



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διερεύνηση στελέχους *Staphylococcus aureus* με
αντοχή στην λινκομυκίνη

ΣΟΥΛΤΣΙΩΤΗ ΜΑΡΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2014



STUDY OF A LINCOMYCIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* STRAIN

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014 υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Μικροβιολογίας κ. Ευθυμίας Πετεινάκη και του καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κωνσταντίνου Ματθιόπουλου.

Τριμελής επιτροπή

- **Ευθυμία Πετεινάκη (Επιβλέπουσα καθηγήτρια)**

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος (Συνεπιβλέπων καθηγητής)**

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Δημήτρης Καρούζας**

Αναπληρωτής καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πρώτα απο όλα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην καθηγήτρια κ. Ευθυμία Πετεινάκη για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας υπο την επίβλεψη της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διπλωματικής εργασίας, τις ουσιώδεις συμβουλές του και τις καθοδηγήσεις του κάθε φορά που τις χρειαζόμουν μέσα απο τις συζητήσεις μας, πάντα με χαμόγελο. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Καρπούζα που πολύ πρόθυμα αποτέλεσε το τρίτο μέλος της επιτροπής μου.

Φυσικά, θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Στέλα Σάρρου για την συνεργασία μας και που δουλέψαμε όλους αυτούς τους μήνες μαζί με πολύ υπομονή και ακόμη περισσότερη επιμονή. Μαζί της ουσιαστικά έκανα τα πρώτα μου βήματα ως επιστήμονας και μου έμαθε να δουλεύω συγκεντρωμένα, οργανωμένα, αποτελεσματικά...και κατα προτίμηση απο νωρίς το πρωί! Αυτούς τους μήνες απέκτησα χρήσιμες γνώσεις και πολλές εμπειρίες που αποτέλεσαν σημαντική βάση και θα με βοηθήσουν στην περαιτέρω επαγγελματική μου σταδιοδρομία.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Γιώτα Κοσκιγιώτη, για τις πολύωρες συζητήσεις μας (που πάντα συνοδεύοντουσαν απο καφέ), τις συμβουλές, την ταύτιση απόψεων και όλα τα πρωινά, μεσημέρια, απογεύματα και ενίοτε και βράδια που περάσαμε στο εργαστήριο μαζί με την Στέλα και μεγάλες ποσότητες καφέ!

Θέλω επίσης να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην διδάσκουσα κ. Κωνσταντίνα Τσουμάνη για την πολύτιμη βοήθεια που μας πρόσφερε και την άποψη συνεργασία μας, τις υποψήφιες διδάκτορες Έφη Σαγρή και Μαριλένα Γρηγορίου καθώς και τον προπτυχιακό φοιτητή Μενέλαο Βούλγαρη και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Σπύρο Τάσσογλου και Αλέξανδρο Μπελαβίλα για το τόσο ωραίο και παρεϊστικό κλίμα στο εργαστήριο, για τις θερινές προβολές ταινιών στην αυλή και γιατί χωρίς όλους αυτούς μάλλον δεν θα πέρναγε έτσι ευχάριστα ένα τέτοιο καυτό καλοκαίρι και κάτω απο ορισμένες «αντίξοες συνθήκες».

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την αμέριστη ηθική και ψυχολογική υποστήριξη τους ακόμα και αν τους ακουγόταν τρελό να δουλεύω με έναν “επικίνδυνο” σταφυλόκοκκο...με αγαπάνε ακόμα παρόλα αυτά!!!

Αυτή η πτυχιακή εργασία είναι αφιέρωμενη στις “Τιτσόβιες” για τα υπέροχα τεσεράμισι χρόνια που περάσαμε όλες μαζί (με κάποιες απο το πρώτο κιόλας μάθημα Οργανικής Χημείας!). Αλλά ιδιαίτερα στην Ράνια, την Βίκυ και την Μαρία (την ψηλή!), για την πραγματικά ανεξάντλητη υπομονή τους κάθε φορά που γκρίνιαζα (ή διάβαζα...ή έγραφα...), για την άπειρη κατανόηση, για τις όμορφες στιγμές που δεν μπορώ να ξεχάσω (τόσο όμορφες που έθεσαν τον πήχη ψηλά!), για τα γέλια μέχρι δακρύων (ή και να μας κοπεί η ανάσα), για τα όσα ζήσαμε, γιατί μαζί τους έγινα άλλος άνθρωπος και μου έμαθαν πολλά...για αυτά τα ξενύχτια και για αυτά τα ξημερώματα...για τις πάρα πολλές αναμνήσεις...

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|--|----|
| Abstract | 8 |
| Περίληψη | 10 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 13 |
| 1. Σταφυλόκοκκοι | 13 |
| 1.1.1 Ιστορική αναδρομή | 13 |
| 1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά και δομή | 14 |
| 1.1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά | 14 |
| 1.1.2.2 Δομή | 14 |
| 1.1.3 Ταξινόμηση | 16 |
| 1.1.4 Επιδημιολογία των λοιμώξεων από σταφυλόκοκκο | 19 |
| 1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 |
| 1.2.1 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά και τυποποίηση | 20 |
| 1.2.2 Παθογένεια και παθογενετικοί μηχανισμοί του <i>S. aureus</i> | 21 |
| 1.3 ΑΝΤΙΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ | 22 |
| 1.3.1 MRSA και MSSA στελέχη | 22 |
| 1.3.2 Μηχανισμοί αντοχής | 23 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ | 25 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 26 |
| 3.1 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων | 26 |
| 3.1.1 Απομονωση DNA από Gram ⁺ βακτήρια | 26 |
| 3.1.1.1 Υλικά | 26 |
| 3.1.1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 26 |
| 3.1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (pcr) για ενίσχυση τμημάτων του γονιδιωματικού DNA και την δημιουργία ανιχνευτών | 27 |
| 3.1.2.1 Υλικά | 27 |
| 3.1.2.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 28 |
| 3.1.2.3 Σημειώσεις | 29 |
| 3.1.3 Καθαρισμός προϊόντος pcr με χρήση του ‘purelink pcr purification kit’ (invitrogen) | 29 |
| 3.1.3.1 Υλικά | 29 |
| 3.1.3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 29 |
| 3.1.4 Κατατμήση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεασες | 30 |
| 3.1.4.1 Υλικά | 30 |
| 3.1.4.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 30 |
| 3.1.5 Κατακρήμνηση των πέψεων | 31 |
| 3.1.5.1 Υλικά | 31 |
| 3.1.5.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 31 |
| 3.1.6 Ηλεκτροφορηση | 31 |
| 3.1.6.1 Υλικά | 31 |
| 3.1.6.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 32 |
| 3.1.6.3 Σημειώσεις | 32 |
| 3.1.7 Απομονωση DNA από πηκτώμα αγαροζης: Purelink quick gel extraction kit (Invitrogen) | 32 |
| 3.1.7.1 Υλικά | 32 |
| 3.1.7.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 33 |

| | |
|---|----|
| 3.2 Στύπωμα κατα Southern | 33 |
| 3.2.1 Υλικά | 34 |
| 3.2.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 34 |
| 3.2.2.1 Μεταφορά του DNA και σταθεροποίηση του σε νάυλον μεμβράνη | 34 |
| 3.2.2.2 Σήμανση ανιχνευτή | 35 |
| 3.2.2.3 Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή | 36 |
| 3.2.2.4 Εμφάνιση σήματος | 36 |
| 3.2.2.5 Σημειώσεις | 37 |
| 3.3 Κλωνοποίηση | 38 |
| 3.3.1 Υλικά | 38 |
| 3.3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 38 |
| 3.3.2.1 Φορέας | 38 |
| 3.3.2.2 Αντίδραση σύνδεσης | 39 |
| 3.3.2.3 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση | 40 |
| 3.3.2.4 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση | 40 |
| 3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λυση (Mini preps) | 41 |
| 3.4.1 Υλικά | 41 |
| 3.4.2 Πειραματικό πρωτόκολλο | 41 |
| 3.5 Δημιουργία αντιγράφων αποικιών (library screening) | 42 |
| 3.5.1 Υλικά | 42 |
| 3.5.2 Πειραματικό πρωτόκολλο: Διαδικασία μεταφοράς σε μεμβράνη | 42 |
| 3.6 Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των απομονωμένων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων | 43 |
| 3.7 Σύγκριση αλληλουχιών DNA | 44 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 45 |
| Χαρακτηρισμός του στελεχους ST398 | 45 |
| 4.1 Ποσοτικοποίηση του DNA μετα την απομόνωση | 46 |
| 4.2 PCR για προετοιμασία των ανιχνευτών | 47 |
| 4.3 Κατάτμηση γονιδιωματικού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού και υβριδοποίηση κατά Southern | 48 |
| 4.4 Δημιουργία ντιγράφων ποικιών και ανίχνευση κλώνων | 49 |
| 4.5 Αλληλούχιση | 50 |
| 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 52 |
| Βιβλιογραφία | 54 |



ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a Gram-positive coccal bacterium and part of the natural microbiota of the nose, skin and the intestinal tract of human. It is a successful pathogen due to a combination of nasal carriage and bacterial immunoevasive strategies. *S. aureus* can cause a range of diseases and it is one of the five most common causes of nosocomial infections, often associated with postsurgical wound infections. It is known that *S. aureus* is able to develop resistance to multiple antimicrobials, methicillin resistance being of major importance. In 2004 a new distinct sequence type (ST398) of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was isolated from pigs in the Netherlands. Since then, the transmission of MRSA ST398 from livestock to humans has been reported in many countries and contact with livestock is recognized as a risk factor for human colonization as the ST398 isolates have been reported to cause serious infections in humans.

The aim of the present degree project was to study the genetic environment of an antibiotic resistance gene found in a strain of *S. aureus* ST398, isolated from a patient in the General University Hospital of Larissa in Central Greece, using molecular biology techniques. The interesting fact was that the strain was not methicillin-resistant but instead lincosamide-resistant, carrying the *lnu(B)* gene, which is rarely found in Staphylococci species bacteria. The methods used for this study were mainly basic primer walking sequencing and molecular cloning techniques.

Firstly, the strain was cultured in blood agar plates for isolation of individual colonies. Then, one of the colonies was inoculated into nutrient-rich liquid broth to inoculate liquid culture of this colony and to grow up a sufficient number of bacteria for DNA isolation. DNA isolation was performed using a CTAB-phenol/chloroform based extraction protocol. Initially, primers were designed based on previous publications for detecting sequences upstream and downstream the *lnu(B)* gene using polymerase chain reaction and sequencing analysis of the products. Surprisingly, the isolated sequence turned out to be of unknown origin and resembled the DNA sequence of a transposable element. Thereafter, we couldn't design primers for PCR and further sequencing anymore to detect the region beyond the resistance gene and so we continued the experiments using molecular cloning. Firstly, we chose restriction enzymes that would cleave specifically the genomic DNA of the strain but they would leave intact the already sequenced region. Then, we used gel electrophoresis to separate as much as possible the digestion products. Subsequently, we performed Southern

blot experiment using biotin-labeled probes designed specifically to detect an unknown DNA sequence that contained a small part of our known sequence in the transposable element. We isolated these DNA fragments and inserted them into cloning vectors containing a lethal gene, which is disrupted by ligation of a DNA insert into the cloning site. As a result only cells with recombinant plasmids were able to propagate, eliminating the need for expensive blue/white screening. After that we prepared electrocompetent DH5a cells and the newly generated plasmids were transformed with electroporation. We cultured the transformed cells in agar plates to detect the recombinant bacteria. Then, we cultured them on agar plates to obtain a genomic library of isolated clones and we proceeded with screening of the library after labeling with specific probes to detect which one of the clones contained the desired DNA fragment. Finally the plasmids were isolated and the DNA inserted in the multiple cloning sites was sequenced.

To summarize, according to the sequencing results, we managed to isolate the whole transposable element that contained the antibiotic resistance gene *lnu(B)* .

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *Staphylococcus aureus* (ή χρυσίζων σταφυλόκοκκος) είναι ένας Gram-θετικός κόκκος που ανήκει στην φυσική χλωρίδα του δέρματος, της μύτης και του γαστρεντερικού συστήματος. Πρόκειται για έναν παθογόνο μικροοργανισμό, του οποίου η εμφάνιση ευνοείται από την μετάδοσή του μέσω επαφής καθώς και την ανάπτυξη μηχανισμών διαφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει ένα μεγάλο εύρος ασθενειών και αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες εμφάνισης ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, προκαλώντας πολλές φορές μετεγχειρητικές λοιμώξεις στους ασθενείς. Είναι επίσης γνωστό ότι ο *S. aureus* παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και πιο συχνά στην μεθικιλίνη. Το 2004 ένα νέο στέλεχος (ST398) σταφυλόκοκκου ανθεκτικού στην μεθικιλίνη (MRSA) απομονώθηκε από χοίρους στην Ολλανδία. Έκτοτε, η μετάδοση του MRSA ST398 από τα ζώα στους ανθρώπους έχει καταγραφεί σε πολλές χώρες και η επαφή του ανθρώπου με κτηνοτροφικά ζώα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για αποίκιση του ST398 στους ανθρώπους και μετέπειτα ανάπτυξης λοίμωξης, καθώς τα στελέχη αυτά έχει αναφερθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές μολύνσεις.

Ο σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί με την χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας το γενετικό περιβάλλον ενός γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και βρέθηκε σε ένα στέλεχος *S. aureus* ST398, το οποίο απομονώθηκε από ασθενή στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι το στέλεχος δεν παρουσίαζε ανθεκτικότητα στην μεθικιλίνη (MSSA) αλλά στην λινκομυκίνη, φέροντας το γονίδιο *lnu(B)*, το οποίο σπάνια εμφανίζεται σε στελέχη του σταφυλόκοκκου. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν primer walking sequencing και molecular cloning.

Αρχικά, το στέλεχος καλλιιεργήθηκε σε στερεό θρεπτικό υλικό (αιματούχο άγαρ) για απομόνωση μεμονομένων αποικιών. Έπειτα, μία από τις αποικίες ενοφθαλμίστηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό προς εμπλουτισμό, για την μετέπειτα απομόνωση DNA. Στην συνέχεια καθώς το γονίδιο ήταν γνωστό από προηγούμενες δημοσιεύσεις, σχεδιάστηκαν εκκινητές και με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε primer walking sequencing για την αλληλούχιση της περιοχής ανοδικά και καθοδικά από το γονίδιο *lnu(B)*. Διαπιστώθηκε, ότι το τμήμα που αλληλουχήθηκε είχε άγνωστη προέλευση και έτσι δεν ήταν δυνατός ο σχεδιασμός εκκινητών για την μετέπειτα μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος του *lnu(B)*, διαπιστώθηκε όμως ότι παρουσίαζε ομοιότητες με κάποιο μεταθετό στοιχείο. Έτσι λοιπόν, καθώς δεν ήταν δυνατή η χρήση της PCR και της αλληλούχισης, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης. Αρχικά, έγινε η επιλογή περιοριστικών ενζύμων τα οποία θα αναγνώριζαν τμήματα του γονιδίου του σταφυλόκοκκου αφήνοντας όμως ακέραια την περιοχή που είχε αλληλουχηθεί. Στην συνέχεια ακολούθησε στύπωμα κατά Southern, με την χρήση σημασμένων ανιχνευτών ώστε να εντοπιστούν κομμάτια του DNA που περιέχουν μέσα τμήμα των άκρων της γνωστής αλληλουχίας καθώς και το τμήμα που δεν είχε αλληλουχηθεί. Τα κομμάτια αυτά απομονώθηκαν και εισήχθησαν σε φορείς κλωνοποίησης και μετά από μετασχηματισμό βακτηρίων και καλλιέργεια τους για τον εντοπισμό των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, ακολούθησε δημιουργία γονιδιωματικών βιβλιοθηκών, ανίχνευση του κλώνου που περιέχει το προς μελέτη ένθεμα στην βιβλιοθήκη DNA (library screening), απομόνωση των πλασμιδίων και αλληλούχιση τους.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι το τμήμα αυτό του DNA ανήκει σε ένα μεταθετό



στοιχείο το οποίο φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας *lnu(B)*, καθώς και ανεστραμμένες αλληλουχίες στα άκρα του και το ένζυμο μεταθετάση (transposase).



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ

1.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το 1878 έγινε η πρώτη παρατήρηση των σταφυλόκοκκων από τον R. Koch. Το 1883 ο Sir Alexander Ogston εισήγαγε για πρώτη φορά την ονομασία σταφυλόκοκκος, λόγω της διάταξης των βακτηρίων όταν διαιρούνται σε δύο επίπεδα καθώς παραμένουν προσκολλημένα μεταξύ τους και εμφανίζουν σχηματισμούς που μοιάζουν με τσαμπιά σταφυλιού. Ακόμα, ήταν ο πρώτος που επεσήμανε την σημασία του σταφυλόκοκκου ως αιτία λοιμώξεων. Το 1884 ο Rosenbach διαχώρισε τους σταφυλόκοκκους ανάλογα με το χρώμα των αποικιών τους (1).

Το 1902 οι Kolle και Otto ανέφεραν ότι με μεθόδους αιμοσυγκόλλησης ήταν δυνατό να διακριθούν τα παθογόνα από τα μη παθογόνα στελέχη. Ο Loeb το 1903, έδειξε ότι ο *S. aureus* προκαλούσε πήξη του αίματος μέσα σε μερικές ώρες, ενώ ο *S. epidermidis* δεν είχε αυτή την ικανότητα. Το 1906 οι Andrews και Gordon προτείνουν μια ταξινόμηση με βάση τον χρώμα καθώς και την παθογονικότητα και προέκυψαν έτσι τρία είδη σταφυλόκοκκου: ο *S. epidermidis albus* και άλλα δύο είδη λευκά, μη παθογόνα. Παρόλα αυτά η ονομασία σταφυλόκοκκος δεν έγινε εύκολα δεκτή και οι οργανισμοί συμπεριλαμβάνονταν στο γένος *Micrococcus*. (2)

Στα μέσα της δεκαετίας του 1950 διατυπώθηκαν αρκετές απόψεις σχετικά με τον διαχωρισμό ή μη των σταφυλόκοκκων από τους μικρόκοκκους. Την ίδια δεκαετία αναγνωρίστηκαν δύο είδη, ο *S. aureus* και ο *S. epidermidis* και διαχωρίστηκαν με βάση την ικανότητα διάσπασης της μαννιτόλης καθώς και την παραγωγή της πηκτάσης. Έτσι κατατάχθηκαν όλοι οι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι σε ένα είδος, τον *S. epidermidis*, το οποίο είδος όμως ήταν εξαιρετικά ετερογενές. Ακόμα, ο διαχωρισμός *Staphylococcus-Micrococcus* δεν ήταν τυποποιημένος και ορισμένα στελέχη μπορούσαν να ταξινομηθούν και στα δύο είδη. Το 1963 ο Baird-Parker χώρισε για πρώτη φορά τους υπότυπους των αρνητικών στην πηκτάση σταφυλόκοκκων με βάση την παραγωγή φωσφατάσης και ακετοΐνης καθώς και την ικανότητα παραγωγής αεροβίως οξέος από την λακτόζη, μαλτόζη και μαννιτόλη.(3) Το 1965 η Διεθνής Επιτροπή για την Συστηματική Βακτηριολογία τυποποίησε την δοκιμασία της αναερόβιας ζύμωσης της γλυκόζης και έτσι έγινε ο διαχωρισμός μεταξύ των *Staphylococcus* και *Micrococcus*. (2)

Στα μέσα της δεκαετίας του '60 έγινε σαφής διαχωρισμός των σταφυλόκοκκων με βάση την σύνθεση του DNA(4). Τα είδη του γένους των σταφυλόκοκκων έχουν στο DNA τους 30-39% περιεκτικότητα σε G+C (γουανοσίνη και κυτοσίνη), ενώ τα είδη του γένους των μικρόκοκκων παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό (63-73%).

Τελικά, τα πλέον αξιόπιστα στοιχεία για τον διαχωρισμό των σταφυλόκοκκων από τους μικρόκοκκους θεωρούνται η ικανότητα τους να αναπτύσσονται και να διασπούν την γλυκερόλη με παραγωγή οξέος παρουσία 0,4mg/l ερυθρομυκίνης, η ευαισθησία τους σε 200mg/l λυσοσταφίνης και η αντοχή τους σε 25mg/l

λυσοενζύμων με την μέθοδο Schleifer & Kloos (5), η αντοχή τους στην βακιτρακίνη και η ευαισθησία τους στην φουραζολιδόνη (6).

1.1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ

1.1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ονομασία σταφυλόκοκκος προέρχεται από την ελληνική λέξη σταφύλι και περιγράφει τις δομές που σχηματίζουν τα βακτήρια όταν αναπτύσσονται και μοιάζουν με τσαμπιά από σταφύλια ή σε σειρά το πολύ τεσσάρων κόκκων. Οι σταφυλόκοκκοι είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι, με διάμετρο 0,5 έως 1,5 μm, δεν έχουν βλεφαρίδες, είναι ακίνητοι, τα περισσότερα είδη είναι αερόβια και προαιρετικά αναερόβια. Δεν φέρουν έλυτρο, αλλά ορισμένα στελέχη αναπτύσσουν ένα λεπτό περίβλημα από αμινογλυκουρονικό οξύ, το οποίο προσδίδει στον *S. aureus* αντοχή στην φαγοκυττάρωση. Δίνουν θετική την αντίδραση καταλάσης. Αντέχουν στην ξηρότητα του ατμοσφαιρικού αέρα, αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (10-42° C) με ευνοϊκότερη θερμοκρασία τους 37°C και παρουσιάζουν αντοχή σε υψηλές πυκνότητες NaCl (8-10%), καθιστώντας έτσι δυνατό τον διαχωρισμό τους από άλλους μικροοργανισμούς (7). Σε στερεά θρεπτικά υλικά αναπτύσσονται μέσα σε 24 ώρες σχηματίζοντας στρογγυλές αποικίες με διάμετρο 1-3mm, λείες, υπερυψωμένες, χωρίς χρώμα ή άσπρες/κιτρινοπορτοκαλί, οι οποίες μπορούν να παρουσιάσουν μερικές φορές ζώνες αιμόλυσης στο αιματούχο άγαρ, λόγω της παραγωγής αιμολυσίνης (**εικ. 1**). Σε υγρά θρεπτικά υλικά παρουσιάζουν θολερότητα (**εικ. 2**).



Εικόνα 1

Καλλιέργεια *S. aureus* σε στερεό θρεπτικό υλικό



Εικόνα 2

Καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό

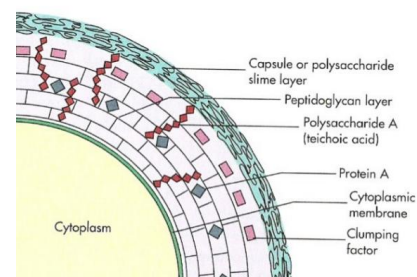
1.1.2.2 ΔΟΜΗ

Το κυτταρικό τοίχωμα των σταφυλόκοκκων αποτελείται από δύο στρώσεις πεπτιδογλυκάνης (καθώς πρόκειται για θετικούς κατά Gram κόκκους), η οποία αποτελεί και το 50% του βάρους του, τειχοϊκά οξέα (τα οποία δεν ανευρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των μικρόκοκκων) και στα στελέχη *S. aureus* ανευρίσκεται και η μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνη A. Άλλες βασικές πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος είναι οι

τέσσερις πενικιλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), η κοαγκουλάση, οι πρωτεΐνες επιφανείας που ανήκουν στην ομάδα των MRCRAMMS (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) και είναι συνδεδεμένες στο κυτταρικό τοίχωμα. (Εικ. 3)

- Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος, αποτελείται από τα αμινοσάκχαρα N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλομουραμικό οξύ που συνδέονται μεταξύ τους με 1,4 β-γλυκοσιδικό δεσμό. Στο διπλό στρώμα πεπτιδογλυκάνης οφείλεται η στερεότητα του τοιχώματος του σταφυλόκοκκου, ενώ παίζει επίσης ρόλο στην παθογόνο δράση του καθώς προκαλεί την παραγωγή ιντερλευκίνης-1 από τα φαγοκύτταρα και χημειοτακτισμό για την συγκέντρωση των πολυμορφοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής (7).
- Τα τειχοϊκά οξέα αποτελούνται από μια ομάδα φωσφορικών πολυμερών. Κάποια από αυτά βρίσκονται συνδεδεμένα με την πεπτιδογλυκάνη (τειχοϊκά οξέα του κυτταρικού τοιχώματος) και αποτελούνται από μια εναλασσόμενη ακολουθία φωσφορικής ριβιτόλης, ενώ άλλα είναι συνδεδεμένα με λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης (τειχοϊκά οξέα της μεμβράνης) και αποτελούνται από φωσφορική γλυκερόλη σε επαναλαμβανόμενες μονάδες (7).
- Η πρωτεΐνη A ανευρίσκεται σε στέλεχος *S. aureus* αλλά όχι στα αρνητικά στην κοαγκουλάση στέλεχος σταφυλόκοκκων (CoNS) και είτε είναι προσδεδεμένη στην πεπτιδογλυκάνη είτε στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, έχει την ιδιότητα να συνδέεται με το Fc τμήμα της ανοσοσφαιρίνης IgG. Η ιδιότητα αυτή έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές στην εργαστηριακή διάγνωση για τον εντοπισμό *S. aureus* σε κλινικά δείγματα (7).

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελείται από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών, λιπιδίων καθώς και από μία μικρή ποσότητα υδατανθράκων. Λειτουργεί ως ωσμωτικό φράγμα για το κύτταρο και επιτρέπει την πρόσδεση όλων των βιοσυνθετικών ενζύμων του κυττάρου. (7)



Εικόνα 3.

Δομή του κυτταρικού τοιχώματος του σταφυλόκοκκου

1.1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι σταφυλόκοκκοι υπάγονται στην οικογένεια των *Micrococccaceae*, η οποία περιλαμβάνει τα γένη *Micrococcus*, *Planococcus* και *Stomatococcus*, αλλά δεν αποτελεί μια φυλογενετικά συναφή ομάδα. Αποτελέσματα από την μελέτη της σύνθεσης του DNA έδειξαν ότι το γένος των σταφυλόκοκκων δεν είναι στενά συνδεδεμένο με το γένος των μικρόκοκκων. Το γένος των σταφυλόκοκκων παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το γένος των *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Planococcus* και *Brochothrix*, ενώ το γένος των μικρόκοκκων παρουσιάζει περισσότερες ομοιότητες με το γένος *Arthrobacter* από τα κορυνοβακτηριοειδή. Παρόλα αυτά, τόσο οι σταφυλόκοκκοι, όσο και οι μικρόκοκκοι δίνουν θετική την αντίδραση της καταλάσης, σε αντίθεση με τους στρεπτόκοκκους και τους αερόκοκκους.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, από τα μέσα της δεκαετίας του '60 έγινε σαφής ο διαχωρισμός των σταφυλόκοκκων από τους μικρόκοκκους με βάση την περιεκτικότητα του DNA σε G+C (γουανίνη και κυτοσίνη). Ακόμα, οι σταφυλόκοκκοι παρουσιάζουν διαφορές από τους μικρόκοκκους και στην δομή του κυτταρικού τοιχώματος, καθώς το κυτταρικό τοίχωμα των σταφυλόκοκκων περιέχει πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκά οξέα, τα οποία δεν ανευρίσκονται στους μικρόκοκκους. Γενικά όμως η κατάταξη των σταφυλόκοκκων σήμερα βασίζεται στην ταξινόμηση των Kloos και Schleifer (5) και περιλαμβάνει πάνω από 30 είδη.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά διαχωρισμού των σταφυλόκοκκων από τους υπόλοιπους θετικούς κατά Gram κόκκους αναφέρονται στον **πίνακα 1**. Τα διάφορα είδη σταφυλόκοκκου όμως διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση τις βιοχημικές τους ιδιότητες όπως αυτές αναφέρονται στον **πίνακα 2**.

Πίνακας 1: Διαχωρισμός σταφυλόκοκκων απο θετικούς κατά Gram κόκκους

| Genus and exceptional species | Mol%G+C of DNA | Ανάπτυξη σε: | | | | | | | | | | Ανοχή σε: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------|--------------------|---------------------------|----------------------|------------------|--------------------|--------------|--------------|----------------|---------------|-------------------|-----------|----------------|-------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Υποχρωμικά αερόβια | Υποαερόβια ή μικροαερόβια | Υποχρωμικά αναερόβια | Τετραικοί κόκκοι | Προκάληση στο agar | Κινητικότητα | 5% NaCl agar | 6.5% NaCl agar | 12% NaCl agar | P agar σε 18 ώρες | κατάσση | Benzidine test | p-Dokim: οξείδωση | Αερόβιο οξύ από γλυκόζη | Αερόβιο οξύ από γλυκερόλη | Ανάπτυξη σε Schleifer-Kramer agar | Λυσασταφίνη 200µg/ml | επιδημιολογική (0,04 µg/ml) | Βακτηρακίνη (0,04 U) | Furazolidone (100µg) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Staphylo- coccus | 30-39 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> subsp. <i>Anaerobius</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | | |
| <i>S. saccharolyticus</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | |
| <i>S. hominis</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | |
| <i>S. auricularis</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | |
| <i>S. saprophyticus</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | |
| <i>S. cohnii</i> , <i>S. xylosus</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| <i>S. kloosii</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. arlettae</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| <i>S. intermedius</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| <i>S. caseolyticus</i> , <i>S. securi</i> , <i>S. lentius</i> , <i>S. vitulus</i> | 34-42 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Entero- coccus | 34-46 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Strepto- coccus | 35-40 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Aerococcus | 39-52 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Planococcus | 56-60 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Stomato- coccus | 66-75 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Micrococcus <i>M. krisinae</i> <i>M. agilis</i> | | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

+, ≥90% των στελεχών είναι θετικά, ±, ≥90% των στελεχών είναι ασθενώς θετικά, -, ≥90% των στελεχών είναι αρνητικά, d, 11-89% των στελεχών είναι θετικά

(), βραδεία αντίδραση

Πίνακας 2: Βιοχημικές ιδιότητες των διαφόρων ειδών του Σταφυλόκοκκου

| Ιδιότητες | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. capitis</i> | <i>S. capitis subs. ureolyticus</i> | <i>S. caprae</i> | <i>S. saccharolyticus</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. lugdunensis</i> | <i>S. schlegelii</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. cohnii</i> | <i>S. cohnii subs. ureolyticus</i> | <i>S. xyloso</i> | <i>S. arlettae</i> | <i>S. equorum</i> | <i>S. gallinarum</i> | <i>S. kloosii</i> | <i>S. simulans</i> | <i>S. camosus</i> | <i>S. schnei</i> | <i>S. lentus</i> | <i>S. auricularis</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. hyicus</i> | <i>S. delphini</i> |
|------------------------|------------------|-----------------------|-------------------|-------------------------------------|------------------|---------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|------------------|------------------------------------|------------------|--------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| Κοαγκουλάση | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ελεύθερη | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Κοαγκουλάση | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| συνδεδεμένη | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Νουκλεάση | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| θερμостаθετική | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Αιμολυσίνες | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Αργινίνη | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ορνιθίνη | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Πυρορροδόνη | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ουρεάση | (d) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Αλκαλική | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Φωσφατάση | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B-Γαλακτο- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| σάκχαση | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ακετοίνη (VP) | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Νιτρικά | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Εσκούλίνη | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Αντοχή σε 10% NaCl | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Αντοχή στη νοβοβιοκίνη | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Αντοχή στην πολυμυξίνη | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Μανιτόλη | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Μαννόζη | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Τρεχαλόζη | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Λακτόζη | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Καταλάση | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Οξιδάση | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

+, ≥90% των στελεχών είναι θετικά, †, ≥90% των στελεχών είναι ασθενώς θετικά, ‡, ≥90% των στελεχών είναι αρνητικά, d, 11-89% των στελεχών είναι θετικά (), βραδεία αντίδραση

1.1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟ

Οι σταφυλόκοκκοι ζουν στο ανθρώπινο σώμα ως μέρος της φυσικής χλωρίδας του δέρματος, της μύτης και της περιγεννητικής περιοχής του ανθρώπου. Η πλειοψηφία των λοιμώξεων που προκαλούνται από σταφυλοκόκκου είναι ακίνδυνες και θεραπεύονται με αντιβιοτικά. Παρόλα αυτά μπορούν να αποτελέσουν αιτία σοβαρής λοίμωξης τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα χαρη στη λοιμογόνο ικανότητα τους που οφείλεται σε παράγοντες επιφάνειας του κυττάρου αλλά και σε εκκρινόμενες πρωτεΐνες (τοξίνες και ένζυμα).

Περισσότερα από 30 είδη σταφυλοκόκκων έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, από αυτά σημαντικά παθογόνα για τον άνθρωπο είναι οι *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* και *S. saprophyticus*, με τους *S. aureus* και *S. epidermidis* να αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες λοιμώξεων της κοινότητας αλλά και του νοσοκομείου.

Οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CoNS, π.χ ο *S. epidermidis*) είναι το πιο συχνό αίτιο νοσοκομειακής μικροβιαμίας, ιδιαίτερα σε μονάδες που χρησιμοποιούνται ενδοαγγειακοί καθετήρες. Ο *S. epidermidis* βρίσκεται στο δέρμα του ανθρώπου και όλων των θερμόαιμων ζώων ως μόνιμη μικροβιακή χλωρίδα. Αποικίζει τους βλεννογόνους του αναπνευστικού, τις ρινικές κοιλότητες, το αυτί και τους οφθαλμούς. Βρίσκεται στην φύση, το νερό και το έδαφος. Είναι ο συχνότερα απομονωθείς σταφυλόκοκκος σε ποσοστό 65-90%. Αποτελεί την κύρια αιτία βακτηριαμίας σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς που παίρνουν ανοσοκατασταλτικά αλλά και σε ασθενείς νεογνολογικών μονάδων. Οι βακτηριαμίες των νεογνών σχετίζονται με το χαμηλό βάρος της γέννησης, την ύπαρξη καθετήρων και μηχανικού αερισμού. Οι CoNS μπορεί να δώσουν θετικές αιμοκαλλιέργειες λόγω επιμόλυνσης από το δέρμα. Τα νοσοκομειακά στελέχη *S. epidermidis* εμφανίζονται πολυανθεκτικά, γεγονός που αποδεικνύει την εκλεκτική πίεση που ασκείται από την ευρεία και μερικές φορές αλόγιστη χορήγηση των αντιβιοτικών στα νοσοκομεία.

Παρά την συχνότητα εμφάνισης του *S. epidermidis* στις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, ο κυριότερος παθογόνος μικροοργανισμός στον άνθρωπο, είναι ο *S. aureus* και έχει μελετηθεί περισσότερο από όλα τα είδη για την κατανόηση της παθογένειας του, της ανθεκτικότητας που παρουσιάζει σε ένα μεγάλο φάσμα αντιβιοτικών, καθώς και για την άντληση νέων πληροφοριών για το ευέλικτο γονιδίωμα του. Ο *S. aureus* συνηθέστερα συνδέεται με λοιμώξεις δέρματος, μολύνσεις των οστών, σηψαιμία και συχνά πνευμονία. Η μόλυνση μπορεί να ξεκινά σε ενδονοσοκομειακό περιβάλλον σε ασθενείς μετεγχειρητικά τραύματα. Τα παιδιά και ο ενήλικες μπορούν να γίνουν φορείς του *S. aureus* με συχνότερο σημείο εντοπισμού την πρόσθια ρινική κοιλότητα, όπου μπορεί να γίνει εύκολα η προσκόλληση του μικροοργανισμού. Η ρινική φορεία υπολογίζεται ότι είναι στο 20-40% του πληθυσμού και εξαρτάται από την εποχή και από τοπικούς επιδημιολογικούς παράγοντες. Υπολογίζεται ότι μόνο το 20% του πληθυσμού δε θα αποικιστούν από στέλεχος του *S. aureus* κατά την διάρκεια της ζωής τους (8). Για την εκρίζωση της ρινικής φορείας χορηγείται τοπικά ο αντιμικροβιακός παράγοντας μουπιροσίνη.

1.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

1.2.1 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Ο *S. aureus* αποτελεί ένα σημαντικά παθογόνο είδος σταφυλοκόκοκου για τον άνθρωπο και είναι συχνά συσχετιζόμενο με ανθρώπινες ασθένειες. Έχει μελετηθεί περισσότερο από όλα τα υπόλοιπα είδη για την κατανόηση των μηχανισμών του σε σχέση με την παθογόνο δράση του και την αντοχή του έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων. Επίσης, είναι το μόνο από τα παθογόνα για τον άνθρωπο είδη που παράγει το ένζυμο κοαγκουλάση (το οποίο στην βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης και ως παράγοντας προσκόλλησης). Ανήκει στην φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπινου οργανισμού και το μεγαλύτερο ποσοστό που ανθρώπινου πληθυσμού θα αποικιστεί κάποια στιγμή της ζωής του από το στέλεχος. Οι φορείς μπορούν να μεταφέρουν το μικρόβιο από τις πρόσθιες ρινικές κοιλότητες στο δέρμα τους, οπότε σε περίπτωση που υπάρξει κάποιος τραυματισμός μπορεί να γίνει μηχανικά η μεταφορά και είσοδος του μικροβίου στην συστηματική κυκλοφορία με αποτέλεσμα να προκληθεί τοπική ή γενικευμένη λοίμωξη.

Τα στελέχη του *S. aureus* παράγουν αποικίες που έχουν κίτρινο χρώμα, γι' αυτό και ο μικροοργανισμός χαρακτηρίστηκε ως 'Σταφυλόκοκκος ο χρυσίζων'. Η ιδιότητα αυτή όμως δεν είναι σταθερή και δεν χρησιμοποιείται σήμερα για τον χαρακτηρισμό του είδους. (9)

Οι μέθοδοι τυποποίησης των βακτηρίων ταξινομούνται στις: α) φαινοτυπικές τεχνικές (βασίζονται σε χαρακτηριστικά που εκφράζονται από τους μικροοργανισμούς και β) γονοτυπικές τεχνικές (βασίζονται στην απευθείας ανάλυση των χρωμοσωμικών και εξωχρωμοσωμικών γενετικών στοιχείων).

Στις φαινοτυπικές ανήκουν: ο βióτυπος, οι μέθοδοι ανίχνευσης ευαισθησίας σε αντιβιοτικά, η ορολογική τυποποίηση, η βακτηριακή τυποποίηση-λυσιτυπία, η ανοσοαποτύπωση (Western Blot) και η πολυτοπική ενζυμική ηλεκτροφόρηση (MLEE).

Στις γονοτυπικές μεθόδους ανήκουν: η πλασμιδιακή ανάλυση, η ανάλυση χρωμοσωμικού DNA μετά από επίδραση περιοριστικής ενδονουκλεάσης, τα συστήματα τυποποίησης με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Rep-PCR και RAPD PCR), ο υβριδισμός κατά Southern χρησιμοποιώντας DNA-ανιχνευτές, η ριβοτυπία, η δυαδική τυποποίηση στελεχών με ειδικούς σε στελέχη DNA-ανιχνευτές, ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE), τυποποίηση πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST), τυποποίηση μονοτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης A (spa typing), μελέτη της έκφρασης γονιδίου με αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time two step RT PCR).

Η πλέον ευρέως διαδεδομένη και γενική μέθοδος μοριακής τυποποίησης, με σκοπό τον χαρακτηρισμό των στελεχών σε μοριακό επίπεδο είναι η MLST. Η κύρια ιδέα της MLST είναι η παροχή ενημερωμένων βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, στις οποίες θα υπάρχει ελεύθερη πρόσβαση. Πρόκειται για μια μέθοδο με υψηλή διακριτική ικανότητα που στην περίπτωση του *S. aureus* βασίζεται στην εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μίας εσωτερικής περιοχής περίπου 450bps, επτά γονιδίων που συντηρούν την κυτταρική λειτουργία (housekeeping genes). Για κάθε γονιδιακό κομμάτι οι διαφορετικές αλληλουχίες προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλληλόμορφα γονίδια και κάθε στέλεχος καθορίζεται από τα αλληλόμορφα των επτά ορισμένων γονιδίων. Στελέχη με το ίδιο αλληλικό προφίλ (allelic profile) ανήκουν στον ίδιο τύπο (ST), ενώ στελέχη που διαφέρουν κατά ένα ή περισσότερα γενετικά συμβάντα κατατάσσονται στον ίδιο κλώνο.

Πίνακας 3: Τα επτά γονίδια του μεταβολισμού που χρησιμοποιούνται στην MLST

| Γονίδια | Μέγεθος (bp) |
|---|--------------|
| Carbamate kinase (arcC) | 456 |
| Shikimate deshydrogenase (aroE) | 456 |
| Glycerol kinase (glpF) | 465 |
| Guanylate kinase (gmK) | 429 |
| Phosphate acetyltransferase (pta) | 474 |
| Triosephosphate isomerase (tpi) | 402 |
| Acetyl coenzymeA acetyltransferase (yqiL) | 516 |

1.2.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ *S. AUREUS*

Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην λοιμογόνο ικανότητα του *S. aureus* και προάγουν την προσκόλληση, την καταστροφή των ιστών, τη διείσδυση και την κυτταροτοξικότητα κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- α) παράγοντες επιφανείας του κυττάρου
- β) ένζυμα που εκκρίνονται εξωκυττάρια
- γ) εξωτοξίνες

Η σύνθεση των ανωτέρω παραγόντων ρυθμίζεται από γονίδια και οπερόνια που άλλοτε παίζουν ρόλο θετικό ενεργοποιώντας και άλλοτε αρνητικό καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος και την φάση ανάπτυξης του βακτηρίου. Έτσι ο *S. aureus* έχει εξελιχθεί σε έναν άριστα προσαρμοσμένο παθογόνο μικροοργανισμό λόγω των πολυπαραγοντικών παθογόνων μικροοργανισμών που διαθέτει. Ο *S. aureus* παράγει περίπου 30 τοξίνες και ένζυμα, από τα οποία των περισσότερων η παραγωγή ρυθμίζεται από την ύπαρξη πλασμιδίων. Οι κυριότερες των οποίων είναι: α) η πηκτάση (κοαγκουλάση), β) αιμολυσίνες (α-, β-, γ-, και δ-), γ) η θερμοανθεκτική νουκλεάση (t-DNase), δ) εντεροτοξίνες, ε) τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST-1), στ) λευκοκτονίνη, ζ) αποφολιδωτική τοξίνη και η) σταφυλοκινάση.

Οι **αιμολυσίνες** είναι κυτταροτοξικές πρωτεΐνες και εκτός από τα ερυθροκύτταρα έχουν την ικανότητα να λύουν και τα ουδετερόφιλα με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται λυσοζυμικά ένζυμα τα οποία στην συνέχεια καταστρέφουν τους γειτονικούς ιστούς.

Η **αποφολιδωτική τοξίνη**, οι **εντεροτοξίνες** και η **TSST-1** ανήκουν σε μία κατηγορία πεπτιδίων τα οποία προσδένονται στο μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC II) και αλληλεπιδρούν με την β υπομονάδα των T κυττάρων, προκαλώντας μη ειδική ενεργοποίηση τους καθώς και απελευθέρωση κυτοκινών με αποτέλεσμα την καταστροφή του ιστού.

Η **πηκτάση** (ή κοαγκουλάση), είναι εξωκυττάρια ενζυμική πρωτεΐνη, που προκαλεί πήξη του πλάσματος του ανθρώπου. Συναντάται σε δύο μορφές: την ελεύθερη και την συνδεδεμένη. Η **ελεύθερη** είναι

εξωτοξίνη και εκκρίνεται από το μικρόβιο. Η πήξη επιτελείται παρουσία ενός παράγοντα που υπάρχει στο πλάσμα του αίματος. Ο παράγοντας αυτός αντιδρά με την πηκτάση, με δράση παρόμοια της ενεργοποίησης της προθρομβίνης σε θρομβίνη και διεγείρει την μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες. Η πηκτάση έτσι προφυλάσσει τον *S. aureus* από την φαγοκυττάρωση και δημιουργεί μια κάψα από ινική γύρω από το σημείο προσβολής του ιστού.

Η **συνδεδεμένη** πηκτάση προκαλεί συγκόλληση πυκνού εναιωρήματος σταφυλόκοκκου, χωρίς τη μεσολάβηση παραγόντων από το πλάσμα. Η παραγωγή της συνδεδεμένης κοαγκουλάσης είναι ανεξάρτητη από την παραγωγή της ελεύθερης. (10)

Η ικανότητα των προαναφερθέντων τοξινών να σχηματίζουν πόρους αποτελεί σημαντικό στοιχείο στην παθογένεια των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Η λύση των κυττάρων-στόχων, που είναι το αποτέλεσμα της δράσης των τοξινών, απελευθερώνει μεγάλα ποσά μορίων που προάγουν την φλεγμονή και ουσίες που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων, ενώ συγχρόνως δημιουργεί και κύτταρα που αποπροσανατολίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα.

1.3 ΑΝΤΙΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Οι σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις αντιμετωπίζονται με την χρήση αντιβιοτικών. Τα αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά ομαδοποιούνται σε ξεχωριστές κατηγορίες με διαφορετικές ιδιότητες ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, το αντιμικροβιακό τους φάσμα και την φαρμακοκινητική τους. Η πενικιλίνη ήταν το πρώτο αντιμικροβιακό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από *S. aureus*. Ο μηχανισμός δράσης της πενικιλίνης αλλά και των άλλων β-λακταμικών αντιβιοτικών έγκειται στην αναστολή της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης. Τα θεαματικά αποτελέσματα που έδωσε η πενικιλίνη στην θεραπεία των σταφυλόκοκκικών λοιμώξεων πολύ γρήγορα περιορίστηκαν λόγω ανάπτυξης αντοχής προς το αντιβιοτικό. Κάπως έτσι ξεκίνησε η σύνθεση των ημισυνθετικών πενικιλινών (μεθικιλίνη, οξακιλλίνη και ναφκιλλίνη) στις αρχές της δεκαετίας του '60 και φάνηκε να δίνει λύση στο πρόβλημα των ανθεκτικών στην πενικιλίνη σταφυλόκοκκων. Σε σύντομο χρονικό διάστημα όμως παρουσιάστηκαν τα ανθεκτικά στην μεθικιλίνη στελέχη (MRSA). Για τα συγκεκριμένα στελέχη φάρμακο εκλογής είναι η κοτριμαξαζόλη και το φουσιδικό οξύ. Η θεραπεία γίνεται συνήθως με συνδυασμούς αντιβιοτικών για την καταστροφή του μικροβίου και την προφύλαξη ανάπτυξης πολυαντοχής, όπως ο συνδυασμός των β-λακταμικών με βανκομυκίνη ή αμινογλυκοσίδες ή μακρολίδες σε συνδυασμό με πενικιλίνες.

1.3.1 MRSA ΚΑΙ MSSA ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα στελέχη *S. aureus* που φέρουν το γονίδιο *mecA* είναι ανθεκτικά σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένου των κεφαλοσπορινών και των καρβαπενεμών και ονομάζονται MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*). Αντίθετα, τα στελέχη του *S. aureus* που είναι ευαίσθητα στην μεθικιλίνη και σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά χαρακτηρίζονται MSSA (methicillin-susceptible *S. aureus*). Η αυξανόμενη εξάπλωση σε όλο τον κόσμο των MRSA ξεκίνησε από τις αρχές του 1960 και έχει δημιουργήσει

σοβαρά προβλήματα στην αντιμικροβιακή θεραπεία. Τα ποσοστά εμφάνισης των στελεχών αυτών ποικίλλουν ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή. Στην Ευρώπη, ενώ στα Σκανδιναβικά νοσοκομεία είναι σπάνια η ανεύρεση MRSA στελεχών, στην Μεσόγειο τα ποσοστά αγγίζουν το 40%. (11) Το ποσοστό των MRSA στελεχών αποτελεί δείκτη της ποιότητας της υγιεινής ενός νοσοκομείου.

Η μετάδοση των στελεχών αυτών μπορεί να γίνει απο ασθενή σε ασθενή μέσω επαφής, απο τα μέλη του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού, απο επιμολυσθέντα αντικείμενα ή μέσω του αέρα. Τα ανθεκτικά στελέχη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο καθώς αποτελούν συνήθη αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων και η συχνότητα απομόνωσης τους είναι αυξανόμενη

1.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ

Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις μηχανισμοί ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Αυτοί είναι: α) η ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού, β) η μεταβολή του μορίου-στόχου, του μορίου δηλαδή με το οποίο δεσμεύεται το αντιβιοτικό, γ) η απομάκρυνση του αντιμικροβιακού παράγοντα μέσω αντλιών εκκροής και δ) ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα.

Μία και μοναδική μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε αντοχή χωρίς να διαφοροποιηθεί η παθογένεια ή η βιωσιμότητα ενός βακτηριακού στελεχούς. Περιστατικά μεταλλάξεων μπορούν επίσης να διαφοροποιήσουν ήδη υπάρχοντες μηχανισμούς αντοχής, ώστε αυτοί να γίνουν πιο ενεργείς με μεγαλύτερο φασμα δραστικότητας. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα βακτήρια επιζητούν εξωγενές γενετικό υλικό το οποίο και ενσωματώνουν συμβάλλοντας έτσι περαιτέρω στην αντιμικροβιακή αντοχή. Πολλά απο τα γονίδια ανθεκτικότητας βρίσκονται σε μεταφερόμενα πλασμίδια ή σε τρανσποζόνια τα οποία μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ διαφόρων βακτηρίων με τους μηχανισμούς της σύζευξης, μεταμόρφωσης και μεταγωγής. Μερικά τρανσποζόνια και πλασμίδια έχουν γενετικά στοιχεία που ονομάζονται αλληλουχίες ένθεσης (Insertion sequences, IS) και μπορούν να ενσωματώσουν εξωγενή γονίδια στο χρωμόσωμα των βακτηρίων.

Πιο συγκεκριμένα, τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκαλούνται απο σταφυλόκοκκο σε ζώα τα οποία σχετίζονται με την κτηνοτροφία είναι οι μακρολίδες και οι λινκοσαμίδες (12). Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια αναπτύσσουν αντοχή ενάντια σε αυτά είναι:

1. Τροποποίηση στόχου δράσης: Αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό αντοχής. Η τροποποίηση γίνεται μέσω τουλάχιστον 36 διαφορετικών rRNA μεθυλασών που κωδικοποιούνται απο τα γονίδια *erm*. Αυτά τα γονίδια έχουν εντοπιστεί σε πολλούς σταφυλόκοκκους και στρεπτόκοκκους καθώς και σε εντερόκοκκους. Ακόμα, το γονίδιο *cfp* κωδικοποιεί μια ασυνήθιστη rRNA μεθυλάση και προσδίδει έναν φαινότυπο αντοχής σε περισσότερα απο ένα αντιβιοτικά ταυτόχρονα.
2. Αντλίες εκκροής: Οι αντλίες αυτές κωδικοποιούνται απο τα γονίδια *mef* και *msr*. Τα γονίδια *mef* *Isa* προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες, ενώ το γονίδιο *Isa(C)* προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και την στρεπτογραμμίνη B. Άλλα γονίδια που κωδικοποιούν για αντλίες εκκροής είναι

τα *vga* γονίδια τα οποία έχουν βρεθεί σε στρεπτόκοκκους και εντερόκοκκους και προσδίδουν αντοχή σε λινκοσαμίδες και στρεπτογραμμίνη A.

3. Υδρολυτικά ένζυμα: Πρόκειται για έναν μηχανισμό κατά τον οποίο η απενεργοποίηση του αντιβιοτικού καταλύεται από φωσφορυλάσες, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mph* και προσδίδουν αντοχή μόνο στις μακρολίδες, τα γονίδια *lin* τα οποία προσδίδουν αντοχή στην λινκομυκίνη ή τρανσφεράσες οι οποίες συμβάλλουν στην αντοχή στην στρεπτογραμμίνη A. (12) (13).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου αντοχής *lnu(B)*, το οποίο ανιχνεύθηκε σε στέλεχος *S. aureus* ST398. Το γονίδιο *lnu(B)* κωδικοποιεί το ένζυμο νουκλεοτίδυλο-τρανσφεράση της λινκομυκίνης και καταλύει την αντίδραση προσθήκης ενός μορίου AMP στην 3' θέση της λινκομυκίνης

Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από ασθενή του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας το Μάρτιο του 2012. Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι το συγκεκριμένο στέλεχος εφερε το γονίδιο *lnu(B)* που του προσέδιδε αντοχή στη λινκομυκίνη και στην κλινταμυκίνη, χωρίς να εμφανίζει συνοδό αντοχή στην ερυθρομυκίνη. Το στέλεχος ήταν ευαίσθητο στην μεθικιλίνη (MSSA) και βάση της τυποποίησης πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST) χαρακτηρίστηκε ως ST398, τύπος που έχει συνδεθεί με την κτηνοτροφία και τις προκαλούμενες σε ζώα λοιμώξεις.

Αρχικά, καθώς το γονίδιο *lnu(B)* ήταν γνωστό από προηγούμενες δημοσιεύσεις, σχεδιάστηκαν εκκινητές και με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε primer walking sequencing για την αλληλούχιση της περιοχής ανοδικά και καθοδικά από το γονίδιο *lnu(B)*. Το τμήμα που αλληλουχήθηκε είχε άγνωστη προέλευση και έτσι δεν ήταν δυνατός ο σχεδιασμός εκκινητών για την μετέπειτα μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος του *lnu(B)*, διαπιστώθηκε όμως ότι παρουσίαζε ομοιότητες με κάποιο μεταθετό στοιχείο. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης. Αρχικά, επιλέχθηκαν περιοριστικά ένζυμα τα οποία αναγνώριζαν τμήματα του γονιδίου του σταφυλόκοκκου αφήνοντας ακέραια την περιοχή που είχε αλληλουχηθεί. Στην συνέχεια ακολούθησε στύπωμα κατά Southern, με την χρήση σημασμένων ανιχνευτών ώστε να εντοπιστούν κομμάτια του DNA που περιέχουν μέσα τμήμα των άκρων της γνωστής αλληλουχίας καθώς και το τμήμα που δεν είχε αλληλουχηθεί. Τα κομμάτια αυτά απομονώθηκαν και εισήχθησαν σε φορείς κλωνοποίησης και μετά από μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α και καλλιέργεια τους για τον εντοπισμό των βακτηριακών κλώνων που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, ακολούθησε δημιουργία γονιδιωματικών βιβλιοθηκών, ανίχνευση του κλώνου που περιέχει το προς μελέτη ένθεμα στην βιβλιοθήκη DNA (library screening), απομόνωση των πλασμιδίων και αλληλούχιση τους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ GRAM⁺ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

3.1.1.1 Υλικά

- T.E buffer: Tris-HCl 1M (pH 8.0), EDTA 0.5M, ddH₂O
- RNάση (20mg/ml)
- λυσοζύμη (200mg/ml)
- EDTA 0.25M
- CTAB 10%
- SDS 20%
- πρωτεΐνάση K (20mg/ml)
- NaCl 5M
- φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκόολη 25:24:1
- ισοπροπανόλη
- αιθανόλη 70%
- ddH₂O

3.1.1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Για κάθε 1 tube DNA γίνεται προετοιμασία 20ml υγρής καλλιέργειας απο το προηγούμενο βράδυ.
2. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρώνται τα 20 ml για 10 λεπτά στα 14.000 rpm.
3. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 500μl TE.
4. Προστίθεται 8μl λυσοζύμης και 2μl RNAάση
5. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 60 λεπτά στους 37° C
6. Προστίθεται 96μl EDTA και 64μl SDS
7. Προστίθεται 4μl πρωτεΐνάση K
8. Το μείγμα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37° C
9. Προστίθεται 72μl NaCl και 60μl CTAB
10. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στους 65° C
11. Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκόολη και ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση στο vortex μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιόμορφο γαλάκτωμα
12. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14.000 rpm σε 4° C

13. Το υπερκείμενο μεταφέρεται πολύ προσεκτικά σε καθαρό erppendorf και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκόολη και ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση στο vortex μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιόμορφο γαλάκτωμα
14. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14.000 rpm σε 4° C
15. Το υπερκείμενο μεταφέρεται πολύ προσεκτικά σε καθαρό erppendorf και προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Ακολουθεί αργή και ήπια ανάδευση μέχρι να σχηματιστούνε διαφανείς/άσπρες ινες (DNA). Ακολουθεί επώαση του μείγματος για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και για 15 λεπτά στους -80° C.
16. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στα 14.000 rpm σε 4° C
17. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και προστίθεται 700μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 14.000 rpm σε 4° C
18. Η αιθανόλη απορρίπτεται προσεκτικά έτσι ώστε να μην χαθεί το ίζημα και ακολουθεί ξήρανσή του σε κλίβανο στους 37° C. Έπειτα το ίζημα αναδιαλύεται σε 40μl ddH₂O για 16-18 ώρες στους 4° C.

3.1.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1983 από τον Kary Banks Mullis και εφαρμόζεται ευρέως στην μοριακή επιδημιολογία και στην διάγνωση. Πρόκειται για μια in vitro τεχνική, με τη βοήθεια της οποίας είναι εφικτός ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Το DNA του μικροβίου που θα μελετηθεί μπορεί να είναι καθαρό, δηλαδή να έχει προηγηθεί εξαγωγή του από τα μικροβιακά κύτταρα (DNA extraction). Η μέθοδος όμως διαθέτει μεγάλη ευαισθησία με αποτέλεσμα το DNA-στόχος να εντοπίζεται ακόμα και σε δείγματα με πολύ χαμηλή συγκέντρωση του στόχου.

Το δείγμα DNA αναμειγνύεται με τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές, primers), δηλαδή μικρά μονόκλωνα μόρια DNA που είναι συμπληρωματικά ως προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA-στόχου και την ειδική DNA πολυμεράση. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95° C για να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 50-65° C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72° C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετή ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος.

3.1.2.1 Υλικά

- DNA
- Taq πολυμεράση
- 10x Taq Buffer με KCl
- MgCl₂
- Μείγμα dNTPs
- ddH₂O
- Ζεύγος εκκινητών

3.1.2.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε σωληνάκι τύπου PCR προστίθενται:

| Αντιδραστήρια | Ποσότητα (μl) |
|-----------------------------|---------------|
| DNA | 2.5 |
| 10x Taq Buffer με KCl | 2.5 |
| Taq πολυμεράση (5u/μl) | 0.2 |
| Forward primer (25pmol/μl) | 0.25 |
| Reversed primer (25pmol/μl) | 0.25 |
| MgCl ₂ (25mM) | 1.5 |
| Μείγμα dNTPs (20mM) | 0.5 |
| ddH ₂ O | 17.3 |
| Τελικός όγκος | 25 |

Πίνακας 4

2. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή με βάση τις παρακάτω συνθήκες:

| | |
|-------------------|---------------|
| Αποδιάταξη | 94° C, 30sec |
| Αναδιάταξη | 56° C, 30sec |
| Επιμήκυνση | 72° C, 30 sec |
| Αριθμός κύκλων | 30 |
| Τελική επιμήκυνση | 72° C, 10min |

Πίνακας 5

Τα ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τους 2 ανιχνευτές είναι:

| | | |
|----------------------------|-------------|----------------------|
| Probe A (500bps) | 2_inv-Rc | CTCCCGCACCAGCCAGTCC |
| | OrfX_fw: | CGGGCATCCCCATGGTTATA |
| Probe B (800bps) | lnubI5 | CTTATATTGCCGGAATACGC |
| | Final7_rv : | TGTTGAAAATGCAGAGCGTG |

Πίνακας 6

3. Η αντίδραση επαναλήφθηκε 3 φορές ώστε ο τελικός όγκος των ανιχνευτών να είναι 75μl για επίτευξη μεγαλύτερης συγκέντρωσης προϊόντος.

3.1.2.3 Σημειώσεις

- ✓ Οι εκκινητές πρέπει να έχουν μήκος 18-24 νουκλεοτίδια, με 40-60% περιεκτικότητα σε G/C, χωρίς να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή στο 5' άκρο τους, χωρίς εσωτερικές παλίνδρομες αλληλουχίες και με παρόμοιες θερμοκρασίες Tm.

3.1.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ PCR ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ 'PURELINK PCR PURIFICATION KIT' (INVITROGEN)

3.1.3.1 Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης Buffer B2
- Wash Buffer W1
- ddH₂O
- Ισοπροπανόλη
- Σωληνάκια τύπου eppendorf
- Σωλήνες περισυλλογής PureLink
- Στήλες δέσμευσης DNA
- αιθανόλη 100%

3.1.3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης Buffer B2 με ισοπροπανόλη σε αναλογία 4:1 ως προς το προϊόν της PCR.
2. Στην συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται σε μία στήλη δέσμευσης του DNA η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής και φυγοκεντρείται σε ταχύτητα πάνω από 10.000g για 1 λεπτό. Απορρίπτεται το έκλουσμα.
3. Η στήλη τοποθετείται σε ένα καινούργιο σωλήνα περισυλλογής και προστίθενται σε αυτή 650μL Wash Buffer W1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στα 10.000g για 1 λεπτό. Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη επανατοποθετείται στον ίδιο σωλήνα περισυλλογής και ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση της στήν μέγιστη ταχύτητα για να απομακρυνθούν τυχόν υπολλέματα του Wash Buffer.

4. Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf και έπειτα προστίθενται στο κέντρο της στήλης 50μl ddH₂O, ώστε η στήλη να διαβραχεί και να αποδεσμευτεί ολόκληρη η ποσότητα του DNA.
5. Η στήλη επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρείται για 4 λεπτά σε ταχύτητα μεγαλύτερη απο 10.000g.
6. Τα καθαρισμένα προϊόντα μπορούν να αποθηκευτούν στους 4° C ή στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν, ενώ μια μικρή ποσότητα (1μl) μπορεί να ηλεκτροφορηθεί όπως περιγράφηκε παραπάνω για ποσοτικοποίηση και έλεγχο της ποιότητας του προϊόντος.

3.1.4 ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και τέμνουν κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA. Λόγω του επαναλήψιμου τρόπου πέψης, τα ένζυμα αυτά επιτρέπουν α) την σηματοδότηση οποιασδήποτε αλληλουχίας DNA (χαρτογράφηση), β) την πέψη (τεμαχισμό) της αρχικής αλληλουχίας DNA σε μικρά τμήματα τα οποία είναι δυνατόν να μελετηθούν χωριστά και γ) την επανασύνδεση των τμημάτων αυτών και την επανασυγκρότηση της αρχικής αλληλουχίας. Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς την θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας.

3.1.4.1 Υλικά

- Γονιδιωματικό DNA
- EcoRV (NEB)
- HincII
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)
- ddH₂O

3.1.4.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 2 σωληνάκια τύπου erpendorf ετοιμάστηκαν οι αντιδράσεις των πέψεων του γονιδιωματικού DNA με τα ένζυμα EcoRV και HincII αντίστοιχα.
2. Σε κάθε σωληνάκι προστέθηκαν 25μl DNA (0.5μg/μl), ένζυμο, 1x buffer του ενζύμου και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 200μl.
3. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του μείγματος και επώαση στους 37° C για 16-18 ώρες
4. Τα προϊόντα των πέψεων έπειτα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20° C (εκτός και αν πρέπει να ακολουθήσει απενεργοποίηση του ενζύμου) ή να κατακρημνιστούν ώστε να μειωθεί ο όγκος τους και να ηλεκτροφορηθούν για περαιτέρω επεξεργασία.

3.1.5 ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΨΕΩΝ

3.1.5.1 Υλικά

- CH₃COONa 3M
- Ισοπροπανόλη
- Προϊόντα αντίδρασης πέψης
- Γλυκογόνο
- Αιθανόλη 70%
- ddH₂O

3.1.5.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε ένα σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται: 200μl προϊόντων πέψης, 20μl CH₃COONa, 220 μl ισοπροπανόλης και 0.5 μl γλυκογόνο
2. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά έως 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Το μείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 13.400rpm.
4. Απορρίπτεται το υπερκείμενο
5. Έπειτα, προστίθονται 500μl αιθανόλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά 13.400rpm.
6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά έτσι ώστε να μην χαθεί το ίζημα και ακολουθεί ξήρανσή του σε κλίβανο στους 37° C. Έπειτα το ίζημα αναδιαλύεται σε 20μl ddH₂O για 16-18 ώρες στους 4° C.

3.1.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση DNA μορίων. Μόρια DNA μεγέθους 200 b έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα του πηκτώματος, το DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, κινείται προς την άνοδο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του μοριακού του βάρους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Το DNA γίνεται ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA

3.1.6.1 Υλικά

- 0.5X TBE
- Δείγματα DNA
- Μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (1kb, Blue DNA ladder, GeneOn)
- Διάλυμα χρωστικής-Gel loading Buffer (Invitrogen)
- Αγαρόζη

3.1.6.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 100 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης (0,5X TBE) διαλύεται με θέρμανση στους 100° C η αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης (1gr για gel ηλεκτροφόρησης με συγκέντρωση 1%).
2. Στο διάλυμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml.
3. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος κατέβει στους 50° C, το διάλυμα τοποθετείται στα ειδικά εκμαγεία ηλεκτροφόρησης.
4. Πριν το διάλυμα πήξει, τοποθετούνται σε αυτό τα χτενάκια ηλεκτροφόρησης, τα οποία θα επιτρέψουν το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα (πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης), όταν το πήκτωμα στερεοποιηθεί.
5. Το πήκτωμα αφήνεται να πήξει καλά για τουλάχιστον 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Στα δείγματα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye, Invitrogen), το οποίο περιέχει και γλυκερόλη. Το διάλυμα αυτό επιτρέπει στο DNA να τοποθετηθεί στα πηγαδάκια και να μην διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ η χρωστική επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.
7. Σε ένα από τα πηγαδάκια τοποθετείται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (Ladder).
8. Το πήκτωμα τοποθετείται στις ειδικές οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης, οι οποίες γεμίζονται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0,5X TBE.
9. Οι παράμετροι της ηλεκτροφόρησης ρυθμίζονται ως εξής: η τάση στα 120V περίπου και το ρεύμα στα 45 mA περίπου.

3.1.6.3 Σημειώσεις

- ✓ Το διάλυμα χρωστικής περιέχει κυανό της ξυλόλης, μπλε της βρωμοφαινόλης, γλυκερόλη και dH₂O. Το μπλέ της βρωμοφαινόλης και το κυανό της ξυλόλης είναι χρωστικές ιχνηλασιμότητας που επιτρέπουν την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης και η γλυκερόλη αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων και διευκολύνει την είσοδο τους στα «πηγαδάκια».

3.1.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ: PURELINK QUICK GEL EXTRACTION KIT (INVITROGEN)

3.1.7.1 Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης στην μεμβράνη Buffer L3
- Wash Buffer W1
- ddH₂O
- αιθανόλη 100%
- σωληνάκια τύπου eppendorf

- σωλήνες περισυλλογής
- Στήλες δέσμευσης DNA

3.1.7.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αποκόπτεται η ζώνη του πηκτώματος που αντιστοιχεί στο επιθυμητό τμήμα DNA και τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf.
2. Προσδιορίζεται το βάρος και έπειτα προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης στην μεμβράνη (Buffer) L3 σε αναλογία 3:1 για πηκτώματα με συγκέντρωση αγαρόζης μικρότερη από 2%.
3. Το μείγμα επωάζεται στους 50° C για 10 λεπτά με ταυτόχρονη ανάδευση ανα τακτά χρονικά διαστήματα μέχρις ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα. Ακολουθεί δεύτερη επώαση για 5 λεπτά.
4. Ακολούθως το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη η οποία τοποθετείται σε έναν σωλήνα συλλογής και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα 12.000g
5. Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα έκλουσης
6. Προστίθενται 500 μl Wash Buffer W1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000g για 1 λεπτό. Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται πάλι στον σωλήνα συλλογής.
7. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση προς απομάκρυνση της αιθανόλης και ο σωλήνας συλλογής απορρίπτεται μαζί με το έκλουσμα.
8. Η στήλη τοποθετείται σε ένα καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf και
9. Έπειτα προστίθενται στο κέντρο της στήλης 50μl ddH₂O, ώστε η στήλη να διαβραχεί και να αποδεσμευτεί ολόκληρη η ποσότητα του DNA.
10. Η στήλη επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε ταχύτητα μεγαλύτερη από 12.000g.
11. Το απομονωθέν DNA αποθηκεύεται στους 4° C ή στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

3.2 ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ SOUTHERN

Το φαινόμενο της υβριδοποίησης, δηλαδή της δυνατότητας ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος να σχηματίζει δίκλωνη έλικα με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο, αποτελεί την βάση της τεχνικής της υβριδοποίησης κατά Southern. Η υβριδοποίηση κατά Southern φέρει το όνομα του E. M. Southern που την ανέπτυξε και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών σε δείγμα DNA.

Η διαδικασία εμπερικλείει τα εξής στάδια:

1. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίηση του σε νάυλον μεμβράνη
2. Σήμανση του ανιχνευτή
3. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή
4. Ανίχνευση του σήματος

3.2.1 Υλικά

- HCl 0.2 M
- Διάλυμα αποδιάταξης: NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M
- Διάλυμα εξουδετέρωσης: NaCl 1.5 M, Tris/HCl 0.5 M
- 10x SSC
- 20x SSC: 175,3gr NaCl, 88,2gr Na₃citrate
- Διάλυμα προϋβριδοποίησης: 0.5% SDS, 6x SSC, 5x Denharts
- Διάλυμα Denharts 50x: 1% PVP, 1% BSA, 1% φικόλλη
- ssDNA (salmon sperm DNA): 10mg/ml
- Διάλυμα wash 1: 2x SSC, 0.1% SDS
- Διάλυμα wash 2: 0.2x SSC, 0.1% SDS
- Διάλυμα A: 0.1M Tris/HCl pH 7.5, NaCl 0.15M
- Διάλυμα Blocking: 10gr αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη σε 100ml διαλύματος A
- Διάλυμα B 1x: Διάλυμα A, 1% διάλυμα Blocking
- Διάλυμα C: 0.1M Tris/HCl pH 9.5, NaCl 0.1M, MgCl₂ 0.05M
- Διάλυμα εμφάνισης: 50μl NBT και 37.5μl BCIP σε 10ml διαλύματος C
- Αντίσωμα στρεπταβιδίνης (Invitrogen)
- Μείγμα μή-σημασμένων νουκλεοτιδίων
- Βιοτυνλιωμένο δεοξυνουκλεοτίδιο (Biotin-11-dUTP)
- Klenow DNA πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης με τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινήτες (Fermentas)
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- CH₃COONa 3M

3.2.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

3.2.2.1 Μεταφορά του DNA και σταθεροποίηση του σε νάυλον μεμβράνη

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης (όπως έχει περιγραφεί παραπάνω), το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται, αφού έχει τοποθετηθεί κατά μήκος του χάρακα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με την εικόνα του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε.
2. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο όπου επωάζεται για 10 λεπτά σε διάλυμα HCl 0.2 M υποανάδευση σε χαμηλή ταχύτητα

3. Στην συνέχεια το διάλυμα αποχύνεται και το πήκτωμα ξεπλένεται με διάλυμα αποδιάταξης
4. Ακολουθεί επώαση του πηκτώματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα αποδιάταξης υπο ανάδευση
5. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4
6. Το διάλυμα αποδιάταξης αποχύνεται, προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης και ακολουθεί επώαση 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
7. Το διάλυμα εξουδετέρωσης αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 6.
8. Το διάλυμα εξουδετέρωσης αποχύνεται και προστίθεται διάλυμα 10x SSC. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
9. Το πήκτωμα στην συνέχεια τοποθετείται σε γέφυρα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM του οποίου οι άκρες εμβαπτίζονται σε 10x SSC
10. Η μεμβράνη, με διαστάσεις λίγο μικρότερες από το πήκτωμα, διαβρέχεται πρώτα με ddH₂O και έπειτα με 10x SSC και στην συνέχεια τοποθετείται πάνω στο πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ του πηκτώματος και της μεμβράνης.
11. 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, με διαστάσεις ίδιες με της μεμβράνης, διαβρέχονται με 10x SSC και τοποθετούνται πάνω από την μεμβράνη και ακολουθούν 2 επιπλέον στεγνά φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 5mm. Στην κορυφή τοποθετείται βάρος περίπου 500gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
12. Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 16-18 ώρες, οπότε αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman 3MM και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέσης των πηγαδιών.
13. Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80° C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA.

3.2.2.2 Σήμανση ανιχνευτή

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλωνα μόρια τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι σημασμένα οπότε μπορούν να εντοπίζονται. Η μεγάλη εξειδίκευση της αντίδρασης υβριδοποίησης ανάμεσα στο μόριο ανιχνευτή και τις αναζητούμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων επιτρέπει τον εντοπισμό τους ακόμα και αν στο κύτταρο ή στο διάλυμα περιέχονται εκατομμύρια διαφορετικών αλληλουχιών DNA ή RNA. Η σήμανση των διαφόρων τύπων ανιχνευτών πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων ή ριβονουκλεοτιδίων, εάν πρόκειται για DNA ή RNA ανιχνευτές αντίστοιχα, είτε κατά τη διαδικασία παραγωγής των ανιχνευτών (μέθοδος τυχίων εκκινήτων), είτε μετά την παραγωγή τους (σήμανση στο 5' ή 3' άκρο του ανιχνευτή). Η σήμανση των νουκλεοτιδίων μπορεί να γίνει είτε με ραδιενέργεια (³²P, ³⁵S, ³H) ή με μη ραδιενεργούς σημαντές [βιοτίνη (BIO), διγοξιγενίνη (DIG)]. Οι μή ραδιενεργοί σημαντές παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο επικίνδυνοι για την υγεία και

επιπλέον μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία -20°C και να είναι διαθέσιμοι προς χρήση για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

1. Σε σωληνάκι τύπου erppendorf τοποθετείται το προϊόν της PCR το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως αλληλουχία-ανιχνευτής, μετά απο καθαρισμό, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης σε τελική συγκέντρωση 1x και ddH₂O.
2. Το μείγμα επωάζεται για 10 λεπτά με θέρμανση στους 100°C για να αποδιαταχθεί, έπειτα ψύχεται στον πάγο για 1 λεπτό και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
3. Προστίθεται Biotin-11-dUTP, μείγμα μή σημασμένων νουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP) και η KlenowDNA πολυμεράση
4. Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται για 16-18 ώρες στους 37°C .
5. Ακολουθεί κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη/ CH₃COONa/ αιθανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH₂O.

3.2.2.3 Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή

1. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης με το DNA να βρίσκεται προς το εσωτερικό του σωλήνα και στην συνέχεια προστίθεται το διάλυμα προϋβριδοποίησης στο οποίο έχει προστεθεί το ssDNA.
2. Ο σωλήνας τοποθετείται σε ειδικό θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται για 2 ώρες στους 65°C υπο στροφή.
3. Το διάλυμα προϋβριδοποίησης μεταφέρεται απο τον κύλινδρο σε σωλήνα τύπου falcon και προστίθεται σε αυτό ο ανιχνευτής.
4. Ο σωλήνας μεταφέρεται στον θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται περιστρεφόμενος για 16-18 ώρες στους 65°C .

3.2.2.4 Εμφάνιση σήματος

1. Το διάλυμα υβριδοποίησης το οποίο περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C , έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί.
2. Η μεμβράνη στην συνέχεια τοποθετείται σε ειδικό δοχείο το οποίο περιέχει το διάλυμα wash 1 και επωάζεται υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
3. Το διάλυμα wash 1 απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 2.
4. Το διάλυμα wash 1 απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα wash 2.
5. Η μεμβράνη επωάζεται στους 65°C υπο ανάδευση για 20 λεπτά.
6. Το διάλυμα wash 2 απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 5.

7. Το διάλυμα wash 2 απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα A
8. Η μεμβράνη επωάζεται για 2 λεπτά υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Το διάλυμα A απορρίπτεται και προστίθεται το διάλυμα B1x
10. Η μεμβράνη επωάζεται για 30 λεπτά υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Το διάλυμα B1x απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα B το οποίο περιέχει στρεπταβιδίνη και αλκαλική φωσφατάση.
12. Η μεμβράνη επωάζεται για 30 λεπτά υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Το διάλυμα B1x με το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης και αλκαλικής φωσφατάσης συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία +4 ° C, έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί.
14. Στο ειδικό δοχείο προστίθεται διάλυμα A και η μεμβράνη επωάζεται για 15 λεπτά υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Το διάλυμα A απορρίπτεται και στην συνέχεια προστίθεται διάλυμα C και η μεμβράνη εξισσοροπείται για 2 λεπτά υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με κάλυψη της μεμβράνης με φρέσκο εμφάνισης το οποίο περιέχει 50μl NBT και 37.5μl BCIP ανά 10ml διαλύματος C.
17. Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με ddH₂O.

3.2.2.5 Σημειώσεις

- ✓ Ο χειρισμός των μεμβρανών πρέπει να γίνεται με γάντια και με ειδικές λαβίδες τύπου Millipore με πεπλατυσμένα άκρα.
- ✓ Όταν τα προς εξέταση τμήματα DNA υπερβαίνουν τις 15kb σε μέγεθος, το πήκτωμα επωάζεται σε 0.2M HCl όπως έγινε στο βήμα 2 ώστε να επέλθει μερική υδρόλυση του DNA και να διευκολυνθεί η μεταφορά των θραυσμάτων DNA.
- ✓ Για την επαλήθευση της σήμανσης των ανιχνευτών, πραγματοποιήθηκε πριν την χρήση τους δοκιμαστική υβριδοποίηση τους σε νάυλον μεμβράνη χωρίς DNA σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις και εμφάνιση του σήματος (spotting)
- ✓ Το ssDNA πριν την χρήση του θερμαίνεται στους 100 ° C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
- ✓ Ο ανιχνευτής πριν την χρήση του θερμαίνεται στους 100 ° C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.

3.3 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

3.3.1 Υλικά

- pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/ul)
- 2x Reaction Buffer
- T4 DNA ligase
- DNA blunting enzyme
- pJET 1.2 Forward Sequencing Primer, 10uM aqueous solution
- pJET 1.2 Reverse Sequencing Primer, 10uM aqueous solution
- Control PCR product
- ddH₂O
- δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α
- Lysogeny Broth (LB)

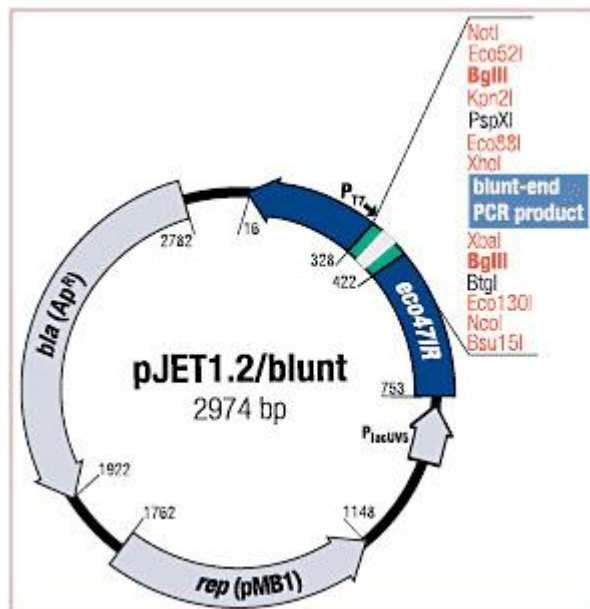
3.3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

Η βασική διαδικασία κλωνοποίησης περιλαμβάνει πέντε στάδια, που στην περίπτωση των πλασμιδιακών φορέων συνοψίζονται ως εξής:

- α) επιλογή τού προς κλωνοποίηση τμήματος DNA και δημιουργία κατάλληλων άκρων για ένθεση στο φορέα που φέρει τα αντίστοιχα άκρα,
- β) σύνδεση του DNA στο φορέα,
- γ) μετασηματισμό βακτηρίων με εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα,
- δ) πολλαπλασιασμός των βακτηριακών κυττάρων
- ε) ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων

3.3.2.1 Φορέας

Στο συγκεκριμένο πείραμα μετά από πέψεις του γονιδιωματικού DNA με τα ένζυμα EcoRV και HincII όπως περιγράφηκε παραπάνω, τα προϊόντα της πέψης κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pJET1.2/blunt Cloning Vector με τυφλά άκρα (Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του φορέα είναι ότι περιέχει ένα θανατηφόρο γονίδιο του οποίου η αλληλουχία διακόπτεται όταν το προς μελέτη τμήμα DNA εισαχθεί στον φορέα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, την ανάπτυξη μόνο των κυττάρων στα οποία εισήχθει το DNA, αποφεύγοντας έτσι το κλασσικό blue/white screening.



Εικόνα 1: Φορέας pJET 1.2/blunt

3.3.2.2 Αντίδραση σύνδεσης

Η κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA επιτυγχάνεται *in vitro* με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (ligase). Η λιγάση καταλύει την ομοιοπολική σύνδεση μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών των 5' φωσφορικών ομάδων(5'-P) και των 3' υδροξυλομάδων(3'-OH) τμημάτων DNA με προεξέχοντα ή τυφλά άκρα. Στην κλωνοποίηση, η αντίδραση σύνδεσης (ligation) χρησιμοποιείται για την ένθεση τμημάτων DNA (προϊόντων ενζυμικής πέψης ή PCR) σε πλασμιδιακούς φορείς με σκοπό το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων. Κατά τη διάρκειά της τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA όσο και τα πλασμίδια εμφανίζουν τάση επανακυκλοποίησης προς τον σχηματισμό τυχαίων ολιγομερών. Για το λόγο αυτό ο μοριακός τους λόγος που εκφράζεται ως η αναλογία των μορίων μεταξύ της αλληλουχίας που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και του πλασμιδιακού φορέα πρέπει κυμαίνεται από 1:1 έως 3:1 και ο υπολογισμός της ποσότητας του ενθέματος γίνεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{ng DNA} = \frac{\text{ng πλασμιδίου} \times \text{μέγεθος DNA} \times \text{μοριακός λόγος}}{\text{μέγεθος πλασμιδίου}}$$

1. Σε σωληνάκι τύπου erppendorf προστίθενται διαδοχικά: 2x Reaction Buffer, blunting enzyme, DNA απο τα προϊόντα των πέψεων και ddH₂O ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση δημιουργίας τυφλών άκρων στο προς μελέτη τμήμα DNA. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά στους 70° C.



2. Έπειτα προστίθεται 50 ng πλασμιδιακού φορέα, 5 unit T4 λιγάσης και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στους 22° C.
3. Το ανασυνδρασμένο πλασμίδιο πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων ή να αποθηκευτεί στους -20° C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

3.3.2.3 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

1. Σε προαποθηκευμένα κύτταρα *E. coli* DH5a εμβαπτίζεται ένας αποστειρωμένος μικροβιολογικός κρίκος και έπειτα εμβολιάζεται σε τρυβλίο με LB άγαρ και επωάζεται για 16 ώρες στους 37° C.
2. Απομονώνεται μια αποικία κυττάρων και έπειτα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου falcon με 5ml LB Broth. Επωάζεται υπο ανάδευση στα 210rpm στους 37° C για 16 ώρες.
3. Η καλλιέργεια μεταφέρεται έπειτα σε κωνική φιάλη με υγρό LB Broth (300ml) και επωάζεται στους 37° C υπό ανάδευση στα 210rpm ώσπου η τιμή της οπτικής πυκνότητας να είναι 0.45-0.60
4. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε προπαγωμένους σωλήνες τύπου falcon 50 ml και διατηρείται στον πάγο για περίπου 10 λεπτά για αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων
5. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 4000g για 10 λεπτά στους 4° C
6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται ήπια σε προψυγμένο ddH₂O (50ml/falcon)
7. Το εναώρημα φυγοκεντρείται σε 4000g για 10 λεπτά στους 4° C
8. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 6 και 7
9. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4ml/falcon) και φυγοκεντρώνται σε 4000g για 10 λεπτά στους 4° C
10. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (250μl/falcon) και φυγοκεντρώνται σε 4000g για 10 λεπτά στους 4° C
11. Το κυτταρικό εναώρημα μοιράζεται σε κλάσματα των 40μl σε προψυγμένα erppendorf
12. Τα κλάσματα διατηρούνται σε θερμοκρασία -80° C

3.3.2.4 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

1. Κλάσμα 40μl δεκτικών κυττάρων DH5a διατηρημένο στους -80° C, τήκεται σε πάγο
2. Ποσότητα ανασυνδρασμένου DNA αναμειγνύεται με τα δεκτικά κύτταρα DH5a και επωάζεται σε πάγο για 30-60 δευτερόλεπτα.
3. Το μείγμα μεταφέρεται σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα διαμέτρου 0.2cm η οποία τοποθετείται στην ειδική θέση υποδοχής της συσκευής ηλεκτροδιάτρησης
4. Στην συνέχεια εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός έντασης 13.8 kv/cm και διάρκειας 5-6 δευτερολέπτων.
5. Αμέσως προστίθεται 1ml διαλύματος υγρού θρεπτικού SOC, το μείγμα μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου falcon και επωάζεται υπο ήπια ανάδευση (180rpm) στους 37° C για 1 ώρα

6. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλίο που περιέχει στερεό θρεπτικό μέσο LB άγαρ.
7. Το τρυβλίο επωάζεται στους 37° C

3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΛΥΣΗ (MINI PREPS)

3.4.1 Υλικά

- GET: 50mM Glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA (pH 8.0)
- CH₃COOK: 5M potassium acetate, glacial acetic acid, H₂O (pH 4.8)

3.4.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf 1.5ml μεταφέρονται οι αποικίες της κορεσμένης βακτηριακής καλλιέργειας
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 3000rpm. Αφαιρείται όσο περισσότερο γίνεται απο το υπερκείμενο και το ίζημα διατηρείται στον πάγο.
3. Προστίθενται 100μl παγωμένου διαλύματος GET, αναδιαλύεται το ίζημα. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση με vortex επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προστίθενται 200μl διαλύματος Alkali. Το μείγμα αναδεύεται αναποδογυρίζοντας το erpendorf 5 φορές και στην συνέχεια επωάζεται για 3-5 λεπτά στον πάγο.
5. Προστίθενται 150μl παγωμένου διαλύματος CH₃COOK. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και επώαση στον πάγο για 8-10 λεπτά
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 13.500rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι
7. Προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και το μείγμα αναδεύεται έντονα και έπειτα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 13.500rpm. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
9. Προστίθεται μισός όγκος αιθανόλης 70%, το μείγμα αναδεύεται και έπειτα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 13.500rpm.
10. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει. Έπειτα αναδιαλύεται σε 50μl TE-RNάσης ή ddH₂O

3.4.3 Σημειώσεις

- ✓ Το GET περιέχει γλυκόζη η οποία διατηρεί το διάλυμα ισοτονικό ώστε να μην σπάσουν οι μεμβράνες
- ✓ Το διάλυμα Alkali περιέχει NaOH το οποίο δημιουργεί ανοίγματα στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να εξαχθεί το πλασμιδιακό DNA αλλά όχι το χρωμοσωμικό.
- ✓ Το CH₃COOK σταματά την λύση των κυττάρων και αντιδρά με το NaOH.

3.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ (LIBRARY SCREENING)

Η διαλογή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης επιτρέπει την απομόνωση επιθυμητών αλληλουχιών που έχουν κλωνοποιηθεί. Η διαδικασία συνίσταται στη μεταφορά σε μεμβράνη των βακτηριακών αποικιών που έχουν δημιουργηθεί σε στερεό υπόστρωμα και ακολούθως στον επιλεκτικό εντοπισμό συγκεκριμένων αποικιών με χρήση κατάλληλα σημασμένων ανιχνευτών μέσω της τεχνικής της υβριδοποίησης. Τελικά οι μεμονωμένες-θετικές μετά την ανίχνευση αποικίες συλλέγονται από το τρυβλίο και το βακτηριακό εναιώρημα που προκύπτει μετά από καλλιέργεια τους σε υγρό θρεπτικό υλικό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για την απομόνωση του επιθυμητού τμήματος της βιβλιοθήκης. Αν δεν είναι εφικτή η συλλογή μεμονωμένης αποικίας μετά τη διαλογή, τότε συλλέγεται ως ευρύτερη περιοχή που περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές αποικίες και ποσότητα του εναιωρήματος επαναεπιστρώνεται για δεύτερη διαλογή (secondary screening). Η τεχνική ακολουθεί τα ίδια στάδια με την ανάλυση κατά Southern, όσον αφορά την υβριδοποίηση και την ανίχνευση του σήματος, με μόνη διαφορά τη διαδικασία μεταφοράς σε μεμβράνη. Η διαδικασία αφορά στη δημιουργία ενός αντιγράφου της κατανομής των αποικιών μετά από επίστρωση μετασηματισμένων βακτηρίων σε στερεό υπόστρωμα. Οι αποικίες μεταφέρονται μέσω τριχοειδών φαινομένων στη μεμβράνη, η οποία ακολούθως επώάζεται σε αλκαλικό διάλυμα με σκοπό την αποδιάταξη του βακτηριακού DNA. Παράλληλα, το αρχικό τρυβλίο διατηρείται στους 37° C με αποτέλεσμα οι αποικίες να συνεχίσουν την αναπτυξή τους. Τελικά το DNA σταθεροποιείται στη μεμβράνη με ξήρανση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στη διαδικασία υβριδοποίησης.

3.5.1 Υλικά

- 6x SSC
- Whatman 3MM
- Νάυλον μεμβράνη
- διάλυμα αποδιάταξης
- διάλυματος εξουδετέρωσης
- 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)
- 2x SSC

3.5.2 Πειραματικό πρωτόκολλο: Διαδικασία μεταφοράς σε μεμβράνη

1. Το τρυβλίο της στερεής καλλιέργειας των μετασηματισμένων βακτηρίων που πρόκειται να σαρωθεί παραμένει σε θερμοκρασία 4°C για τουλάχιστον 2 ώρες πριν τη χρήση του. Σε θερμοκρασία 4°C η αгарόζη στερεοποιείται πλήρως και αποφεύγεται η αποκόλληση και επομένως η μεταφορά της στη μεμβράνη.
2. Η μεμβράνη, της οποίας οι διαστάσεις καθορίζονται όσο οι αντίστοιχες του τρυβλίου, τοποθετείται στην επιφάνειά του στερεού μέσου ανά πλευρά της επιφάνειας του πηκτώματος, αφού διαβραχεί διαδοχικά με ddH₂O και με διάλυμα 6X SSC. Κατά τη τοποθέτησή της, αρχικά η μεμβράνη εφάπτεται στο κέντρο του

- τρυβλίου και καθώς διαβρέχεται προοδευτικά καλύπτει και την υπόλοιπη περιφέρεια, αποφεύγοντας τη δημιουργία κενών μεταξύ υπερκείμενης αγαρόζης και μεμβράνης που παρεμποδίζουν τη μεταφορά του DNA.
3. Η μεμβράνη διατηρείται στην επιφάνεια του τρυβλίου για 2 λεπτά μέχρι να διαβραχεί πλήρως. Στη διάρκεια αυτή σημειώνεται ο προσανατολισμός της ως προς το τρυβλίο petri δημιουργώντας ασύμμετρους πόρους (τρυπήματα) σε μη αντιδιαμετρικά περιφερειακά σημεία της, μέσω διείσδυσης αποστειρωμένης βελόνας. Ο καθορισμός του προσανατολισμού απαιτείται ώστε να είναι εφικτός ο εντοπισμός των πλακών που αντιστοιχούν στα θετικά σήματα της υβριδοποίησης και κατ'έκταση η απομόνωσή τους.
 4. Ακολούθως η μεμβράνη μεταφέρεται ανεστραμμένη στην επιφάνεια διαλύματος αποδιάταξης για 2 min. Η αναστροφή της μεμβράνης περιορίζει την άμεση επαφή των αποικιών με το διάλυμα αποδιάταξης και επομένως διατηρείται η ακεραιότητα του DNA.
 5. Στη συνέχεια μεταφέρεται κατά τον ίδιο τρόπο στην επιφάνεια διαλύματος εξουδετέρωσης για 5 min.
 6. Ακολουθεί έκπλυση για διάστημα μικρότερο των 30 sec σε διάλυμα που περιέχει 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5) και 2X SSC.
 7. Τέλος η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 h και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί για ανάλυση κατα Southern όπως περιγράφηκε παραπάνω.

3.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Μετά απο δεύτερη διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και απομόνωση μόνο των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, αυτά αποστέλλονταν σε ειδικό τμήμα του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για αλληλούχιση με την μέθοδο Sanger. Για κάθε αλληλούχιση αποστέλλονταν 10μl DNA (100ng/ μl) και 20μl απο έναστο εκκινητή σε συγκέντρωση 5pmol/μl.

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| Final1_rv : | TTA-AAA-GGG-ACA-TAG-TTC-CG |
| pJET 1.2 Reverse Sequencing Primer | 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3' |
| T7 universal primer | TAATACGACTCACTATAGGG |
| M13 reverse sequencing primer: (-48) | AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA |

Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση

3.7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA

Έπειτα οι αλληλουχίες υποβάλλονταν σε μελέτη με το πρόγραμμα BLAST.

Οι συγκρίσεις με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της GeneBank πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των προγραμμάτων της οικογένειας BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), που είναι διαθέσιμα στο δικτυακό τόπο του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) και συγκεκριμένα του προγράμματος BLASTN.

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης με το εν λόγω πρόγραμμα απεικονίζεται από το λογισμικό BLAST με τη μορφή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (BLAST hits) στοιχισμένων με την αλληλουχία που αποτελεί το ερώτημα (Query) της σύγκρισης. Επιπλέον, αναφέρεται το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ του κάθε BLAST hit και της αλληλουχίας Query, καθώς και η τιμή E, η οποία εκφράζει την στατιστική σπουδαιότητα κάθε στοίχισης, δηλαδή την πιθανότητα η στοίχιση να είναι τυχαία.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ

Το στέλεχος *S. aureus* απομονώθηκε μετά απο καλλιέργεια δείγματος πύου απο το κάτω ακρο ασθενούς 43 ετών απο το Ανθηρό Καρδίτσας, ο οποίος προσήλθε στην Αγγειοχειρουργική κλινική ωστε να υποβληθεί σε ακρωτηριασμό του τρίτου δακτύλου του αριστερού ποδιού.

Στην συνέχεια το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε βρέθηκε ότι με βάση την τυποποίηση πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST) ανήκει στο κλωνικό σύμπλεγμα CC398 και συγκεκριμένα στον τυπο ST398. Τα στελέχη του κλωνικου συμπλέγματος αυτού, σχετίζονται και έχουν μελετηθεί επισταμένως κυρίως λόγω της συνδεσής τους με την κτηνοτροφία (Livestock-associated, LA-MRSA). Συνήθως παρουσιάζουν αντοχή στη μεθικιλίνη και την τετρακυκλίνη ανήκοντας έτσι στην κατηγορία των MRSA-Tet^R στελεχών (14). Το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος παράλα αυτά είναι ευαίσθητο στην μεθικιλίνη, παρουσιάζει αντοχή ως προς την τετρακυκλίνη φέροντας το γονίδιο *tet(M)* και παράλληλα φέρει το γονίδιο *lnu(B)* το οποίο του προσδίδει αντοχή σε λινκομυκίνη-κλινδαμυκίνη.

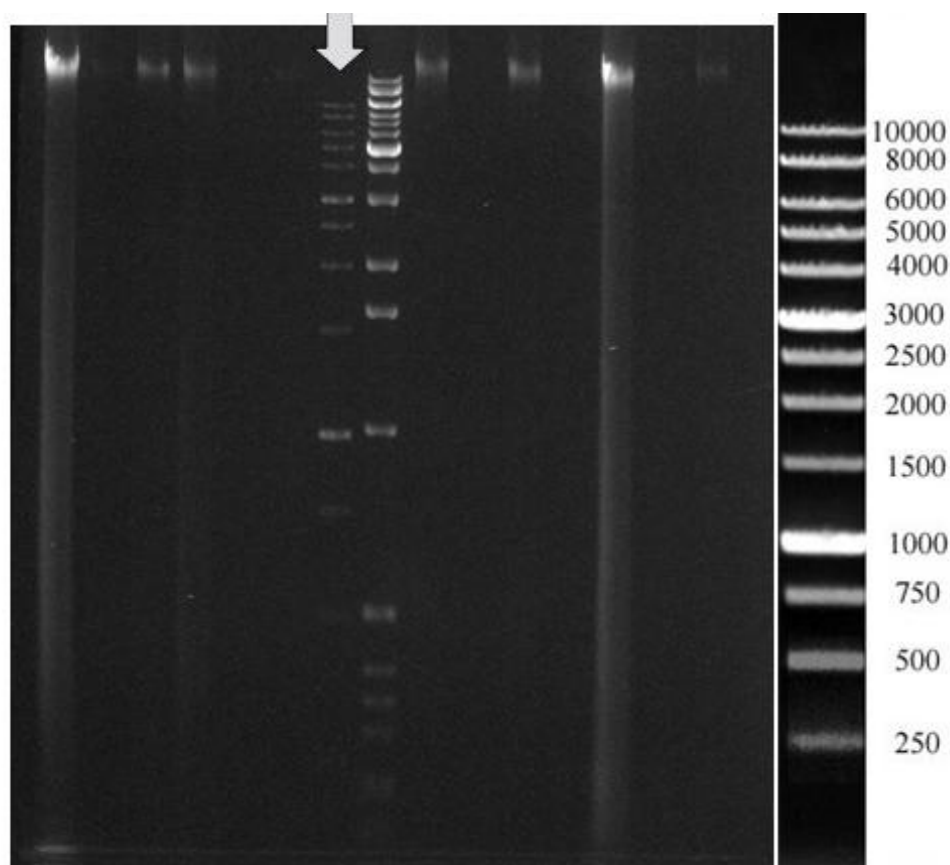
Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το γονίδιο *lnu(B)* σπάνια εμφανίζεται σε σταφυλόκοκκους και κυρίως έχει ανιχνευθεί σε στελέχη του *Enterococcus faecalis* (15) και *Streptococcus agalactiae* (16). Σε στελέχη MRSA ST398 στα οποία έχει αναφερθεί να εντοπίστηκε το γονίδιο *lnu(B)*, ο εντόπισμός του έγινε σε ένα μεγάλο μεγέθους πλασμίδιο, ενώ στα MSSA στελέχη ήταν ενσωματωμένο στο χρωμοσωμικό DNA του σταφυλόκοκκου (15).

Από τον έλεγχο και σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες, το στέλεχος παρουσιαζε το παρακάτω αντιβιογραμμα:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|--------------|---|------------------|---|----------|---|------------|---|------------------|---|-------------|---|------------|---|----------------|---|-------------|---|-----------|---|--------------|---|------------|---|--------------|---|------------|---|----------|---|-------|---|--------------|---|-----------|---|--------------|---|-----------|---|----------------|---|---------------|---|------------|---|-------------|--|--------------|--|-------------|--|------------|--|-----|--|------------|--|
| Ampicillin | | Azithromycin | | Benzylpenicillin | | cefaclor | | cefotaxime | | cefoxitin screen | | ceftriaxone | | cefuroxime | | clarithromycin | | clindamycin | | daptoycin | | erythromycin | | fosfomycin | | fusidic acid | | gentamycin | | imipenem | | IML58 | | levofloxacin | | linezolid | | moxifloxacin | | mupirocin | | nitrofurantoin | | oxacillin MIC | | rifampicin | | teicoplanin | | tetracycline | | tigecycline | | tobramycin | | SXT | | vancomycin | |
| R | S | R | S | S | S | neg | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | neg | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S | S | S | | | | | | | | | | | | |

4.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

Ο έλεγχος της ποιότητας του DNA καθώς και η ποσοτικοποίηση του πραγματοποιήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση 1μl της αρχικής ποσότητας του και μετέπειτα αραιώσεων 1:20 και σύγκριση του με μάρτυρα γνωστού μεγέθους καθώς και μοριακού βάρους . Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους της GeneOn, Blue DNA Ladder 1kb για τον οποίο είναι επίσης γνωστή η ποσότητα του DNA που αντιστοιχεί σε κάθε ζώνη όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. (εικόνα 4.1)



Εικόνα 4.1: Ποσοτικοποίηση του DNA μετά απο ηλεκτροφόρηση με τον μάρτυρα 1kb, Blue DNA ladder, GeneOn]

Number of bands an approx. DNA Mass:

| base pairs | 250 | 500 | 750 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 | 3000 | 4000 | 5000 | 6000 | 8000 | 10000 |
|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| DNA mass ng | 20 | 30 | 60 | 210 | 50 | 60 | 70 | 200 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση το δείγμα DNA στο 1^ο πηγαδάκι ηλεκτροφόρησης, η αραιώση (1:20) του οποίου στην 2^η θέση δίνει την ίδια εικόνα με την ποσότητα του DNA στα 500bps του μάρτυρα. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι αραιωμένο το συγκεκριμένο δείγμα DNA έχει συγκέντρωση 30ng και άρα

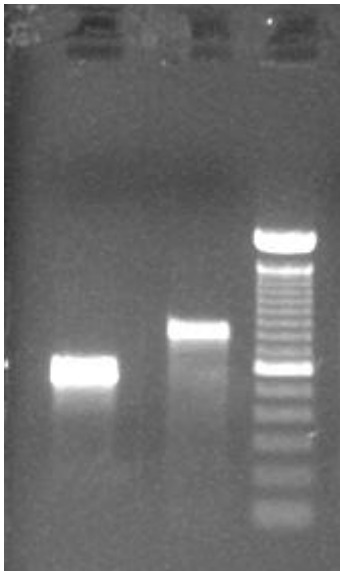
η αρχική του ποσότητα είναι 0.5.-0.6 μg/μl. Η ποσότητα του κατακερματισμένου DNA θεωρήθηκε αμελητέα και κρίθηκε ότι ήταν καλής ποιότητας και άρα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην περαιτέρω πειραματική διαδικασία.

4.2 PCR ΓΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ

Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε PCR για την ενίσχυση 2 τμημάτων του γονιδιωματικού DNA του *S. aureus* ST398 (εικόνα 4.2.1). Ο σκοπός ήταν τα τμήματα αυτά, τα οποία είχαν γνωστές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και το ένα βρισκόταν ανοδικά του γονιδίου ανθεκτικότητας *lnu(B)*, ενώ το δεύτερο καθοδικά, να σημειωθούν με βιοτίνη και να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές οι οποίοι θα εντόπιζαν μέσα στο συνολικό γονιδιωματικό DNA του σταφυλόκοκκου, μετά απο κατάτμηση του με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, τα άκρα της άγνωστης αλληλουχίας. Μετά απο κλωνοποίηση των απομονοθέντων τμημάτων σε φορείς θα ήταν δυνατή και η περαιτέρω αλληλούχιση τους.

Το τμήμα ανοδικά του *lnu(B)* μπορούσε να εντοπιστεί με την χρήση του ανιχνευτή A (probe A-500bps), ο οποίος αποτελούσε μια μικρή νουκλεοτιδική αλληλουχία που συμπεριλαμβανόταν σε ένα ευρύτερο κομμάτι του DNA του σταφυλόκοκκου που ήταν δυνατό να απομονωθεί μετά απο πέψη του DNA με το ένζυμο περιορισμού *HincII*. Αντίθετα, το τμήμα καθοδικά του *lnu(B)* μπορούσε να εντοπιστεί με την χρήση του ανιχνευτή B (probe B-800bps), ο οποίος αποτελούσε κομμάτι μιας αλληλουχίας που ήταν δυνατό να

probe A probe R Ladder



Εικόνα 4.2.1 : Τα προϊόντα της PCR μετά απο ενίσχυση των δύο τμημάτων που επιλέχθηκαν ως ανιχνευτές σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp DNA Ladder (Invitrogen)

probe A probe B



Εικόνα 4.2.2: Probe Spotting των ανιχνευτών A και B

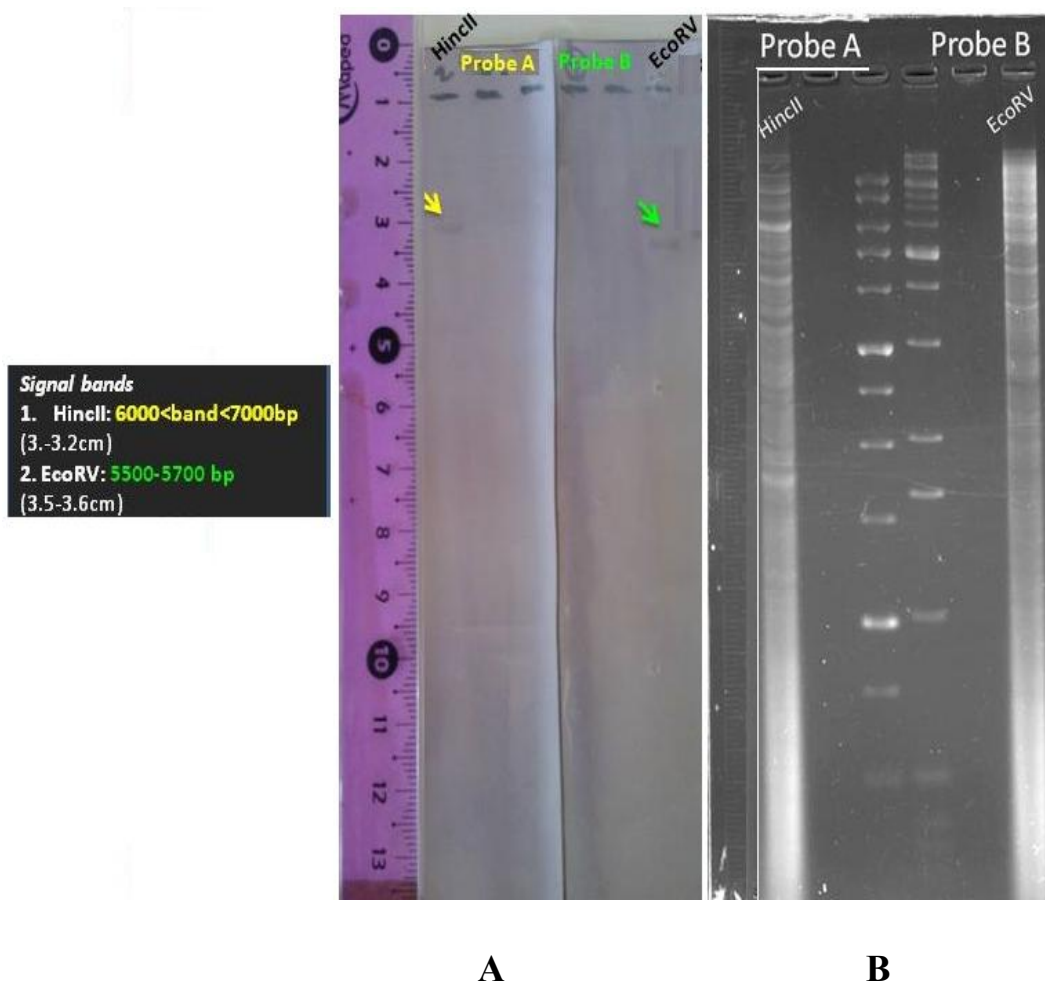
απομονωθεί μετα απο πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRV*.

Έπειτα ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR και σήμανση τους με βιοτίνη όπως περιγράφηκε παραπάνω. Για την επαλήθευση της σήμανσης των ανιχνευτών, πραγματοποιήθηκε πριν την

χρήση τους δοκιμαστική υβριδοποίηση σε νάυλον μεμβράνη χωρίς DNA σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις και εμφάνιση του σήματος (spotting). (εικόνα 4.2.2)

4.3 ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

Έπειτα ακολούθησε κατάτμηση του γονιδιωματικού DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού και υβριδοποίηση κατά Southern με την χρήση των ανιχνευτών όπως δημιουργήθηκαν παραπάνω (εικόνα 4.3 Α). Μετά την ανίχνευση σήματος, τα ίδια προϊόντα πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν ξανά με τον ίδιο τρόπο και οι ζώνες στις οποίες ανιχνεύθηκε το σήμα απομονώθηκαν απο το πήκτωμα αγαρόζης (εικόνα 4.3 Β) και τα κομμάτια του DNA κλωνοποιήθηκαν σε φορείς και ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση.



Εικόνα 4.3:

A) Μεμβράνη Southern μετά απο υβριδοποίηση με τους ανιχνευτές A και B και
 B) το πήκτωμα αγαρόζης μετά απο overnight ηλεκτροφόρηση των πέψεων του γονιδιωματικού DNA με τα ένζυμα EcoRV και HincII

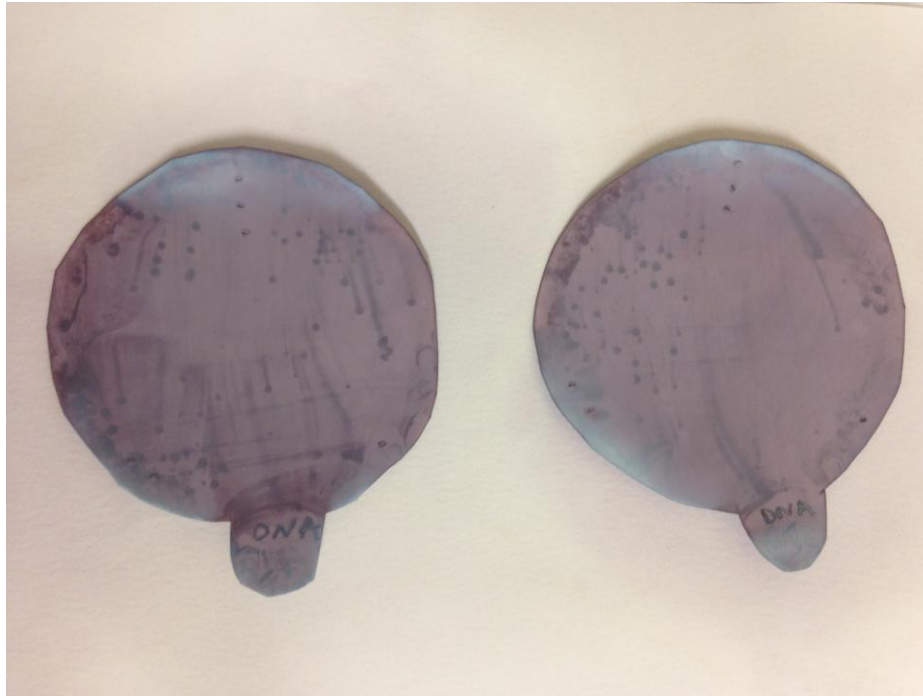
Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα ένζυμα ήταν επειδή και τα δύο είχαν θέσεις αναγνώρισης στο εσωτερικό της ήδη γνωστής αλληλουχίας η οποία περιλάμβανε το γονίδιο ανθεκτικότητας *lnu(B)* που ήταν και το γονίδιο αναφοράς, καθώς και στο γονιδιωματικό DNA του σταφυλοκοκκικού στελέχους ST398. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να τέμνουν το DNA σε αυτά τα σημεία, χωρίς να διακόπτουν τις αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές αλλά παράλληλα καθιστώντας δυνατή την απομόνωση μεγάλων τμημάτων DNA με σκοπό την αλληλούχιση τους για ανάλυση της πλέον άγνωστης νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας.

4.4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΛΩΝΩΝ

Στην συνέχεια απομονώθηκαν τα τμήματα DNA που δημιουργήθηκαν μετά τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού και εισήχθησαν σε φορείς pJET1.2/blunt όπως περιγράφηκε παραπάνω (Υλικά και μέθοδοι: 3.3.2.2). Έπειτα, δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a μετασχηματίστηκαν με τους ανασυνδυασμένους φορείς και ακολούθησε καλλιέργεια τους σε τρυβλία petri με στερεό θρεπτικό μέσο LB άγαρ. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.4.1, μόνο όσα κύτταρα είχαν προσλάβει τον ανασυνδυασμένο φορέα pJET1.2/blunt αναπτύχθηκαν. Απο την γονιδιωματική βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε, ακολούθησε μεταφορά των αποικιών σε μεμβράνη, υβριδοποίηση με χρήση των ίδιων ανιχνευτών, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και ανίχνευση σήματος κατά Southern (εικόνα 4.4.2) ώστε να εντοπιστούν οι κλώνοι που περιέχουν τα επιθυμητά τμήματα DNA, καθώς στο ίδιο ύψος του ηλεκτώματος από όπου απομονώθηκε το DNA ήταν συγκεντρωμένα χιλιάδες κομμάτια που προέκυψαν μετά την πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες και τα οποία είχαν το ίδιο μέγεθος με τις προς ανάλυση επιθυμητές αλληλουχίες. Έπειτα, ακολούθησε υγρή καλλιέργεια των αποικιών που έδωσαν θετικό σήμα και απομόνωση των πλασμιδίων με αλκαλική λύση (mini preps). Τα απομονοθέντα πλασμίδια στην συνέχεια αποστάληκαν για αλληλούχιση.



Εικόνα 4.4.1: Ενδεικτικό τρυβλίο petri μετά από επίστρωση των υγρών καλλιεργειών των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ και στο οποίο αναπτύχθηκαν μόνο τα βακτήρια που φέρουν τον ανασυνδυασμένο φορέα pJET1.2/blunt.



Εικόνα 4.4.2: Μεμβράνες μετά απο ανάλυση της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης κατά Southern και υβριδοποίηση τους με τους ανιχνευτές A και B.

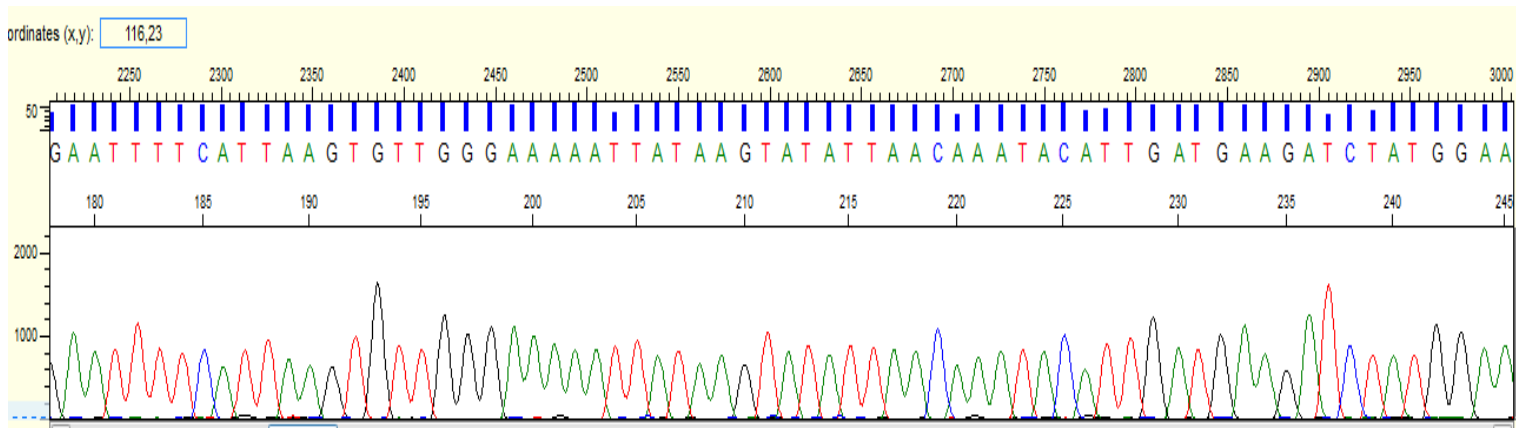
4.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που απομονώθηκαν απο τα μετασχηματισμένα βακτήρια που έδωσαν θετικό σήμα κατά την ανάλυση της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης αποστάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας τους όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Υλικά και μέθοδοι: 3.6-3.7).

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης της αλληλουχίας των μελετώμενων γονιδίων παρουσιάζεται με την μορφή ενός ηλεκτροφερογράμματος (electropherogram), το οποίο αποτελείται απο μια σειρά κορυφών. Κάθε κορυφή (peak) αντιστοιχεί σε μία απο τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις του DNA (A: αδενίνη, T: Θυμίνη, C: Κυτοσίνη, G: Γουανίνη) και εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα ανάλογα με το χρώμα φθορισμού (εικόνα 4.5.1). Πιο συγκεκριμένα, στο ηλεκτροφερόγραμμα αναπαρίσταται η ένταση των φθορίζόντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.

Η επεξεργασία των αλληλουχιών των γονιδιακών θραυσμάτων, καθώς και η στοίχιση-ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (sequence alignment) πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του λογισμικού προγράμματος Mega 6.0. Η επεξεργασία καθιστά τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνωρίσιμες και συγκρίσιμες.

Μετά την επεξεργασία και την μελέτη αλληλούχισης των νουκλεοτιδίων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων κατέστη πλέον γνωστή η ακριβής νουκλεοτιδική αλληλουχία καθενός απο τα δύο προς μελέτη τμήματα ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου *lnu(B)* και υποβλήθηκε σε μελέτη με το πρόγραμμα BLAST, όπως αναλύθηκε παραπάνω (Υλικά και μέθοδοι: 3.7).



Εικόνα 4.5.1: Ενδεικτικό ηλεκτροφερόγραμμα τμήματος της αλληλουχίας

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο *S. aureus* αποτελεί παθογόνο είδος σταφυλόκοκκου και είναι συχνά συσχετιζόμενο με ανθρώπινες ασθένειες. Έχει μελετηθεί περισσότερο από τα υπόλοιπα έδη σταφυλοκόκκων για την κατανόηση των μηχανισμών του, ανήκει στην φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπινου οργανισμού και το μεγαλύτερο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού θα αποικιστεί κάποια στιγμή της ζωής του από το βακτήριο.

Τα αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη ανήκουν σε ξεχωριστές ομάδες και χαρακτηρίζονται από διαφορετικές ιδιότητες ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση, το αντιμικροβιακό τους φάσμα και την φαρμακοκινητική τους. Το πρώτο αντιμικροβιακό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από *S. aureus* ήταν η πενικιλίνη αλλά σε σύντομο χρονικό διάστημα τα στελέχη του *S. aureus* παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Έτσι ξεκίνησε η σύνθεση των ημισυνθετικών πενικιλινών (μεθικιλίνη, οξακιλλίνη και ναφκιλλίνη), οι οποίες όμως αποτέλεσαν μια προσωρινή λύση καθώς γρήγορα εμφανίστηκαν τα ανθεκτικά στην μεθικιλίνη στελέχη (MRSA). Τα MRSA στελέχη εξαπλώθηκαν γρήγορα σε όλο τον κόσμο και αποτελούν ακόμα και σήμερα την συχνότερη αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων προκαλώντας σοβαρά προβλήματα

Στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας το Μάρτιο του 2012 απομονώθηκε για πρώτη φορά ένα ευαίσθητο στην μεθικιλίνη στέλεχος *S. aureus* ST398 αλλά με αντοχή στις λινκοσαμίδες. Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα αντοχής των *S. aureus* στην Ελλάδα έτσι κρίθηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου αντοχής στην λινκομυκίνη *lnu(B)*, το οποίο έχει ανιχνευθεί σε στελέχη του *Enterococcus faecalis* (15) και *Streptococcus agalactiae* (16) σε προηγούμενες μελέτες.

Αρχικά η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την χρήση της τεχνικής primer walking καθώς το γονίδιο αυτό είχε βρεθεί και σε προηγούμενες μελέτες και έτσι υπήρχαν γνωστά ζεύγη εκκινητών. Μετά από διαδοχικές αλληλουχίσεις τμημάτων διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο αυτό δεν βρίσκεται σε κάποιο πλασμίδιο του βακτηρίου αλλά στο γονιδιωματικό DNA του ST398. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι το *lnu(B)* μετατέθηκε στο γονιδιωματικό DNA από κάποιο πλασμίδιο και ενσωματώθηκε πιθανότατα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού.

Στην συνέχεια καθότι η αλληλουχία ήταν πλέον άγνωστο σε ποιο σημείο του χρωμοσώματος είχε ενσωματωθεί καθώς και σε συνδυασμό με ποιά άλλα γονίδια εκτός του *lnu(B)* και του *aad(E)* είχε μετατεθεί από το πλασμίδιο προέλευσης, δεν ήταν δυνατός ο σχεδιασμός εκκινητών για περαιτέρω αλληλούχιση με τη μέθοδο primer walking. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern και τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης.

Επιλέχθηκαν δύο περιοριστικά ένζυμα, το HincII και το EcoRV, τα οποία είχαν θέσεις αναγνώρισης στο εσωτερικό της γνωστής αλληλουχίας, ανοδικά και καθοδικά του *lnu(B)* αντίστοιχα, χωρίς να τέμνουν το γονίδιο. Παράλληλα αυτές οι θέσεις αναγνώρισης ήταν πολύ κοντά στο σημείο τερματισμού της γνωστής έως τότε αλληλουχίας. Ακόμα, τα ένζυμα αυτά είχαν θέσεις αναγνώρισης και στο γονιδιωματικό DNA του ST398

(GenBank AM990992) χωρίς να επηρεάζονται από μεθυλίωση και δημιουργώντας τμήματα DNA που θα επέτρεπαν την κλωνοποίησή τους σε κατάλληλο φορέα.

Έπειτα, με βάση την γνωστή αλληλουχία σχεδιάστηκαν ανιχνευτές για την ανάλυση κατά Southern οι οποίοι αναγνώριζαν τμήματα μεγέθους 500bps και 800bps, ανοδικά και καθοδικά του *lnu(B)* αντίστοιχα, και δεν περιείχαν καμία θέση αναγνώρισης για τα ένζυμα περιορισμού. Η θέση των ανιχνευτών αυτών όμως ήταν ιδανική καθώς τοποθετούνταν στα άκρα του ήδη γνωστού τμήματος και άρα επέτρεπαν την εύρεση αυτού ανάμεσα σε χιλιάδες άλλα κομμάτια DNA που επρόκειτο να σχηματιστούν μετά την πέψη όλου του σταφυλοκοκκικού DNA με τα ένζυμα περιορισμού.

Στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας ελεύθερο λογισμικό (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/PATMATCH/RestrictionMapper>) έγινε ο υπολογισμός για την εύρεση των θέσεων περιορισμού των ενζύμων πάνω στο γονιδίωμα του ST398 καθώς και στο τμήμα με την ήδη γνωστή αλληλουχία. Με δεδομένη την θέση του μεταθετού στοιχείου βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες (15) ήταν επίσης δυνατόν να υπολογιστεί σε ποιο μέγεθος θα έδιναν σήμα οι ανιχνευτές μετά την ανάλυση κατά Southern ώστε να προκύψουν τα τμήματα DNA που θα κλωνοποιούνταν.

Ακολούθως, μετά τις αντιδράσεις των πέψεων με τα ένζυμα περιορισμού, την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων και την ανάλυση κατά Southern, τα κομμάτια του DNA απομονώθηκαν από το σημείο του πηκτώματος όπου ανιχνεύθηκε το σήμα και κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα. Στην συνέχεια δημιουργήθηκε μια γονιδιωματική βιβλιοθήκη και μετά από δημιουργία αντιγράφων της βιβλιοθήκης σε μεμβράνη και ανάλυση τους κατά Southern, εντοπίστηκαν τελικώς οι κλώνοι οι οποίοι περιείχαν μόνο τους ανασυνδυασμένους φορείς με τα δύο προς μελέτη τμήματα DNA.

Μετά την αλληλούχιση των τμημάτων που εισήχθησαν στους φορείς διαπιστώθηκε ότι το προς εξέταση τμήμα ήταν μέρος ενός μεταθετού στοιχείου. Η αλληλούχιση του κλωνοποιημένου τμήματος που προέκυψε από πέψη με περιοριστικό ένζυμο *HincII* ανέδειξε την ύπαρξη ανεστραμμένης αλληλουχίας (IR) και ένζυμου μεταθετάσης (transposase). Αυτή η μεταθετάση, *ISSsu5*, ανήκει στην οικογένεια των *IS1380* αλληλουχιών εισδοχής που είχανε πρωτοπεριγραφεί στο *S. suis* (17). Από το τμήμα που κλωνοποιήθηκε μετά από την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRV* δεν προέκυψε αλληλουχία πέραν του του τμήματος που είχε ήδη αλληλουχιστεί.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rosenbach F. Micro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. 1884.
2. Συμεωνίδου-Καραγιαννίδου Σ. Σταφυλόκοκκοι πηκτάση αρνητικοί. Κλινική σημασία. 1989.
3. Baird-Parker A. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. J Gen Microbiol. 1963;
4. Silvestri L, Hill L. Agreement between deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy classification of gram-positive cocci. J Bacteriol. 1965;
5. Kloos W, Bannerman T. Staphylococcus and Micrococcus. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington: ASM Press; 1995. p. 282–98.
6. Baker J. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci.
7. Medical Microbiology. Fifth Edition. United States of America: ELSEVIER MOSBY; 2005. p. 221–35.
8. Waldvogel F. Staphylococcus aureus (including toxic shock syndrome). Principles and Practise of Infectious Diseases. Third edition. 1990. p. 1489–510.
9. Δημητρακόπουλος ΓΟ. Ιατρική Βακτηριολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδη; 1987.
10. Foster T. Staphylococcus. In: Samuel B, editor. Medical Microbiology. 4th ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston;
11. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of Staphylococcus aureus. Infect Genet Evol. 2008 Dec;8(6):747–63.
12. Pyörälä S, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, Greko C, Moreno MA, et al. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. Vet J. 2014 May;200(2):230–9.
13. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2002 Feb 15;34(4):482–92.
14. Benito D, Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Vasquez MA, Ceballos S, et al. Characterization of tetracycline and methicillin resistant Staphylococcus aureus strains in a Spanish hospital: Is livestock-contact a risk factor in infections caused by MRSA CC398? Int J Med Microbiol. 2014 Nov;304(8):1226–32.
15. Lozano C, Aspiroz C, Sáenz Y, Ruiz-García M, Royo-García G, Gómez-Sanz E, et al. Genetic environment and location of the *lnu(A)* and *lnu(B)* genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus and other staphylococci of animal and human origin. J Antimicrob Chemother. 2012 Dec 1;67(12):2804–8.
16. Montilla A, Zavala A, Cáceres Cáceres R, Cittadini R, Vay C, Gutkind G, et al. Genetic Environment of the *lnu(B)* Gene in a Streptococcus agalactiae Clinical Isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep;58(9):5636–7.
17. Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, et al. A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomics of *S. suis* 2 Chinese Isolates. PLoS ONE. 2007 Mar 21;2(3):e315.

