triplex PCR-phylogrouping, με την οποία τα στελέχη κατατάχθηκαν στις ομάδες A, B1, B2, D. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε βάσει της δημοσιευμένης μελέτης (**Clermont, Bonacorsi & Bingen, 2000**). Ενδεικτικά στην **Εικόνα 3.13** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης της triplex PCR.

Παρατηρήθηκε ότι η επικρατέστερη φυλογενετική ομάδα μεταξύ των στελεχών της πρώτης δειγματοληψίας ήταν η B2 (43%, 28/65) ενώ ακολούθησαν οι ομάδες B1 (42%, 27/65), η A (12%, 8/65) και η D (3%, 2/65) (**Εικόνα 3.14**). Μεταξύ των στελεχών της δεύτερης δειγματοληψίας η επικρατέστερη ομάδα ήταν η A (77%, 17/22) ενώ ακολούθησαν οι ομάδες D (14%, 3/22) και η B2 (9%, 2/22) (**Εικόνα 3.15**).

Μεταξύ των συνολικών στελεχών *E. coli* (n=87) που απομονώθηκαν από δείγματα θαλασσινού νερού, η πλειοψηφία κατατάχθηκε στην ομάδα B2 (34%, 30/87) και ακολούθησαν οι ομάδες B1 (31%, 27/87), A (29%, 25/87) και D (6%, 5/87) (**Εικόνα 3.16**).

Στην **Εικόνα 3.17** παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης των φυλογενετικών ομάδων μεταξύ των στελεχών της 1ης και 2ης δειγματοληψίας ξεχωριστά αλλά και στο σύνολο τους.

Κατά την σύγκριση φυλογενετικών ομάδων και προφίλ αντοχής μεταξύ των ολικών στελεχών που απομονώθηκαν, διαπιστώθηκε ότι μεταξύ των στελεχών που εντάχθηκαν στην φυλογενετική ομάδα B2 (n=30) η πλειοψηφία αφορούσε R στελέχη (90%, 27/30) (**Εικόνα 3.18**). Αντιθέτως, στην ομάδα B1 (n=27) κατατάχθηκαν περισσότερα WT στελέχη (96%, 26/27), ενώ η ομάδα A ήταν εξίσου συχνή και στους δυο πληθυσμούς (**Εικόνα 3.18**).

Στον **Πίνακα 3.4** παρουσιάζονται οι φυλογενετικές ομάδες και τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά των στελεχών.

Πίνακας 3.4 Χαρακτηριστικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα θαλασσινού νερού (Ημερομηνία δειγματοληψίας, Φυλογενετική Ομάδα βάσει της δημοσιευμένης μελέτης *Clermont et al. 2000*, Πρότυπο Αντοχής και Προφίλ Αντοχής).

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ	ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΝΤΟΧΗΣ	ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΤΟΧΗΣ
E1	18/05/2023	B1		WT
E2	18/05/2023	B1		WT
E3	18/05/2023	B1		WT
E4	18/05/2023	A		WT
E5	18/05/2023	A		WT
E6	18/05/2023	A		WT
E7	18/05/2023	B1		WT
E8	18/05/2023	B1		WT
E9	18/05/2023	B1		WT
E10	18/05/2023	B1	AMP, TIC, PIP, SXT	R
E11	18/05/2023	B1		WT
E12	18/05/2023	B1		WT
E14	18/05/2023	B1		WT
E15	18/05/2023	B1		WT
E16	18/05/2023	B1		WT
E17	18/05/2023	B1		WT
E18	18/05/2023	B1		WT
E19	18/05/2023	A		WT
E20	18/05/2023	B1		WT
E21	18/05/2023	B1		WT
E22	18/05/2023	A	AMP, TIC, SXT, CIP, NAL	R
E23	18/05/2023	B1		WT
E24	18/05/2023	D		WT

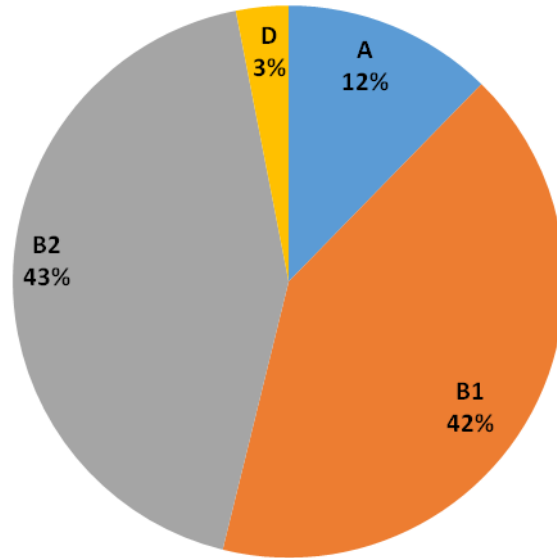
E25	18/05/2023	B1		WT
E26	18/05/2023	A		WT
E27	18/05/2023	B1		WT
E28	18/05/2023	B1		WT
E29	18/05/2023	D		WT
E30	18/05/2023	B1		WT
E31	18/05/2023	B1		WT
E32	18/05/2023	B1		WT
E33	18/05/2023	B1		WT
E34	18/05/2023	B2		WT
E35	18/05/2023	B1		WT
E36	18/05/2023	B1		WT
E37	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E38	18/05/2023	B1		WT
E39	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E40	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E41	18/05/2023	B2		WT
E42	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E43	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E44	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E45	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E46	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E47	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E48	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E49	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E50	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E51	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E52	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R

E53	18/05/2023	A		WT
E54	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E55	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E56	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E57	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E58	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E59	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E60	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E61	18/05/2023	B2		WT
E62	18/05/2023	B2	AMP, TIC, PIP	R
E63	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E64	18/05/2023	A		WT
E65	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E66	18/05/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP	R
E68	19/07/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP, SXT, CIP, NAL	R
E69	19/07/2023	B2	AMP, TIC, TCC, PIP, SXT	R
E70	19/07/2023	A		WT
E71	19/07/2023	A		WT
E72	19/07/2023	D		WT
E73	19/07/2023	D		WT
E74	19/07/2023	A		WT
E75	19/07/2023	A		WT
E76	19/07/2023	A		WT
E77	19/07/2023	A		WT

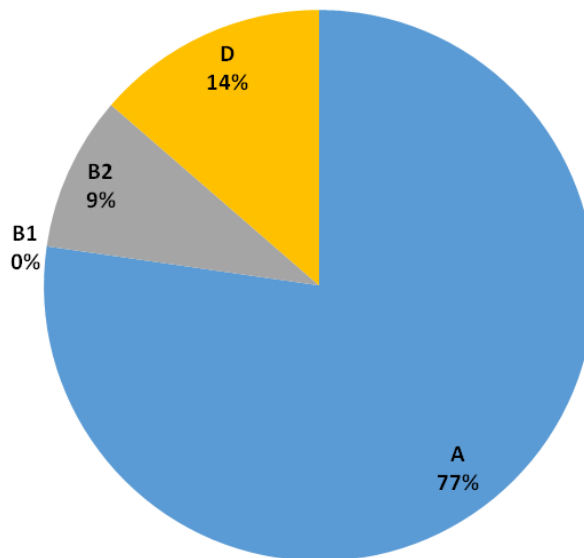
E78	19/07/2023	A	AMP	R
E79	19/07/2023	A	AMP	R
E80	19/07/2023	A	AMP	R
E81	19/07/2023	A	AMP	R
E82	19/07/2023	A	AMP	R
E83	19/07/2023	A	AMP	R
E84	19/07/2023	A	AMP	R
E85	19/07/2023	D	AMP	R
E87	19/07/2023	A	AMP	R
E89	19/07/2023	A	AMP, SXT	R
E90	19/07/2023	A	AMP	R
E91	19/07/2023	A	AMP	R



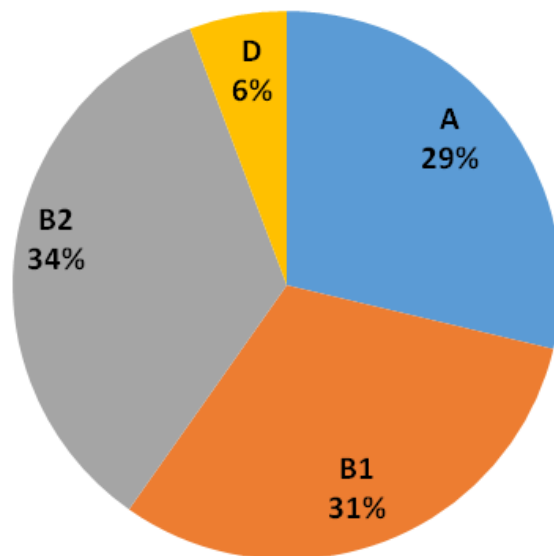
Εικόνα 3.13 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης triplex-PCR - Phylogrouping



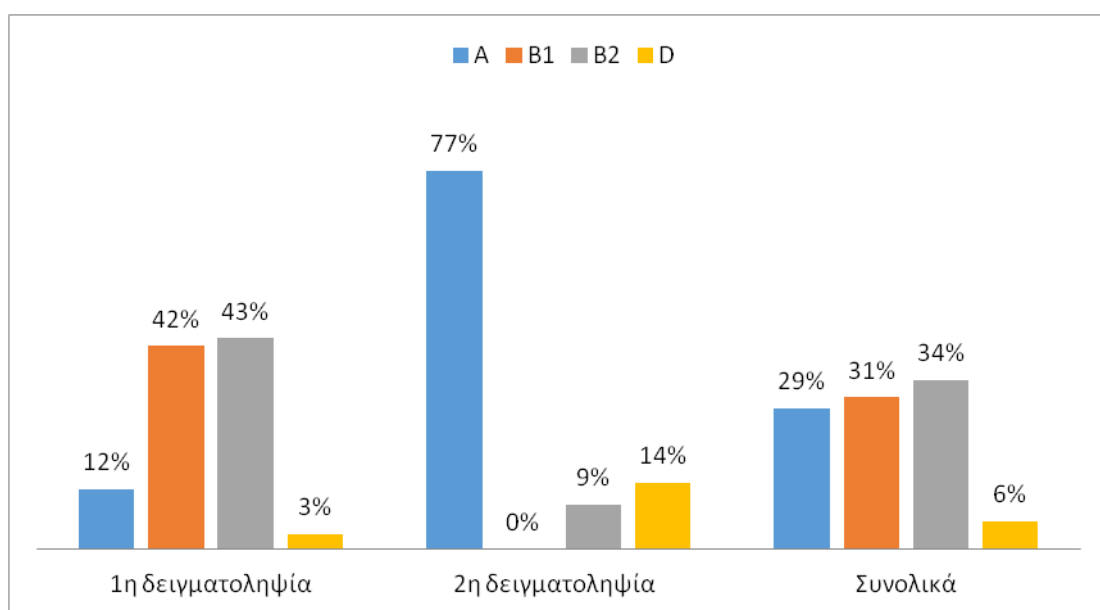
Εικόνα 3.14 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης βάσει της δημοσιευμένης μελέτης Clermont *et al.* 2000 των στελεχών *E. coli* της 1^{ης} δειγματοληψίας.



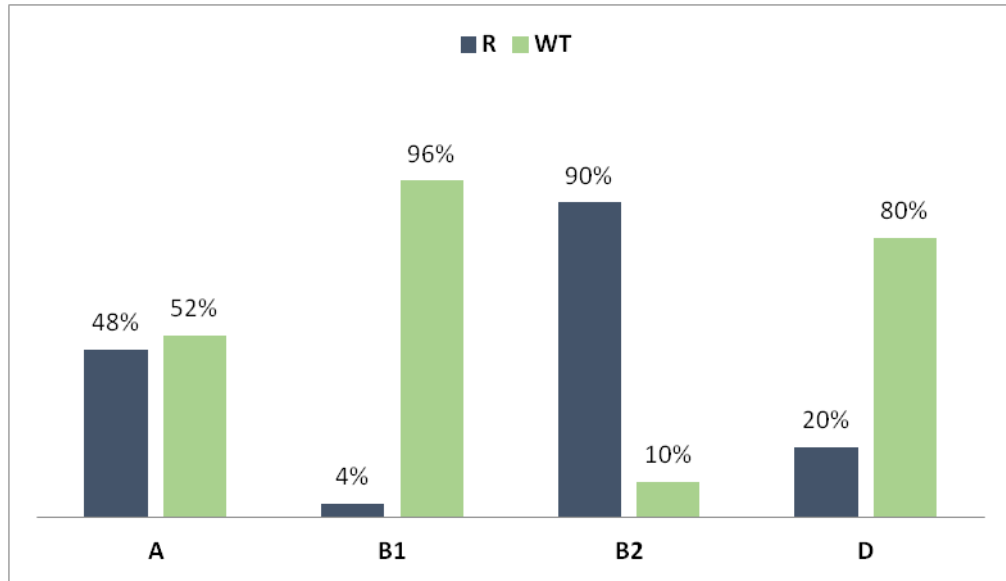
Εικόνα 3.15 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης βάσει της δημοσιευμένης μελέτης Clermont *et al.* 2000 των στελεχών *E. coli* της 2^{ης} δειγματοληψίας.



Εικόνα 3.16 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης βάσει της δημοσιευμένης μελέτης Clermont et al. 2000 των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν συνολικά από τα δείγματα θαλασσινού νερού.



Εικόνα 3.17 Συγκεντρωτικό διάγραμμα των συχνοτήτων εμφάνισης των φυλογενετικών ομάδων βάσει της δημοσιευμένης μελέτης Clermont et al. 2000, μεταξύ των στελεχών της 1ης και 2ης δειγματοληψίας ξεχωριστά αλλά και στο σύνολο τους



Εικόνα 3.18 Συσχέτιση φυλογενετικών ομάδων βάσει της δημοσιευμένης μελέτης *Clermont et al.* (2000) και προφίλ αντοχής των στελεχών *E. coli*.

Συζήτηση

Τα νερά αναψυχής συμπεριλαμβανομένης της θάλασσας προσφέρουν τεράστια οφέλη στη σωματική και στην ψυχική υγεία των ανθρώπων. Επιπρόσθετα, η θάλασσα αποτελεί σπίτι ποικίλων οργανισμών και οστρακοειδών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και μέρος αναψυχής του (**World Health Organization, 2017**). Παρά τα οφέλη του, το θαλασσινό νερό μπορεί να εκθέσει τον άνθρωπο σε μία πληθώρα κινδύνων υγείας, όπως αυτών που οφείλονται σε ευκαιριακά παθογόνους ή/και παθογόνους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται στο νερό. Η έκθεση μπορεί να γίνει άμεσα, μέσω της επαφής με το νερό, ή έμμεσα, μέσω κατανάλωσης θαλασσινών (**Cabral, 2010**). Έτσι, η ασφάλεια του θαλασσινού νερού κρίνεται απαραίτητη για την προστασία της δημόσιας υγείας και για αυτό το λόγο η ποιότητά του υπόκειται σε αυστηρό μικροβιακό έλεγχο (**World Health Organization, 2017**).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα νερά της συγκεκριμένης κολυμβητικής ακτής κρίθηκαν ακατάλληλα για κολύμβηση, γεγονός που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων του Πανελληνίου Κέντρου Οικολογικών Ερευνών (ΠΑΚΟΕ), που είχαν πραγματοποιηθεί τον Ιούνιο 2023 (δηλαδή σε χρονική στιγμή ανάμεσα στις δύο δειγματοληψίες που αναφέρθηκαν στην παρούσα εργασία) (**ΠΑΚΟΕ, 2023**). Παρά ταύτα, η συγκεκριμένη κολυμβητική ακτή φιλοξενεί, καθ' όλη τη διάρκεια της κολυμβητικής περιόδου, αυξημένο αριθμό λουόμενων, μεταξύ των οποίων ηλικιωμένους και μικρά παιδιά. Επομένως, τα παραπάνω ευρήματα κρίνονται σημαντικά για την κοινωνία, τονίζοντας την επικινδυνότητα της έκθεσης σε μικροβιακά επιβαρυμένα ύδατα, και την ανάγκη για επαρκή, έγκαιρη και εύκολα προσβάσιμη πληροφόρηση.

Παρά το γεγονός ότι η συγκεκριμένη κολυμβητική ακτή χαρακτηρίστηκε ακατάλληλη, μεταξύ των δειγματοληψιών της διπλωματικής αυτής εργασίας, παρατηρήθηκαν ορισμένες αποκλίσεις. Το παράδοξο είναι ότι η θάλασσα βρέθηκε περισσότερο επιβαρυμένη κατά την πρώτη δειγματοληψία η οποία πραγματοποιήθηκε στις αρχές της κολυμβητικής περιόδου (Μάιος 2023). Αυτό πιθανά να οφείλεται στο ότι κατά την διάρκεια της άνοιξης του 2023 σημειώθηκαν αρκετές βροχοπτώσεις, οι οποίες παρασύρουν φερτά υλικά και λάσπη, επηρεάζοντας την ποιότητα του νερού. Ακόμη, το ποσοστό των ανθεκτικών R στελεχών ήταν μεγαλύτερο στη δεύτερη δειγματοληψία, γεγονός που συνάδει με την πρόοδο της κολυμβητικής περιόδου και την αυξημένη κίνηση λόγω τουρισμού. Επιπρόσθετα, η μελέτη αυτή φέρει μεθοδολογικές αδυναμίες. Συγκεκριμένα, το αυστηρό

χρονικό πλαίσιο, η έλλειψη ανθρώπινου δυναμικού και κατάλληλων μέσων δεν επέτρεψαν την πραγματοποίηση περισσότερων δειγματοληψιών, την λήψη περισσότερων δειγμάτων από διαφορετικά σημεία και από διαφορετικά βάθη της επιλεγμένης κολυμβητικής ακτής και τον έλεγχο επιπλέον μικροβιολογικών δεικτών.

Ομοίως με προηγούμενες δημοσιεύσεις, διαπιστώθηκε πως ορισμένα στελέχη *E. coli* της παρούσας μελέτης, που απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό, ήταν ανθεκτικά σε ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (Wang et al., 2023; Dasí et al., 2024; Drali et al., 2018; Alves et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.12** τα ποσοστά αντοχής στα αντιβιοτικά AMP, PIP, TIC, TCC, SXT ήταν 98%, 66%, 59%, 27% και 12% αντίστοιχα. Η ανθεκτικότητα στους παραπάνω αντιβιοτικούς παράγοντες οφείλεται σε επίκτητους μηχανισμούς αντοχής, που πιθανά να εδράζονται σε κάποιο μεταθετό γενετικό στοιχείο (όπως πλασμίδια). Ακόμη μία αδυναμία της συγκεκριμένης μελέτης είναι ότι δεν μελετήθηκαν διεξοδικά οι μηχανισμοί αντοχής.

Το γεγονός ότι ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό ανθεκτικών στελεχών κατατάχθηκε στη φυλογενετική ομάδα B2 (**Εικόνα 3.18**) είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό, λόγω της ύπαρξης του γονιδίου *chuA*. Το γονίδιο αυτό έχει ταυτοποιηθεί σε πολλά εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* και σχετίζεται με παθογονικότητα, καθώς ευθύνεται για την απόσπαση και την αξιοποίηση της ομάδας αίμης των ερυθρών (Chakraborty et al., 2015; Clermont et al., 2000; Dioli et al., 2023). Συνεπώς, οι λουόμενοι μπορεί να εκτεθούν σε παθογόνα και ταυτόχρονα ανθεκτικά βακτήρια *E. coli*, οδηγώντας στην ανάπτυξη δύσκολα διαχειρίσιμων λοιμώξεων. Επίσης η παρατήρηση αυξημένου αριθμού στελεχών της φυλογενετικής ομάδας B2 σημειώθηκε στην πρώτη δειγματοληψία, γεγονός που μπορεί να οφείλεται όπως αναφέρεται και παραπάνω στις συχνές βροχοπτώσεις της άνοιξης 2023. Ακόμη, η πλειοψηφία των στελεχών που κατατάχθηκε στη φυλογενετική ομάδα B1, η οποία αφορά κυρίως περιβαλλοντικά στελέχη *E. coli*, χαρακτηρίστηκε ως άγριου τύπου. Ωστόσο, σχεδόν τα μισά στελέχη που εντάχθηκαν στη φυλογενετική ομάδα A, η οποία σχετίζεται κυρίως με στελέχη *E. coli* της συμβιωτικής χλωρίδας, παρουσίασαν αντοχή (Bhowmik et al., 2023). Η παρατήρηση αυτή αναδεικνύει πως άνθρωποι και άλλα ζώα μπορεί να αποικίζονται από ανθεκτικά βακτήρια. Τα συμβιωτικά ανθεκτικά βακτήρια μπορούν με τη σειρά τους να μεταδώσουν οριζοντίως τους παράγοντες αντοχής και σε άλλα βακτήρια, είτε της συμβιωτικής χλωρίδας είτε σε παθογόνα.

Συμπερασματικά, τα υδάτινα περιβάλλοντα μπορούν να λειτουργήσουν ως δεξαμενές για τη μετάδοση ανθεκτικών βακτηρίων, επηρεάζοντας την υγεία του ανθρώπου όσο και ολόκληρο το οικοσύστημα (Clermont et al., 2000; Dioli et al., 2023). Η πολυδιάστατη

φύση του φαινομένου της αντιμικροβιακής αντοχής απαιτεί μία ολιστική προσέγγιση, αυτή της Ενιαίας Υγείας (One Health). Η Ενιαία Υγεία προσβέυει πως η υγεία του ανθρώπου εξαρτάται από την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος, και προωθεί τη διεπιστημονική συνεργασία (Arbab et al., 2022; Davis et al., 2017; Joddha et al., 2023; Kotsiri et al., 2019; Landrigan et al., 2020; Pandiscia et al., 2024; Toubiana et al., 2021; Zgouridou et al., 2021).

Η εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στα θαλάσσια οικοσυστήματα μέσω λυμάτων και βιομηχανικών εκροών αποτελεί μία από τις κύριες προκλήσεις. Η αντιμετώπιση της αντιμικροβιακής αντοχής απαιτεί την ενίσχυση των διαδικασιών επεξεργασίας λυμάτων, την προώθηση βέλτιστων πρακτικών στη γεωργία και την εκπαίδευση των κοινοτήτων για τους κινδύνους που σχετίζονται με αυτή.

Επιπλέον, γίνονται προσπάθειες παγκοσμίως για τη μείωση της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και την αλιεία, σε συνδυασμό με μέτρα για την υγεία των θαλάσσιων οικοσυστημάτων (Peng et al., 2022). Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη περιπτώσεις που δυσκολεύουν τον περιορισμό της χρήσης αντιβιοτικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αύξηση της παγκόσμιας κατανάλωσης αντιβιοτικών λόγω εκτεταμένης χρήσης τους στην υποσαχάρια Αφρική, με σκοπό τη μείωση της παιδικής θνησιμότητας (Keenan et al., 2018).

Οι συνέπειες της αντιμικροβιακής αντοχής φαίνεται να είναι πολυδιάστατες. Οι οικονομικές επιπτώσεις στην αλιεία και τις υδατοκαλλιέργειες είναι σημαντικές λόγω της πρόκλησης ασθενειών και της μείωσης της παραγωγής. Ωστόσο πλήττονται και άλλοι τομείς, με τεράστια κόστη νοσηλείας/ περίθαλψης, καθώς επίσης με μεγάλες ζημιές στον ελληνικό τουρισμό. (Alexopoulos et al., 2011; Economides & Arvanitides, 1989; Kotsiri et al., 2019; Nikolakopoulou et al., 2008; Papastergiou et al., 2009; Vantarakis et al., 2005; Zgouridou et al., 2021).

Οι διεθνείς συνεργασίες και η ανάπτυξη τυποποιημένων μεθόδων για την ανίχνευση και παρακολούθηση της αντιμικροβιακής αντοχής είναι κρίσιμες για την αποτελεσματική διαχείριση του προβλήματος (Daly et al., 2023; Landrigan et al., 2020; Mavroidi et al., 2024). Η επένδυση σε έρευνα και ανάπτυξη νέων μεθόδων παρακολούθησης και ελέγχου της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι επίσης σημαντική. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ενίσχυση της υγιεινής στις εγκαταστάσεις αλιείας και υδατοκαλλιέργειας και στην ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών που μπορούν να βοηθήσουν στη μείωση της διασποράς ανθεκτικών βακτηρίων. Νέες τεχνολογίες για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, όπως μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι, μπορούν να ενισχύσουν τις

προσπάθειες αυτές ελέγχου και πρόληψης (Vaou et al., 2021). Η βέλτιστη εκμετάλλευση και χρήση των νέων τεχνολογιών μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσα από την εκπαίδευση και ευαισθητοποίηση των άμεσα εμπλεκόμενων εργαζόμενων αλλά και του συνόλου της κοινότητας. Η συνεργασία μεταξύ επιστημονικών κοινοτήτων, κυβερνητικών φορέων, βιομηχανικών επιχειρήσεων και της κοινωνίας αποτελεί θεμελιώδη λίθο στη συνολική αυτή προσπάθεια (Landrigan et al., 2020).

Για τη συνεχιζόμενη παρακολούθηση της εξέλιξης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στα θαλάσσια οικοσυστήματα, είναι απαραίτητη η συλλογή μεγάλου όγκου δεδομένων. Οι οποιεσδήποτε ενέργειες για παρακολούθηση και έλεγχο μπορούν να πραγματοποιηθούν μόνο στην έκταση της υφαλοκρηπίδας (Toubiana et al., 2021), ενώ για τα βαθύτερα θαλάσσια οικοσυστήματα οι πληροφορίες είναι ελάχιστες. Ήδη, μια μελέτη θαλάσσιων θηλαστικών υπογράμμισε την ύπαρξη πολύ-ανθεκτικών βακτηρίων, επιστώντας την προσοχή στην ύπαρξη στελεχών που κατατάσσονται στα επικίνδυνα για μελλοντική έξαρση λοιμώξεων επιπέδου πανδημίας (Grünzweil et al., 2021).

Με έναυσμα την αναφορά στις πανδημίες, η πανδημία COVID-19 επηρέασε τη διαχείριση της αντιμικροβιακής αντοχής, με αποτέλεσμα την αυξημένη χρήση αντιβιοτικών για δευτερογενείς λοιμώξεις, επιδεινώνοντας ενδεχομένως το πρόβλημα, του οποίου η έκταση θα γίνει εμφανής μόνο σε μετα-αναλύσεις και συστηματικές ανασκοπήσεις. Η διαταραχή των συνήθων υπηρεσιών υγειονομικής περίθαλψης λόγω της πανδημίας υπογραμμίζει την ανάγκη για ολοκληρωμένα συστήματα υγείας που μπορούν να αντιμετωπίζουν κρίσεις όπως η πανδημία COVID-19, ενώ παράλληλα διατηρούν τη λειτουργία επιτήρησης της αντιμικροβιακής αντοχής (Kariyawasam et al., 2022).

Στο πλαίσιο αυτό, η μηχανική μάθηση (machine learning-ML) και η τεχνητή νοημοσύνη (artificial intelligence-AI) προσφέρουν καινοτόμες λύσεις για την επιτήρηση και διαχείριση της αντιμικροβιακής αντοχής. Η ανάλυση μεγάλων δεδομένων μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη της ανθεκτικότητας και την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών, με τις πλατφόρμες AI να υποστηρίζουν προγράμματα διαχείρισης αντιβιοτικών, βελτιστοποιώντας τη χρήση τους και μειώνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Stoesser et al., 2016; Ali, Ahmed & Aslam, 2023).

Ένα άλλο ζήτημα που ίσως χρειάζεται την προσοχή όλων, είναι η κλιματική αλλαγή, η οποία μπορεί να επιδεινώσει τη διάδοση της ανθεκτικότητας, καθώς οι αυξανόμενες θερμοκρασίες της θάλασσας και οι μεταβαλλόμενες καιρικές συνθήκες επηρεάζουν την ανάπτυξη βακτηρίων και τη διασπορά ρυπαντών (Landrigan et al., 2020; Sunde et al., 2021; Zgouridou et al., 2021).

Οι προαναφερθείσες συνεργασίες και οι πολιτικές δημόσιας υγείας είναι απαραίτητες, αλλά έχουν μικρή ισχύ εάν εμείς οι ίδιοι, ο καθένας σαν μονάδα αλλά και μέρος του συνόλου δεν φροντίσουμε για την προάσπιση της δημόσιας υγείας, όπου αυτό είναι εφικτό.

Βιβλιογραφία

Ελληνική Δημοκρατία. (2017). ΚΥΑ 8600/416. Υγειονομικές διατάξεις για την προστασία της δημόσιας υγείας από τη μόλυνση του θαλασσινού νερού.

ΠΑΚΟΕ. (2023). Καταλληλότητα ακτών κολύμβησης από το ΠΑΚΟΕ. ΠΑΚΟΕ. Διαθέσιμο στο: <https://www.pakoe.gr/2023/06/26/καταλληλότητα-ακτων-κολυμβησης-απο-τ-4/> [Πρόσβαση 18 Ιουλ. 2024].

Προφίλ Υδάτων Κολύμβησης Ελλάδας. (2024). Πρόγραμμα. Προφίλ Υδάτων Κολύμβησης Ελλάδας. Διαθέσιμο στο: <https://bathingwaterprofiles.gr/program> [Πρόσβαση 18 Ιουλ. 2024].

Σκεπαστιανός, Π. & Καραμητρούσης, Ε. (2015). Θεραπευτικά υποστρώματα και μεταβολισμός. Εκδόσεις University Studio Press.

Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας. (2024). Ακτές Κολύμβησης. Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας. Διαθέσιμο στο: <https://ypen.gov.gr/perivallon/ydatikoi-poroi/aktes-kolymvisis/> [Πρόσβαση 18 Ιουλ. 2024].

Alexopoulos, A., Plessas, S., Voidarou, C., Noussias, H., Stavropoulou, E., Mantzourani, I., Tzora, A., Skoufos, I., & Bezirtzoglou, E. (2011). Microbial ecology of fish species on-growing in Greek sea farms and their watery environment. *Anaerobe*, 17(6), 264-266.

Ali, T., Ahmed, S., & Aslam, M. (2023). Artificial Intelligence for Antimicrobial Resistance Prediction: Challenges and Opportunities towards Practical Implementation. *Antibiotics (Basel)*, 12(3), 523.

Alves, M.S., Pereira, A., Araújo, S.M., Castro, B.B., Correia, A.C.M., & Henriques, I. (2014). Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Frontiers in Microbiology*, 5, 426.

Anyanwu, M.U., Jaja, I.F., & Nwobi, O.C. (2020). Occurrence and Characteristics of Mobile Colistin Resistance (*mcr*) Gene-Containing Isolates from the Environment: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1028.

Arbab, S., Ullah, H., Wang, W., & Zhang, J. (2022). Antimicrobial drug resistance against *Escherichia coli* and its harmful effect on animal health. *Veterinary Medicine and Science*, 8, 1780-1786.

Ashbolt, N. J., & Bruno, J. (2003). Application and characterisation of surfactant-degrading bacteria for effective greywater treatment. *Water Science and Technology*, 46(6-7), 203-210.

Basavaraju, M. & Gunashree, B.S. (2023). *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. In: *Escherichia coli - Old and New Insights*. IntechOpen. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.105508> [Accessed 18 Jul. 2024].

Baquero, F., & Coque, T.M. (2014). Multilevel population genetics in antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 837-858.

Bazzoni, A.M., Mudadu, A.G., Esposito, G., Urru, R., Ortu, S., Mara, L., Uda, M.T., Arras, I., Lorenzoni, G., Sanna, G., Bazzardi, R., Marongiu, E., Virgilio, S., & Meloni, D. (2022). Bacterial and Viral Investigations Combined with Determination of Phytoplankton and Algal Biotoxins in Mussels and Water from a Mediterranean Coastal Lagoon (Sardinia, Italy). *Journal of Food Protection*, 85(9), 1501-1511.

Bej, A.K., DiCesare, J.L., Haff, L. & Atlas, R.M. (1991). Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), pp.1013-1017.

Berrazeg, M., Deriet, A., De Keersmaecker, S.C.J., Verhaegen, B., Vanneste, K., Botteldoorn, N., Roosens, N.H.C., Mouffok, F., & Drali, R. (2019). Whole-genome sequencing of multidrug-resistant *Escherichia coli* strains harboring the *mcr-1* gene, isolated from seawater of the Algiers coast in Algeria. *Microbiol Resour Announc*, 8, e00638-19.

Bhowmik, A., Shah, S.M.T., Goswami, S., Sirajee, A.S., & Ahsan, S. (2023). Predominance of Multidrug Resistant *Escherichia coli* of Environmental Phylotype in Different Environments of Dhaka, Bangladesh. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(4), 226

Cabral, J. P. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657-3703.

Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 298-304.

Chakraborty, A., Saralaya, V., Adhikari, P., Shenoy, S., Baliga, S., & Hegde, A. (2015). Characterization of *Escherichia coli* Phylogenetic Groups Associated with Extraintestinal Infections in South Indian Population. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 5(4), pp.241-246.

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.

Cordeiro-Moura, J.R., Kraychete, G.B., de Araújo Longo, L.G., Corrêa, L.L., da Silva, N.M.V., Campana, E.H., Oliveira, C.J.B., & Picão, R.C. (2022). Description and comparative genomic analysis of a *mcr-1*-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 97, 105196.

Daly M, Powell J, O'Connell NH, Murphy L, Dunne CP. (2023). Antimicrobial Resistance Is Prevalent in *E. coli* and Other Enterobacterales Isolated from Public and Private Drinking Water Supplies in the Republic of Ireland. *Microorganisms*, 11(5):1224.

Dasí, D., Camaró-Sala, M.L., González, A., García-Ferrús, M., Jiménez-Belenguer, A.I., & Castillo, M.Á. (2024). Antibiotic Resistance in Seawater Samples from East Coast of Spain. *Applied Sciences*, 14(5), 1965.

Davis, M.F., Rankin, S.C., Schurer, J.M., Cole, S., Conti, L., Rabinowitz, P., & COHERE Expert Review Group. (2017). Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence (COHERE). *One Health*, 4, 14-21.

de Kraker, M.E., Stewardson, A.J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Medicine*, 13(11), e1002184.

Dioli, C., Pappa, O., Siatravani, E., Bratakou, S., Tatsiopoulos, A., Giakkoupi, P., Miriagou, V., & Beloukas, A. (2023). Molecular Characterization and Prevalence of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates Derived from Clinical Specimens and Environmental Habitats. *Microorganisms*, 11, 1399.

Drali, R., Berrazeg, M., Zidouni, L.L., Hamitouche, F., Abbas, A.A., Deriet, A., & Mouffok, F. (2018). Emergence of *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. *Science of The Total Environment*, 642, pp.90-94.

Economides, D.J., & Arvanitides, G. (1989). Sea water quality monitoring in Rhodes and Cos (Greece). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 20-21(1), 383-386.

EUCAST. (2024). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Available at: <https://www.eucast.org/> [Accessed 18 Jul. 2024].

Grünzweil, O.M., Palmer, L., Cabal, A., Szostak, M.P., Ruppitsch, W., Kornschöber, C., Korus, M., Misić, D., Bernreiter-Hofer, T., Korath, A.D.J., Feßler, A.T., Allerberger, F., Schwarz, S., Spargser, J., Müller, E., Braun, S.D., Monecke, S., Ehrlich, R., Walzer, C., & Lončarić, I. (2021). Presence of β -Lactamase-producing Enterobacterales and *Salmonella* Isolates in Marine Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5905), 1-24.

Horakova, K., Mlejnkova, H., & Mlejnek, P. (2008). Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, β -d-glucuronidase, and β -d-galactosidase. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 970-976. MOLECULAR AND OTHER TECHNIQUES.

Jeamsripong, S., Thaotumpitak, V., Anuntawirun, S., Roongrojmongkhon, N., Atwill, E.R., & Hinthong, W. (2022). Molecular Epidemiology of Antimicrobial Resistance and Virulence Profiles of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Vibrio* spp. Isolated from Coastal Seawater for Aquaculture. *Antibiotics*, 11(1688), 1-17.

Joddha, H.B., Mathakiya, R.A., Joshi, K.V., Khant, R.B., Golaviya, A.V., Hinsu, A.T., Desai, M.R., Jakhesara, S.J., & Koringa, P.G. (2023). Profiling of Antimicrobial Resistance Genes and Integron from *Escherichia coli* Isolates Using Whole Genome Sequencing. *Genes*, 14, 1212.

Kariyawasam, R.M., Julien, D.A., Jelinski, D.C., Larose, S.L., Rennert-May, E., Conly, J.M., Dingle, T.C., Chen, J.Z., Tyrrell, G.J., Ronksley, P.E., & Barkema, H.W. (2022). Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019-June 2021). *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 11(1), 45.

Keenan, J.D., Bailey, R.L., West, S.K., et al. (2018). Azithromycin to Reduce Childhood Mortality in Sub-Saharan Africa. *New England Journal of Medicine*, 378(17), pp.1583-1592.

Kim, S., Woo, J.H., Kim, N., Kim, M.H., Kim, S.Y., Son, J.H., ... & Lee, J.C. (2019). Characterization of Chromosome-Mediated Colistin Resistance in *Escherichia coli* Isolates From Livestock in Korea. *Infection and Drug Resistance*, 12, pp.3291–3299.

Kotsiri, Z., Vantarakis, A., Rizzotto, F., Kavanaugh, D., Ramarao, N., & Vidic, J. (2019). Sensitive Detection of *E. coli* in Artificial Seawater by Aptamer-Coated Magnetic Beads and Direct PCR. *Applied Sciences*, 9(24), 5392.

Kumar, M., & Brahma, A. (2023). Identification and characterization of colistin-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from Lower Himalayan Region of India. *Discover Applied Sciences*.

Landrigan, P.J., Stegeman, J.J., Fleming, L.E., Allemand, D., Anderson, D.M., Backer, L.C., & Rampal, P. (2020). Human Health and Ocean Pollution. *Annals of Global Health*, 86(1), 151, 1-64.

Le, T.H., Truong, T., Tran, L.-T., Nguyen, D.-H., Pham, T.P.T., & Ng, C. (2023). Antibiotic resistance in the aquatic environments: the need for an interdisciplinary approach. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20, 3395–3408.

Martínez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893-2902.

Mavroidi, A., Froukala, E., & Tsakris, A. (2024). Comparative Genomics of an Emerging Multidrug-Resistant *bla*NDM-Carrying ST182 Lineage in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antibiotics*, 13(6), p.535.

Mellou, K., Katsioulis, A., Potamiti-Komi, M., Pournaras, S., Kyritsi, M., Ketsiaflaka, A., Kallimani, A., Kokkinos, P., Petinaki, E., Sideroglou, T., Georgakopoulou, T., Vantarakis, A., & Hadjichristodoulou, C. (2014). A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. *Epidemiology and Infection*, 142(1), 40-50.

Mehrotra, T., Konar, D., Pragasam, A.K., Kumar, S., Jana, P., Babele, P., Paul, D., Purohit, A., Tanwar, S., Bakshi, S., Das, S., Verma, J., Talukdar, D., Narendrakumar, L., Kothidar, A., Karmakar, S.P., Chaudhuri, S., Pal, S., Jain, K., Srikanthe, C.V., Sankar, M.J., Atmakuri, K., Agarwal, R., Gaind, R., Ballal, M., Kammili, N., Bhadra, R.K., Ramamurthy, T., Nair, G.B., & Das, B. (2023). Antimicrobial resistance heterogeneity among multidrug-resistant Gram-negative pathogens: Phenotypic, genotypic, and proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(33), e2305465120.

Moreira, S., Brown, A., Ha, R., Iserhoff, K., Yim, M., Yang, J., Liao, B., Pszczolko, E., Qin, W., & Leung, K.T. (2012). Persistence of *Escherichia coli* in freshwater periphyton: biofilm-forming capacity as a selective advantage. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), pp.608-618.

Morier, D. (2024). *Antibiotic resistance*. Encyclopedia Britannica. Available at: <https://www.britannica.com/science/antibiotic-resistance> [Accessed 20 Jul. 2024].

Mueller, M. & Tainter, C.R. (2023). *Escherichia coli* Infection. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>.

Nikolakopoulou, T.L., Smalla, K., Van Overbeek, L.S., Heuer, H., Karagouni, A.D., & Wellington, E.M.H. (2008). Tetracycline resistance genes in seawater bacteria: Diversity, prevalence, and mobility. *The Journal of Microbiology*, 46(6), 633-640.

Odonkor, S.T. & Ampofo, J.K. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*, 4, e2.

Pandiscia, A., Lorusso, P., Manfredi, A., Sánchez, G., Terio, V., & Randazzo, W. (2024). Leveraging Plasma-Activated Seawater for the Control of Human Norovirus and Bacterial Pathogens in Shellfish Depuration. *Foods*, 13(850), 1-16.

Pappa, O., Vantarakis, A., Galanis, A., Vantarakis, G., & Mavridou, A. (2016). Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various Greek aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(5), fiw042.

Papastergiou, P., Mouchtouri, V., Karanika, M., Kostara, E., Kolokythopoulou, F., Mpitsolas, N., Papaioannou, A., & Hadjichristodoulou, C. (2009). Analysis of seawater microbiological quality data in Greece from 1997 to 2006: Association of risk factors with bacterial indicators. *Journal of Water and Health*, 7(3), 514-522.

Pellicano, R., Brunetti, R., Toscano, T., Smeraldo, S., Baldi, L., Cavallo, S., Capone, S., & Colarusso, G. (2023). Risk evaluation for *E. coli* contamination in Campania region shellfish from 2016 to 2021. *Heliyon*, 9, e21716.

Peng, Z., Hu, Z., Li, Z., Zhang, X., Jia, C., Li, T., Dai, M., Tan, C., Xu, Z., Wu, B., Chen, H., & Wang, X. (2022). Antimicrobial resistance and population genomics of mul-

tidrug-resistant *Escherichia coli* in pig farms in mainland China. *Nature Communications*, 13, 1116.

Perestrello, S., Amaro, A., Brouwer, M.S.M., Clemente, L., Ribeiro Duarte, A.S., Kaesbohrer, A., Karpíšková, R., Lopez-Chavarrias, V., Morris, D., Prendergast, D., et al. (2023). Building an International One Health Strain Level Database to Characterise the Epidemiology of AMR Threats: ESBL—AmpC Producing *E. coli* as An Example—Challenges and Perspectives. *Antibiotics*, 12(3), 552.

Poey, M.E., de los Santos, E., Aznarez, D., García-Laviña, C.X., & Laviña, M. (2024). Genetics of resistance to trimethoprim in cotrimoxazole resistant uropathogenic *Escherichia coli*: integrons, transposons, and single gene cassettes. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1395953.

Şahin, S., Sivri, N., Akpınar, I., Çiçin, Z.B., & Sönmez, V.Z. (2021). A comprehensive bibliometric overview: antibiotic resistance and *Escherichia coli* in natural water. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 32256-32263.

Sharma, K.S.R., & Sumithra, T.G. (2023). Antimicrobial resistance in marine ecosystem: An emerging threat for public health. In: *Sharma, K.S.R., & Sumithra, T.G. (eds) Handbook on Antimicrobial Resistance*. Singapore: Springer.

Skippington E, Ragan MA. (2012). Phylogeny rather than ecology or lifestyle biases the construction of *Escherichia coli-Shigella* genetic exchange communities. *Open Biol.*, 2(9):120112. doi: 10.1098/rsob.120112. PMID: 23091700; PMCID: PMC3472396.

Stoesser, N., Sheppard, A.E., Pankhurst, L., De Maio, N., Moore, C.E., Sebra, R., Turner, P., Anson, L.W., Kasarskis, A., Batty, E.M., Kos, V., Wilson, D.J., Phetsouvanh, R., Wyllie, D., Sokurenko, E., Manges, A.R., Johnson, T.J., Price, L.B., Peto, T.E., Johnson, J.R., Didelot, X., Walker, A.S., Crook, D.W., & MMMIG (Modernizing Medical Microbiology Informatics Group). (2016). Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *mBio*, 7(2), e02162.

Sunde, M., Ramstad, S.N., Rudi, K., Porcellato, D., Ravi, A., Ludvigsen, J., das Neves, C.G., Tryland, M., Ropstad, E., Slette-meås, J.S., & Telke, A.A. (2021). Plasmid-

associated antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* in a high arctic reindeer subspecies. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 26, 317-322.

Toubiana, M., Salles, C., Tournoud, M.-G., Licznar-Fajardo, P., Zorgniotti, I., Trémélo, M.-L., Jumas-Bilak, E., Robert, S., & Monfort, P. (2021). Monitoring Urban Beach Quality on a Summer Day: Determination of the Origin of Fecal Indicator Bacteria and Antimicrobial Resistance at Prophète Beach, Marseille (France). *Frontiers in Microbiology*, 12, 710346.

Vantarakis, A.C., Tsibouxi, A., Venieri, D., Komninou, G., Athanassiadou, A., & Papapetropoulou, M. (2005). Evaluation of microbiological quality of coastal waters in Greece. *Journal of Water and Health*, 3(4), 371-380.

Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.

Walsh, T.R. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, S8-S14.

Wang, X., Tan, J., Ni, S., Zhou, D., Liu, B., & Fu, Q. (2023). Antimicrobial efficacy of composite irrigation solution against dominant pathogens in seawater immersion wound and in vivo wound healing assessment. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1188373.

Wolska, L., Kowalewski, M., Potrykus, M., Redko, V., & Rybak, B. (2022). Difficulties in the Modeling of *E. coli* Spreading from Various Sources in a Coastal Marine Area. *Molecules*, 27(14), 4353.

World Health Organization. (2017). Guidelines for safe recreational water environments: Coastal and fresh waters. Geneva: WHO.

Wongtawan T, Narinthorn R, Sontigun N, Sansamur C, Petcharat Y, Fungwithaya P, Saengsawang P, Blackall PJ, Thomrongsuwannakij T. (2022). Characterizing the antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* found in sport animals (fighting cocks,

fighting bulls, and sport horses) and soils from their environment. *Vet World*, 15(11):2673-2680.

Zgouridou, A., Tripidaki, E., Giantsis, I.A., Theodorou, J.A., Kalaitzidou, M., Raitzos, D.E., Lattos, A., Mavropoulou, A.M., Sofianos, S., Karagiannis, D., Chaligiannis, I., Anestis, A., Papadakis, N., Feidantsis, K., Mintza, D., Staikou, A., & Michaelidis, B. (2021). The current situation and potential effects of climate change on the microbial load of marine bivalves of the Greek coastlines: an integrative review. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1012-1034.