



Πανεπιστήμιο Αιγαίου
Σχολή Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και
Διατροφής



Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν από
σφήκες μέσω αλληλούχισης ριβοσωμικών 16S rRNA
γονιδίων

Πειραματική Πτυχιακή Μελέτη



Γκιτσάκη Ιωάννα

Καραμβάλης Νικόλαος



Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- ❖ Γκιαούρης Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)
- ❖ Αργυρίου Αναγνώστης, Καθηγητής
- ❖ Δρ. Παπαχριστοφόρου Αλέξανδρος, Λέκτορας (ΠΔ407/80)

Ευχαριστίες

«Σαν βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη, να εύχεσαι να' ναι μακρύς ο δρόμος, γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις», είπε ο Καβάφης, έτσι μας είπαν και οι δικοί μας άνθρωποι πριν ξεκινήσουμε το πρώτο μας πρακτικό ταξίδι στον εργαστηριακό κόσμο. Θεωρήσαμε ότι μιλούσαν μεταφορικά, αλλά η πανδημία covid-19 φρόντισε να μας πραγματοποιήσει την ευχή με εξαιρετικά κυριολεκτικό τρόπο. Φτάνοντας στο τέλος αυτού του ταξιδιού, και έχοντας συναντήσει και τους Λαιστρυγόνες και τους Κύκλωπες και τον Ποσειδώνα τον ίδιο, θέλουμε να ευχαριστήσουμε θερμά τα άτομα που ήταν δίπλα μας σε κάθε βήμα στηρίζοντάς μας με κάθε δυνατό τρόπο.

Πρώτα και σημαντικότερα, ευχαριστούμε θερμά τον κ. Γκιαούρη Ευστάθιο, Αναπληρωτή Καθηγητή στη Μικροβιολογία Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής (ΤΕΤΔ), αρχικά για την έμπνευση ώστε να αγαπήσουμε τη Μικροβιολογία και τη Μοριακή Βιολογία κατά τα προπτυχιακά μας μαθήματα και να ακολουθήσουμε τη συγκεκριμένη κατεύθυνση. Επιπλέον, που μας επέλεξε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής, κι έπειτα για τις συμβουλές, τη συνεχή καθοδήγηση, την υπομονή και την ψυχραιμία που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τέλος, θέλουμε να τον ευχαριστήσουμε θερμά για τις παροτρύνσεις να πάρουμε πρωτοβουλίες και για την εμπιστοσύνη που μας έδειχνε κάθε φορά που προτεινάμε νέες ιδέες.

Επειτα, ευχαριστούμε τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Μιχαηλίδου Σοφία από το Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ, Θεσσαλονίκη) για τη συνεργασία και την συμβολή στην περάτωση της μελέτης κατά τις αλληλουχίσεις των ριβοσωμικών γονιδίων. Εν συνεχεία, ευχαριστούμε τον Δρ. Παπαχριστοφόρου Αλέξανδρο για τη δική του συμβολή στην εκπόνηση της πτυχιακής, τις συμβουλές, τις οδηγίες και γενικότερα τη συμμετοχή του, χωρίς την οποία δεν θα υπήρχε καν το θέμα της μελέτης, όπως επίσης και τον Καθηγητή κ. Αργυρίου Αναγνώστη για την συμμετοχή και βοήθειά του. Παρότι σύντομη, εξίσου σημαντική ήταν και η συμβολή της υποψήφιας διδάκτορος του ΤΕΤΔ, κ. Κώστογλου Δήμητρας, για τη βοήθεια κατά τη λήψη των αποτελεσμάτων.

Εκτός αυτών, ευχαριστούμε το σύνολο το Πανεπιστήμιο Αιγαίου και συγκεκριμένα το ΤΕΤΔ για τη διάθεση του Εργαστηρίου Βιολογίας, Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας (ΕΒΜΒΤ) και για την εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων για την προστασία μας κατά τη διάρκεια της πανδημίας.

Τέλος, ευχαριστούμε πολύ θερμά τις οικογένειές μας, τους συντρόφους μας, τους φίλους μας και συμφοιτητές μας, οι οποίοι μας συμπαραστάθηκαν σε όλες τις δυσκολίες, μας συμβούλεψαν και άκουγαν τις ανησυχίες και τα προβλήματά μας, πολλές φορές χωρίς καν να καταλαβαίνουν τη φύση αυτών. Ευχαριστούμε για την αγάπη, το ενδιαφέρον, την υπομονή και τον κοινό αγώνα που έκαναν μαζί μας.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Αγγλική περίληψη (Abstract).....	8
1. Μικροβιολογία σφηκών και η σημασία της για το τρόφιμο και τον άνθρωπο.....	9
1.1. Οι σφήκες και ο ρόλος τους στο περιβάλλον.....	9
1.2. Το μικροβίωμα των σφηκών και οι κίνδυνοι που εγκυμονεί.....	10
1.2.1. Το εσωτερικό μικροβίωμα και οι παράγοντες διαμόρφωσής του.....	10
1.2.2. Το εξωτερικό μικροβιακό φορτίο.....	13
1.2.3. Οι σφήκες ως απειλή για τη δημόσια υγεία και οικονομία.....	13
1.3. Τα είδη <i>Vespula germanica</i> και <i>Vespa orientalis</i>	14
2. Μέθοδοι ταυτοποίησης μικροοργανισμών.....	15
2.1. Φαινοτυπικές και βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης.....	16
2.1.1. Χρώσεις κυττάρων.....	16
2.1.2. Δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης.....	18
2.1.3. Επιλεκτικά και διαγνωστικά θρεπτικά υλικά.....	20
2.1.4. Ανάπτυξη παρουσία αντιβιοτικών.....	22
2.2. Γονοτυπικές – Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης.....	24
2.2.1. Εισαγωγή.....	24
2.2.2. Λύση κυττάρου- Απομόνωση DNA.....	24
2.2.3. Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων μέσω φασματοφωτομετρίας.....	27
2.2.4. Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και τα πιο κοινά είδη της.....	28
2.2.4.1. Πολυπλεκτική (multiplex) PCR.....	29
2.2.4.2. PCR Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RT-PCR).....	30
2.2.4.3. PCR και RT-PCR πραγματικού χρόνου (qPCR, RT-qPCR)	30
2.2.4.4. Φωλιασμένη (δύο σταδίων) PCR (Nested PCR).....	31
2.2.5. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	31
2.2.6. Ηλεκτροφόρηση- UV απεικόνιση.....	33

2.2.7.	Μέθοδος ηλεκτροφόρησης πηκτής παλλόμενου πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)	35
2.2.8.	Μέθοδος πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).....	36
2.2.9.	Μέθοδος πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων πολλαπλασιασμού (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP).....	37
2.2.10.	Μέθοδος τυχαίου πολλαπλασιασμού πολυμορφικού DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD).....	38
2.2.11.	Μέθοδος αλληλούχισης πολλαπλών θέσεων γονιδίων (Multilocus Sequence Typing, MLST).....	39
2.2.12.	Ριβοτυποποίηση (Ribotyping).....	40
2.2.13.	Ηλεκτροφόρηση πηκτής βαθμιδωτής θερμοκρασίας και ηλεκτροφόρηση πηκτής βαθμιδωτής μειουσίωσης (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE).....	41
2.2.14.	Αλληλούχιση κατά Sanger (Sanger Sequencing).....	42
3.	Σκοπός μελέτης και σύνοψη μεθοδολογίας	42
4.	Υλικά και μέθοδοι.....	43
4.1.	Παρασκευή θρεπτικών υλικών και απομόνωση μικροοργανισμών από άγριες σφήκες.....	43
4.1.1.	Υλικά και διαλύματα.....	43
4.1.2.	Αναλώσιμα και εξοπλισμός.....	44
4.1.3.	Περιγραφή διαδικασίας.....	44
4.2.	Χρώση κατά Gram για μικροσκοπιακή παρατήρηση και δοκιμή καταλάσης.....	47
4.2.1.	Υλικά και διαλύματα.....	47
4.2.2.	Αναλώσιμα και εξοπλισμός.....	47
4.2.3.	Περιγραφή διαδικασίας.....	48
4.3.	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.....	49
4.3.1.	Υλικά και διαλύματα.....	49
4.3.2.	Αναλώσιμα και εξοπλισμός	49
4.3.3.	Περιγραφή διαδικασίας.....	50
4.4.	Ποσοτικοποίηση απομονωθέντος DNA μέσω φασματοφωτομετρίας.....	52
4.4.1.	Υλικά και διαλύματα.....	52

4.4.2.	Αναλώσιμα και εξοπλισμός	52
4.4.3.	Περιγραφή διαδικασίας.....	52
4.5.	Απεικόνιση απομονωθέντος DNA μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής.....	53
4.5.1.	Υλικά και διαλύματα.....	53
4.5.2.	Αναλώσιμα και εξοπλισμός.....	53
4.5.3.	Περιγραφή διαδικασίας.....	54
4.6.	Πολλαπλασιασμός 16S rDNA γονιδίου μέσω PCR και απεικόνιση μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής.....	55
4.6.1.	Υλικά και διαλύματα.....	55
4.6.2.	Αναλώσιμα και εξοπλισμός	56
4.6.3.	Περιγραφή διαδικασίας.....	57
4.7.	Καθαρισμός προϊόντων PCR	58
4.7.1.	Υλικά και διαλύματα.....	58
4.7.2.	Αναλώσιμα και εξοπλισμός.....	59
4.7.3.	Περιγραφή διαδικασίας.....	59
4.8.	Αλληλούχιση κατά Sanger.....	60
4.9.	Επεξεργασία και απεικόνιση αποτελεσμάτων με το λογισμικό MEGA-X.....	60
5.	Αποτελέσματα.....	61
6.	Συζήτηση.....	72
7.	Βιβλιογραφία.....	76
	Αναφορές από Ιστοσελίδες.....	82

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1.1.1 Φυλογενετικά δέντρα της οικογένειας Vespidae A) Με βάση μορφολογία και συμπεριφορά B) Με βάση μοριακά δεδομένα.....	9
Εικόνα 1.1.2 Εξωτερική ανατομία σφήκας.....	10
Εικόνα 1.2.1.1 Επισκόπηση κατανομής πληθυσμού εντερικού μικροβιώματος στα είδη <i>Vespa mandarinia</i> και <i>Vespa simillima</i>	11
Εικόνα 1.2.1.2 Επισκόπηση ορισμένων αλληλεπιδράσεων της σφήκας με μικροοργανισμούς.....	12
Εικόνα 1.3.1 Η σφήκα <i>Vespula germanica</i>	15
Εικόνα 1.3.2 Η σφήκα <i>Vespa orientalis</i>	15
Εικόνα 2.1.1.1 Δομή τοιχώματος Gram+ βακτηρίου.....	17
Εικόνα 2.1.1.2 Δομή τοιχώματος Gram- βακτηρίου.....	17
Εικόνα 2.1.1.3 Αποτελέσματα χρώσης Gram+ βακτηρίου.....	18
Εικόνα 2.1.1.4 Αποτελέσματα χρώσης Gram- βακτηρίου.....	18
Εικόνα 2.1.2.1. Δοκιμή καταλάσης σε αντικειμενοφόρο πλάκα και σε δοκιμαστικό σωλήνα.....	19
Εικόνα 2.1.2.2. Δοκιμή οξειδάσης.....	20
Εικόνα 2.1.3.1 Ανάπτυξη <i>Staphylococcus aureus</i> σε διαγνωστικό άγαρ αίματος γενικού σκοπού.....	21
Εικόνα 2.1.3.2 Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε επιλεκτικό διαγνωστικό θρεπτικό υλικό McConkey Agar.....	21
Εικόνα 2.1.3.3 Αποτελέσματα επώασης σε θρεπτικό ζυμό BGGB.....	21
Εικόνα 2.1.4.1 Ανάπτυξη <i>Escherichia coli</i> παρουσία διαφόρων αντιβιοτικών (μέθοδος διάχυσης από δισκίο).....	23
Εικόνα 2.2.2.1 Σύνοψη των πιο γνωστών και ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων απομόνωσης DNA.....	26
Εικόνα 2.2.4.1.1 Σύνοψη δράσης πολυπλεκτικής (multiplex) PCR.....	29
Εικόνα 2.2.4.4.1 Επισκόπηση δράσης φωλιασμένης (nested) PCR.....	31
Εικόνα 2.2.6.1 Σύνοψη δομής συστήματος και διαδικασίας ηλεκτροφόρησης.....	34

Εικόνα 2.2.7.1 Σχεδιάγραμμα διαφορών ηλεκτροφόρησης παλλόμενου πεδίου και απλής ηλεκτροφόρησης.....	35
Εικόνα 2.2.7.2. Ενδεικτικό αποτέλεσμα ανάλυσης PFGE.....	36
Εικόνα 2.2.8.1. Σύνοψη διαδικασίας στυπώματος κατά Southern (Southern blotting) για ανάλυση των αποτελεσμάτων της RFLP.....	37
Εικόνα 2.2.10.1 Σύνοψη διαδικασίας και ερμηνείας αποτελεσμάτων RAPD.....	39
Εικόνα 5.2 Αποτελέσματα χρώσης κατά Gram για το δείγμα Νο. 46.....	63
Εικόνα 5.3 Αποτελέσματα χρώσης κατά Gram για το δείγμα Νο. 54.....	63
Εικόνα 5.4 Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων χρώσης Gram.....	63
Εικόνα 5.5 Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων μικροσκοπικής παρατήρησης μορφολογίας δειγμάτων.....	64
Εικόνα 5.6 Απεικόνιση αποτελεσμάτων δοκιμής καταλάσης.....	64
Εικόνα 5.7 Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης πηκτής δειγμάτων DNA πριν και μετά την επώαση σε διάλυμα RNάσης.....	65
Εικόνα 5.9. Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης δειγμάτων καθαρισμένων 16S rRNA γονιδίων σε πηκτική αгарόζης.....	67
Εικόνα 5.11 Απεικόνιση αποτελεσμάτων ανάλυσης και ταυτοποίησης των δειγμάτων σε φυλογενετικό δέντρο.....	71
Εικόνα 5.12 Απεικόνισης αναλογίας γενών που εντοπίστηκαν στα αποτελέσματα αλληλούχισης κατά Sanger.....	72

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 2.2.5.1 Σύνοψη πληροφοριών για πέντε γνωστά είδη περιοριστικών ενδονουκλεασών.....	33
Πίνακας 4.1.3.1 Πληροφορίες για τους απομονωθέντες μικροοργανισμούς.....	45
Πίνακας 5.1. Αναλυτικά αποτελέσματα μικροσκοπικής παρατήρησης δειγμάτων και δοκιμής καταλάσης.....	61
Πίνακας 5.8 Σύνοψη πληροφοριών για χρήση εκκινητών ανά δείγμα.....	66
Πίνακας 5.10 Σύνοψη αποτελεσμάτων αλληλούχισης κατά Sanger στα 47 δείγματα..	68

Περίληψη

Οι σφήκες αποτελούν μία από τις γνωστότερες κατηγορίες εντόμων με τις οποίες αλληλεπιδρά ο άνθρωπος μιας και οι δραστηριότητές τους σε πολλές περιπτώσεις πραγματοποιούνται ταυτόχρονα στον ίδιο χώρο. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εντοπίζονται γενικά στις σφήκες, εσωτερικά και εξωτερικά, διαμορφώνονται, κυρίως, από το περιβάλλον και τις διατροφικές επιλογές της εκάστοτε σφήκας. Η πιθανή παρουσία και μεταφορά παθογόνων αποτελεί τον κύριο λόγο για τον οποίο απαιτείται η ανάλυση του μικροβιακού φορτίου ορισμένων ειδών κοινωνικών σφηκών, ώστε να καθοριστεί το μέτρο της ασφάλειας της συνύπαρξής τους με τον άνθρωπο.

Για τον σκοπό αυτό, στη συγκεκριμένη μελέτη απομονώθηκαν 47 μικροβιακά δείγματα (αποικίες βακτηρίων) από σφήκες που συλλέχθηκαν από ποικίλα ενδιαίτηματα του νησιού της Λήμνου και από διαφορετικά τμήματα του σώματος της κάθε σφήκας ώστε να ταυτοποιηθούν. Η αρχική απομόνωση των βακτηρίων έγινε χρησιμοποιώντας επιλεκτικά θρεπτικά υλικά, ενώ τα απομονωθέντα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν αρχικά με βάση τα αποτελέσματα χρώσης κατά Gram και δοκιμής καταλάσης.

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων επιλέχθηκε να πολλαπλασιαστεί και στη συνέχεια να αλληλουχηθεί πλήρως το γονίδιο 16S rDNA. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα, αρχικά, υποβλήθηκαν σε διαδικασία απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA από το καθένα και ποσοτικοποίησής του ώστε να μπορέσει ακολούθως να πολλαπλασιαστεί το συγκεκριμένο γονίδιο μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας καθολικούς εκκινητές (universal primers). Η οπτικοποίηση των αμπλικονίων της PCR έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αγαρόζη. Έπειτα, το κάθε δείγμα αφού καθαρίστηκε στάλθηκε για πλήρη αλληλούχιση κατά Sanger στα εργαστήρια του ΕΚΕΤΑ. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης για κάθε δείγμα (βακτηριακή απομόνωση) διασταυρώθηκαν εν τέλει με βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με χρήση του λογισμικού BLAST ώστε να γίνει η τελική ταυτοποίηση (σε επίπεδο είδους). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα 47 δείγματα, τα κυρίαρχα γένη ήταν *Enterococcus* (περίπου 38%), *Proteus* (32%) και σε μικρότερο βαθμό εντοπίστηκαν τα γένη *Enterobacter* (10,6%), *Staphylococcus* (6,3%), *Klebsiella* (2%), *Gibbsiella* (2%), *Lactobacillus* (2%) και *Lactococcus* (2%). Τα τελικά αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την αρχική υποψία περί πιθανής μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών από τις σφήκες, καθώς στα δείγματα που στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν εντοπίστηκαν είδη σημαντικών ευκαιριακών παθογόνων (πχ *Proteus mirabilis*) καθώς και δείκτες εντερικών παθογόνων όπως κολίμορφα βακτήρια (*Enterobacter*, *Klebsiella*) και εντερόκοκκοι, γεγονός που αναδεικνύει τον κίνδυνο που πιθανώς να διατρέξει ο άνθρωπος σε περίπτωση επαφής με σφήκα. Η μέθοδος αλληλούχισης του γονιδίου 16S rDNA, παρόλο που έδωσε ικανοποιητικά ευρήματα, για ορισμένα δείγματα (συγκεκριμένα για 7 από τα 47) σημειώθηκαν και αποτελέσματα όπου η ταυτοποίηση μπόρεσε να επιτευχθεί μόνο μέχρι το επίπεδο του γένους (και όχι είδους), συνεπώς για ακριβέστερη ταυτοποίηση απαιτείται η χρήση εναλλακτικών μεθόδων (πχ MALDI-TOF, API, species-specific PCRs).

Αγγλική περίληψη (Abstract)

Wasps consist one of the most common category of insects humans interact with due to the fact that in many cases their activities take place simultaneously at the same space. Wasps' internal and external microbiota is formed mostly based on each wasp's habitat and nutritional preferences. The potential presence and transfer of pathogens is the main reason an analysis on the microbiota of certain common species of social wasps is required, so that the human safety during the cohabitation with the wasps is clarified.

For that purpose, during this study, 47 microbial samples (bacterial colonies) were isolated from wasps collected from various habitats of the island of Lemnos and from various parts of each wasp's anatomy in order to be identified. The initial isolation was conducted using selective media while the isolated samples were categorized based on the results of Gram staining and catalase reaction.

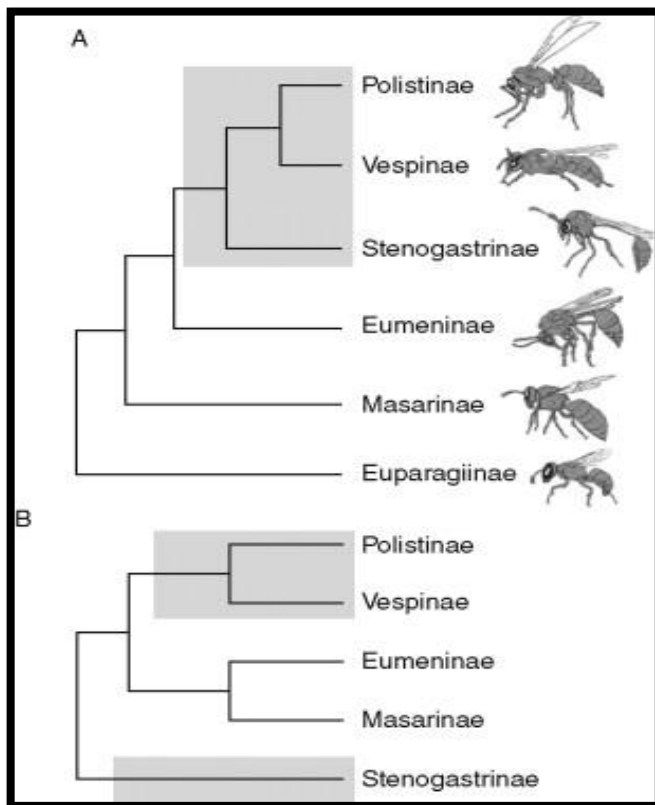
16S rDNA gene was chosen for multiplication and full sequencing in order to achieve identification. For that purpose, the samples, firstly, underwent a genomic DNA isolation and quantification process in order for it to be exponentially multiplied through a Polymerase Chain Reaction (PCR) using universal primers. The visualization of the PCR amplicons was achieved through agarose gel electrophoresis. After that, each sample was shipped to EKETA Labs to be identified through Sanger Sequencing. The sequencing results for each sample (bacterial isolation) were cross-referenced with a nucleotide sequence database, using the BLAST software in order to achieve the final identification (species level). The results showed that in the 47 samples the dominant genera were *Enterococcus* (approximately 38%), *Proteus* (32%) while the genera *Enterobacter* (10,6%), *Staphylococcus* (6,3%), *Klebsiella* (2%), *Gibbsiella* (2%), *Lactobacillus* (2%) and *Lactococcus* (2%) were also traced in smaller percentages. The final results confirmed the initial suspicion about potential pathogen transfer from wasps, as certain species of important opportunistic pathogens (e.g., *Proteus mirabilis*) and indicators of enteric pathogens such as coliforms (*Enterobacter*, *Klebsiella*) and *Enterococcus* spp were detected, which proves the existence of potential danger in the interaction between humans and wasps. Although the method of the 16S rDNA gene sequencing gave satisfying results, there were also certain cases (specifically 15 out of 47 samples) where the identification only offered information about the genus (and not the species), so in order for the results to be precise, use of alternative methods is required (e.g., MALDI-TOF, API).

1. Μικροβιολογία σφηκών και η σημασία της για το τρόφιμο και τον άνθρωπο

1.1. Οι σφήκες και ο ρόλος τους στο περιβάλλον

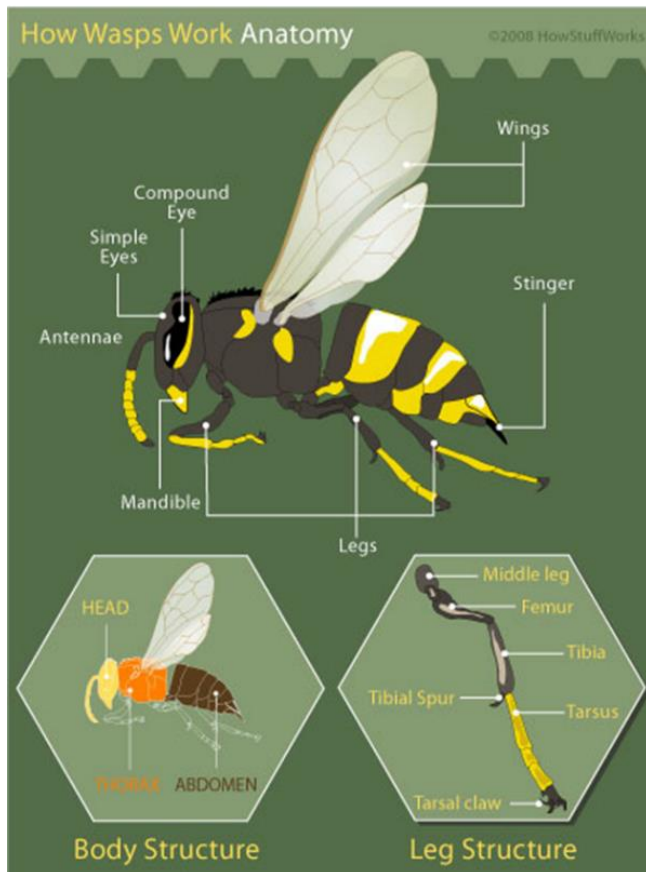
Οι σφήκες είναι έντομα της τάξης (order) Hymenoptera και της υπο-τάξης (suborder) Apocrita. Κατατάσσονται σε πολλές οικογένειες (families), εκ των οποίων η πιο γνωστή και κοινή είναι η Vespidae και στην οποία ανήκουν 6 υποοικογένειες (Εικόνα 1.1.1) και πάνω από 5.000 είδη. Οι σφήκες της συγκεκριμένης οικογένειας χαρακτηρίζονται ως έντομα σαρκοφάγα και παρασιτικά, δηλαδή διατηρούν στενή σχέση με κάποιον ξενιστή προκειμένου να τραφούν, γεγονός που, συνήθως, οδηγεί τελικά στον θάνατό του (Akre, 1982, Akre and Meyer, 1994, Carpenter and Nguyen, 2003). Παρόλα αυτά, καταναλώνουν και τρόφιμα πλούσια σε υδατάνθρακες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, χρησιμοποιούν το δηλητήριο που παράγουν για να ακινητοποιήσουν τον ξενιστή και να παρασιτήσουν εις βάρος του (Reed and Landolt, 2019). Χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες τις κοινωνικές (social) και τις απόμερες (solitary) (Hunt and Toth, 2017) με βάση την οργάνωση «κοινωνιών» και τη συμβίωση με άλλες σφήκες. Οι κοινωνικές σφήκες σχηματίζουν οργανωμένες φωλιές και κοινωνίες με συγκεκριμένους ρόλους (βασιλίσα, εργάτρια, κηφήνες) (Akre, 1982, Akre and Meyer, 1994, Carpenter and

Nguyen, 2003), ενώ οι απόμερες (που αποτελούν έως και το 95% των σφηκών (Akre and Davis, 1978), δεν σχηματίζουν ούτε «κοινωνίες», ούτε καν φωλιές στις περισσότερες των περιπτώσεων (O' Neil, 2001).



Εικόνα 1.1.1 Φυλογενετικά δέντρα της οικογένειας Vespidae A) Με βάση μορφολογία και συμπεριφορά B) Με βάση μοριακά δεδομένα (Bruschini et al, 2010)

Όσον αφορά τα εξωτερικά χαρακτηριστικά, η σφήκα χωρίζεται σε 3 μέρη, το κεφάλι (head), τον θώρακα (thorax) και την κοιλιά (abdomen). Στο κεφάλι βρίσκονται οι κεραιές (antennae), τα μάτια (eyes) και οι δαγκάνες (mandibles). Στον θώρακα βρίσκονται τα φτερά (wings) και τα πόδια (legs). Στο άκρο της κοιλιακής χώρας βρίσκεται το κεντρί (stinger). Ο θώρακας και η κοιλιά ενώνονται μέσω του μίσχου (O'Neil, 2001), όπως φαίνονται καθαρά και στην εικόνα 1.1.1.



Ως προς το περιβάλλον, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ισορροπία των οικοσυστημάτων και των τροφικών αλυσίδων, διότι τρέφονται με άλλα έντομα και παράσιτα διατηρώντας έτσι του πληθυσμούς αυτών των ειδών σε φυσιολογικά επίπεδα (Akre, 1982, Akre and Meyer, 1994, Zytynska and Meyer, 2019).

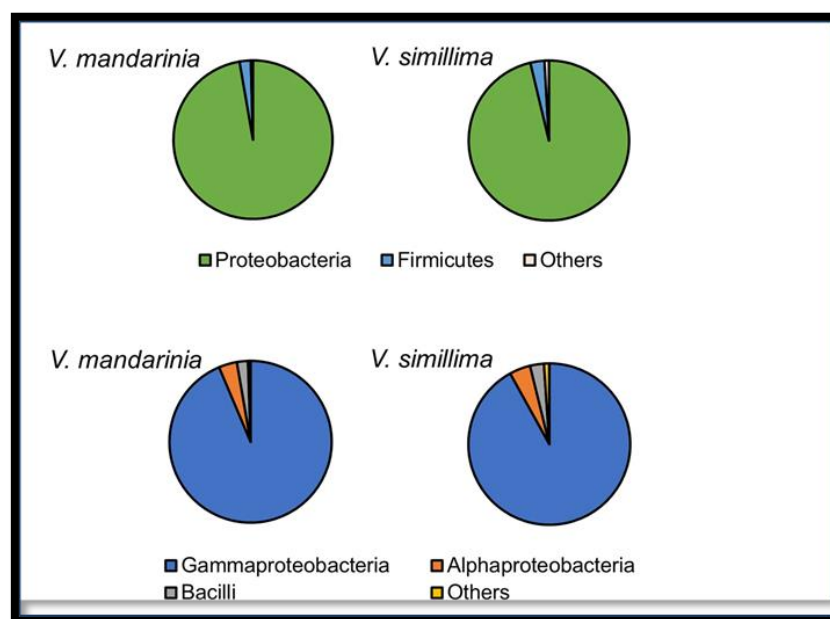
Εικόνα 1.1.2 Εξωτερική ανατομία σφήκας
Πηγή: howstuffworks.com

1.2. Το μικροβίωμα των σφηκών και οι κίνδυνοι που εγκυμονεί

1.2.1. Το εσωτερικό μικροβίωμα και οι παράγοντες διαμόρφωσής του

Όπως και οι περισσότεροι άλλοι οργανισμοί, οι σφήκες έχουν μια εσωτερική φυσιολογική μικροχλωρίδα, με την οποία υπάρχουν ποικίλων μορφών αλληλεπιδράσεις, όπως ωφέλιμη (mutualism) και προσσιτιστική (commensalism)

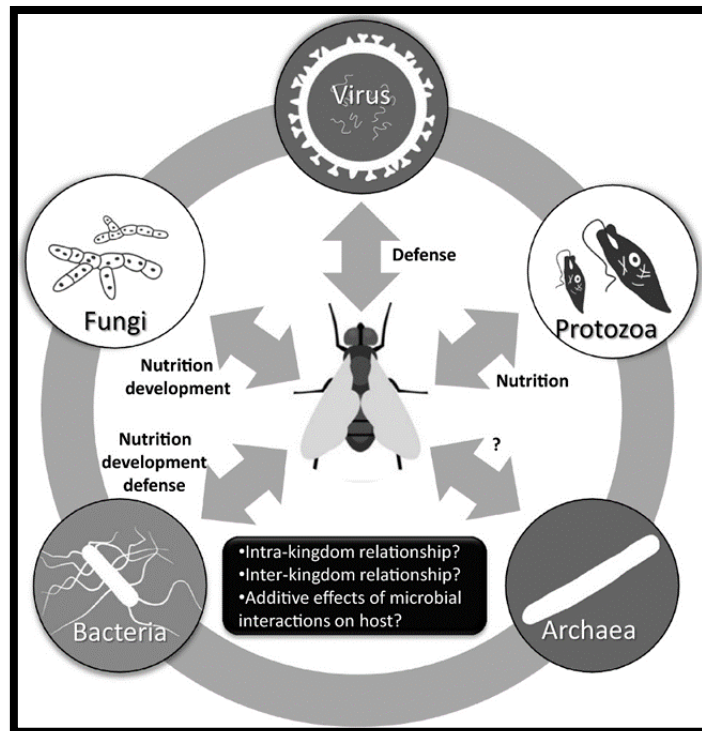
συμβίωση (Duan et al, 2020, Reeson et al, 2003, Suenami et al, 2019). Τα βακτήρια αυτής ποικίλουν σημαντικά, με τα κυρίαρχα γένη να ανήκουν στις τάξεις των α- και γ-πρωτεοβακτηρίων και συγκεκριμένα, σε μεγάλο βαθμό στην οικογένεια Enterobacteriaceae (Reeson et al, 2003, Suenami et al, 2019). Εντοπίζονται, επίσης, γένη οικογενειών της τάξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria, LAB) (McFrederick et al, 2013) και γένη της οικογένειας Staphylococcaceae (Duan et al, 2020). Ενδεικτικά, στην εικόνα 1.2 απεικονίζεται η κατανομή της εντερικής μικροχλωρίδας των ειδών *Vespa mandarinia* και *Vespa simillima* σε φύλα και τάξεις με βάση τους Suenami et al σε δημοσίευση του 2019 οι οποίοι χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA.



Εικόνα 1.2.1.1 Επισκόπηση κατανομής πληθυσμού εντερικού μικροβιώματος στα είδη *Vespa mandarinia* και *Vespa simillima* (A) σε επίπεδο φύλου και (B) σε επίπεδο τάξης μετά από εφαρμογή της μεθόδου αλληλούχισης 16S rRNA γονιδίου.

Γενικά, εκτός από βακτήρια, εντοπίζονται και πολλοί μύκητες, τα επίπεδα των οποίων παρουσιάζουν μεγάλες διαφοροποιήσεις ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης της σφήκας, αλλά αποτελούν επίσης καλύτερο δείκτη του σταδίου ανάπτυξης, σύμφωνα με τους Cini et al (2020) και τις αναλύσεις τους στο είδος *Vespa velutina*. Η κυρίαρχη τάξη είναι οι Saccharomycetes. Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι σφήκες έρχονται σε επαφή ακόμη και με αρχαιοβακτήρια, τα οποία μπορεί να συμβιώνουν με κάποιον οργανισμό στον οποίο παρασιτεί η σφήκα αν το ενδιαίτημα αυτού του ξενιστή είναι κάποιο περιβάλλον με ακραίες συνθήκες (πχ υψηλή αλατότητα), αν και η φύση της αλληλεπίδρασής της των σφηκών με τα αρχαία δεν είναι ακόμη γνωστή (Gurung et al, 2019).

Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πέψη των τροφών, στο ανοσοποιητικό σύστημα, στην αντίσταση σε παρασιτοκτόνα, στην αναπαραγωγή, ακόμη και στην εξέλιξη του είδους της σφήκας (Cavichioli de Oliveira and Cònsoli, 2020, Duan et al, 2020). Η φύση ορισμένων αλληλεπιδράσεων με τους μικροοργανισμούς συνοψίζεται και στην εικόνα 1.2.1.2. Παρόλα αυτά, και οι Suenami et al (2019) και οι Duan et al (2020) υποστηρίζουν ότι η εντερική μικροχλωρίδα των σφηκών διαφέρει σημαντικά από είδος σε είδος για ποικίλους λόγους.



Εικόνα 1.2.1.2 Επισκόπηση ορισμένων αλληλεπιδράσεων της σφήκας με μικροοργανισμούς και ερωτήματα που δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί για τις αλληλεπιδράσεις αυτές (Gurung et al, 2019)

Ο κυριότερος λόγος για τον οποίο οι μικροχλωρίδες ανάμεσα στα είδη σφηκών διαφέρουν πέρα από τη διαφοροποίηση στην εξέλιξή τους και τα ενδιαυτήματά τους, είναι οι τροφικές προτιμήσεις. Οι Duan et al (2020), Pusceddu et al (2018) και Suenami et al (2019) υποστηρίζουν πως η εντερική μικροχλωρίδα του ξενιστή μπορεί να επηρεάζει και να μεταβάλλει ακόμη και μόνιμα το βασικό μικροβίωμα της σφήκας λόγω της επαφής της με τη μικροχλωρίδα του ξενιστή κατά τον παρασιτισμό. Αντίστοιχα, οι Cavichioli de Oliveira and Cònsoli (2020), ενώ συμφώνησαν με τους παραπάνω, απέδειξαν ότι μπορεί να γίνει και το αντίστροφο, δηλαδή οι σφήκες να επηρεάσουν το εντερικό μικροβίωμα του ξενιστή, όταν κατά τον παρασιτισμό τελικά ο ξενιστής δεν θανατώνεται και μέσω της μεταφοράς μικροοργανισμών (βακτηρίων,

μυκήτων, ιών, ακόμη και πρωτόζωων) από το εξωτερικό της σφήκας στον ξενιστή, όταν αυτοί έρχονται σε επαφή.

1.2.2. Το εξωτερικό μικροβιακό φορτίο

Το σύνολο των μικροοργανισμών που εντοπίζονται στο εξωτερικό μιας σφήκας αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κεφάλαιο για τη μελέτη του είδους. Ως επί το πλείστον, καθορίζεται από τους οργανισμούς και τις επιφάνειες με τις οποίες έρχεται σε επαφή η σφήκα, συνεπώς διαφέρει σημαντικά ανά τα είδη πόσο μάλλον ανά την κοινωνική συμπεριφορά (κοινωνικές και απόμερες) (Akre, 1982, O'Neil, 2001). Ως είδος, η σφήκα τρέφεται σε μεγάλο βαθμό, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.1, με ζωντανά ή νεκρά έντομα και παράσιτα, αλλά και καρπούς, φρούτα και τρόφιμα πλούσια σε υδατάνθρακες, πολλά από τα οποία βρίσκονται στα ανθρώπινα σκουπίδια. Τα παραπάνω φέρουν με τη σειρά τους ένα ορισμένο μικροβιακό ή/και ιικό φορτίο, ή βρίσκονται σε ένα περιβάλλον που περιέχει το δικό του μικροβιακό/ικό φορτίο (Akre, 1982, Akre and Meyer, 1994, Carpenter and Nguyen, 2003). Συνεπώς με την επαφή οι μικροοργανισμοί αυτοί μεταφέρονται στη σφήκα (Pusceddu et al, 2018, Suenami et al, 2019), η οποία με τη σειρά της τα μεταφέρει στον επόμενο οργανισμό ή επιφάνεια με την οποία θα έρθει σε επαφή. Πιο συγκεκριμένα, τα πόδια, τα οποία χρησιμοποιεί για να προσγειωθεί, το κεντρί που χρησιμοποιεί κυρίως για άμυνα αλλά και επίθεση και οι δαγκάνες είναι τα μέρη που αναμένεται να υπάρχουν τα μεγαλύτερα μικροβιακά και ιικά φορτία μιας και έρχονται σε μεγαλύτερη επαφή με τις πιθανές εστίες μόλυνσης (Akre, 1982).

1.2.3. Οι σφήκες ως απειλή για τη δημόσια υγεία και οικονομία

Οι σφήκες μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για την υγεία με πολλούς τρόπους. Ο πιο ευρέως γνωστός και διαδεδομένος είναι μέσω του τσίμπηματος. Το τσίμπημα της σφήκας, κατά κύριο λόγο προκαλεί ερεθισμό του δέρματος, πρήξιμο, πόνο και σε ορισμένες περιπτώσεις πυρετό. Κατά το τσίμπημα, όμως, η σφήκα απελευθερώνει και δηλητήριο το οποίο αν περάσει στην οργανισμό του ανθρώπου [εξαρτάται από τη σφήκα και το μέγεθος του κεντριού, (Akre, and Davis, 1978)], μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση. Η αντίδραση αυτή (αναφυλαξία) μπορεί να εκδηλωθεί με συμπτώματα ήπια ή και σοβαρότερα και σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στον θάνατο (Adib-Tezer and Bayerl, 2018). Κατά το διάστημα 2000-2017

υπήρξαν 1.119 θάνατοι στην Αμερική (National Vital Statistics System, 2019) από αναφυλαξία που προκλήθηκε από σφήκες και μέλισσες.

Εκτός από την πιθανότητα αναφυλαξίας, το τσίμπημα σφήκας (αλλά και μέλισσας) εγκυμονεί κι άλλους κινδύνους. Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 1.2.2, οι σφήκες μπορούν να γίνουν φορείς παθογόνων βακτηρίων τα οποία πιθανώς να περάσουν στο δέρμα του άλλου οργανισμού που υφίσταται το τσίμπημα μέσω του κεντριού. Το 2000 σημειώθηκε φαινόμενο κατά το οποίο ηλικιωμένος με ιστορικό καρδιαγγειακού νοσήματος πέθανε μετά από τσίμπημα μέλισσας το οποίο τελικά αποδόθηκε σε μόλυνση από *Streptococcus pyogenes*, ένα αιμολυτικό, παθογόνο βακτήριο (Truskinovsky et al, 2001). Στην αναφορά τους οι Truskynovski et al (2001), ανέφεραν κι άλλες περιπτώσεις που μετά από τσίμπημα μέλισσας βρέθηκε μόλυνση από παθογόνα βακτήρια και συγκεκριμένα *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Xanthomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* (και άλλα είδη σταφυλόκοκκων), γεγονός που γεννά ερωτήσεις για το αν οι σφήκες μπορεί να έχουν την ίδια ικανότητα μεταφοράς παθογόνων κατά το τσίμπημα/επαφή.

Πέρα, όμως, από τους κινδύνους που είναι συνδεδεμένοι με το τσίμπημα, με την πιθανή μεταφορά παθογόνων ή και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, οι σφήκες που παρασιτούν σε φρούτα και καρπούς, αφενός πιθανώς να μεταφέρουν κάποιον μικροοργανισμό που μπορεί να αλλοιώσει το τρόφιμο και αφετέρου μετά από ανθρώπινη κατανάλωση του συγκεκριμένου τροφίμου να προκληθεί κάποιο τροφιογενές νόσημα, το οποίο πιθανώς να προκαλέσει ακόμη και θάνατο.

Τέλος, σημαντική είναι και η αρνητική επίδραση που μπορούν να έχουν στην οικονομία μιας και με την αλλοίωση τροφίμων μπορούν να καταστραφούν γεωργικές καλλιέργειες. Μεγάλο πρόβλημα έχουν δημιουργήσει και στη μελισσοκομεία καθώς είναι σε θέση να θανατώνουν μεγάλο αριθμό μελισσών και είτε παίρνουν το μέλι για κατανάλωση, είτε προκαλούν αλλοιώσεις με τον μηχανισμό που αναλύθηκε (Clapperton et al, 1989, Evans and Schwarz, 2011, Pusceddu et al, 2018).

1.3. Τα είδη *Vespula germanica* και *Vespa orientalis*

Τα είδη *Vespula germanica* και *Vespa orientalis* (Εικόνες 1.3.1 και 1.3.2 αντίστοιχα) είναι δύο από τα πιο κοινά και γνωστά είδη σφηκών. Ανήκουν στην οικογένεια Vespidae και στα γένη *Vespula* και *Vespa* αντίστοιχα. Το γένος *Vespa* απαριθμεί 20 είδη συνολικά και το *Vespula* απαριθμεί περισσότερα από 20 (Akre, 1982). Ως επί το πλείστον πρόκειται για κοινωνικές σφήκες. Οι διατροφικές τους συνήθειες είναι παρόμοιες καθώς προτιμούν να τρέφονται με έντομα όπως γρύλλους, ακρίδες, άλλες σφήκες και μέλισσες (Pusceddu et al, 2018).



Εικόνα 1.3.1 Η σφήκα *Vespa germanica* (Πηγή: alchetron.com)



Εικόνα 1.3.2 Η σφήκα *Vespa orientalis* (Πηγή: inaturalist.ca)

Η *V. germanica* μπορεί να βρεθεί ως επί το πλείστον στην κεντρική και νότια Ευρώπη, ενώ η *V. orientalis* στη Νοτιοδυτική Ασία και Δυτική Ευρώπη. Αποτελούν τα δύο είδη που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη συγκεκριμένη μελέτη, λόγω της αυξημένης επαφής στην οποία έρχονται με τον άνθρωπο σε συνδυασμό με την ανάγκη για προσδιορισμό του κινδύνου που εγκυμονεί η μεταφορά παθογόνων. Μια τέτοια περίπτωση υπήρξε στο Ισραήλ όπου σφήκες του είδους *V. germanica* προκάλεσαν μαστίτιδα σε γαλακτοφόρες αγελάδες. Έτσι, στο διάστημα 1989 έως 1993, 32 κοπάδια ανέπτυξαν την ασθένεια η οποία προκλήθηκε από μεταφορά του παθογόνου βακτηρίου *Streptococcus dysgalactiae* (Yeruham et al, 2011).

2. Μέθοδοι ταυτοποίησης μικροοργανισμών

Κατά τον 19^ο και 20^ο αιώνα, όταν οι γνώσεις για τους μικροοργανισμούς ήταν πολύ πιο περιορισμένες απ' ό τι στη σημερινή εποχή, προκειμένου να μελετηθούν, οι μικροοργανισμοί υπέστησαν ορισμένες ομαδοποιήσεις με βάση κοινά τους χαρακτηριστικά, οι οποίες, πλέον, ποικίλουν από πολύ γενικές σε πολύ ειδικές (Busse et al, 1996). Η ταυτοποίηση είναι η πρακτική εφαρμογή των κριτηρίων διαφοροποίησης ανάμεσα σε οργανισμούς ίδιας ή και διαφορετικής ομάδας για να ερευνηθούν, χρησιμοποιηθούν ή επιβεβαιωθεί η παρουσία τους (Baron, 1996). Προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση ακολουθούνται ορισμένες μέθοδοι οι οποίες κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις φαινοτυπικές (phenotypic) και τις γονοτυπικές (genotypic).

2.1 Φαινοτυπικές και βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι αποτελούν έμμεσο τρόπο ταυτοποίησης των μικροοργανισμών. Ο σκοπός τους είναι να υποβάλουν τον υπό εξέταση μικροοργανισμό σε αρκετές δοκιμές ώστε να δημιουργηθεί ένα «προφίλ» και μέσω κατάταξης σε ήδη υπάρχουσες μικροβιολογικές ομάδες με ίδια χαρακτηριστικά, να μπορέσει να επιβεβαιωθεί το γένος/ είδος/ στέλεχος για το οποίο πρόκειται (Baron, 1996, Busse et al, 1996).

Αντίστοιχα, οι βιοχημικές δοκιμές έχουν ως σκοπό την κατάταξη ανάλογα με τα δεδομένα του μεταβολισμού του υπό εξέταση μικροοργανισμού (βιοχημικό «προφίλ»). Η αρχή μεθόδου είναι η διαφορετική απόκριση των μικροοργανισμών σε στοιχεία του περιβάλλοντος λόγω διαφοροποιήσεων στο μεταβολισμό τους και η (εύκολη) ορατή εμφάνιση των αποτελεσμάτων μέσω χρήσης κατάλληλων δεικτών (Váradi et al, 2017). Γίνονται σε στερεά ή υγρά μέσα και είναι χρονοβόρες, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι απόλυτα ακριβείς γι' αυτό γίνονται συνήθως σε παραπάνω από ένα στάδια (διαφορετικές δοκιμές), προκειμένου να συγκεντρωθούν επαρκή στοιχεία για το βιοχημικό προφίλ του μικροοργανισμού και κατά συνέπεια τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα (Busse et al, 1996). Συνήθως ακόμη και όταν η ταυτοποίηση είναι επιτυχής, αυτή περιορίζεται μέχρι και το επίπεδο είδους, αδυνατώντας να διαχωρίσει τα διαφορετικά στελέχη.

Οι φαινοτυπικές και βιοχημικές μέθοδοι αποτελούν την πιο κλασσική μέθοδο ταυτοποίησης μικροοργανισμών στη μικροβιολογία. Τα στοιχεία τα οποία εξετάζονται χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες (Baron, 1996, Busse et al, 1996):

- *Μορφολογία*
- *Χαρακτηριστικά ανάπτυξης*
- *Βιοχημικά χαρακτηριστικά*
- *Αντίσταση σε αντιβιοτικά*
- *Ευαισθησία-αντίδραση σε αντιγόνα (υποκατηγορία ορολογικών δοκιμών)*

2.1.1 Χρώσεις κυττάρων

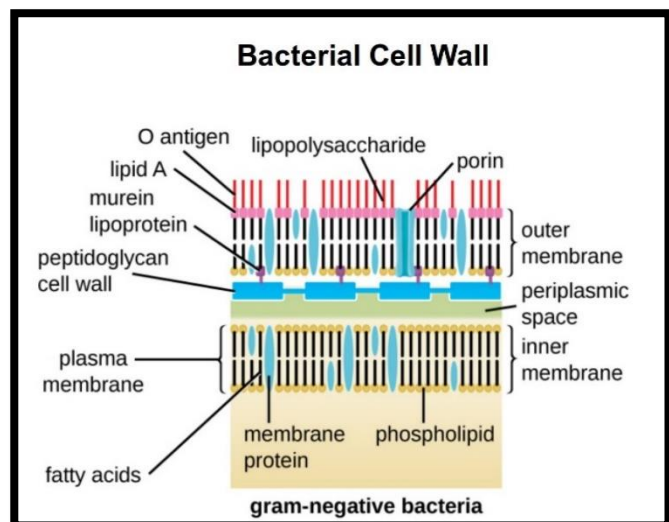
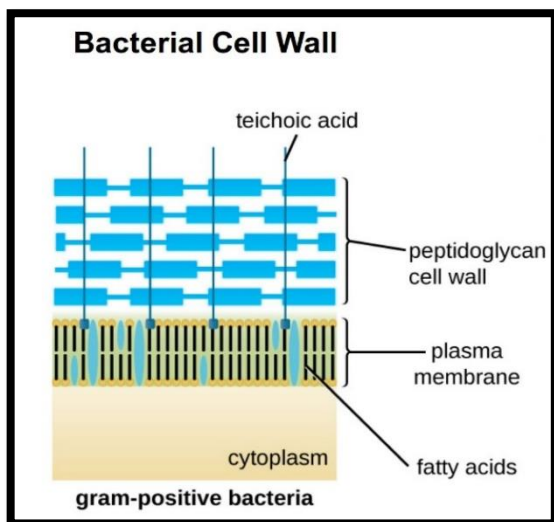
Χρώση είναι ο εμποτισμός ενός μικροοργανισμού με διάφορες χρωστικές προκειμένου να γίνει παρατήρηση των μορφολογικών, κυρίως, χαρακτηριστικών του στο μικροσκόπιο. Οι χρώσεις ποικίλουν ανάλογα με το χαρακτηριστικό που επιδιώκεται να παρατηρηθεί. Με τη μέθοδο αυτή μελετάται το σχήμα, το μέγεθος, ο διαχωρισμός κατά Gram, η κινητικότητα, ο προσανατολισμός των οργανιδίων που τη διευκολύνουν, η πιθανή παρουσία σπορίων κλπ. (Baron, 1996). Η πιο αξιοσημείωτη διαδικασία χρώσης είναι η χρώση κατά Gram που εφαρμόζεται σε βακτήρια.

Η αρχή πάνω στην οποία βασίζεται η χρώση κατά Gram είναι η διαφορά στο πάχος του κυτταρικού τοιχώματος ανάμεσα στα θετικά (Gram⁺) και αρνητικά (Gram⁻) κατά Gram

βακτήρια στην οποία αποδίδεται το αν το κύτταρο έχει την ικανότητα να συγκρατήσει τη χρωστική κρυσταλλικό ιώδες μετά από ξέπλυμα με οργανικό διαλύτη (όπως ακετόνη ή αιθανόλη) (Μπαλατσούρας, 2006).

Τα Gram⁺ βακτήρια αποτελούνται από μία εσωτερική πλασματική μεμβράνη, ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα (το οποίο αποτελείται από έως και 40 στρώματα πεπτιδογλυκάνης) και έναν περιπλασμικό χώρο ανάμεσά τους. Τέλος, εντοπίζονται και τειχοϊκά οξέα και λιποτεϊκοϊκά οξέα, τα τελευταία είναι συνδεδεμένα στην πλασματική μεμβράνη και διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα (Εικόνα 2.1.1.1) (Reece et al, 2015, Μπαλατσούρας, 2006).

Τα Gram⁻ βακτήρια αποτελούνται από μια εσωτερική πλασματική μεμβράνη, ένα λεπτό κυτταρικό τοίχωμα, μία εξωτερική κυτταρική μεμβράνη και έναν περιπλασμικό χώρο ανάμεσα σε κάθε μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα. Τέλος, πάνω στην εξωτερική μεμβράνη υπάρχουν λιποσακχαρίτες, λιπίδια, πρωτεΐνες και άλλες ενώσεις (Εικόνα 2.1.1.2) (Reece et al, 2015, Μπαλατσούρας, 2006).

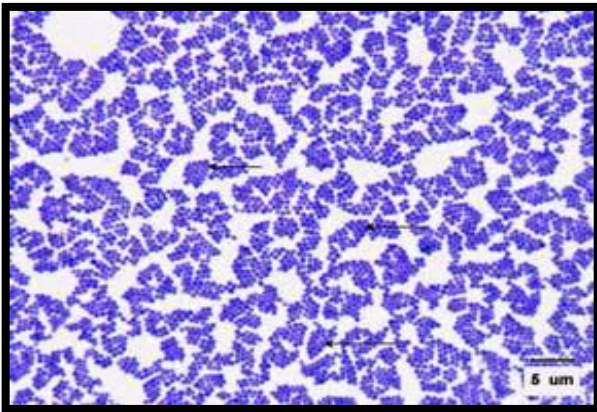


Εικόνα 2.1.1.1 Δομή τοιχώματος Gram⁺ βακτηρίου (πηγή: thoughtco.com)

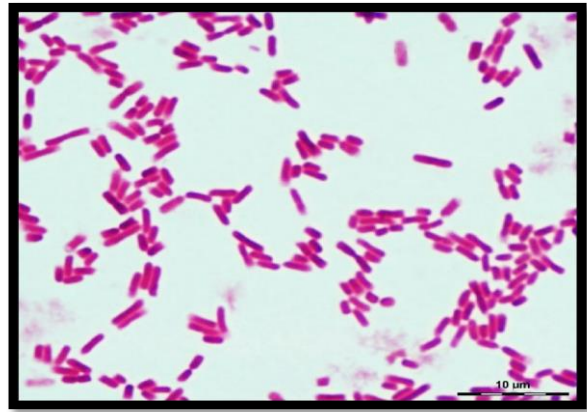
Εικόνα 2.1.1.2 Δομή τοιχώματος Gram⁻ βακτηρίου (πηγή:thoughtco.com)

Τα Gram⁺ κύτταρα δεσμεύουν το κρυσταλλικό ιώδες μιας και το παχύ κυτταρικό τους τοίχωμα όταν αφυδατωθεί αποτρέπει τη χρωστική να εξέλθει από το κύτταρο όταν αυτό ξεπλυθεί με οργανικό διαλύτη. Κατά συνέπεια τα κύτταρα αποκτούν χρώμα μωβ (Εικόνα 2.1.1.3).

Αντίστοιχα, τα Gram⁻ κύτταρα, αποβάλλουν τη χρωστική λόγω του λεπτού τοιχώματος. Για να τα διαχωριστούν, προστίθεται η χρωστική σαφρανίνη η οποία δίνει έντονο ροζ χρώμα (Εικόνα 2.1.1.4).



Εικόνα 2.1.1.3 Αποτελέσματα χρώσης Gram+ βακτηρίου (Πηγή: Scott Jones, ncbi.nlm.nih.gov)

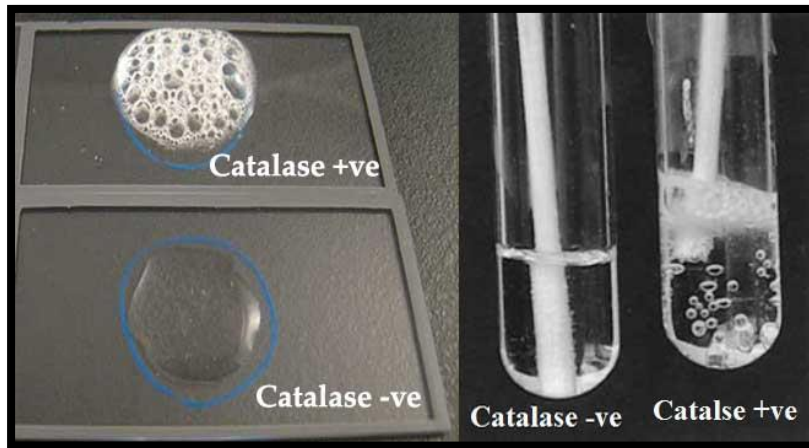


Εικόνα 2.1.1.4 Αποτελέσματα χρώσης Gram- βακτηρίου (Thairou et al, 2014)

2.1.2 Δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης

Οι δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης έχουν ως σκοπό τον προσδιορισμό των δεδομένων ανάπτυξης του μικροοργανισμού όσον αφορά το οξυγόνο.

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στους οργανισμούς που μπορούν να κάνουν αερόβια αναπνοή (υποχρεωτικά και προαιρετικά αερόβιοι). Αερόβια αναπνοή χαρακτηρίζεται η διαδικασία κατά την οποία τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την οξείδωση θρεπτικών συστατικών της τροφής, έχουν ως τελικό αποδέκτη το οξυγόνο (Jurtschuk, 1996). Κατά τη διάρκεια της αναπνοής παράγονται οι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) οι οποίοι στην πορεία μετασχηματίζονται από τα ένζυμα υπεροξική δισμουτάση και καταλάση, αντίστοιχα. Η καταλάση μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και αέριο O_2 (Ighodaro et al, 2018). Η δοκιμή δίνει θετικό αποτέλεσμα όταν με προσθήκη μερικών σταγόνων H_2O_2 σε κύτταρα παραχθούν φυσαλίδες και αρνητική όταν δεν παραχθούν (Εικόνα 2.1.2.1) (microbiologyinfo.com)



Εικόνα 2.1.2.1. Δοκιμή καταλάσης σε αντικειμενοφόρο πλάκα (αριστερά) και σε δοκιμαστικό σωλήνα (δεξιά). Στις εικόνες με παραγωγή φυσαλίδων η δοκιμή είναι θετική και σε αυτές χωρίς φυσαλίδες η δοκιμή είναι αρνητική.

Η οξειδάση του κυτοχρώματος c (ή κυτοχρωμική οξειδάση) αποτελεί ένα σύμπλοκο ενζύμων που βρίσκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, στα κύτταρα που υπάρχουν μιτοχόνδρια. Στα βακτήρια, μιας και δεν εντοπίζονται μιτοχόνδρια, η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (αν υπάρχει) εντοπίζεται στην εσωτερική κυτταρική μεμβράνη. Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων, το σύμπλοκο της οξειδάσης του κυτοχρώματος c βρίσκεται στην ανηγμένη του μορφή και οξειδώνεται χρησιμοποιώντας το O_2 ως δέκτη ηλεκτρονίων με τελικό προϊόν το νερό (Campbell, 2008, lumenlearning.com). Η δοκιμή οξειδάσης δίνει πληροφορίες για το αν υπάρχει το συγκεκριμένο σύμπλοκο στον οργανισμό. Με τη μεταφορά 4 ηλεκτρονίων στην κυτοχρωμική οξειδάση, το κυτόχρωμα c (τμήμα του συμπλόκου) μένει στην οξειδωμένη του μορφή. Αν εισαχθεί το αντιδραστήριο TMPD (Αντιδραστήριο Κονας) το οποίο βρίσκεται στην ανηγμένη του μορφή και είναι άχρωμο, τότε δρα ως δότης ηλεκτρονίων στο κυτόχρωμα c και του προκαλεί αναγωγή. Το ίδιο το αντιδραστήριο οξειδώνεται και παράγει μια ρίζα ιώδους χρώματος. Συνεπώς θετική δοκιμή δίνει ιώδες χρώμα, ενώ αρνητική δίνει άχρωμο αποτέλεσμα (American Society for Microbiology, 2016).



Εικόνα 2.1.2.2. Δοκιμή οξειδάσης. Στα αριστερά η δοκιμή είναι θετική και στα δεξιά αρνητική (Πηγή: American Society for Microbiology, 2016)

2.1.3 Επιλεκτικά και διαγνωστικά θρεπτικά υλικά

Για να επιτευχθεί η κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών που προαναφέρθηκε μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκεκριμένα θρεπτικά υλικά. Τα θρεπτικά υλικά, γενικά, χωρίζονται σε 3 κατηγορίες: τα γενικού σκοπού (non-selective), τα επιλεκτικά (selective), και τα διαγνωστικά (differential). Τα θρεπτικά υλικά *γενικού σκοπού* (Εικόνα 2.1.3.1) επιτρέπουν την ανάπτυξη όλων των ειδών μικροοργανισμών (που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακή καλλιέργεια). Τα *επιλεκτικά* θρεπτικά υλικά (Εικόνα 2.1.3.2) αποτελούν ένα περιβάλλον που λόγω της σύστασης των θρεπτικών συστατικών, του pH και των παραγόντων παρεμπόδισης (πχ. αντιβιοτικά) που μπορεί να υπάρχουν προωθεί την ανάπτυξη συγκεκριμένων μόνο κατηγοριών μικροοργανισμών που μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε αυτά. Τα *διαγνωστικά* θρεπτικά υλικά (Εικόνα 2.1.3.1, Εικόνα 2.1.3.2, Εικόνα 2.1.3.3), τα οποία μπορεί να είναι είτε γενικού σκοπού, είτε επιλεκτικά, περιέχουν δείκτες οι οποίοι μπορούν να κάνουν οπτικά εμφανή διαχωρισμό ανάμεσα σε κατηγορίες μικροοργανισμών όσον αφορά ένα υπό εξέταση (συνήθως βιοχημικό) χαρακτηριστικό. (Bonnet et al, 2020, bio.libretexts.org, 2020).

Με την ανάπτυξη, λοιπόν, μιας καθαρής καλλιέργειας σε διαγνωστικά θρεπτικά υλικά, μπορούν να δοθούν πληροφορίες για τα μεταβολικά μονοπάτια των μικροοργανισμών και τα προϊόντα αυτών.



Εικόνα 2.1.3.1 Ανάπτυξη *Staphylococcus aureus* σε διαγνωστικό άγαρ αίματος γενικού σκοπού. Η αιμόλυση που προκαλείται είναι εμφανής. (microbiologyinpictures.com)



Εικόνα 2.1.3.2 Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε επιλεκτικό διαγνωστικό θρεπτικό υλικό McConkey Agar. Οι αποικίες στα αριστερά ζυμώνουν τη λακτόζη ενώ οι αποικίες στα δεξιά όχι. Οι αλλαγές στο χρώμα οφείλονται στις διαφορετικές τιμές pH που προκύπτουν από τα προϊόντα του μεταβολισμού (πηγή: Tankeshwar, 2019)



Εικόνα 2.1.3.3 Αποτελέσματα επώασης σε θρεπτικό ζωμό BGGB. Στον πρώτο σωλήνα δεν υπήρξε ανάπτυξη, στον δεύτερο υπήρξε ανάπτυξη αλλά δεν υπήρξε παραγωγή αερίου και στον τρίτο υπήρξε ανάπτυξη και παραγωγή αερίου (πηγή: quizlet.com)

Έτσι, σε ορισμένες περιπτώσεις τα επιλεκτικά θρεπτικά υλικά συνδυάζονται με κάποιον άλλον παράγοντα ώστε να γίνουν παράλληλα και διαγνωστικά όπως στην περίπτωση του επιλεκτικού θρεπτικού ζωμού BGBB ή BGBLB (Brilliant Green Bile Broth/ Brilliant Green Bile Lactose Broth) ο οποίος χρησιμοποιείται για εντοπισμό εντεροβακτηρίων που μεταβολίζουν τη λακτόζη με πιθανή παραγωγή αερίου. Στο BGBB προστίθεται ένα ανεστραμμένο σωληνάκι (σωληνάκι Durham) το οποίο χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό παραγωγής αερίου σε περίπτωση ζύμωσης της λακτόζης (Εικόνα 2.1.2.1.3) (amylmedia.com, bio-rad.com).

2.1.4 Ανάπτυξη παρουσία αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες οι οποίες έχουν την δυνατότητα να αντιμετωπίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Οι τρόποι δράσης τους ποικίλουν και μπορεί να έχουν βακτηριοστατική (αναστολή ανάπτυξης) ή βακτηριοκτόνο φύση (μικροβιακή θανάτωση) (Kohanski, 2010):

- Παρεμπόδιση σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
- Παρεμπόδιση πρωτεϊνοσύνθεσης
- Παρεμπόδιση αντιγραφής DNA
- Παρεμπόδιση μεταβολισμού
- Επίδραση στην κυτταρική μεμβράνη.

Οι πιο γνωστές κατηγορίες αντιβιοτικών είναι οι (labtestonline, 2018):

- Πενικιλίνες
- Κεφαλοσπορίνες
- Τετρακυλίνες
- Καρβαπενέμες
- Αμινογλυκοσίδες
- Μακρολίδες
- Φλουοροκινολόνες
- Σουλφοναμίδες

Τα βακτήρια λόγω πιθανής ύπαρξης συγκεκριμένων γονιδίων (τα οποία συχνά εντοπίζονται στα πλασμίδια τους), έχουν την ικανότητα να αντιστέκονται στη δράση ορισμένων αντιβιοτικών όταν βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον. Η πιθανή αντοχή σε ορισμένα είδη αντιβιοτικών αποτελεί μέρος του βιοχημικού προφίλ του κάθε μικροοργανισμού, συνεπώς η καλλιέργεια αυτού παρουσία συγκεκριμένων αντιβιοτικών μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες. Επιπλέον με το μέγεθος

της ζώνης παρεμπόδισης που παρατηρείται στο τρυβλίο δίνονται πληροφορίες και για τον βαθμό ισχύος του κάθε αντιβιοτικού (Εικόνα 2.1.4.1). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα αξιόπιστα καθώς τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζονται/εξελίσσονται και σε βάθος χρόνου να αποκτούν ανοχή ενάντια σε αντιβιοτικά τα οποία μέχρι τότε θα ανέστελλαν την ανάπτυξή τους. Αυτό συμβαίνει με τον εξής τρόπο. Όταν διαφορετικά βακτηριακά γένη με διαφορετικές ικανότητες αντίστασης σε αντιβιοτικά βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον και κάποια κύτταρα ενός από τα γένη θανατώνονται, υπάρχει πιθανότητα το γενετικό υλικό του πλασμιδίου των κυττάρων αυτών (το οποίο περιέχει το γονίδιο αντίστασης σε ένα αντιβιοτικό) να εισαχθεί στο γενετικό υλικό των ζωντανών κυττάρων (μέσω οριζόντιας μεταφοράς) και να του προσδώσει την νέα αυτή ιδιότητα (Martinez, 2013, Wertz, 2017). Επίσης, τυχαίες μεταλλάξεις στο ήδη υπάρχον γενετικό υλικό ενός μικροοργανισμού, οι οποίες συχνά συμβαίνουν παρουσία επιλεκτικής πίεσης (π.χ. παρουσία αντιβιοτικού), μπορούν να τον καταστήσουν ανθεκτικό σε μία ή περισσότερες χημικές ουσίες και καταπονήσεις.



Εικόνα 2.1.4.1 Ανάπτυξη *Escherichia coli* παρουσία διαφόρων αντιβιοτικών (μέθοδος διάχυσης από δισκίο). Όπως φαίνεται οι ζώνες αναστολής ποικίλουν σε μέγεθος ενώ στις κάτω και κάτω αριστερά περιπτώσεις η ανάπτυξη δεν παρεμποδίστηκε καθόλου, γεγονός που υποδηλώνει αντίσταση στα εμποτισμένα αντιβιοτικά των δύο συγκεκριμένων δισκίων (Πηγή: John Durham, Science Photo Library)

2.2 Γονοτυπικές - Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης

2.2.1 Εισαγωγή

Οι γονοτυπικές μέθοδοι ταυτοποίησης βασίζονται σε ένα σύνολο αναλύσεων που γίνεται στο γενετικό υλικό του κυττάρου με χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας. Θεωρούνται εναλλακτικές μέθοδοι των φαινοτυπικών, των οποίων τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα ακριβή και κατά συνέπεια αξιόπιστα, παρά τα ορισμένα πλεονεκτήματά τους. Οι μοριακές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό για ποικίλων ειδών ελέγχους λόγω της μεγάλης ακρίβειάς τους, της σχετικής ευκολίας στη διαδικασία, όπως και του πολύ μειωμένου (σε σχέση με τις φαινοτυπικές μεθόδους) απαιτούμενου χρόνου για παραλαβή αποτελεσμάτων (Busse et al, 1996, Váradi et al, 2017).

Τα είδη των μοριακών τεχνικών είναι πολλά σε αριθμό και ποικίλουν ανάλογα με τη μελέτη που διεξάγεται. Οι πιο γνωστές στοχεύουν τη μελέτη του πολυμορφισμού του DNA, την ταξινόμηση του μικροοργανισμού μέχρι και σε επίπεδο οροτύπου (serovar), την απόκτηση πληροφοριών για επιδημιολογικές μελέτες και αφορούν επίσης δοκιμές ταυτοποίησης DNA (DNA fingerprinting). Οι μηχανισμοί στους οποίους βασίζονται οι αναλύσεις στις περισσότερες περιπτώσεις συνδυάζονται μεταξύ τους για την επίτευξη του τελικού αποτελέσματος.

Τα μόρια-στόχοι ποικίλουν, επίσης, σημαντικά και διαφοροποιούνται με βάση την κατηγορία οργανισμού. Συγκεκριμένα, οι αναλύσεις μπορεί να εστιάσουν σε (Aguilera et al, 2015, Busse et al, 1996, Váradi et al, 2017):

- Ολόκληρο το γενετικό υλικό του πυρήνα ή του πυρηνοειδούς (στην περίπτωση ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων, αντίστοιχα)
- Γενετικό υλικό πλασμιδίων (στην περίπτωση βακτηρίων)
- Γενετικό υλικό μιτοχονδρίων και, αν υπάρχουν, χλωροπλαστών (σε ευκαρυωτικά κύτταρα)
- Γονίδια που εντοπίζονται στο γενετικό υλικό οποιασδήποτε από τις παραπάνω περιπτώσεις
- Ριβοσωμικό RNA ή γονίδιο υπεύθυνο για τη σύνθεσή του.

2.2.2 Λύση κυττάρου- Απομόνωση DNA

Γενικότερα, για τη μοριακή ανάλυση οποιουδήποτε μορίου στο κύτταρο προτιμάται η απομόνωσή του, ώστε τα υπόλοιπα μόρια και οργανίδια του κυττάρου να μην επηρεάσουν αρνητικά τη διαδικασία. Αντίστοιχα, προκειμένου να αναλυθεί το γενετικό

υλικό απαιτείται η λύση του κυττάρου για την απελευθέρωση και την απομόνωση του υλικού αυτού.

Οι διαδικασίες απομόνωσης του DNA, όπως και τα τελικά τους αποτελέσματα, ποικίλουν σημαντικά γεγονός που καθιστά απαραίτητη την αναζήτηση της κατάλληλης διαδικασίας που θα έχει επαρκή απόδοση για τις μετέπειτα αναλύσεις (Al-Talib et al, 2013). Κυριότερος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψιν είναι το είδος του κυττάρου καθώς η φυσιολογία του επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία.

Παρόλο που υπάρχουν διαφοροποιήσεις ανά τις μεθόδους, τα βασικά στάδια της χημικής απομόνωσης και οι στόχοι τους παραμένουν κοινοί και συνοψίζονται στα παρακάτω (Dhaliwal, 2020):

- Λύση κυττάρου μέσω διάσπασης κυτταρικού τοιχώματος (εφόσον υπάρχει) και κυτταρικής μεμβράνης
- Απομάκρυνση λιπιδίων μεμβράνης
- Μετουσίωση πρωτεϊνών και απομάκρυνσή τους
- Απομάκρυνση υπολοίπων υπολειμμάτων κυττάρου
- Επώαση στο ένζυμο RNAάση, για διάσπαση μορίων RNA
- Παραλαβή ή έκλυση (elution) (ανάλογα με το πρωτόκολλο) DNA σε υπερκάθαρο νερό (διπλής απόσταξης) ή σε ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα και αποθήκευση σε κατάψυξη.

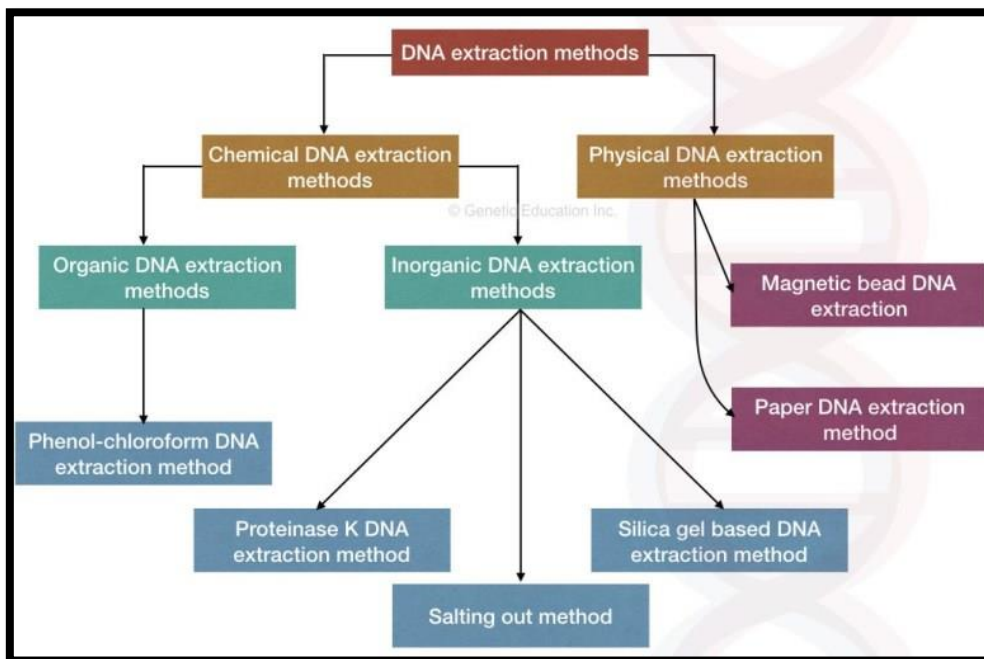
Η λύση του κυττάρου, δηλαδή η διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος (αν υπάρχει) και της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να γίνει με πολλές μεθόδους, με τις πιο γνωστές να είναι η μηχανική λύση (π.χ., αιχμηρές επιφάνειες με «νανομαχαίρια» που προκαλούν ρήξη στο τοίχωμα και τη μεμβράνη, ισχυρός σπρωβιλισμός των κυττάρων παρουσία σφαιριδίων), η ηχητική λύση (με χρήση υπερήχων), ηλεκτρική λύση και, τέλος τη χημική λύση (η πιο κοινή μέθοδος η οποία γίνεται με χρήση απορρυπαντικών ή/και με εισχώρηση ιόντων OH^- για δημιουργία υψηλής βαθμίδωσης ανάμεσα σε κυτταρόπλασμα και εξωκυττάριο χώρο και τελικά πρόκληση ρήξης) (Brown and Audet, 2008).

Για τη ρήξη των μεμβρανών χρησιμοποιούνται επίσης σε πολλές περιπτώσεις ένζυμα όπως πρωτεάσες και πεπτιδάσες για μετουσίωση ή αποδιάταξη των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Τέλος, με χρήση αλκοολών όπως αιθανόλης, αλάτων όπως χλωριούχου νατρίου (NaCl), οξικού νατρίου (CH_3COONa) ή οξικού καλίου (CH_3COOK) τα υπολείμματα δεσμεύονται, συσσωματώνονται και τελικά απομακρύνονται μέσω φυγοκέντρησης, ενώ το γενετικό υλικό προστατεύεται από μετουσίωση (Eslami et al, 2017, Elkins, 2013). Για να είναι τα αποτελέσματα πιο αξιόπιστα γίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις επώαση σε RNAάση στο τέλος προκειμένου τα ριβονουκλεϊκά μόρια να διασπαστούν και να μην επηρεάσουν ενδεχομένως αρνητικά τη συνέχεια της διαδικασίας.

Οι παραπάνω μέθοδοι αποτελούν τις πιο γνωστές και εύκολα εφαρμόσιμες στον τομέα. Παρόλα αυτά, οι πιο σύγχρονες προσεγγίσεις στο θέμα της απομόνωσης του DNA είναι

μέσω χρήσης εμπορικών κυτιών (commercial kits) τα οποία με χρήση ορισμένων προπαρασκευασμένων αντιδραστηρίων φροντίζουν για την απομόνωση σε λίγα μόνο στάδια και σε πολύ σύντομο χρόνο. Τα κυτία αυτά, παρόλο που προσφέρουν γρήγορα σχετικά αποτελέσματα, τείνουν να είναι αρκετά εξειδικευμένα και προορίζονται για μικροοργανισμούς που έχουν αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό στο εργαστήριο (Dhaliwal, 2020), γεγονός που δεν είναι ιδιαίτερα βοηθητικό στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί και η δομή των κυττάρων είναι άγνωστες μεταβλητές. Επιπλέον, τα κυτία αυτά συνήθως έχουν κόστος αρκετά υψηλό ώστε να μην τα κάνει προσβάσιμα σε κάθε εργαστήριο.

Τέλος υπάρχουν και πιο καινοτόμες μέθοδοι, όπως η μέθοδος μαγνητικών χαντρών, οι οποίες απομονώνουν το DNA με διαφορετικούς τρόπους βασισμένες στο μέγεθός του, τη δομή του και την πολικότητά του (Shetty, 2020). Οι κατηγορίες των πιο βασικών και ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων απομόνωσης συνοψίζονται στην εικόνα 2.2.2.1



Εικόνα 2.2.2.1 Σύνοψη των πιο γνωστών και ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων απομόνωσης DNA (πηγή: Chauhan, 2018, genetic education.co.in)

2.2.3 Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων μέσω φασματοφωτομετρίας

Η υπάρχουσα ποσότητα DNA ή/και RNA ενός δείγματος μπορεί να προσδιοριστεί μέσω φασματοφωτομετρίας υπεριώδους (UV). Τα νουκλεϊκά οξέα, μονόκλινα και δίκλινα, όπως και οι βασικές τους δομικές μονάδες, τα νουκλεοτίδια, είναι σε θέση να απορροφούν ακτινοβολία στα 260 nm, χωρίς όμως να μπορεί να γίνει μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου υπολογισμός της ακριβούς αναλογίας τους στο δείγμα (Joseph, 2016). Εκτός από τις μετρήσεις στα 260 nm, χρήσιμες πληροφορίες δίνονται και από τις μετρήσεις στα 280 nm, μήκος κύματος ακτινοβολίας στην οποία παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση οι περιεχόμενες πρωτεΐνες. Μέσω της αναλογίας A_{260}/A_{280} βγαίνουν σημαντικά συμπεράσματα για την καθαρότητα του DNA με τις αποδεκτές τιμές να κυμαίνονται από 1,8 έως 2. Όταν ο λόγος των απορροφήσεων τείνει ή υπερβαίνει το 2, υπάρχει μεγάλη ένδειξη ύπαρξης ακαθαρσιών στο DNA οι οποίες είναι συνήθως κυτταρικά υπολείμματα, υδατάνθρακες ή φαινόλες (Joseph, 2016, Barbas III et al, 2007). Για να ερευνηθεί η θεωρία πιθανής ύπαρξης υπολειμμάτων γίνονται και μετρήσεις στα 310 nm όπου δίνονται πληροφορίες για την ποσότητα ποικίλων ακαθαρσιών στο δείγμα. Οι ιδανικές τιμές απορρόφησης στα 310 nm είναι από μηδενικές έως 0,015.

Προκειμένου να γίνουν οι μετρήσεις συνήθως το δείγμα υφίσταται προηγουμένως αραίωση σε υπερκάθαρο νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, EDTA (TE, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), ώστε η τιμή της απορρόφησης να μην υπερβαίνει το 1. Υπερκάθαρο νερό ή TE χρησιμοποιείται και ως τυφλό για τον μηδενισμό του μηχανήματος (φασματοφωτόμετρου). Τα μηχανήματα ποικίλουν πολύ μεταξύ τους, όπως και τα «δοχεία» στα οποία τοποθετείται το δείγμα για να γίνουν οι μετρήσεις. Όταν χρησιμοποιούνται κυψελίδες προτιμώνται αυτές από χαλαζία, καθώς παρουσιάζουν αμελητέα απορρόφηση στο υπεριώδες (Barbas III et al, 2007).

Για τον υπολογισμό της ποσότητας περιεχόμενων νουκλεϊκών οξέων με βάση την μετρημένη απορρόφηση χρησιμοποιείται η εξίσωση Lambert-Beer:

$$A = \epsilon * L * C,$$

όπου A η μετρημένη απορρόφηση (στα 260 nm)

ϵ η μοριακή απορρόφηση, δηλαδή η απορρόφηση 1M της ουσίας ($\text{cm}^{-1} * \text{M}^{-1}$)

L το μήκος που διατρέχει η ακτινοβολία στο εσωτερικό της κυψελίδας (συνήθως 1 cm)

C η συγκέντρωση της ουσίας (M)

Συγκεκριμένα για τα νουκλεϊκά οξέα, έχει βρεθεί πειραματικά ότι με χρήση κυψελίδας εσωτερικού πλάτους 1cm, για να ληφθεί τιμή απορρόφησης ίση με 1 απαιτούνται διαλύματα με τις παρακάτω συγκεντρώσεις (Barbas III et al, 2007, Berthold Technologies):

- Για δίκλινο DNA (dsDNA): 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Για μονόκλινο DNA (ssDNA): 33-37 $\mu\text{g}/\text{ml}$

- Για μονόκλωνο RNA (ssRNA): 40 µg/ml
- Για ολιγονουκλεοτίδια: 20-30 µg/ml

Συνεπώς, ο υπολογισμός της συγκέντρωσης dsDNA ενός διαλύματος γίνεται ως εξής:

$$C (\mu\text{g/ml}) = 50 \mu\text{g/ml} * A_{260} * \text{Παράγοντας Αραιώσης}$$

Όπου C: η συγκέντρωση του dsDNA (µg/ml)

A_{260} : Η απορρόφηση που έδωσε το δείγμα στα 260 nm

Παράγοντας Αραιώσης: οι φορές που αραιώθηκε το δείγμα πριν τις μετρήσεις

2.2.4 Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και τα πιο κοινά είδη της

Προκειμένου μια αλληλουχία γενετικού υλικού να αναλυθεί πρέπει αρχικά να εντοπιστεί, στη συνέχεια να απομονωθεί και τέλος να αντιγραφεί αρκετές φορές ώστε να υπάρχει σε επαρκή (μεγάλη) ποσότητα για τις μετέπειτα μελέτες. Η πιο γνωστή μέθοδος για να συμβεί αυτό είναι η PCR.

Η PCR είναι μέθοδος εκθετικού πολλαπλασιασμού μιας επιλεγμένης αλληλουχίας (Wages Jr, 2005). Χωρίζεται σε 3 βασικά στάδια (Caetano-Anollés, 2013):

1. Αποδιάταξη του νουκλεϊκού οξέος.
2. Εύρεση και προσκόλληση εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων (primers) στα δύο άκρα της επιθυμητής αλληλουχίας του μορίου.
3. Επιμήκυνση της νέας αλληλουχίας με χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση.

Στη συνέχεια υπάρχει επανάληψη των παραπάνω σταδίων αρκετές φορές (περίπου 30-40) για να εξασφαλιστεί μεγάλος αριθμός αντιγράφων. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cyclers). Η διαδικασία βασίζεται στην προσαρμογή της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος ώστε να υποβοηθείται η δράση των αντιδραστηρίων που φροντίζουν για κάθε στάδιο.

Προκειμένου να γίνει η διαδικασία κάθε δείγμα πρέπει να αποτελεί μείγμα συγκεκριμένων αντιδραστηρίων. Παρόλο που τα αντιδραστήρια ποικίλουν ανάλογα με το είδος της διαδικασίας, τον σκοπό της και την εταιρία που τα παρέχει, τα βασικά απαραίτητα αντιδραστήρια παραμένουν κοινά. Συγκεκριμένα, απαιτείται (Lorenz, 2012):

- Ποσότητα πρότυπου DNA (template DNA), σε αραιωμένη ή πυκνή μορφή.
- DNA πολυμεράση, για την επιμήκυνση των νέων αλυσίδων. Η πιο γνωστή πολυμεράση για εργαστηριακή χρήση είναι η θερμοσταθερή Taq Polymerase που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*.
- Εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια ή εκκινήτες (primers) μήκους περίπου 15-30 nt για εύρεση της επιθυμητής αλληλουχίας. Συνήθως χρησιμοποιείται ένα ζεύγος,

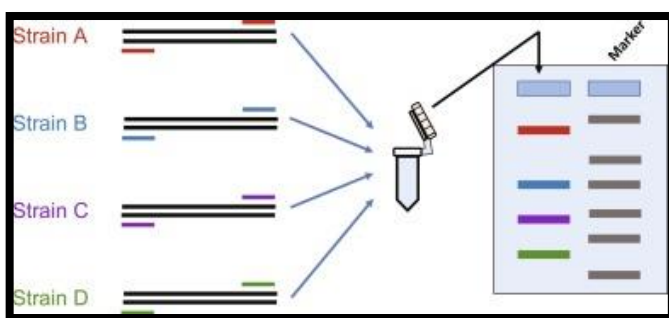
με αντιπαράλληλο προσανατολισμό, για να γίνει ταυτόχρονη επιμήκυνση και στις δύο αλυσίδες του νουκλεϊκού οξέος.

- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιούνται για την επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), ιόντα Mg^{2+} , Cl^{-} για εξασφάλιση βέλτιστης απόδοσης των ενζύμων
- ddH₂O (Νερό διπλής απόσταξης ή υπερκάθαρο)

Για επίτευξη διαφορετικών σκοπών κατά τις μοριακές αναλύσεις, η τεχνική της PCR έχει υποστεί πολλές τροποποιήσεις και διαφοροποιήσεις, έχοντας όμως ως βάση την ίδια αρχή μεθόδου. Οι μορφές της PCR που χρησιμοποιούνται για ταυτοποίηση (identification) μικροοργανισμών συνοψίζονται παρακάτω.

2.2.4.1 Πολυπλεκτική (multiplex) PCR

Η multiplex PCR είναι μία μέθοδος κατά την οποία εισάγονται στην ίδια αντίδραση δύο ή και περισσότερα ζεύγη εκκινητών (primers) για την ταυτόχρονη ανίχνευση/πολλαπλασιασμό διαφορετικών αλληλουχιών. Οι αλληλουχίες αυτές μπορούν να βρίσκονται είτε στο ίδιο δείγμα DNA, είτε σε διαφορετικό, δηλαδή μπορούν να εισαχθούν παραπάνω από ένα δείγματα. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη εξοικονόμηση χρόνου και αντιδραστηρίων που σε πολλές περιπτώσεις, για παράδειγμα στην περιορισμένη διαθεσιμότητα δείγματος DNA, μπορεί να είναι ύψιστης σημασίας (Shen, 2019). Η διαδικασία συνοψίζεται στην εικόνα 2.2.4.1.1. Για τη λήψη σωστών αποτελεσμάτων και αποφυγή σφαλμάτων κατά τη διαδικασία, μεγάλης σημασίας είναι η κατάλληλη επιλογή των εκκινητών οι οποίοι είναι απαραίτητο να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και να μπορούν να ενεργοποιηθούν και να δράσουν σε παραπλήσιες θερμοκρασίες (Mahony and Chernesky, 1995).



Εικόνα 2.2.4.1.1 Σύνοψη δράσης πολυπλεκτικής (multiplex) PCR (Shen, 2019)

2.2.4.2 PCR Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RT-PCR)

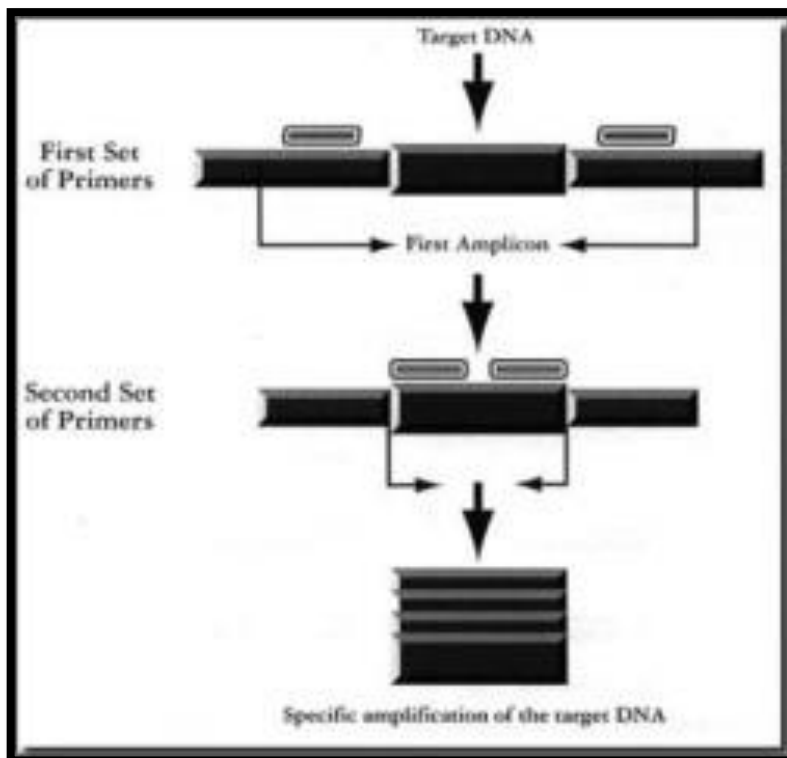
Η RT (reverse transcription)-PCR είναι μέθοδος που αποσκοπεί στον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας RNA. Η μέθοδος βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση το οποίο φροντίζει για την παραγωγή ενός μορίου DNA συμπληρωματικό σ' ένα μόριο RNA. Το νεοσυντιθέμενο μόριο DNA ονομάζεται cDNA (complementary DNA) και είναι συμπληρωματικό στο αρχικό μόριο RNA. Στη συνέχεια το μόριο DNA γίνεται δίκλωνο (double stranded DNA, dsDNA) και υφίσταται τη διαδικασία της PCR όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 2.2.4 (Jalali et al, 2017). Ο λόγος για τον οποίο επιλέγεται να πολλαπλασιαστεί το μόριο στη δίκλωνη μορφή είναι γιατί το δίκλωνο μόριο είναι πολύ πιο ανθεκτικό και δεν κινδυνεύει να υποστεί μετουσίωση, σε αντίθεση με το μονόκλωνο RNA. Η μέθοδος είναι πολύ χρήσιμη για μελέτη γενετικού υλικού RNA ιών και μπορεί να αποδώσει ακόμα και με εξαιρετικά μικρό αριθμό κυττάρων (Álvarez-Fernández, 2013, Farkas and Holland, 2009).

2.2.4.3 PCR και RT-PCR πραγματικού χρόνου (qPCR και RT-qPCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου ή αλλιώς ποσοτική PCR είναι μία μέθοδος κατά την οποία πέρα από τον πολλαπλασιασμό μιας επιθυμητής αλληλουχίας, μπορεί να παρακολουθηθεί σε πραγματικό χρόνο η παραγόμενη ποσότητα του επιθυμητού γονιδίου καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας (Dymond, 2013, Maddocks and Jenkins, 2017). Επίσης, με την κατασκευή της κατάλληλης πρότυπης καμπύλης (αντίστροφης γραμμικής συσχέτισης της αρχικής ποσότητας DNA και του χρόνου ανίχνευσης των παραγόμενων αμπλικονίων) μπορεί να ποσοτικοποιηθεί η αρχική ποσότητα του DNA που εισάγεται κάθε φορά στην αντίδραση. Αντίστοιχα, με την RT-PCR μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και δείγμα RNA (συμπεριλαμβανομένου του mRNA) (Wright, 2015). Η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη για τον εντοπισμό πιθανής παρουσίας συγκεκριμένων μικροοργανισμών στο δείγμα, την ποσοτικοποίησή τους ή και τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων τους, με σημαντικό πλεονέκτημα την αξιοσημείωτη εξοικονόμηση χρόνου. Παρόλα αυτά, η μέθοδος παρουσιάζει αυξημένο βαθμό ευαισθησίας και επιρρεπής στις επιμολύνσεις, γεγονός που αυξάνει το βαθμό δυσκολίας της.

2.2.4.4 Φωλιασμένη (δύο σταδίων) PCR (Nested PCR)

Η φωλιασμένη PCR αποτελεί μία τροποποιημένη μορφή της κλασσικής διαδικασίας που αναλύθηκε στην παράγραφο 2.2.4. Συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο στάδια στο καθένα από τα οποία λαμβάνει χώρα μια ξεχωριστή PCR. Η διαδικασία συνοψίζεται ως εξής: Στο πρώτο στάδιο πολλαπλασιάζεται μία αλληλουχία από το εισαγόμενο DNA με χρήση ενός συγκεκριμένου ζεύγους εκκινητών. Τα προϊόντα του πρώτου αυτού σταδίου αποτελούν το εισαγόμενο δείγμα για το δεύτερο στάδιο στο οποίο πραγματοποιείται και πάλι PCR με χρήση διαφορετικού ζεύγους εκκινητών που εντοπίζουν αλληλουχία εσωτερική του προϊόντος του πρώτου σταδίου. Το αποτέλεσμα δίνει ένα πολύ πιο συγκεκριμένο, ακριβές και ξεκάθαρο, επιθυμητό προϊόν. Παρόλα αυτά, η διαδικασία



Εικόνα 2.2.4.4.1 Επισκόπηση δράσης φωλιασμένης (nested) PCR

είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιρρεπής στις επιμολύνσεις, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την εμπειρία του χειριστή (Hanlon and Nadin-Davis, 2013, Wanger et al, 2017, Wilczynski, 2009). Στις ορθές πρακτικές μάλιστα, σύμφωνα με τους Carr et al (2010), συγκαταλέγεται και η εναλλαγή των δωματίων ανά στάδιο που πραγματοποιείται η διαδικασία για αποφυγή επαφής με επιμολυντές. Η διαδικασία συνοψίζεται στην εικόνα 2.2.4.4.1 (Marmioli and Maestri, 2007).

2.2.5 Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή αλλιώς ένζυμα περιορισμού είναι μόρια τα οποία βρίσκονται φυσιολογικά σε πολλά βακτηριακά κύτταρα και αναγνωρίζουν

συγκεκριμένες αλληλουχίες στο δίκλωνο μόριο DNA, κόβοντάς τες σε καθορισμένα σημεία (Berta et al, 2015). Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν είναι μικρού μεγέθους, της τάξης των 4 έως 8 ζευγών βάσεων και το σημείο τομής είναι είτε εσωτερικό των βάσεων αυτών, είτε σε πολύ κοντινή απόσταση (Mariani and Bekkevold, 2014).

Η δράση των ενζύμων περιορισμού αποσκοπεί στην άμυνα του κυττάρου έναντι παραγόντων που πιθανώς να το απειλήσουν μέσω πρόκλησης μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η μόλυνση από βακτηριοφάγους οι οποίοι, εισάγουν το γενετικό τους υλικό στον ξενιστή προκειμένου να αναπαραχθούν. Με τη δράση τους τα περιοριστικά ένζυμα τεμαχίζουν το γενετικό υλικό του βακτηριοφάγου καθιστώντας το αδύνατο να πολλαπλασιαστεί και κατά προέκταση να θανατώσει το βακτήριο. Οι αλληλουχίες που ανιχνεύονται από τα περιοριστικά ένζυμα αλλά βρίσκονται φυσιολογικά στο γονιδίωμα του βακτηρίου υφίστανται μία προσωρινή τροποποίηση από τα ένζυμα μεθυλάσες τα οποία προσθέτουν μεθυλομάδες (-CH₃) στις αζωτούχες βάσεις του σημείου τομής προκειμένου να παρεμποδιστεί η δράση των περιοριστικών ενζύμων (Brittanica, 2020). Η τομή γίνεται μέσω υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών που αναπτύσσονται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια της ίδιας αλυσίδας. Στη συνέχεια, τα εναπομείναντα τμήμα συνδέονται μεταξύ τους μέσω του ενζύμου λιγάση. Η δομή και αλληλουχία αναγνώρισης κάθε περιοριστικής ενδονουκλεάσης ποικίλει ανά βακτηριακό είδος και το εκάστοτε όνομα προκύπτει από το γένος, το είδος και το υποείδος του βακτηρίου όπου εντοπίζεται. Ορισμένα από τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα περιοριστικά ένζυμα συνοψίζονται στον πίνακα 2.2.5.1 (Zerbini et al, 2014).

Τα περιοριστικά ένζυμα είναι εξαιρετικά χρήσιμα στον τομέα της γενετικής μηχανικής και της μοριακής βιολογίας. Μέσω της δράσης τους, μπορεί να γίνει επίδραση στο γενετικό υλικό πολλών οργανισμών προκειμένου να αποκτήσει νέες, επιθυμητές ιδιότητες. Αντίστοιχα, μιας και το γενετικό υλικό αποτελείται από ένα ή περισσότερα μόρια μεγάλου μεγέθους, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορούν να το τεμαχίσουν σε μικρότερα τμήματα ώστε να είναι πολύ πιο εύκολη η μελέτη του και η κατανόησή του.

Τα ένζυμα περιορισμού χωρίζονται σε 4 κατηγορίες (I, II, III, IV) ανάλογα με τη δομή, τη λειτουργικότητα και τους συνπαράγοντές τους. Τα ένζυμα τύπου I και III έχουν παρόμοια δράση και δομή. Ο περιορισμός, όπως και η μεθυλίωση γίνεται από το ίδιο σύμπλοκο, ενώ ο περιορισμός μπορεί να γίνει είτε κοντά, είτε αρκετά μακριά από το σημείο αναγνώρισης. Τα ένζυμα τύπου II δεν έχουν ενιαίο σύμπλοκο και για τις δύο λειτουργίες, ενώ ο τεμαχισμός γίνεται μόνο εσωτερικά της περιοχής αναγνώρισης. Τέλος, τα ένζυμα τύπου IV, έχουν ως στόχο μεθυλιωμένο DNA (Britannica, 2020, New England BioLabs Inc, 2021).

Πίνακας 2.2.5.1 Σύνοψη πληροφοριών για 5 γνωστά είδη περιοριστικών ενδονουκλεασών

Όνομασία Ενζύμου	Προέλευση	Αλληλουχία Αναγνώρισης
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> RY13	5' G//AATTC 3' 3' CTAA//G 5'
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5' G//GATCC 3' 3' CCTAG//G 5'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	5' A//AGCTT 3' 3' TTCGA//A 5'
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' GG//CC 3' 3' CC//GG 5'
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5' GGTAC//C 3' 3' C//CATGG 5'

2.2.6 Ηλεκτροφόρηση-UV απεικόνιση

Η ηλεκτροφόρηση, γενικότερα, είναι μία διαδικασία διαχωρισμού φορτισμένων μορίων μέσω επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου. Μεταξύ άλλων, χρησιμοποιείται σε πολλές περιπτώσεις για διαχωρισμό και ανάλυση νουκλεϊκών οξέων.

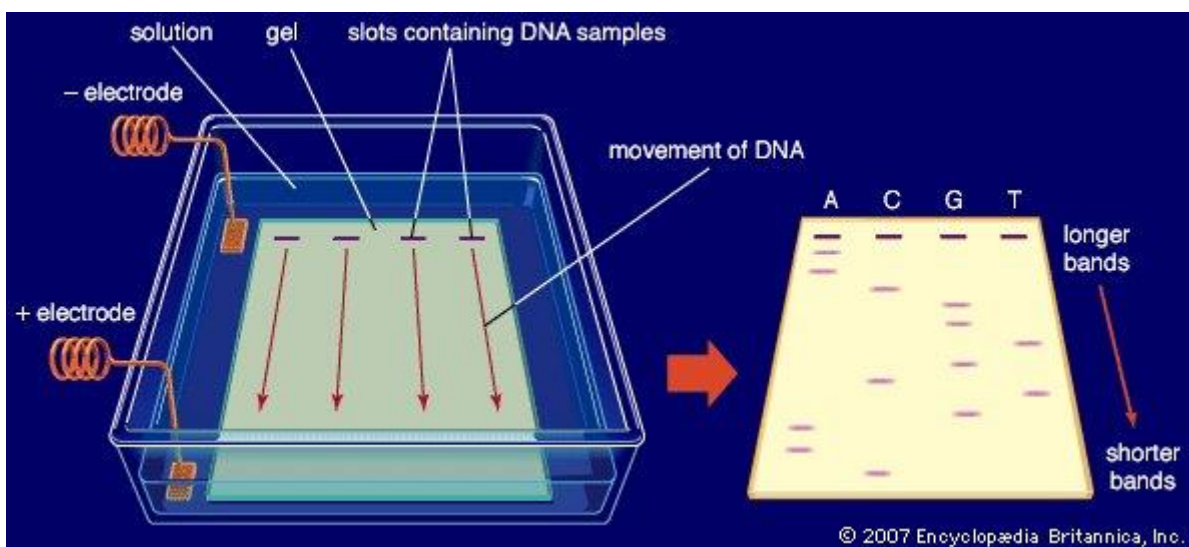
Η συσκευή στη οποία πραγματοποιείται αφορά ένα σύστημα που αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια με αντίθετο φορτίο, ένα σε κάθε πόλο και ένα αγώγιμο μέσο που λέγεται ηλεκτρολύτης (σε μορφή υγρή ή υδρόφιλης πηκτής). Μέσω δημιουργίας ηλεκτρικού πεδίου, τα μόρια κινούνται από τον έναν πόλο στον άλλον με βάση το φορτίο τους. Κατά τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων, υπάρχει μετανάστευση των μορίων προς τον θετικό πόλο λόγω του γεγονότος ότι τα νουκλεϊκά οξέα είναι φορτισμένα αρνητικά. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται χάρη στη διαφορετική ταχύτητα κίνησης (velocity, v) του κάθε μορίου, η οποία εξαρτάται από την κινητικότητα του μορίου (motility, m) και την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου (E) μέσω της εξίσωσης $v=m \cdot E$. Η κινητικότητα του μορίου εξαρτάται από το μέγεθός του, το σχήμα του, το φορτίο του και τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η διαδικασία (η οποία παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης) (Fritsch and Krause, 2003).

Τα δείγματα εισάγονται μέσα σε οπές που έχουν δημιουργηθεί κατά την παρασκευή και την στερεοποίηση της πηκτής (gel). Η πηκτή παρασκευάζεται με χρήση (Scull, 2014):

- Αγαρόζης για νουκλεϊκά οξέα μεγάλου μεγέθους ή πολυακρυλαμιδίου για πρωτεΐνες ή μικρά τμήματα DNA (Isbir et al, 2013)
- Ρυθμιστικού διαλύματος, συνήθως TBE (Tris-Boric acid-EDTA) ή TAE (Tris-Acetic acid-EDTA)
- Φθορίζουσας χρωστικής, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο βοηθά στην παρατήρηση των διαχωρισμένων μορίων υπό UV ακτινοβολία.

Η ακριβής σύσταση της πηκτής και το μέγεθος των πόρων της διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό των μεγάλων μορίων από τα μικρότερα καθώς δυσκολεύει τη μετακίνηση των πρώτων και διευκολύνει την μετακίνηση των δεύτερων. Πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στην πηκτή συχνά γίνεται ανάμειξη αυτών με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει κάποια χρωστική, αρνητικά φορτισμένη για να κινείται με τον ίδιο τρόπο με τα νουκλεϊκά οξέα. Ο ρόλος του είναι βοηθητικός καθώς διευκολύνουν την οπτική παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης και συμπυκνώνουν παράλληλα το διάλυμα του δείγματος (Lee et al, 2002). Η πιο γνωστή χρωστική που περιέχεται είναι το μπλε της βρωμοφαινόλης.

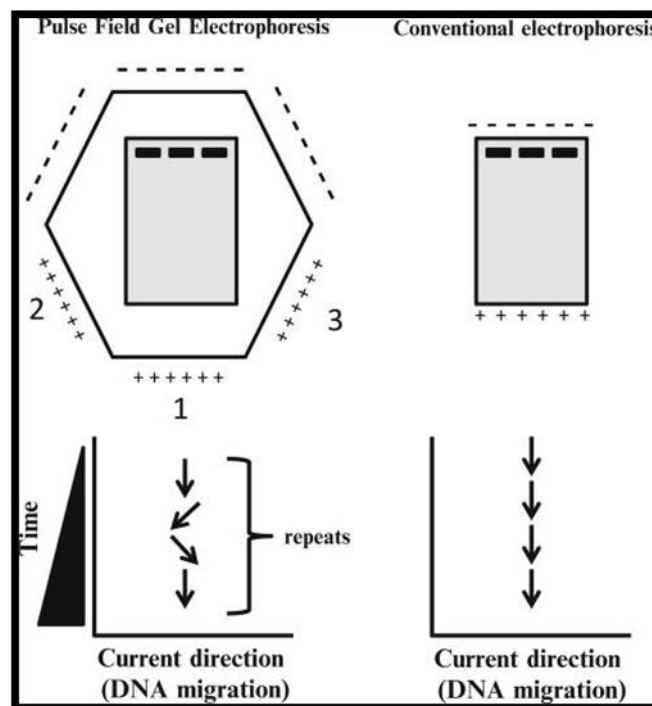
Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή αφαιρείται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ακολούθως εισάγεται σε μία συσκευή ψηφιακής απεικόνισης UV, όπου με τη βοήθεια της φθορίζουσας χρωστικής που είχε προστεθεί νωρίτερα (π.χ. βρωμιούχο αιθίδιο) υπάρχει εμφανής απεικόνιση των γραμμών που δημιουργήθηκαν. Κάθε ξεκάθαρη γραμμή ονομάζεται μπάντα (band). Η διαδικασία συνοψίζεται στην εικόνα 2.2.6.1.



Εικόνα 2.2.6.1 Σύνοψη δομής συστήματος και διαδικασίας ηλεκτροφόρησης (Encyclopedia Brittanica, 2007)

2.2.7 Μέθοδος ηλεκτροφόρησης πηκτής παλλόμενου πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Η μέθοδος της PFGE είναι μία μοριακή τεχνική ανάλυσης γονιδιωματικού DNA. Χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει κυρίως βακτηριακά στελέχη ανάλογα με την εικόνα που δημιουργείται μετά από επώαση του γονιδιωματικού τους DNA με συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Wang et al, 2015). Η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου, διαφοροποιείται από τη συμβατική ηλεκτροφόρηση στο γεγονός ότι ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα η δράση των ηλεκτροδίων και κατά συνέπεια των «πόλων» έλξης και άπωσης, αλλάζει άξονα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν 3 διαφορετικοί άξονες: ένας κεντρικός, κάθετος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και 2 ακόμη, δεξιά και αριστερά από τον βασικό, με τον οποίο σχηματίζουν γωνία 60°. Η μέθοδος βοηθά στον καλύτερο διαχωρισμό των τμημάτων μεγάλου μεγέθους από τα μικρότερα των οποίων η κίνηση πιθανώς να παρεμποδίζεται λόγω «εγκλωβισμού» ανάμεσα σε τμήματα με μεγαλύτερη δυσκολία να μετακινηθούν (Εικόνα 2.2.7.1) (Sharma-Kuinke et al, 2017).



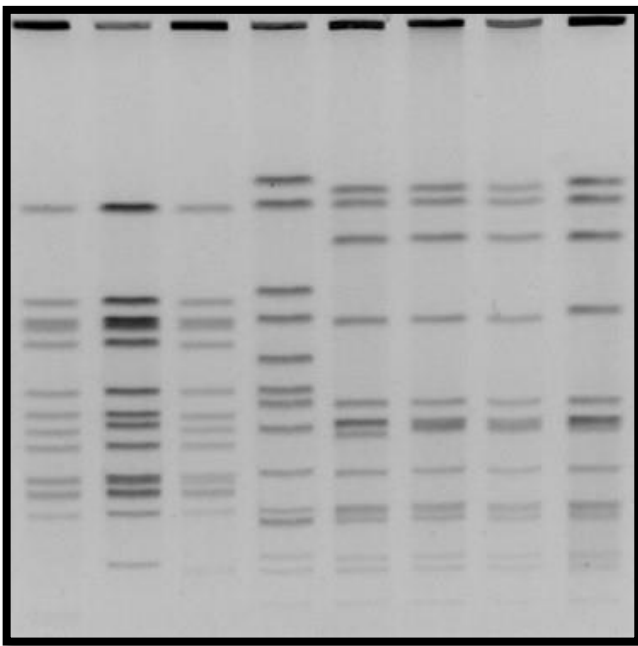
Εικόνα 2.2.7.1 Σχεδιάγραμμα διαφορών ηλεκτροφόρησης παλλόμενου πεδίου (αριστερά) και απλής ηλεκτροφόρησης (δεξιά).

Η διαδικασία αποτελείται από 3 βασικά μέρη:

1. Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA με χρήση διαλυμάτων λύσης ή, σε κάποιες περιπτώσεις, μεθόδων που αναλύονται στην παράγραφο 2.2.2
2. Επώαση του DNA μαζί με επιλεγμένο ένζυμο περιορισμού για την κατάτμησή του σε μικρότερα κομμάτια διαφορετικών μεγεθών.
3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη σε παλλόμενο πεδίο για εμφανή διαχωρισμό των μορίων (περιοριστικών θραυσμάτων).

Η εικόνα που δημιουργείται αποκαλείται «αποτύπωμα DNA» ή «μοτίβο PFGE» (Wang et al, 2015) και χρησιμοποιείται για να συγκριθεί με άλλα (πρότυπα) στελέχη προκειμένου να εξακριβωθεί αν υπάρχει ταυτοποίηση (Εικόνα 2.2.7.2).

Η μέθοδος παρόλο που έχει μεγάλο βαθμό ακρίβειας και βοηθά στην ανάλυση ολόκληρου του γονιδιωματικού DNA παρουσιάζει υψηλό βαθμό δυσκολίας και είναι χρονοβόρα. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη σε επιδημιολογικές μελέτες, αν και τα τελευταία χρόνια τείνει να αντικαθίσταται από τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς (next generation sequencing technologies) (Magalhães et al, 2014).

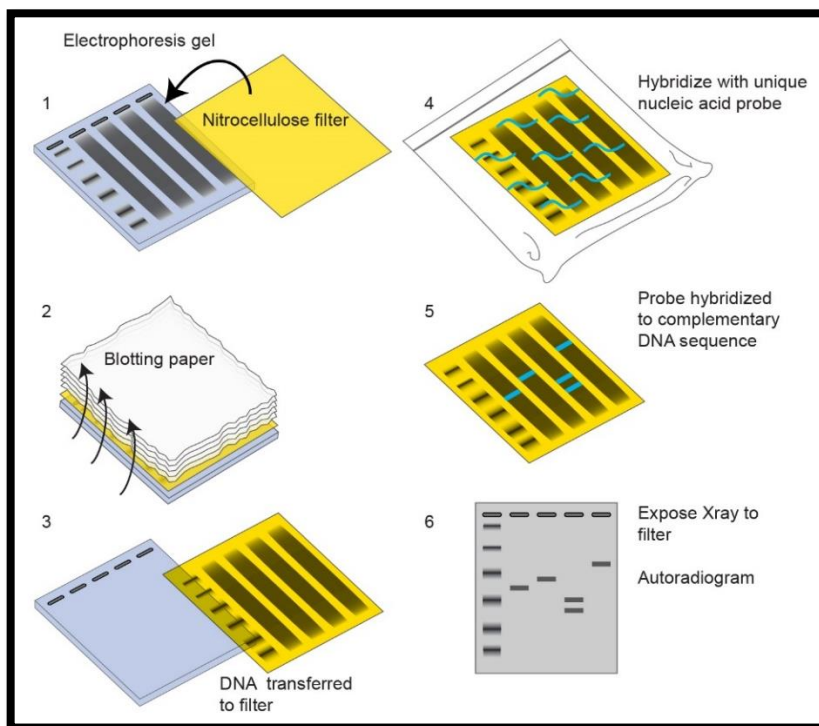


Εικόνα 2.2.7.2. Ενδεικτικό αποτέλεσμα ανάλυσης PFGE. Γενομικό DNA από *Neisseria meningitidis* που επώαστηκε με το ένζυμο περιορισμού *NheI* και διαχωρίστηκε μέσω PFGE. Παρατίθενται ποικίλα στελέχη για να φανεί η ομοιότητα ή η διαφορά τους (Wang et al, 2015).

2.2.8 Μέθοδος πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Η μέθοδος RFLP χρησιμοποιείται για να μελετήσει την ποικιλομορφία που υπάρχει σε ομόλογες περιοχές του DNA, η οποία μπορεί να υπάρχει είτε φυσιολογικά, είτε να είναι

απόρροια μετάλλαξης. Συγκεκριμένα, όπως και στη μέθοδο PFGE (Παράγραφος 2.2.7) τα δείγματα του απομονωθέντος DNA υφίστανται επώαση μαζί με επιλεγμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία ανάλογα με τις διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία του γενετικού υλικού δημιουργεί θραύσματα διαφορετικού αριθμού και μήκους στο κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, τα δείγματα υφίστανται διαχωρισμό μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής και τα επιθυμητά θραύσματα απομονώνονται για περαιτέρω αναλύσεις, όπως αναζητήσεις συγκεκριμένων αλληλουχιών μέσω ικνηθειμένων εκκινητών (μέθοδος Southern Blotting, εικόνα 2.2.8.1) (Loftus, National Human Genome Research Institute, 2021) ή αλληλούχιση (sequencing). Για την εφαρμογή της μεθόδου δεν είναι απαραίτητη η εισαγωγή όλου του γονιδιώματος, παρά μόνο της υπό εξέταση περιοχής των μορίων (Ben-Ari and Lavi, 2012, Mittal et al, 2013.)



Εικόνα 2.2.8.1.
Σύνοψη διαδικασίας
στυπώματος κατά
Southern (Southern
blotting) για ανάλυση
των αποτελεσμάτων
της RFLP (Loftus,
National Human
Genome Research
Institute, 2021)

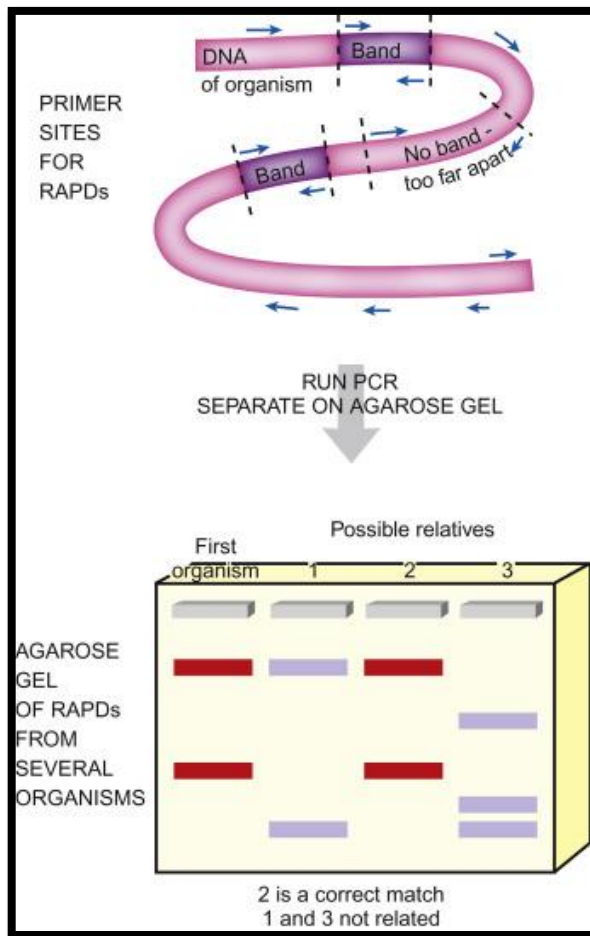
2.2.9 Μέθοδος πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων πολλαπλασιασμού (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

Η μέθοδος AFLP χρησιμοποιείται, όπως και η RFLP για μελέτη της ποικιλομορφίας σε ομόλογες περιοχές των γενετικού υλικού. Πέρα από τον παρόμοιο σκοπό, παρουσιάζει και άλλες ομοιότητες με την RFLP και στη διαδικασία με βασική διαφορά την ύπαρξη της διαδικασίας της PCR στην AFLP. Η AFLP χαρακτηρίζεται, επίσης, και ως συνδυασμός της RFLP και της PCR (Lee et al, 2013). Συγκεκριμένα τα στάδια της AFLP συνοψίζονται ως εξής (Foster et al, 2011):

1. Απομόνωση γενετικού υλικού (η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως σε DNA)
2. Τεμαχισμός DNA από ένζυμα περιορισμού και δημιουργία πολλών τμημάτων άνισου μεγέθους
3. Πρόσδεση, στα άκρα των τμημάτων, υποδοχέων οι οποίοι κάνουν δίκλιωνα τα μικρού μήκους τμήματα τα οποία ήταν μονόκλιωνα λόγω επίδρασης των ενζύμων περιορισμού
4. Εκθετικός πολλαπλασιασμός μέσω PCR ενός ή παραπάνω τμημάτων προκειμένου να υπάρχουν αρκετά αντίγραφα ώστε να μελετηθεί στη συνέχεια
5. Ηλεκτροφόρηση για απεικόνιση των θραυσμάτων, της ποσότητάς τους και του μεγέθους τους.
6. Περαιτέρω αναλύσεις στα επιθυμητά θραύσματα.

2.2.10 Μέθοδος τυχαίου πολλαπλασιασμού πολυμορφικού DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

Η μέθοδος RAPD χρησιμοποιείται για να συγκρίνει την ομοιότητα δύο ή περισσότερων δειγμάτων γενετικού υλικού και τον προσδιορισμό συγγένειας. Έχει ως σημαντικό πλεονέκτημα το γεγονός ότι δεν απαιτείται η ύπαρξη υποβάθρου γενετικών πληροφοριών για το υπό εξέταση δείγμα, παρά μόνο για το δείγμα με το οποίο θα γίνει τελικά η σύγκριση (Hoy, 2019). Επιπλέον, είναι διαδικασία σχετικά οικονομική και δεν απαιτεί μεγάλη ποσότητα δείγματος. Κατά τη διαδικασία, πραγματοποιείται μία PCR με χρήση ενός εκκινητή μικρού μεγέθους (μήκους περίπου 10 νουκλεοτιδίων, ή περισσότερων αν τα υπό εξέταση δείγματα ανήκουν σε εξελικτικά ανώτερο οργανισμό) ο οποίος προσδέεται σε πολλά σημεία ταυτόχρονα, λόγω ύπαρξης μεγάλου αριθμού συμπληρωματικών αλληλουχιών. Αν δύο μόρια του ίδιου εκκινητή (ή και περισσότερα) συνδεθούν με τρόπο αντιπαράλληλο σε δύο θέσεις κοντινές (απόσταση έως περίπου 2000 νουκλεοτίδια) που βρίσκονται στην ίδια αλυσίδα τότε θα παραχθεί προϊόν από την PCR. Η περιοχή που έχουν προσδεθεί οι εκκινητές και τελικά παράγει προϊόν PCR ονομάζεται περιοχή τυχαίου πολλαπλασιασμού πολυμορφικού DNA (RAPD locus). Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή πολλαπλών μορίων διαφορετικού μήκους (ποικίλουν από 100 έως 3000 base pairs). Τελικά, τα θραύσματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου και συγκρίνονται για ομοιότητες (Clark and Pazdernik, 2013, van Treuren, Wageningen University and Research). Να σημειωθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται παραπάνω από ένας εκκινητές έτσι ώστε τα προϊόντα της PCR να είναι πολυπληθέστερα. Ο μηχανισμός της διαδικασίας αναλύεται στην εικόνα 2.2.10.1



Εικόνα 2.2.10.1 Σύνοψη διαδικασίας και ερμηνείας αποτελεσμάτων RAPD (Clark and Pazdernik, 2013)

2.2.11 Μέθοδος αλληλούχισης πολλαπλών θέσεων γονιδίων (Multilocus Sequence Typing, MLST)

Η μέθοδος MLST αποσκοπεί στον εκθετικό πολλαπλασιασμό και στη συνέχεια αλληλούχιση πολλαπλών γονιδίων ταυτόχρονα. Τα γονίδια τα οποία μελετώνται στη διαδικασία συνήθως είναι σε αριθμό 5 έως 7 και ανήκουν σε μία κατηγορία που ονομάζεται ως γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes). Αυτά είναι γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μόρια απαραίτητα για την επιβίωση και τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου. Οι περιοχές τους μέσα στο γονιδίωμα είναι πολύ προστατευμένες, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την πιο αργή εξέλιξη και διαφοροποίησή τους σε σχέση με άλλα γονίδια (Ong, 2019). Παρόλα αυτά, εξελίσσονται πιο γρήγορα από το γονίδιο *16S rDNA* (Βλέπε παράγραφο 2.2.12) και η ομοιόμορφη κατανομή τους στο γονιδίωμα δίνει καλύτερη εικόνα συγκριτικά με άλλες μεθόδους (Keim, 2005). Η διαδικασία περιλαμβάνει την απομόνωση του DNA, την εφαρμογή της PCR με τους κατάλληλους εκκινητές, την ηλεκτροφόρηση για οπτική παρατήρηση αποτελεσμάτων, τον καθαρισμό των δειγμάτων από τα

υπολείμματα της PCR, την αλληλούχιση των δειγμάτων και τέλος την διασταύρωση των αποτελεσμάτων με μία βάση δεδομένων MLST για ταυτοποίηση (Ρανόν et al, 2009). Η μέθοδος, παρόλο που είναι εξαιρετικά χρήσιμη, έχει σχετικά υψηλό κόστος και είναι πολύ ευαίσθητη (Dingle et al, 2015).

2.2.12 Ριβοτυποποίηση (Ribotyping)

Η ριβοτυποποίηση είναι μία γνωστή μέθοδος μέσω της οποίας μπορεί να γίνει ταυτοποίηση ενός υπό εξέταση οργανισμού. Βασίζεται στη μελέτη και την ανάλυση αλληλουχιών του γονιδιώματος οι οποίες είναι υπεύθυνες για την κωδικοποίηση ριβοσωμικών τμημάτων. Η ύπαρξη των ριβοσωμικών αυτών γονιδίων είναι κοινή σε όλα τα βακτήρια, όμως οι διαφοροποιήσεις στις αλληλουχίες, και τελικά στις δομές των ριβοσωμάτων, αποτελούν την αρχή στην οποία βασίζεται η μέθοδος για την ταυτοποίηση.

Τα ριβοσώματα αποτελούνται από ριβοσωμικό RNA (rRNA) και πρωτεΐνες. Τα προκαρυωτικά ριβοσώματα αποτελούνται από 2 υπομονάδες, μία μεγάλη (50S) και μία μικρή (30S). Η υπομονάδα 50S αποτελείται από δύο τύπους rRNA (5S και 23S) και 31 πρωτεΐνες, ενώ η υπομονάδα 30S αποτελείται από έναν τύπο rRNA (16S) και 21 πρωτεΐνες (Austin and Pagotto, 2003, Kaiser, 2021). Κατά τη διαδικασία της ριβοτυποποίησης, οι υπό μελέτη αλληλουχίες του γονιδιώματος είναι αυτές που κωδικοποιούν το rRNA, συνεπώς στην περίπτωση των προκαρυωτών, τα υπό εξέταση γονίδια είναι τα 23S, 16S και 5S rDNA.

Η ανάλυση των αλληλουχιών μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους. Ο πιο απλός είναι με απομόνωση του γονιδιωματικού DNA, πολλαπλασιασμό του υπό εξέταση γονιδίου μέσω PCR κι έπειτα αλληλούχιση. Η άλλη μέθοδος είναι μέσω κατάτμησης του απομονωθέντος DNA με ένζυμα περιορισμού, διαχωρισμός των τμημάτων μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής και υβριδισμός μέσω στυπώματος κατά Southern (Southern blotting) (δημιουργία μονόκλωνων αλυσιδών και σύνδεση με συμπληρωματικά, επισημασμένα ολιγονουκλεοτίδια που προσδένονται στις επιθυμητές αλληλουχίες, Εικόνα 2.2.8.1) (Austin and Pagotto, 2003, Naum and Lampel, 2011) . Και στις δύο περιπτώσεις η δυσκολία έγκειται στην εύρεση των κατάλληλων εκκινητών, ενώ ένα γενικό μειονέκτημα της μεθόδου της ριβοτυποποίησης είναι ότι η εξειδίκευση γίνεται περισσότερο στο επίπεδο του είδους και λιγότερο σε πιο χαμηλά επίπεδα (Naum and Lampel, 2011).

2.2.13 Ηλεκτροφόρηση πηκτής βαθμιδωτής θερμοκρασίας και ηλεκτροφόρηση πηκτής βαθμιδωτής μετουσίωσης (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Οι μέθοδοι TGGE και DGGE είναι δύο μορφές ηλεκτροφόρησης πηκτής οι οποίες χρησιμοποιούνται σε δείγματα νουκλεϊκών οξέων, και σπανιότερα σε δείγματα πρωτεϊνών, για ανάλυση συγκεκριμένων γονιδίων και έλεγχο πολυμορφισμού τους. Κατά τη διαδικασία τους, κάποιο γονίδιο το οποίο έχει προηγουμένως πολλαπλασιαστεί μέσω PCR με χρήση συγκεκριμένων εκκινητών, εισάγεται σε πηκτή ακρυλαμιδίου και μέσω επίδρασης είτε θερμοκρασίας, είτε κάποιου χημικού αποδιατακτικού παράγοντα δίνονται πληροφορίες για την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του με βάση το σημείο στο οποίο παρατηρήθηκε ότι επήλθε μετουσίωση (Bharagava et al, 2019). Τα γονίδια τα οποία επιλέγονται για ανάλυση είναι συνήθως αντιπροσωπευτικά του είδους ή του υποείδους έτσι ώστε να είναι κοινά ανά τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς αλλά με διαφοροποιήσεις σε αλληλουχία ώστε τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα να είναι αποδεκτά. Συνήθως για αυτού του είδους τις αναλύσεις χρησιμοποιούνται γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωμικό RNA όπως το γονίδιο *16S rDNA*.

Η αρχή στην οποία βασίζονται είναι οι διαφορετικές «αντιδράσεις» των μορίων που εισάγονται σε μέσο με βαθμιδωτή αύξηση της θερμοκρασίας (στην περίπτωση της TGGE) ή βαθμιδωτή αύξηση συγκέντρωσης κάποια χημικής ουσίας (στην περίπτωση της DGGE). Οι «αντιδράσεις» αυτές διαφοροποιούνται με βάση τη δομή του μορίου και συγκεκριμένα την περιεκτικότητα του μορίου σε ζεύγη βάσεων κυτοσίνης-γουανίνης (C-G) τα οποία λόγω του τριπλού δεσμού υδρογόνου που τα ενώνει, προσδίδει μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με τα ζεύγη βάσεων αδενίνη- θυμίνη (A-T) των οποίων ο δεσμός είναι διπλός. Συνεπώς, με επίδραση θερμοκρασίας ή χημικού παράγοντα λαμβάνονται πληροφορίες με βάση το σημείο που παρατηρήθηκε η μετουσίωση (Kouzuma and Watanabe, 2011).

Οι συγκεκριμένες μέθοδοι, παρά τα χρήσιμα συμπεράσματα που μπορούν να δώσουν, έχουν και πολλούς περιορισμούς και μειονεκτήματα, όπως τη σχετικά υψηλή δυσκολία στο να περατωθούν, τη χαμηλή δυνατότητα αναπαραγωγής με ίδια αποτελέσματα, τις περιορισμένες πληροφορίες που δίνονται για τις αλληλουχίες των γονιδίων και το γεγονός πολλά τμήματα έχουν το ίδιο σημείο μετουσίωσης παρά τη διαφορά στις αλληλουχίες, γεγονός που εν μέρει οφείλεται στην ύπαρξη μιας μικρής διακύμανσης στο μέγεθος των εισακτέων γονιδίων (Bharagava et al, 2019).

2.2.14 Αλληλούχιση κατά Sanger (Sanger Sequencing)

Η αλληλούχιση κατά Sanger είναι μέθοδος μέσω της οποίας μπορεί να καταγραφεί η πλήρης αλληλουχία ενός επιθυμητού τμήματος DNA. Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία, εισάγεται σε μηχανήμα αλληλούχισης (sequencer) ένα τμήμα DNA του οποίου η αλληλουχία είναι υπό μελέτη. Εισάγονται επίσης, τα αντιδραστήρια τα οποία θα χρησιμοποιούνταν για μία αντίδραση PCR (παράγραφος 2.2.4), δηλαδή ένα ζεύγος κατάλληλων εκκινητών, DNA πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs και συγκεκριμένα dATPs, dTTPs, dGTPs, dCTPs ανάλογα με τη μορφή της αζωτούχας βάσης) και πιθανώς ορισμένα ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία θα διευκολύνουν την αντίδραση. Τέλος, εισάγονται ορισμένα τροποποιημένα dNTPs, τα οποία ονομάζονται διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) και διαφέρουν με τα dNTPs ως προς το γεγονός ότι τους έχουν αφαιρεθεί τα -OH από τον 3^ο άνθρακα (C) της πεντόζης ώστε να μην μπορούν να συνδεθούν με επόμενο νουκλεοτίδιο (Shen, 2019).

Η αρχή στην οποία βασίζεται είναι ο τυχαίος τερματισμός επιμήκυνσης νέων αλυσίδων, συμπληρωματικών στην αλληλουχία που εισάχθηκε, μέσω χρήσης των ddNTPs που αποτρέπουν την περαιτέρω επιμήκυνση της αλυσίδας, δημιουργώντας έτσι πολλές αλυσίδες διαφορετικού μήκους. Όταν, στη συνέχεια, τα τμήματα αυτά διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής, τα ddNTPs όντας ικνηθειμένα με φθορίζουσες ουσίες, μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τον τύπο ddNTP που φρόντισε να τερματίσει την επιμήκυνση. Συνεπώς, καταγράφεται το κάθε νουκλεοτίδιο δίνοντας έτσι την πλήρη αλληλουχία του εισαχθέντος τμήματος DNA (Gomes and Korf, 2018, Solomon, 2018).

Πλέον, η μέθοδος αλληλούχισης Sanger χρησιμοποιείται σε μικρότερο βαθμό λόγω ανάπτυξης νέων μεθόδων αλληλούχισης, όπως η τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), η οποία μπορεί να αλληλουχίσει πολύ μεγαλύτερα τμήματα με εύκολο τρόπο. Παρόλα αυτά, η αλληλούχιση Sanger χρησιμοποιείται ακόμη σε λιγότερο πολύπλοκες διαδικασίες και σε πολλές περιπτώσεις δρα ως επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της NGS (Hagemann, 2015).

3. Σκοπός μελέτης και σύνοψη μεθοδολογίας

Στη συγκεκριμένη μελέτη ο σκοπός ήταν ο μικροβιολογικός έλεγχος σφηκών για πιθανή μεταφορά παθογόνων βακτηρίων στον άνθρωπο. Για να επιτευχθεί αυτό, έγινε ταυτοποίηση 47 μικροβιακών δειγμάτων που απομονώθηκαν από διάφορα σημεία του σώματος άγριων σφηκών που είχαν προηγουμένως συλλεχθεί από ποικίλα ενδιαίτηματα της Λήμνου, μέσω συνδυασμού φαινοτυπικών και γονοτυπικών μεθόδων. Για την αρχική απομόνωση των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά επιλεκτικά θρεπτικά υλικά. Ακολούθως, από φαινοτυπικές μεθόδους εφαρμόστηκε η χρώση κατά Gram ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των δειγμάτων κατά

Gram, να παρατηρηθεί η μορφολογία των κυττάρων και να επιβεβαιωθεί πως πρόκειται για βακτήρια, καθώς και η δοκιμή καταλάσης ώστε να δοθούν πληροφορίες για τις απαιτήσεις ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού ως προς το οξύγονο. Όσον αφορά τις γονοτυπικές μεθόδους, η ταυτοποίηση έγινε μέσω πλήρους αλληλούχισης του γονιδίου 16S rDNA. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA από το κάθε δείγμα, εκθετικού πολλαπλασιασμού του γονιδίου 16S rDNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ζεύγος καθολικών εκκινητών (universal primers), καθαρισμού των προϊόντων της αντίδρασης κι έπειτα αλληλούχισης κατά Sanger. Οι παραληφθείσες αλληλουχίες του κάθε δείγματος εν τέλει διασταυρώθηκαν με διαθέσιμες βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (ανάλυση BLAST) για την τελική ταυτοποίηση του κάθε βακτηρίου (προσδιορισμό είδους αυτού).

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1. Παρασκευή θρεπτικών υλικών και απομόνωση μικροοργανισμών από άγριες σφήκες

4.1.1. Υλικά και διαλύματα

- Άγριες σφήκες ειδών *Vespula germanica* και *Vespa orientalis* απομονωμένες από ποικίλα ενδιαιτήματα της Λήμνου
- Στερεό θρεπτικό υλικό γενικού σκοπού τρυπτόνης σόγιας (Tryptone Soy Agar, TSA)
- Υγρό θρεπτικό υλικό (ζωμός) γενικού σκοπού τρυπτόνης σόγιας (Tryptone Soy Broth, TSB)
- Επιλεκτικό θρεπτικό υλικό Baird- Parker Agar (BP Agar) για απομόνωση του *Staphylococcus aureus* και άλλων σταφυλόκοκκων (π.χ. *S. epidermidis*)
- Επιλεκτικό θρεπτικό υλικό Kanamycin Aesculin Azide (KAA Agar) για απομόνωση εντεροκόκκων (μας ενδιαφέρουν κυρίως τα ευκαιριακά παθογόνα είδη *E. faecalis* και *E. faecium*)
- Επιλεκτικό θρεπτικό υλικό Strep Agar για απομόνωση στρεπτόκοκκων (μας ενδιαφέρει κυρίως το παθογόνο είδος *S. pneumoniae*)
- Επιλεκτικό θρεπτικό υλικό Cephaloridine Fucidin Ceftrimide (CFC) Agar για απομόνωση ψευδομονάδων (μας ενδιαφέρει κυρίως το ευκαιριακά παθογόνο είδος *P. aeruginosa*)
- Απεσταγμένο νερό (αντίστροφης ώσμωσης)
- Αλατούχο διάλυμα ¼ Ringer

4.1.2. Αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ζυγός ακριβείας (Scout, OHAUS)
- Γυάλινες φιάλες Duran
- Πλαστικά τρυβλία Petri
- Μεταλλική τσιμπίδα
- Κλίβανος Υγρής Αποστείρωσης (αυτόκαυτο)
- Υδατόλουτρο
- Θερμοπροστατευτικά γάντια
- Λύχνος Bunsen
- Μηχανικός κυκλοαναδευτήρας (Συσκευή Vortex)
- Κρυοφυαλίδια (cryotubes)
- Καταψύκτης
- Μηχανικές πιπέτες των 1000 μ L και 200 μ L
- Αποστειρωμένα ρύγχη (tips) των 1000 μ L και 200 μ L

4.1.3. Περιγραφή διαδικασίας

Μετά από ζύγιση της απαιτούμενης ποσότητας του εκάστοτε θρεπτικού υλικού και προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας απεσταγμένου νερού (οι συστάσεις δίνονται από τον κατασκευαστή του κάθε θρεπτικού υλικού) τα διαλύματα αποστειρώθηκαν και μετά από ψύξη τους επιστρώνονται στα τρυβλία Petri (στην περίπτωση των στερεών θρεπτικών υλικών) μέχρι τη στερεοποίησή τους.

Ακολουθεί ο εμβολιασμός των θρεπτικών υλικών με τις σφήκες ο οποίος γίνεται με ποικίλους τρόπους. Συγκεκριμένα, οι ενοφθαλμισμοί έγιναν είτε με χρήση των ποδιών, είτε με το κεντρί, είτε με ολόκληρη τη σφήκα. Στην πρώτη περίπτωση, τα πόδια αφαιρέθηκαν από το υπόλοιπο σώμα και σε μερικές περιπτώσεις αναδεύτηκαν επίσης μέσα σε διάλυμα $\frac{1}{4}$ Ringer με χρήση του μηχανικού κυκλοαναδευτήρα (vortexer) και τελικώς ποσότητα του διαλύματος εισήχθη στα τρυβλία. Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και στην τρίτη περίπτωση, με μόνη διαφορά την χρήση ολόκληρης της σφήκας αντί αποκλειστικά των ποδιών. Τόσο τα πόδια, όσο και ολόκληρη η σφήκα επίσης τοποθετήθηκαν και κατευθείαν πάνω στο εκάστοτε θρεπτικό υλικό για τον παράλληλο ενοφθαλμισμό αυτού. Τέλος, για την περίπτωση του κεντριού, το κάθε θρεπτικό υλικό εμβολιάστηκε μέσω προσομοίωσης της διαδικασίας του κεντρίσματος

της σφήκας και η οποία παρέμενε ζωντανή μέχρι τον ενοφθαλμισμό. Ακολούθησε επώαση όλων των τρυβλίων στους 37°C για 1 έως 2 ημέρες (αναλόγως το θρεπτικό υλικό) ώστε να υπάρξει εμφανής ανάπτυξη των αποικιών. Μετά την επώαση, επιλεγμένες και κατά προτίμηση μορφολογικά διαφορετικές αποικίες απομονώθηκαν από κάθε τρυβλίο και ανακαλλιεργήθηκαν, πρώτα σε υγρό και στη συνέχεια σε στερεό θρεπτικό υλικό (TSA) για να επιβεβαιωθεί ότι οι νέες καλλιέργειες είναι καθαρές. Τέλος, ποσότητα από την κάθε υγρή καλλιέργεια (σε TSB) εισήχθη σε κρυοφυαλίδιο (cryotube) μαζί με 15% (v/v) γλυκερόλη και αποθηκεύθηκε στην κατάψυξη στους -80°C. Οι απομονωθέντες μικροοργανισμοί και σχετικές πληροφορίες για τον καθένα όσον αφορά το δείγμα προέλευσης συνοψίζονται στον πίνακα 4.1.3.1.

Πίνακας 4.1.3.1 Πληροφορίες για τους απομονωθέντες μικροοργανισμούς.

α/α	Κωδικός αποικίας	Θρεπτικό υλικό	Δείγμα	Τρόπος δειγματοληψίας	Σφήκα
1	33	TSA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
2	34	TSA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
3	35	TSA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
4	36	TSA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
5	37	TSA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
6	38	BP agar	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
7	39	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
8	40	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
9	41	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
10	42	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
11	44	TSA	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespa orientalis</i>
12	46	TSA	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespa orientalis</i>
13	47	TSA	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespa orientalis</i>
14	48	KAA	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespa orientalis</i>

Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν από σφήκες μέσω αλληλούχισης ριβοσωμικών 16S rRNA γονιδίων

15	49	KAA	Κέντρισμα θρεπτικού	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespa orientalis</i>
16	50	TSA	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
17	53	TSA	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
18	54	TSA	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
19	55	CFC agar	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
20	56	CFC agar	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
21	57	CFC agar	Ολόκληρη σφήκα	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
22	58	CFC agar	Κέντρισμα θρεπτικού	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
23	59A	KAA	Κέντρισμα θρεπτικού	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
24	59B	KAA	Κέντρισμα θρεπτικού	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
25	60	CFC agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
26	61	CFC agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
27	62	CFC agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
28	63	CFC agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
29	64	CFC agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
30	65	CFC agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
31	66	CFC agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
32	67	CFC agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
33	68	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
34	69	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
35	70	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
36	71	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
37	72	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>

38	73	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
39	74	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
40	75	STREP agar	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
41	76	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
42	77	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
43	78	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
44	79	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
45	81	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
46	82	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>
47	83	KAA	Πόδια	Με κυκλοανάδευση	<i>Vespula germanica</i>

4.2. Χρώση κατά Gram για μικροσκοπιακή παρατήρηση και δοκιμή καταλάσης

4.2.1. Υλικά

- Καθαρές καλλιέργειες των 47 μικροοργανισμών ανεπτυγμένες σε τρυβλία με TSA
- Απεσταγμένο νερό
- Χρωστική κρυσταλλικό ιώδες
- Ιωδιούχο διάλυμα
- Ακετόνη
- Χρωστική σαφρανίνη
- Έλαιο μικροσκοπικής παρατήρησης
- Διάλυμα 3% (v/v) υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)

4.2.2. Αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Πλαστικός δοκιμαστικός σωλήνας (falcon) των 15mL
- Λύχνος Bunsen
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Τοιμπίδα μικροσκοπίας
- Υδροβολέας με απεσταγμένο νερό

- Μικροβιολογικοί κρίκοι (μεταλλικοί και πλαστικοί)
- Πλαστικό μπολ
- Χειρουργικά γάντια Latex
- Οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου

4.2.3. Περιγραφή διαδικασίας

Προκειμένου να μελετηθούν οι 47 μικροοργανισμοί οι οποίοι βρίσκονταν αποθηκευμένοι σε κρυσταλλίδια στην κατάψυξη (-80°C) και να διαφοροποιηθούν ως προς την κατάταξη Gram, αρχικά ενοφθαλμίστηκαν από τα κρυσταλλίδια σε τρυβλία Petri με χρήση της μεθόδου των παράλληλων γραμμών (streaking), στα οποία υπήρχε στερεοποιημένο TSA. Η διαδικασία έγινε με τη βοήθεια μικροβιολογικών κρίκων και υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24-48 ώρες μέχρι να σχηματιστούν ευδιάκριτες αποικίες (ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε μικροοργανισμού).

Στη συνέχεια επιλέχθηκε μια αποικία από το κάθε τρυβλίο και υπό ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκε με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου σε αντικειμενοφόρο πλάκα που είχε ήδη προστεθεί μία σταγόνα απεσταγμένου νερού και έγινε διασπορά. Έπειτα, με χρήση λύχνου Bunsen και τσιμπίδας έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων μέσω περασμάτων της πλάκας πάνω από τη φλόγα. Στη συνέχεια, προστέθηκε μικρή ποσότητα χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους στην αντικειμενοφόρο πλάκα και αφέθηκε για ένα λεπτό. Με το πέρασμα του 1 λεπτού η αντικειμενοφόρος πλάκα ξεπλύθηκε για απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής. Έπειτα προστέθηκε στο παρασκεύασμα ιωδιούχο διάλυμα για σταθεροποίηση, η περίσσεια του οποίου απομακρύνθηκε μετά από 1 λεπτό με χρήση απεσταγμένου νερού. Εν συνεχεία, επήλθε αποχρωματισμός μέσω ξεπλύματος του παρασκευάσματος με ακετόνη. Τέλος, εισήχθη για 30" η χρωστική σαφρανίνη η οποία στο τέλος ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό. Τα παρασκευάσματα αφέθηκαν να στεγνώσουν, μετά την απομάκρυνση της περίσσειας νερού με απορροφητικό χαρτί.

Με το πέρας της χρώσης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες μεταφέρθηκαν στο μικροσκόπιο στο οποίο έγινε παρατήρηση με τους αντικειμενικούς φακούς με μεγέθυνση x40 και x100 (επιτυχάνοντας τελικές μεγεθύνσεις x400 και x1000, αντιστοίχως). Να σημειωθεί ότι για παρατήρηση με χρήση του φακού x100 έγινε χρήση ελαίου μικροσκοπίας (για αύξηση της ευκρίνειας/διακριτικής ικανότητας του φακού). Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν, με τα δείγματα που έχουν ροζ χρώμα να χαρακτηρίζονται ως Gram⁻ και τα δείγματα με ιώδες χρώμα να χαρακτηρίζονται ως Gram⁺. Η κάθε απομόνωση επίσης φωτογραφήθηκε (με κάμερα κινητού τηλεφώνου που τοποθετήθηκε στη θέση των προσοφθάλμιων φακών) και όλα τα ψηφιακά αρχεία (φωτογραφίες) αποθηκεύθηκαν σε φάκελο σκληρού δίσκου H/Y.

Για τη δοκιμή καταλάσης, εισήχθηκε μία σταγόνα H₂O₂ σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη σταγόνα αυτήν, μεταφέρθηκαν, στη συνέχεια, μερικά κύτταρα μιας μεμονωμένης αποικίας από το εκάστοτε τρυβλίο με χρήση μικροβιολογικού κρίκου και το παρασκεύασμα παρατηρήθηκε για πιθανή δημιουργία φυσαλίδων. Η ύπαρξη φυσαλίδων υποδηλώνει θετική δοκιμή καταλάσης ενώ η απουσία τους, αρνητική δοκιμή.

4.3. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

4.3.1. Υλικά και διαλύματα

- Τρυβλία με θρεπτικό υλικό TSA (Tryptone Soy Agar)
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon) με θρεπτικό υλικό TSB (Tryptone Soy Broth)
- Μικροοργανισμοί αποθηκευμένοι σε κρυοφιαλίδια (cryotubes) στην κατάψυξη (-80 °C)
- Διάλυμα λύσης (1 M σορβιτόλη, 0,1 M EDTA, 25mg/ml λυσοζύμη, 5 U μουτανολυσίνη, pH 7,5)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, pH 7,5
- Διάλυμα 10% SDS
- Διάλυμα 5 M οξικού καλίου
- Παγωμένη ισοπροπανόλη
- Παγωμένη απόλυτη αιθανόλη
- Ρυθμιστικό Διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8)
- Διάλυμα RNAase (RNAase 0,1 mg/ml, Tris-HCl 10 mM, NaCl 15 mM)
- Πάγος

4.3.2. Αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Μικροβιολογικοί κρίκοι
- Επωαστικός κλίβανος (37 °C)
- Κατάψυξη (-20 °C και -80 °C)
- Μεγάλη επιτραπέζια φυγόκεντρος (Frontier OHAUS)
- Μικρή επιτραπέζια φυγόκεντρος (Eppendorf)
- Διάταξη θερμοστάτησης τύπου dry block για την ψύξη – θέρμανση μικροφυγόκεντρικών σωλήνων (Biosau)

- Κυκλικός αναδευτήρας (Vortexer, OHAUS)
- Μηχανή πάγου
- Μηχανικές πιπέτες
 - 2-20 μL (Nichypette)
 - 5-50 μL (Laborpette hirschmann)
 - 20-200 μL (Optipette)
 - 100-1000 μL (Nichirgo Le)
- Ρύχνη (tips) για τις πιπέτες
- Ξηραντήρας (40 °C)
- Σωληνάκια Eppendorf των 1,5 και 2 mL
- Τσιμπίδα μικροσκοπίας

4.3.3. Περιγραφή διαδικασίας

❖ Προετοιμασία κυττάρων

Τρυβλία επιστρωμένα με TSA ενοφθαλμίστηκαν με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών (streaking) με κύτταρα του εκάστοτε μικροοργανισμού που βρίσκονταν αποθηκευμένα στην κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα τρυβλία εισήχθησαν στον επωαστήρα (στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 18-36 ώρες, ανάλογα με τις ανάγκες ανάπτυξης του εκάστοτε μικροοργανισμού. Στη συνέχεια και αφού επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα των καλλιιεργειών σε κάθε τρυβλίο, επιλέχθηκε μία μεμονωμένη και ευδιάκριτη αποικία από το κάθε τρυβλίο και μεταφέρθηκε με χρήση μικροβιολογικού κρίκου σε falcon με 5 mL TSB υπό ασηπτικές συνθήκες. Για δοκιμαστικούς σκοπούς υπήρξαν περιπτώσεις που η εκάστοτε αποικία μεταφέρθηκε σε σωλήνα falcon με 20 mL TSB, με τον λόγο να αναλύεται στην υποπαράγραφο «Απομόνωση DNA». Οι πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες (falcon) μεταφέρθηκαν, τελικά, στον επωαστήρα (στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 18-36 ώρες.

❖ Απομόνωση DNA

Αρχικά, τα σωληνάκια falcon αφαιρέθηκαν από τον επωαστήρα και με χρήση μικροβιολογικών κρίκων, λήφθηκαν κύτταρα από την κάθε καλλιέργεια τα οποία μεταφέρθηκαν σε τρυβλία επιστρωμένα με TSA με χρήση της μεθόδου των παράλληλων γραμμών και ακολούθως τα τρυβλία εισήχθησαν στον επωαστήρα και αφέθηκαν για 18-36 ώρες (στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Αυτό έγινε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η καθαρότητα των καλλιιεργειών εργασίας για την κάθε απομόνωση.

Τα falcon εισήχθησαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο σε θέσεις αντιδιαμετρικές και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 4000 g. Στην περίπτωση των falcon των 20 mL το ελαιώδη διαιρέθηκε και μεταφέρθηκε σε 4 σωλήνες των 5 mL και τα δείγματα σημειώθηκαν ως Α, Β, Γ και Δ αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη διαδικασία ακολουθήθηκε στην περίπτωση που μελετάται η επίδραση της επώασης της λυσοζύμης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα στα κυτταρικά τοιχώματα του ίδιου μικροοργανισμού. Με το τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο (supernatant) απομακρύνθηκε, το ίζημα (pellet) διαλύθηκε σε 0,5 mL διαλύματος λύσης (1M σορβιτόλη, 0,1M EDTA, 25mg/ml λυσοζύμη, 5U μουτανολυσίνη, pH 7,5) και το νέο μείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκια Eppendorf των 1,5 mL. Τα σωληνάκια εισήχθησαν σε Dry Block και επώαστηκαν στους 37 °C για 2 ώρες, ενώ ανά 30' υπέστησαν ανάδευση μέσω vortex. Στην περίπτωση της δοκιμαστικής διαδικασίας που αναλύθηκε παραπάνω, τα δείγματα Α, Β, Γ, Δ, επώαστηκαν για 30', 1 ώρα, 1,5 ώρες και 2 ώρες αντίστοιχα. Το στάδιο της λυσοζύμης αποσκοπεί στη ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10' στα 5.000 g στους 4 °C. Λόγω παρατήρησης μη σχηματισμού ευδιάκριτου ιζήματος μετά το τέλος του συγκεκριμένου βήματος σε ορισμένες περιπτώσεις, η σχετική φυγόγεντος δύναμη (RCF) αυξήθηκε στα 15.000 g. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα διαλύθηκε σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,5. Στο διάλυμα προστέθηκαν επίσης 50 µL 10% SDS και τα δείγματα μεταφέρθηκαν και πάλι στο Dry Block για επώαση στους 65 °C για 30' προκειμένου να γίνει ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης.

Με το τέλος της επώασης, προστέθηκαν 200 µL οξικού καλίου 5M (CH₃COOK, 5M), έγινε ανάδευση και τα δείγματα επώαστηκαν στον πάγο για 30'. Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης επώασης, το οξικό κάλιο δεσμεύει τα κυτταρικά υπολείμματα και τις περιεχόμενες πρωτεΐνες. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 20.000g για 10 λεπτά στους 4 °C και τα υπερκείμενα που δημιουργήθηκαν, προσεκτικά μεταφέρθηκαν σε νέα, άδεια Eppendorf των 2 mL.

Στα δείγματα προστέθηκε, στη συνέχεια, 1mL παγωμένης ισοπροπανόλης και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 10.000 g στους 4 °C. Το υπερκείμενο, μετά, απομακρύνθηκε και προστέθηκε 1 mL παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για τελευταία φορά στα 20.000g στους 4°C για 15 λεπτά. Έπειτα, αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, τα Eppendorf μεταφέρθηκαν με ανοιχτά καπάκια στον ξηραντήρα για 1,5 ώρα προκειμένου να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης. Η ισοπροπανόλη και η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκαν για τη δέσμευση των υπολειμμάτων πρωτεϊνών, τη συσσωμάτωση του DNA, και την απομάκρυνση αλάτων.

Με το πέρας της ξήρασης, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 120 µL ρυθμιστικού διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) και έγινε καλή ανάδευση με χρήση πιπέτας μέχρι πλήρους διάλυσης του ιζήματος. Τέλος, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 12 µL διαλύματος RNAase (RNAase 0,1mg/ml, Tris-HCl 10mM, NaCl

15mM) και ακολούθησε επώαση στο Dry Block για 1 ώρα στους 37° C. Το συγκεκριμένο διάλυμα αποσκοπεί στη διάσπαση τμημάτων RNA που μπορεί να έχουν επίσης απομονωθεί κατά τη διαδικασία απομόνωσης του DNA, τα οποία είναι ανεπιθύμητα καθώς επηρεάζουν αρνητικά την ποσοτικοποίηση του DNA και κατά συνέπεια τις μετέπειτα διαδικασίες.

4.4. Ποσοτικοποίηση απομονωθέντος DNA μέσω φασματοφωτομετρίας

4.4.1. Υλικά και Διαλύματα

- 47 δείγματα απομονωθέντος DNA διαλυμένα σε 120 μ L TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) και τα οποία έχουν υποστεί πέψη με RNAase
- Υπερκάθαρο H₂O (ddH₂O)

4.4.2. Αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους
- Κυψελίδες χαλαζία (χωρητικότητας 0,5 mL)
- Πιπέτες των 100-1000 μ L και 0,5-10 μ L
- Ρύγχοι (tips) για τις πιπέτες
- Τσιμπίδα μικροσκοπίας

4.4.3. Περιγραφή Διαδικασίας

Αρχικά, το φασματοφωτόμετρο ενεργοποιήθηκε και ρυθμίστηκε ώστε να λάβει μετρήσεις στα 260 nm, 280 nm και 310 nm. Οι κυψελίδες καθαρίστηκαν με διπλή έκπλυση με ddH₂O. Έπειτα, το μηχάνημα μηδενίστηκε με χρήση τυφλού διαλύματος το οποίο στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 0,5 ml ddH₂O. Στη συνέχεια, με χρήση των κατάλληλων πιπετών, αναμείχθηκαν 495 μ l ddH₂O και 5 μ l δείγματος απομονωμένου DNA (1:100 αραιώση) και ακολούθησε ανάδευση. Τα τοιχώματα της κυψελίδας σκουπίστηκαν και τοποθετήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο όπου λήφθηκαν οι μετρήσεις σε κάθε επιλεγμένο μήκος

κύματος. Έπειτα, με βάση τις τιμές απορρόφησης υπολογίστηκε η συγκέντρωση του περιεχόμενου DNA του εκάστοτε δείγματος με χρήση του τύπου (παράγραφος 2.2.3):

$$C (\mu\text{g/ml}) = 50 \mu\text{g/ml} * A_{260} * \text{Παράγοντας Αραίωσης}$$

Όπου C: η συγκέντρωση του dsDNA ($\mu\text{g/ml}$)

A₂₆₀: Η απορρόφηση που έδωσε το δείγμα στα 260 nm

4.5. Απεικόνιση απομονωθέντος DNA μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής

4.5.1. Υλικά και Διαλύματα

- Πηκτή 1,5% (w/v) αγαρόζης (0,75 g αγαρόζης διαλυμένα σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE συγκεντρώσεων 1X και 0,5X (A3945,1000 TBE(10x)Buffer, PanReac, AppliChem)
- Φθορίζουσα χρωστική Βρωμιούχο αιθίδιο 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (EtBr stock 10 mg/ml)
- 47 δείγματα απομονωθέντος DNA διαλυμένα σε 120 μL TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) και τα οποία έχουν υποστεί πέψη με RNAase
- Διάλυμα φόρτωσης (6x DNA Loading Dye)
- DNA Ladder [ready-to-use, 12 bands (100-3000bp), 50 μg (100 lanes) (MWD100, Nippon Genetics)]
- Πάγος

4.5.2 Αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Κωνική φιάλη των 100 mL
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL
- Επιτραπέζιος ζυγός ακριβείας
- Ειδικές πλαστικές στήλες (καλούπι) σχηματισμού πηκτής αγαρόζης
- Κουταλάκι
- Αλουμινόχαρτο
- Φούρνος μικροκυμάτων (Carrefour home)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mupid-One (NIPPON Genetics)

- Μηχάνημα UV απεικόνισης (Quantum ST4 gel documentation imaging system, Vilber Lourmat)
- Πιπέτες των 0,1-2, 0,5-10 και 2-20 μl
- Ρύγχη για τις πιπέτες
- Μεμβράνη παραφίνης (Parafilm)

4.5.3 Περιγραφή Διαδικασίας

Αρχικά παρασκευάζεται πηκτή 1.5% (w/v) αγαρόζης. Για τον σκοπό αυτόν ζυγίζονται 0,75 g αγαρόζης και προστίθενται στην κωνική φιάλη μαζί με 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X. Πραγματοποιείται ανάδευση στη συνέχεια η κωνική φιάλη τοποθετείται στον φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 30 δευτερόλεπτα (μέχρι σημείο βρασμού) για ομογενοποίηση. Αν το διάλυμα είναι ομοιογενές (εντελώς διάφανο) εξέρχεται και αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5-10 λεπτά ώστε η θερμοκρασία του να μην ξεπερνά τους 50-60 °C. Τότε προστίθενται 0,25 μl χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου (0,05 μg/ml) και γίνεται ήπια ανάδευση. Σημειώνεται πως λόγω της τοξικότητας του βρωμιούχου αιθιδίου, η προσθήκη διενεργήθηκε στον απαγωγό αερίων ενώ η απόρριψη του ρύγχους που χρησιμοποιείται γίνεται σε ειδικό χώρο απορριμάτων.

Έπειτα το διάλυμα χύνεται στην ειδική πλαστική στήλη η οποία δρα ως καλούπι και έχει ως σκοπό να του προσδώσει παραλληλόγραμμο σχήμα όταν στερεοποιηθεί. Με πλαστική χτένα που προσαρμόζεται πάνω σε αυτό το σύστημα δημιουργούνται οι οπές της πηκτής μέσα στις οποίες θα τοποθετηθούν αργότερα τα δείγματα DNA για ηλεκτροφόρηση. Σε 5-10 λεπτά έκθεσης σε θερμοκρασία δωματίου η πηκτή έχει πλέον στερεοποιηθεί και μπορεί να εισαχθεί στο μηχάνημα ηλεκτροφόρησης, το οποίο έχει πληρωθεί με περίπου 350 mL διαλύματος TBE 0.5x. Σημειώνεται ότι, ανάλογα με την πλαστική χτένα που χρησιμοποιείται, οι οπές που δημιουργούνται μπορούν να είναι είτε 13 είτε 26. Η επιλογή γίνεται ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων που απαιτούνταν κάθε φορά να ηλεκτροφορηθούν.

Παράλληλα, χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες πιπέτες, τοποθετούνται σε μεμβράνη Parafilm 10 μl από κάθε δείγμα DNA το ένα παραδίπλα στο άλλο ώστε να είναι ευδιάκριτα και να μην υπάρχει πιθανότητα ανάμειξής τους. Στη συνέχεια, σε κάθε 10 μl DNA προστίθενται 2 μl χρωστικής Loading Dye και πραγματοποιείται ανάδευση με την πιπέτα. Να σημειωθεί ότι υπήρξαν περιπτώσεις ηλεκτροφορήσεων που επιλέχθηκε αναλογία DNA template: Loading Dye 6:1, όπως στην απεικόνιση των καθαρισμένων (purified) προϊόντων PCR (παράγραφος 4.7.3)

Τα δείγματα αυτά τοποθετούνται με τη βοήθεια κατάλληλης πιπέτας με τη σειρά στις αντίστοιχες οπές της πηκτής αγαρόζης η οποία βρίσκεται ήδη μέσα στο μηχάνημα της

ηλεκτροφόρησης, και εμβαπτισμένη μέσα στο διάλυμα 0,5x TBE. Χρειάζεται προσοχή προκειμένου το εισερχόμενο διάλυμα να παραμείνει εντός της οπής της πηκτής.

Πέρα από τα δείγματα που εισάγονται, μια οπή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή 5 µl DNA Ladder, του οποίου ο ρόλος είναι η παροχή πληροφοριών για το μήκος (σε ζεύγη βάσεων, bp) και την ποσότητα (σε ng) των μορίων των εισακτέων δειγμάτων. Το μήκος καθορίζεται από το σημείο στο οποίο σχηματίζεται η μπάντα στο κάθετο άξονα και η ποσότητα από τη φωτεινότητα της μπάντας.

Το μηχάνημα ρυθμίζεται και ενεργοποιείται στα 100 Volt για 30 λεπτά.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτική αφαιρείται και τοποθετείται προσεκτικά στο μηχάνημα UV απεικόνισης.

Τελικά, ενεργοποιώντας το μηχάνημα αυτό και με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, παρατηρείται το αποτέλεσμα: οι μπάντες των δειγμάτων DNA συγκρίνονται με τις ενδεικτικές μπάντες του DNA Ladder και διαπιστώνεται αν η απομόνωση του DNA ήταν επιτυχής. Δίνονται, επιπλέον, γενικές πληροφορίες για την ποσότητα που απομονώθηκε βάσει της φωτεινότητας της μπάντας. Επιπλέον διαπιστώνεται αν έχει απομονωθεί και πλασμιδιακό DNA καθώς αυτό θα δημιουργούσε επιπλέον μπάντα σε χαμηλότερο σημείο μιας και το μέγεθός του είναι μικρότερο από το γενομικό DNA.

4.6 Πολλαπλασιασμός 16S rDNA γονιδίου μέσω PCR και απεικόνιση μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής

4.6.1. Υλικά και Διαλύματα

- 47 δείγματα απομονωθέντος DNA διαλυμένα σε 120 µL TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) με προσθήκη και επώαση 12 µL RNAase (RNAase 0,1mg/ml, Tris-HCl 10mM, NaCl 15mM)
- Kappa Taq PCR Kit το οποίο περιέχει:
 - Ρυθμιστικό διάλυμα 10X Buffer A
 - Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs (10 mM)
 - DNA πολυμεράση Taq DNA polymerase (5 U/µl)
- Quick Load Taq 2x Master Mix kit
- Εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια Forward primer 16SF (10 µM) και Reverse primer 16SR (10 µM)
16SF 5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3' (sense; 22 nt)

- 16SR 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (antisense; 20 nt)
- Εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια Forward primer 63F και Reverse primer 1542R
63F 5' -CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'
1542R 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'
 - Υπερκάθαρο (διπλής απόσταξης) ddH₂O
 - Πάγος για συντήρηση των απομονωμένων δειγμάτων DNA και αντιδραστηρίων
 - Πηκτική αγαρόζης (0,75 g αγαρόζης διαλυμένα σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα TBE συγκεντρώσεων 1X και 0,5X (A3945,1000 TBE(10x)Buffer, PanReac, AppliChem)
 - Φθορίζουσα χρωστική Βρωμιούχο αιθίδιο 0,05 µg/ml (EtBr stock 10 mg/ml)
 - Διάλυμα φόρτωσης (6x DNA Loading Dye)
 - DNA Ladder [ready-to-use, 12 bands (100-3000bp), 50µg (100 lanes) (MWD100, Nippon Genetics)]
 - Πάγος

4.6.2. Αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Πιπέτες των 0,1-2 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 5-50 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
- Αντίστοιχα tips με φίλτρο
- Σωληνάκια Eppendorf των 1,5 ml και 200 µl
- Θερμικός κυκλοποιητής (3 διαφορετικές συσκευές) (PeqStar 96 HPL Gradient Thermocycler (PqLab), Fast Gene (Nippon Genetics Europe), QuantStudio5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific))
- Κωνική φιάλη των 100 mL
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL
- Επιτραπέζιος ζυγός ακριβείας (Scout, OHAUS)
- Ειδικές πλαστικές στήλες (καλούπι) σχηματισμού πηκτικής αγαρόζης
- Κουταλάκι
- Αλουμινόχαρτο
- Φούρνος μικροκυμάτων (Carrefour home)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mupid-One (NIPPON Genetics)
- Μηχάνημα UV απεικόνισης (Quantum ST4 gel documentation imaging system, Vilber Lourmat)
- Μεμβράνη παραφίνης (Parafilm)

4.6.3. Περιγραφή Διαδικασίας

Αρχικά, τα δείγματα DNA και τα απαραίτητα για τη διαδικασία αντιδραστήρια τοποθετούνται σε πάγο. Με βάση την ποσοτικοποίηση DNA που έγινε στα προηγούμενα στάδια μέσω φασματοφωτομετρίας και ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης, επιλέγονται ορισμένα δείγματα τα οποία υφίστανται αραιώση 1:2 ή 1:4 ή 1:10 με ddH₂O προκειμένου να μην προκληθεί πρόβλημα στη διαδικασία της PCR λόγω προσθήκης υπερβολικής ποσότητας υποστρώματος DNA.

Στη συνέχεια, παρασκευάζεται ένα ενιαίο μείγμα με τις απαραίτητες ποσότητες (Master Mix) αντιδραστηρίων το οποίο θα προστεθεί σε κάθε δείγμα απομονωμένου DNA πριν την εισαγωγή στον θερμικό κυκλοποιητή. Για την παρασκευή του Master Mix απαιτείται προσθήκη ενός (τουλάχιστον) ζεύγους εκκινητών (Forward, Reverse), DNA πολυμεράσης, τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), ρυθμιστικού διαλύματος για τη επίτευξη σωστής λειτουργίας της πολυμεράσης και τέλος υπερκάθαρου ύδατος (ddH₂O). Επιπλέον το Master Mix που δημιουργείται περιέχει συγκέντρωση 1,5 mM ιόντων Mg. Κατά τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 2 είδη εμπορικών kit για την παραγωγή του Master Mix, το Kappa Taq PCR kit και το QuickLoad Taq 2x Master Mix kit. Οι υπολογισμοί για τις απαιτούμενες ποσότητες του κάθε αντιδραστηρίου έγιναν βάσει των οδηγιών που παρείχε ο παρασκευαστής του κάθε kit, τον αριθμό των δειγμάτων και με βάση το γεγονός ότι ο συνολικός όγκος στις περισσότερες περιπτώσεις επιλέχθηκε να είναι 50 μL (για να εξασφαλιστεί επαρκή ποσότητα του κάθε προϊόντος για τη συνέχεια, καθαρισμό και αλληλούχιση), ενώ σημειώθηκαν και περιπτώσεις όπου για δοκιμαστικούς λόγους επιλέχθηκε συνολικός όγκος 25 μL.

Για την προετοιμασία του Master Mix με χρήση του Kappa Taq PCR kit και τη δημιουργία τελικού όγκου 50 μL, προστίθενται ανά δείγμα 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος 10X Buffer, 0,2 μL (1U) του ενζύμου DNA πολυμεράσης (Taq DNA pol, 5 U/μL) και στη συνέχεια 1 μl (τελική συγκέντρωση 0,2 mM) τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs, 10 mM). Έπειτα, προστίθενται τα εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια Forward primer 16SF και Reverse primer 16SR (10μM) σε ποσότητα 2,5 μL (τελική συγκέντρωση (0,5 μM) το καθένα. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα, όμως παρατηρήθηκαν πολλές περιπτώσεις που δεν μπόρεσε να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός του ριβοσωμικού γονιδίου. Για να αντιμετωπιστεί αυτό οι εκκινητές 16SF και 16SR αντικαταστάθηκαν από τους primers 63F και 1542R. Μετά, πραγματοποιείται η ανάμειξη του παραπάνω μείγματος με την κατάλληλη ποσότητα απομονωμένου δείγματος DNA η οποία καθορίζεται με βάση την ποσοτικοποίηση DNA που έγινε σε προηγούμενα στάδια (παράγραφος 4.4 και 4.5). Οι ποσότητες του υποστρώματος DNA κυμαίνονται από 1 έως και 20 μl είτε αραιωμένου είτε πυκνού δείγματος. Σκοπός, η εύρεση της κατάλληλης ποσότητας DNA δειγμάτων για να μπορέσει να πολλαπλασιαστεί επιτυχώς το γονίδιο 16S rRNA. Τέλος, προστίθεται υπερκάθαρο νερό διπλής απόσταξης (ddH₂O) έως τελικό όγκο 50 μL (ή 25 μL) για κάθε ξεχωριστό δείγμα.

Σημειώνεται ότι σε ορισμένα δείγματα τα οποία δεν εμφάνιζαν το επιθυμητό αποτέλεσμα, το Karra Taq PCR kit αντικαταστάθηκε από το QuickLoad Taq 2x PCR Kit το οποίο περιείχε ήδη παρασκευασμένο διάλυμα με τις κατάλληλες ποσότητες 10X Buffer, dNTPs και πολυμεράσης Taq DNA pol. Επομένως σε αυτό απλά προστίθεντο ποσότητες primers, νερό διπλής απόσταξης και δείγματος DNA.

Κάθε τέτοιο τελικό μείγμα εισήχθη σε σωληνάκι Eppendorf των 100 µl και εισήλθε στον θερμικό κυκλοποιητή. Το μηχανήμα ρυθμίζεται να βάλει σε εφαρμογή το πρόγραμμα 16S RDNA.CYC το οποίο αποτελείται από τα παρακάτω βήματα:

Θέρμανση κεφαλής στους 110 °C

95 °C για 3 min

95 °C για 30 s

56 °C για 30 s

72 °C για 2 min

35 κύκλοι

Διατήρηση στους 72 °C για 2 min

Ψύξη στους 4 °C για μέχρι 1 h

Με το πέρας του προγράμματος η αλυσιδωτή αντίδραση έχει υλοποιηθεί και τα δείγματα εξέρχονται και ετοιμάζονται για παρατήρηση με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης πηκτής ακριβώς όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.5.

Μέσω του υπολογιστή παρατηρείται σε κάθε δείγμα αν έχει πολλαπλασιαστεί το κατάλληλο γονίδιο και αν η ποσότητά του επαρκεί για να επακολουθήσει καθαρισμός (παράγραφος 4.7) και αργότερα αποστολή του για αλληλούχιση (sequencing).

4.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR

4.7.1 Υλικά και Διαλύματα

- 47 δείγματα πολλαπλασιασμένου 16S rRNA γονιδίου των 40 µl
- NucleoSpin Gel & PCR clean-up kit το οποίο περιέχει:
 - Binding Buffer (NT1)
 - Wash Buffer (NT3) με προσθήκη αιθανόλης
 - Elution Buffer (NE) (5mM Tris/HCl, pH 8,5)

- Πηκτή 1,5% (w/v) αγαρόζης (0,75 g αγαρόζης διαλυμένα σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1x TBE)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE συγκεντρώσεων 1X και 0,5X (A3945,1000 TBE(10x)Buffer, PanReac, AppliChem)
- Φθορίζουσα χρωστική Βρωμιούχο αιθίδιο 0,05 µg/ml (EtBr stock 10 mg/ml)
- Διάλυμα φόρτωσης (6x DNA Loading Dye)
- DNA Ladder [ready-to-use, 12 bands (100-3000bp), 50µg (100 lanes) (MWD100, Nippon Genetics)]
- Πάγος

4.7.2 Αναλώσιμα και εξοπλισμός

- Πιπέτες των 0,1-2 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 5-50 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
- Αντίστοιχα tips με φίλτρο
- Στήλες καθαρισμού και σωληνάκια συλλογής (Clean-up Columns, Collection tubes, παρέχονται από το NucleoSpin Gel & PCR clean-up kit)
- Σωληνάκια Eppendorf των 1,5 ml
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος (Frontiers OHAUS)
- Κωνική φιάλη των 100ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100ml
- Επιτραπέζιος ζυγός ακριβείας (Scout, OHAUS)
- Ειδικές πλαστικές στήλες σχηματισμού Gel αγαρόζης
- Κουταλάκι
- Αλουμινόχαρτο
- Φούρνος μικροκυμάτων (Carrefour home)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mupid-One (NIPPON Genetics)
- Μηχάνημα UV απεικόνισης (Quantum ST4 gel documentation imaging system, Vilber Lourmat)
- Μεμβράνη παραφίνης (Parafilm)

4.7.3 Περιγραφή Διαδικασίας

Αρχικά, με χρήση των κατάλληλων πιπετών αναμειγνύεται η ποσότητα του διαλύματος προϊόντος της PCR με τη διπλάσια ποσότητα Binding Buffer (NTI). Μιας και το δείγμα αποτελείται από 40 µL, λοιπόν, προστίθενται 80 µl NTI και γίνεται καλή ανάδευση. Το μείγμα μεταφέρεται σε μία στήλη καθαρισμού η οποία είναι τοποθετημένη μέσα σε σωληνάκι συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 g. Με το τέλος

της φυγοκέντρησης, αδειάζεται το υπερκείμενο του σωλήνα συλλογής και επανασυνδέεται με τη στήλη καθαρισμού. Έπειτα, προστίθενται 700 µL Wash Buffer (NT3) στη στήλη καθαρισμού και ξαναγίνεται φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 30 sec. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και πάλι και ακολουθεί άλλη μία φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα του NT3 από τη στήλη καθαρισμού. Με την απομάκρυνση του υπερκειμένου, η στήλη μεταφέρεται σε καινούριο Eppendorf και εισάγονται 30 µL Elution Buffer (NE) και το δείγμα αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 g. Στη συνέχεια, η στήλη καθαρισμού αφαιρείται και απορρίπτεται ενώ το Eppendorf σφραγίζεται και αποθηκεύεται στους -20 °C.

Τέλος, για την οπτική καταγραφή των αποτελεσμάτων τα δείγματα υφίστανται ηλεκτροφόρηση αγαρόζης πηκτής σύμφωνα με τη διαδικασία που αναλύθηκε στην παράγραφο 4.5. Σημειώνεται ότι για λόγους εξοικονόμησης προϊόντος, η αναλογία κατά την εισαγωγή των δειγμάτων στην πηκτή αγαρόζης είναι: Δείγμα καθαρισμένου 16S rDNA γονιδίου: διάλυμα φόρτωσης (loading dye) 5:1.

4.8 Αλληλούχιση κατά Sanger

Τα καθαρισμένα δείγματα με τα πολλαπλασιασμένα 16S rRNA γονίδια συσκευάζονται και μαζί με ποσότητα από τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR του κάθε δείγματος, αποστέλλονται στο Εργαστήριο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του ΕΚΕΤΑ (Θεσσαλονίκη), στο οποίο υφίστανται αλληλούχιση κατά Sanger κι έπειτα διασταύρωση με βάσεις δεδομένων για προσδιορισμό του είδους στο οποίο ανήκει το κάθε δείγμα. Οι τελευταίες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια του ΕΚΕΤΑ Δρ. Μιχαηλίδου Σοφία.

4.9 Επεξεργασία και απεικόνιση αποτελεσμάτων με το λογισμικό MEGA-X

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης κατά Sanger και συγκεκριμένα η ακριβής αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA του κάθε δείγματος εισήχθη στο λογισμικό MEGA-X προκειμένου να κατασκευαστεί φυλογενετικό δέντρο απεικόνισης της συγγένειας των ειδών στα οποία ανήκουν τα δείγματα.

Για τον σκοπό αυτόν, επιλέχθηκε η λειτουργία “Align” όπου εισάχθηκαν οι πλήρεις αλληλουχίες των γονιδίων οι οποίες στη συνέχεια ευθυγραμμίστηκαν μέσω της επιλογής “Align by MUSCLE”. Έπειτα τα δεδομένα μεταφέρθηκαν στην επιλογή

“Phylogeny” αρχικής σελίδας του λογισμικού όπου κατασκευάστηκε το σχετικό φυλογενετικό δέντρο.

5. Αποτελέσματα

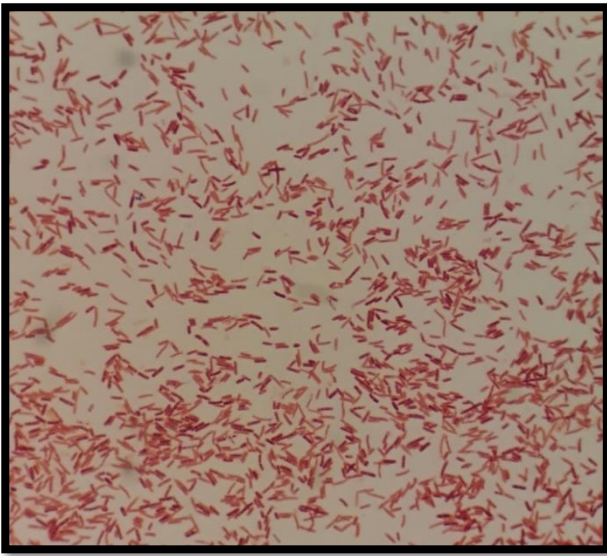
Από τα 47 δείγματα, παρατηρήθηκαν 29 Gram⁺ και 18 Gram⁻. Αναλυτικά, οι πληροφορίες παρατίθενται στον πίνακα 5.1. Ενδεικτικά, παρατίθενται 2 φωτογραφίες από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο μετά από τη χρώση Gram ενός Gram⁺ (Εικόνα 5.2) και ενός Gram⁻ (Εικόνα 5.3) δείγματος, όπως και διαγράμματα με τις αναλογίες δειγμάτων από τα αποτελέσματα της χρώσης Gram (Εικόνα 5.3), της μικροσκοπικής παρατήρησης της μορφολογίας των κυττάρων (Εικόνα 5.4) και της δοκιμής καταλάσης (Εικόνα 5.5).

Πίνακας 5.1. Αναλυτικά αποτελέσματα μικροσκοπικής παρατήρησης δειγμάτων και δοκιμής καταλάσης

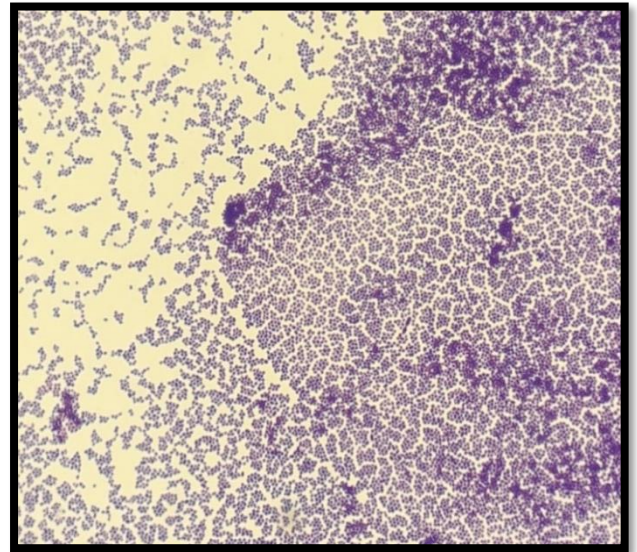
Αριθμός Δείγματος	Κωδικός Δείγματος	Μορφολογία	Κατάταξη Gram	Αποτέλεσμα Καταλάσης
1	33	Διπλόκοκκος	+	-
2	34	Διπλόκοκκος	+	-
3	35	Διπλόκοκκος	+	-
4	36	Διπλόκοκκος	+	-
5	37	Διπλόκοκκος	+	-
6	38	Κόκκος	+	+
7	39	Διπλόκοκκος	+	-
8	40	Διπλόκοκκος	+	-
9	41	Διπλόκοκκος	+	-
10	42	Διπλόκοκκος	+	-
11	44	Κόκκος	-	+
12	46	Βάκιλος	-	+
13	47	Βάκιλος	+	+
14	48	Κόκκος	+	-
15	49	Κόκκος	+	+
16	50	Κόκκος	+	+
17	53	Βάκιλος	-	+

Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν από σφήκες μέσω αλληλούχισης ριβοσωμικών 16S rRNA γονιδίων

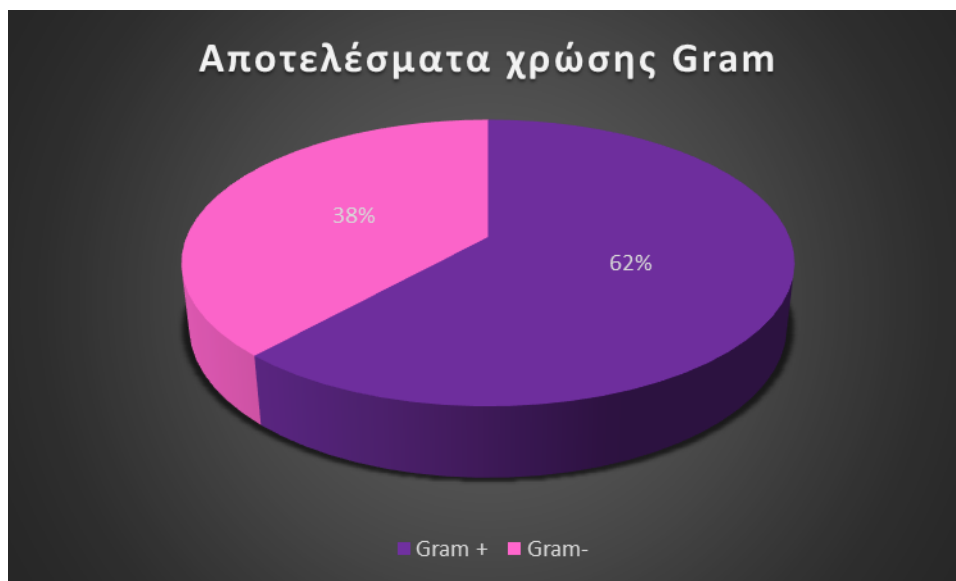
18	54	Κόκκος	+	-
19	55	Βάκιλος	-	+
20	56	Βάκιλος	-	+
21	57	Κόκκος	+	+
22	58	Κοκκοβάκιλος	+	+
23	59A	Κόκκος	+	-
24	59B	Κοκκοβάκιλος	-	+
25	60	Κοκκοβάκιλος	-	+
26	61	Βάκιλος	-	+
27	62	Βάκιλος	+	+
28	63	Βάκιλος	-	+
29	64	Κόκκος	-	+
30	65	Κόκκος	-	+
31	66	Κόκκος	-	+
32	67	Βάκιλος	-	+
33	68	Κόκκος	-	+
34	69	Κόκκος	-	-
35	70	Βάκιλος	+	-
36	71	Κόκκος	+	-
37	72	Κόκκος	-	+
38	73	Κόκκος	+	-
39	74	Κόκκος	+	-
40	75	Κόκκος	+	-
41	76	Κόκκος	+	-
42	77	Κόκκος	+	+
43	78	Βάκιλος	+	+
44	79	Βάκιλος	-	+
45	81	Κόκκος	+	+
46	82	Κόκκος	-	+
47	83	Κόκκος	+	-



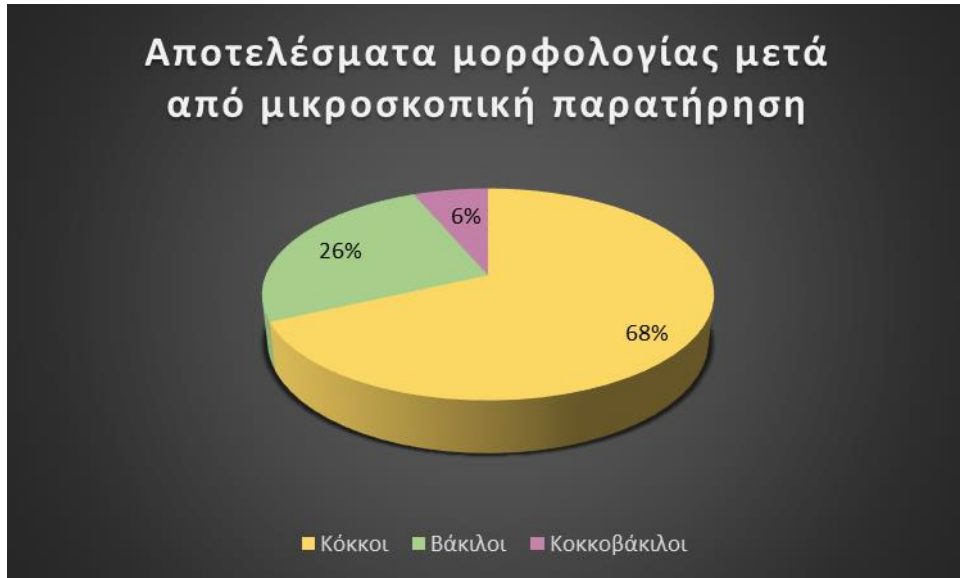
Εικόνα 5.2 Αποτελέσματα χρώσης Gram για το δείγμα Νο 46



Εικόνα 5.3 Αποτελέσματα χρώσης Gram για το δείγμα Νο 54



Εικόνα 5.4 Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων χρώσης Gram



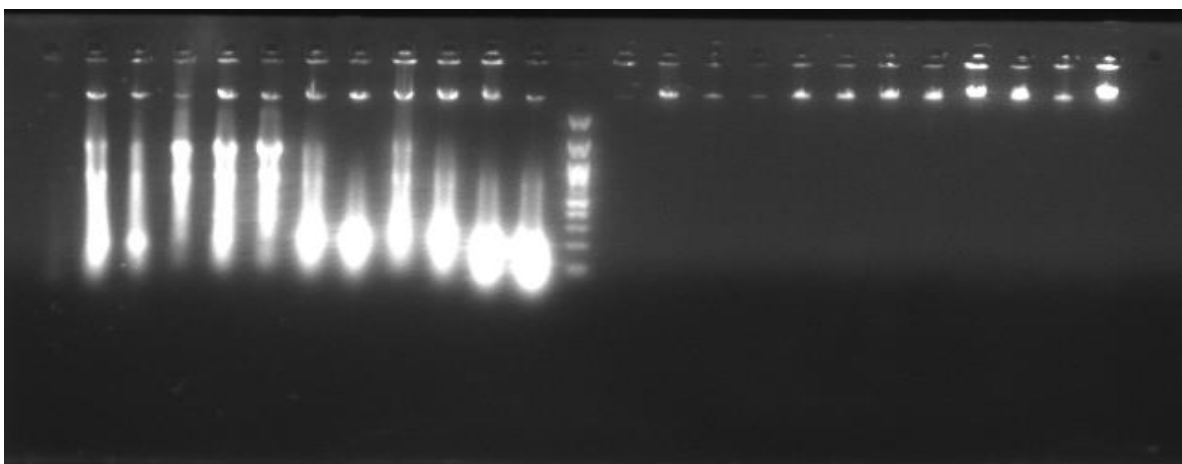
Εικόνα 5.5 Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων μικροσκοπικής παρατήρησης μορφολογίας δειγμάτων



Εικόνα 5.6 Απεικόνιση αποτελεσμάτων δοκιμής καταλάσης

Η αρχική ποσοτικοποίηση του απομονωθέντος DNA (πριν από την πέψη με RNAάση) μέσω φασματοφωτομετρίας αποδείχτηκε μη αποτελεσματική ως μέθοδος καθώς οι τιμές των μετρήσεων δεν ήταν αντιπροσωπευτικές της πραγματικής ποσότητας DNA που υπήρχε στο δείγμα. Ο λόγος αποδείχτηκε πως ήταν η παρουσία κι άλλων νουκλεϊκών οξέων, δηλαδή RNA όπως και η παρουσία ελεύθερων νουκλεοτιδίων τα οποία, όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 2.2.3 συμπεριλαμβάνονται επίσης στις μετρήσεις φασματοφωτομετρίας χωρίς όμως να αποτελούν το επιθυμητό δείγμα. Για να αντιμετωπιστεί αυτό αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ηλεκτροφόρησης για να διαπιστωθεί αν όντως υπήρξε απομόνωση γονιδιωματικού DNA και στη συνέχεια η επώαση του δείγματος σε ένζυμο RNAάσης ώστε να εξασφαλιστεί η αποκλειστική παρουσία γονιδιωματικού DNA πριν την εισαγωγή του δείγματος σε PCR. Λόγω ευκολίας και πιο αξιόπιστων οπτικών αποτελεσμάτων, τελικά η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αγαρόζη αντικατέστησε πλήρως τη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού DNA μέσω φασματοφωτομετρίας (Εικόνα 5.7).

Για την λήψη των βέλτιστων αποτελεσμάτων κατά τη διαδικασία της PCR έγιναν συνεχείς προσαρμογές στην ποσότητα του εισαγόμενου DNA (με βάση την ποσότητα που φαινόταν μέσω ηλεκτροφόρησης ότι είχε απομονωθεί), στην επιλογή των εκκινητών και στην επιλογή του PCR kit. Οι πληροφορίες για την χρήση εκκινητών συνοψίζονται στον πίνακα 5.8 ενώ ενδεικτικά αποτελέσματα μετά από το τέλος της PCR και την απεικόνισή τους σε ηλεκτροφόρηση πηκτικής φαίνονται στην εικόνα 5.9.



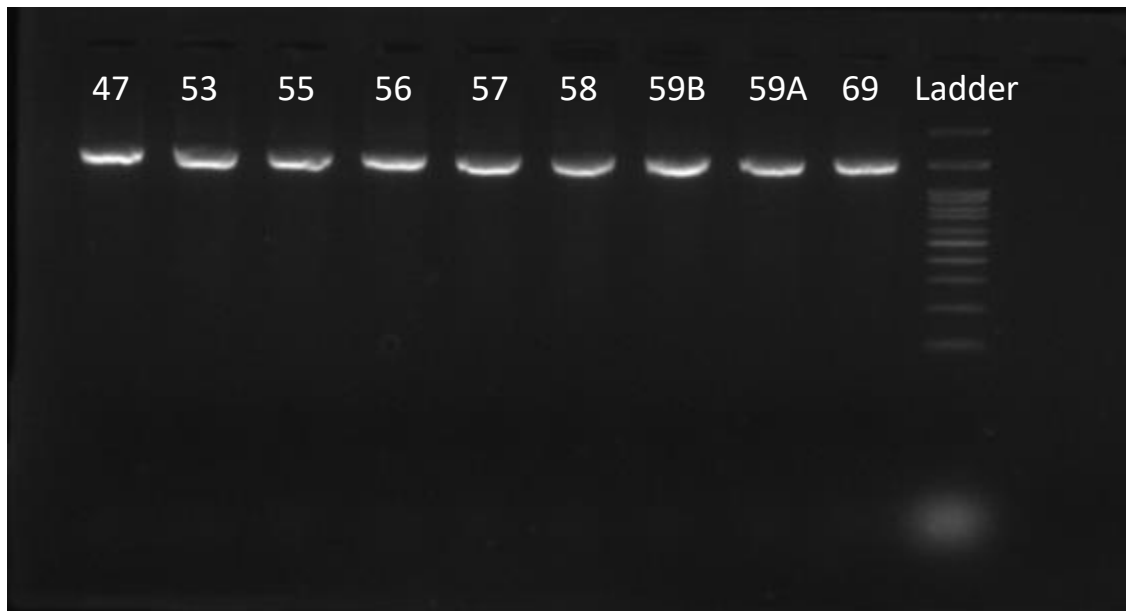
Εικόνα 5.7 Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης πηκτής δειγμάτων DNA πριν και μετά την επώαση σε διάλυμα RNAάσης. Αριστερά του Ladder (L) βρίσκονται τα δείγματα (38-63) πριν την επώαση σε RNAάση και δεξιά του Ladder (L) βρίσκονται τα ίδια δείγματα μετά από επώαση σε RNAάση. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτική αγαρόζη 1,5% (w/v), στα 100V για 30 min.

Πίνακας 5.8 Σύνοψη πληροφοριών για χρήση εκκινητών ανά δείγμα. *Η προσπάθεια για απομόνωση του DNA των δειγμάτων 38, 46 και 70 δεν ήταν επιτυχής με τις παραπάνω μεθόδων οπότε τα δείγματα στάλθηκαν στο ΕΚΕΤΑ μέσα σε κρυοφυαλίδια (cryotubes) για απομόνωση, PCR και αλληλούχιση με χρήση άλλων μεθόδων.

Αριθμός Δείγματος	Κωδικός Δείγματος	Ζεύγος εκκινητών
1	33	16SF / 16SR
2	34	63F / 1542R
3	35	16SF / 16SR
4	36	16SF / 16SR
5	37	16SF / 16SR
6	38*	63F / 1542R
7	39	16SF / 16SR
8	40	16SF / 16SR
9	41	63F / 1542R
10	42	63F / 1542R
11	44	63F / 1542R
12	46*	63F / 1542R
13	47	63F / 1542R
14	48	16SF / 16SR
15	49	16SF / 16SR
16	50	63F / 1542R
17	53	63F / 1542R
18	54	63F / 1542R
19	55	63F / 1542R
20	56	63F / 1542R
21	57	63F / 1542R
22	58	63F / 1542R
23	59A	63F / 1542R
24	59B	63F / 1542R
25	60	63F / 1542R
26	61	63F / 1542R
27	62	63F / 1542R
28	63	63F / 1542R

Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν από σφήκες μέσω αλληλούχισης ριβοσωμικών 16S rRNA γονιδίων

29	64	63F / 1542R
30	65	63F / 1542R
31	66	63F / 1542R
32	67	63F / 1542R
33	68	63F / 1542R
34	69	63F / 1542R
35	70*	Αναμένονται αποτελέσματα
36	71	16SF / 16SR
37	72	63F / 1542R
38	73	63F / 1542R
39	74	16SF / 16SR
40	75	16SF / 16SR
41	76	63F / 1542R
42	77	16SF / 16SR
43	78	63F / 1542R
44	79	63F / 1542R
45	81	63F / 1542R
46	82	63F / 1542R
47	83	16SF / 16SR



Εικόνα 5.9. Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης δειγμάτων καθαρισμένων 16S rRNA γονιδίων σε πηκτή αγαρόζης (1,5% w/v). Αναγράφονται οι κωδικοί των δειγμάτων και ο Ladder.

Με την παραλαβή των αποτελεσμάτων μετά την αλληλούχιση, τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν (εκτός του 70 για το οποίο τα αποτελέσματα αναμένονται) και η πλήρης αλληλουχία του κάθε γονιδίου καταγράφηκε ώστε να ενσωματωθεί μελλοντικά σε σχετική δημόσια βάση δεδομένων (NCBI). Παρατηρήθηκε ότι σε πολλά δείγματα η ταυτοποίηση έγινε σε επίπεδο είδους, ενώ σημειώθηκαν και άλλα όπου η ταυτοποίηση έγινε σε επίπεδο γένους. Οι πληροφορίες συνοψίζονται στον πίνακα 5.10.

Πίνακας 5.10 Σύνοψη αποτελεσμάτων αλληλούχισης κατά Sanger στα 47 δείγματα

Αριθμός Δείγματος	Κωδικός Δείγματος	Είδος
1	33	<i>Enterococcus mundtii</i>
2	34	<i>Enterococcus mundtii</i>
3	35	<i>Enterococcus mundtii</i>
4	36	<i>Enterococcus mundtii</i>
5	37	<i>Enterococcus mundtii</i>
6	38*	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
7	39	<i>Enterococcus mundtii</i>
8	40	<i>Enterococcus mundtii</i>
9	41	<i>Enterococcus mundtii</i>
10	42	<i>Enterococcus mundtii</i>
11	44	<i>Proteus mirabilis</i>
12	46*	<i>Proteus mirabilis</i>
13	47	<i>Gibbsiella dentisursi</i>
14	48	<i>Enterococcus faecalis</i>

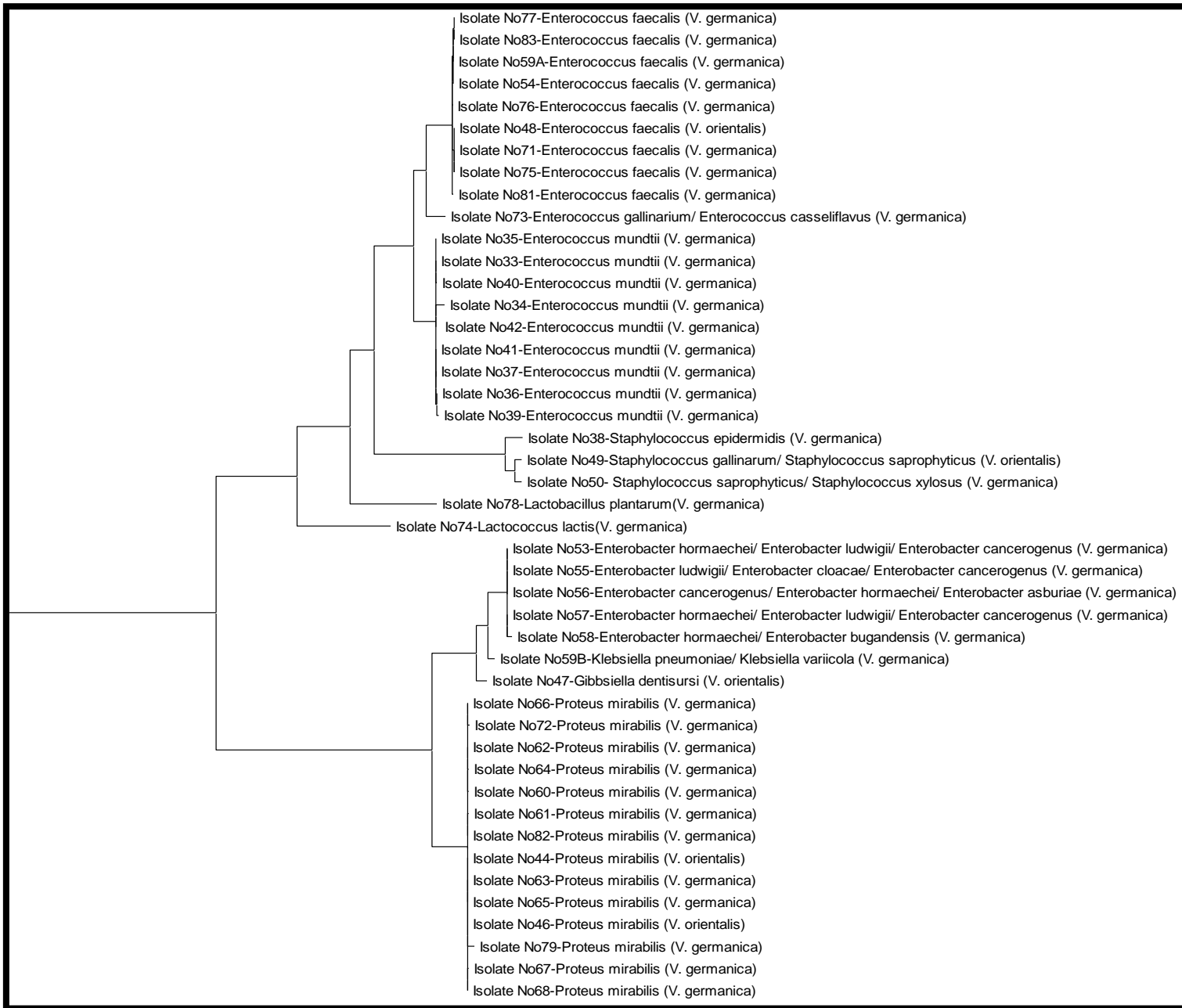
Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν από σφήκες μέσω αλληλούχισης ριβοσωμικών 16S rRNA γονιδίων

15	49	<i>Staphylococcus gallinarum/ Staphylococcus saprophyticus</i>
16	50	<i>Staphylococcus saprophyticus/ Staphylococcus xylosus</i>
17	53	<i>Enterobacter hormaechei/ Enterobacter ludwigii/ Enterobacter cancerogenus</i>
18	54	<i>Enterococcus faecalis</i>
19	55	<i>Enterobacter ludwigii/ Enterobacter cloacae/ Enterobacter cancerogenus</i>
20	56	<i>Enterobacter cancerogenus/ Enterobacter hormaechei/ Enterobacter asburiae</i>
21	57	<i>Enterobacter hormaechei/ Enterobacter ludwigii/ Enterobacter cancerogenus</i>
22	58	<i>Enterobacter hormaechei/ Enterobacter bugandensis</i>
23	59A	<i>Enterococcus faecalis</i>
24	59B	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25	60	<i>Proteus mirabilis</i>
26	61	<i>Proteus mirabilis</i>
27	62	<i>Proteus mirabilis</i>
28	63	<i>Proteus mirabilis</i>
29	64	<i>Proteus mirabilis</i>
30	65	<i>Proteus mirabilis</i>
31	66	<i>Proteus mirabilis</i>
32	67	<i>Proteus mirabilis</i>
33	68	<i>Proteus mirabilis</i>
34	69	<i>Proteus mirabilis</i>
35	70*	Αναμένονται αποτελέσματα
36	71	<i>Enterococcus faecalis</i>
37	72	<i>Proteus mirabilis</i>
38	73	<i>Enterococcus gallinarium</i>
39	74	<i>Lactococcus lactis</i>
40	75	<i>Enterococcus faecalis</i>

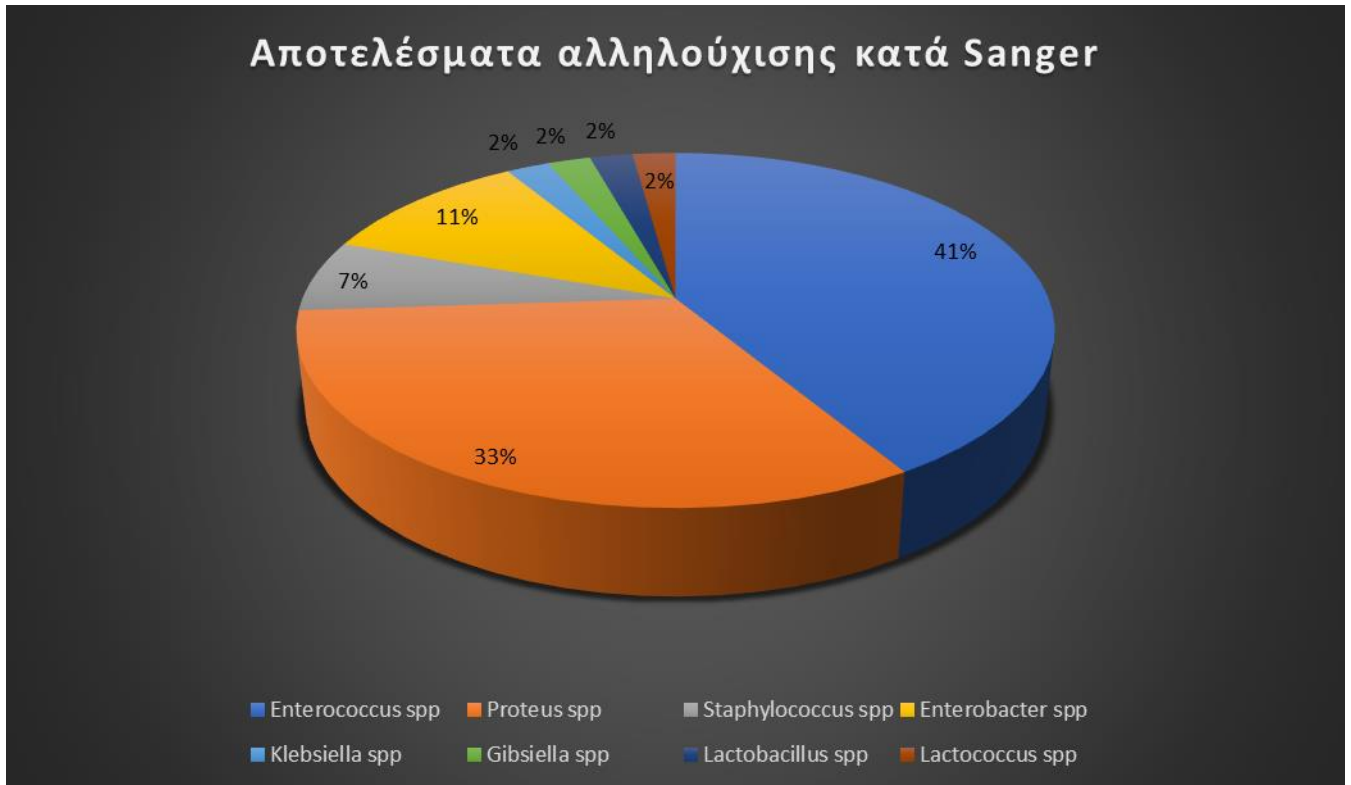
Μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων που απομονώθηκαν από σφήκες μέσω αλληλούχισης
ριβωσωμικών 16S rRNA γονιδίων

41	76	<i>Enterococcus faecalis</i>
42	77	<i>Enterococcus faecalis</i>
43	78	<i>Lactobacillus plantarum</i>
44	79	<i>Proteus mirabilis</i>
45	81	<i>Enterococcus faecalis</i>
46	82	<i>Proteus mirabilis</i>
47	83	<i>Enterococcus faecalis</i>

Παρατίθεται κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων σε φυλογενετικό δέντρο με χρήση του λογισμικού προγράμματος MEGA-X (Εικόνα 5.11), όπως και διάγραμμα απεικόνισης της αναλογίας των γενών που εντοπίστηκαν στα αποτελέσματα της αλληλούχισης κατά Sanger (Εικόνα 5.12).



Εικόνα 5.11 Απεικόνιση αποτελεσμάτων ανάλυσης και ταυτοποίησης των δειγμάτων σε φυλογενετικό δέντρο (Tamura and Nei, 1993, Kumar et al, 2018)



Εικόνα 5.12 Απεικόνιση αναλογίας γενών που εντοπίστηκαν στα αποτελέσματα αλληλούχισης κατά Sanger

6. Συζήτηση

Κατά την παρούσα μελέτη, ο σκοπός ήταν η ανάλυση του εξωτερικού και εσωτερικού μικροβιακού φορτίου δύο κοινών ειδών σφηκών, προκειμένου να προσδιοριστεί η ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών και, κατά συνέπεια, η ύπαρξη κινδύνου σε περίπτωση ανθρώπινης επαφής με αυτές. Με γνώμονα αυτό, λήφθηκαν συνολικά 47 δείγματα από τις σφήκες *Vespa orientalis* και *Vespula germanica* οι οποίες βρίσκονταν σε ποικίλα ενδιαίτηματα του νησιού της Λήμνου ώστε να ταυτοποιηθούν με χρήση μοριακών τεχνικών και συγκεκριμένα την αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA. Τα μικροβιακά δείγματα λήφθηκαν από διάφορα σημεία της ανατομίας της σφήκας και συγκεκριμένα, από τα πόδια, το κεντρί, ή ολόκληρο το σώμα. Τα δείγματα μελετήθηκαν κατά την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό υλικό για να σημειωθούν τα χαρακτηριστικά τους, όπως ο απαιτούμενος χρόνος επώασης έως την εμφάνιση ευδιάκριτων αποικιών, η μορφολογία των αποικιών αυτών και η πιθανή ορατή παραγωγή εξωπολυσακχαριτών/βλέννας.

Στη συνέχεια, ως πρώτο βήμα ταυτοποίησης, έγινε χρώση κατά Gram όπου παρατηρήθηκαν 38 Gram⁺ και 9 Gram⁻ βακτήρια διαφορετικής μορφολογίας. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν κόκκοι, βάκιλοι και ωοειδείς βάκιλοι (κοκκοβάκιλοι). Εκτός αυτού, έγινε και δοκιμή καταλάσης όπου και 28 δείγματα έδωσαν θετική δοκιμή και 19 έδωσαν αρνητική δοκιμή. Τα αποτελέσματα της δοκιμής καταλάσης και μικροσκοπικής παρατήρησης μετά από χρώση Gram παρατίθενται στον πίνακα 5.1.

Έπειτα, τα δείγματα υπέστησαν απομόνωση DNA το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με φασματοφωτομετρία και οπτικοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 5, η ποσοτικοποίηση με χρήση φασματοφωτομέτρου, δεν έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς οι τιμές απορρόφησης δεν αντιστοιχούσαν αποκλειστικά στο απομονωμένο γονιδιωματικό DNA, αλλά και στα περιεχόμενα μόρια RNA και ελεύθερων νουκλεοτιδίων.

Στην πορεία, από το απομονωμένο DNA του κάθε δείγματος πολλαπλασιάστηκε μέσω PCR το γονίδιο 16S rRNA το οποίο μετά καθαρίστηκε από τα υπολείμματα της διαδικασίας και στάλθηκε στα εργαστήρια ΕΚΕΤΑ όπου και ταυτοποιήθηκε μετά από αλληλούχιση Sanger.

Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα αποτελούσαν είδη των γενών *Staphylococcus* (7%), *Enterococcus* (41%), *Proteus* (33%), *Enterobacter* (11%), *Lactococcus* (2%), *Klebsiella* (2%) και *Gibbsiella* (2%) (Πίνακας 5.10, Εικόνα 5.12), με κυρίαρχα να είναι τα *Enterococcus* spp.

Τα πορίσματα που βγαίνουν από τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τα ευρήματα περί μικροβιώματος των σφηκών που αναλύεται στην παράγραφο 1.2.1. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Reeson et al (2003) και Suenami et al (2019), τα κυρίαρχα γένη ανήκουν στις τάξεις των φύλων α- και γ-πρωτεοβακτηρίων κι συγκεκριμένα στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν αυτά τα ευρήματα καθώς καταγράφηκαν 15 δείγματα του γένους *Proteus*, 5 του γένους *Enterobacter*, 1 του γένους *Klebsiella* και 1 του γένους *Gibbsiella*.

Αντίστοιχα, οι McFrederick et al (2013) εντόπισαν γένη της τάξης των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) αν και σε πολύ μικρότερη αναλογία με τα Enterobacteriaceae, κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση αφού εντοπίστηκαν 2 είδη γαλακτικών βακτηρίων (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*).

Εκτός αυτών, οι Duan et al (2020) εντόπισαν γένη της οικογένειας Staphylococcaceae, το οποίο συμφωνεί με τα συγκεκριμένα ευρήματα αφού σημειώθηκαν 3 δείγματα σταφυλοκόκκων.

Τέλος, σε μεγάλο βαθμό εντοπίστηκαν και είδη του γένους *Enterococcus*, το οποίο σύμφωνα με τους Suenami et al (2019) εντοπίστηκε και στα δικά τους ευρήματα. Εξάλλου, η εύρεσή των εντερόκοκκων είναι αναμενόμενη λόγω της ήδη γνωστής θέσης τους στη φυσιολογική μικροχλωρίδα κυρίως του γαστρεντερικού συστήματος πολλών οργανισμών.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης κατά Sanger διασταυρώθηκαν και με τα αποτελέσματα των χρώσεων Gram και των δοκιμών καταλάσης για την εξακρίβωση λήψης ορθών αποτελεσμάτων κατά τις τελευταίες (Πίνακας 5.1, Πίνακας 5.10) και επιβεβαιώθηκαν.

Το γένος *Enterococcus* γενικά εντοπίζεται σε πολλών ειδών ενδιαιτήματα, όπως χώμα, νερό και φυτά. Αποτελεί δείκτη υγιεινής ενός δείγματος διότι ένα από τα βασικότερα ενδιαιτήματά του είναι το γαστρεντερικό σύστημα (Franz and Holzapfel, 2006). Η παρουσία του και τα επίπεδα του πληθυσμού που εντοπίζονται ανά δείγμα, αποτελούν δείκτη κακής υγιεινής και όταν πρόκειται για τρόφιμα, καθορίζουν το μέτρο ασφάλειας κατανάλωσής τους (Giraffa, 1999). Η επικινδυνότητα του γένους *Enterococcus* είναι αμφιλεγόμενη. Το γένος αποτελείται από είδη δυνητικά παθογόνα, τα οποία παρόλο που στις περισσότερες περιπτώσεις δεν δρουν ως παθογόνα, περιέχουν στελέχη τα οποία δημιουργούν πολλά προβλήματα στο ουροποιητικό σύστημα και παρουσιάζουν μεγάλη αντίσταση στα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (Giraffa, 1999). Εξάλλου, με την χρήση τους ως δείκτες υγιεινής, η παρουσία τους υποδηλώνει την πιθανή επαφή με υλικά κοπρανώδους προέλευσης (αν και τα ίδια σπανίως προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα) και κατά συνέπεια την πιθανή παρουσία ειδών εντερικών παθογόνων (π.χ. σαλμονέλας, εντερικών ιών), τα οποίοι μπορούν αποτελέσουν σοβαρό κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου.

Το γένος *Proteus* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae, στην οποία ανήκουν και τα γένη *Enterobacter*, *Klebsiella* και *Gibbsiella*. Το *Proteus* και συγκεκριμένα ο *Proteus mirabilis* είναι δυνητικά παθογόνο και ένα από τα φυσιολογικά του ενδιαιτήματα είναι το γαστρεντερικό σύστημα ζώων και ανθρώπου (Whary et al, 2015). Παρόλο που η παρουσία του στο γαστρεντερικό σύστημα είναι φυσιολογική, λοιπόν, το είδος έχει ενοχοποιηθεί πολλές φορές για λοιμώξεις του ουροποιητικού αλλά και αναπνευστικού συστήματος (Chenal et al, 2015).

Το γένος *Enterobacter* εμφανίζεται σε μια πληθώρα ενδιαιτημάτων, όπως νερό, χώμα, βλάστηση, εγκαταστάσεις διαχείρισης τροφίμων και γαστρεντερικά συστήματα ανθρώπων και ζώων (Cooney et al, 2014, Rogers et al, 2016). Τα είδη του είναι δυνητικά παθογόνα, με τα πιο επικίνδυνα να είναι τα *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter aerogenes*. Τα προβλήματα που προκαλούν αφορούν ερεθισμούς στο δέρμα και λοιμώξεις στο αναπνευστικό σύστημα και στα μάτια (Rogers et al, 2016). Συγκαταλέγεται μαζί με τα γένη *Citrobacter*, *Escherichia* και *Klebsiella* στα κολίμορφα βακτήρια τα οποία και αυτά χρησιμοποιούνται ως δείκτες υγιεινής και πιθανής παρουσίας εντερικών παθογόνων σε διάφορα δείγματα (τροφίμων και άλλα περιβαλλοντικά).

Το γένος *Klebsiella* είναι δυνητικά παθογόνο και εμφανίζεται, επίσης σε πληθώρα διαφορετικών ενδιαιτημάτων, για τον οποίο λόγο και η προέλευση του συνήθως είναι δύσκολο να διευκρινιστεί. Είναι παρόν στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, στο οποίο μπορεί να προκαλέσει και λοίμωξη υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Gundogan, 2014). Έκτος αυτού μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στο αναπνευστικό σύστημα. Η αντιμετώπισή της είναι ιδιαίτερα απαιτητική καθώς έχει αναπτύξει μεγάλη ανθεκτικότητα έναντι των πιο γνωστών αντιβιοτικών (Buckle, 2015).

Το γένος *Gibbsiella* βρίσκεται κυρίως σε φυτικά ενδιαιτήματα, αλλά και στα εντερικά συστήματα ανθρώπου και ζώων. Είναι δυνητικά παθογόνο, αλλά η παθογονικότητά του επηρεάζει τους φυτικούς ιστούς και όχι τόσο τον άνθρωπο (Basavand et al, 2021).

Το γένος *Staphylococcus* βρίσκεται παντού στη φύση και υπάρχει φυσιολογικά στο δέρμα του ανθρώπου. Αποτελείται από πολλά είδη τα οποία είναι δυνητικά παθογόνα, ενώ το είδος *S. aureus* προκαλεί τροφιμογενείς δηλητηριάσεις με συμπτώματα και επιπτώσεις στην υγεία μεγάλου εύρους (Rajkovic, 2016).

Τα γένη *Lactococcus* και *Lactobacillus* (και το *Enterococcus* που αναλύθηκε παραπάνω) ανήκουν στην κατηγορία γαλακτικών βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria, LAB). Τα περισσότερα LAB γενικά χαρακτηρίζονται ως ασφαλείς μικροοργανισμοί (Generally Recognized As Safe, GRAS) και πολλά από αυτά χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των τροφίμων, όπως το γιαούρτι, ζυμώμενα αλλαντικά κλπ. (Mozzi, 2016).

Με βάση τα προαναφερθέντα, τα βακτήρια τα οποία βρέθηκαν στις σφήκες *Vespa orientalis* και *Vespa germanica* από το νησί της Λήμνου, ήταν κυρίως δυνητικά παθογόνα. Η σύσταση του μικροβιώματος αυτού έχει επηρεαστεί από το περιβάλλον στο οποίο ζει η σφήκα και τις διατροφικές της συνήθειες. Η εύρεση *Enterococcus faecalis* και των άλλων κολίμορφων βακτηρίων (*Klebsiella*, *Enterobacter*) είναι σαφής ένδειξη επαφής με ανθρώπινα υλικά κοπρανώδους προέλευσης κάτι που μπορεί να αποδειχτεί εξαιρετικά επικίνδυνο για την υγεία.

Γενικά, με βάση όλες τις παραπάνω μελέτες και τα ευρήματα της παρούσας, μπορεί να ειπωθεί πως η ανθρώπινη επαφή με τις σφήκες είναι δυνητικά επικίνδυνη, ειδικά για ανθρώπους που ανήκουν σε ευαίσθητες και ευπαθείς ομάδες, όπως τα μικρά παιδιά, τα βρέφη, έγκυες γυναίκες, ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένους. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η μεταφορά των βακτηρίων που στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν και η μόλυνση των ανθρώπων μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας τα οποία πιθανώς και να οδηγήσουν στον θάνατο (π.χ. σε περίπτωση εισόδου αυτών στην κυκλοφορία του αίματος και συστημικής επακόλουθης μεταφοράς σε άλλα όργανα και ιστούς).

7. Βιβλιογραφία

- Adib-Tezer, H. & Bayerl, C. (2018), 'Honeybee and wasp venom allergy: Sensitization and immunotherapy', *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology* 16(10), 1228-1247.
- Aguilera, G.; Castro-Escarpulli, G.; Alonso-Aguilar, N.; Rivera, G.; Bocanegra-Garcia, V.; Guo, X.; Juárez-Enríquez, S.; Luna-Herrera, J. & Martínez, C. (2015), 'Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections: a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study', *Archives of Clinical Microbiology* 7, 3.
- Akre, R. D. & Davis, H. G. (1978), 'Biology and Pest Status of Venomous Wasps', *Annual Review of Entomology* 23(1), 215-238.
- Akre, R. D. & Mayer, D. F. (1994), 'Bees and vespine wasps', *Bee World* 75(1), 29-37.
- Akre, R. G. HERMANN, H. R., ed. (1982), *Social Wasps*, Academic Press.
- Al-Talib, H.; Yean, C.; Rajih, A. & Ravichandran, M. (2013), 'Comparative Evaluation of Three Different Methods of Genomic DNA Extraction for *Staphylococcus aureus*', *World Applied Sciences Journal* 21, 424-427.
- Álvarez-Fernández, R. (2013), Chapter One - Explanatory Chapter: PCR Primer Design, in Jon Lorsch, ed., 'Laboratory Methods in Enzymology: DNA', Academic Press, pp. 1-21.
- Austin, J. W. & Pagotto, F. J. (2003), MICROBIOLOGY | Detection of Foodborne Pathogens and their Toxins, in Benjamin Caballero, ed., 'Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)', Academic Press, Oxford, pp. 3886-3892.
- Barbas, C.; Burton, D.; Scott, J. & Silverman, G. (2007), 'Quantitation of DNA and RNA', *CSH protocols* 2007, pdb.ip47.
- Baron, E. J. Baron, S., ed. (1996), 3. Classification, University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Basavand, E.; Khodaygan, P.; Doonan, J. & Rahimian, H. (2021), 'Gibbsiella quercinecans as new pathogen involved in bacterial canker of Russian olive', *3Biotech* 11.
- Ben-Ari, G. & Lavi, U. (2012), 11 - Marker-assisted selection in plant breeding, in Arie Altman & Paul Michael Hasegawa, ed., 'Plant Biotechnology and Agriculture', Academic Press, San Diego, pp. 163-184.
- Berta, A.; Sumich, J. L. & Kovacs, K. M. (2015), Chapter 14 - Population Structure and Dynamics, in Annalisa Berta; James L. Sumich & Kit M. Kovacs, ed., 'Marine Mammals (Third Edition)', Academic Press, San Diego, pp. 533-595.
- Bharagava, R. N.; Purchase, D.; Saxena, G. & Mulla, S. I. Das, S. & Dash, H. R., ed. (2019), *Applications of Metagenomics in Microbial Bioremediation of Pollutants: From Genomics to Environmental Cleanup*, Academic Press.
- Bonnet, M.; Lagier, J. C.; Raoult, D. & Khelaifia, S. (2020), 'Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology', *New Microbes and New Infections* 34, 100622.

- Brown, R. B. & Audet, J. (2008), 'Current techniques for single-cell lysis', *Journal of Royal Society Interface* 5, S131-S138.
- Bruschini, C.; Cervo, R. & Turillazzi, S. (2010), Chapter Nineteen - Pheromones in Social Wasps, in Gerald Litwack, ed., 'Pheromones', Academic Press, pp. 447-492.
- Buckle, J. (2015), Chapter 7 - Infection, in Jane Buckle, ed., 'Clinical Aromatherapy (Third Edition)', Churchill Livingstone, St. Louis, pp. 130-167.
- Caetano-Anollés, D. (2013), Polymerase Chain Reaction, in Stanley Maloy & Kelly Hughes, ed., 'Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)', Academic Press, San Diego, pp. 392-395.
- Carpenter, J. & Nguyen, L. (2003), 'Keys to the genera of social wasps of South-East Asia (Hymenoptera: Vespidae)', *Entomological Science* 6, 183 - 192.
- Cavichioli De Oliveira, N. & Cônsoli, F. L. (2020), 'Beyond host regulation: Changes in gut microbiome of permissive and non-permissive hosts following parasitization by the wasp *Cotesia flavipes*', *FEMS Microbiology Ecology* 96(2).
- Chenal, A.; Sotomayor-Perez, A. C. & Ladant, D. (2015), 23 - Structure and function of RTX toxins, in Joseph Alouf; Daniel Ladant & Michel R. Popoff, ed., 'The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition)', Academic Press, Boston, pp. 677-718.
- Cini, A.; Meriggi, N.; Bacci, G.; Cappa, F.; Vitali, F.; Cavaliere, D. & Cervo, R. (2020), 'Gut microbial composition in different castes and developmental stages of the invasive hornet *Vespa velutina nigrithorax*', *Science of the Total Environment* 745.
- Clapperton, B. K.; Alspach, P. A.; Moller, H. & Matheson, A. G. (1989), 'The impact of common and german wasps (Hymenoptera: Vespidae) on the new zealand beekeeping industry', *New Zealand Journal of Zoology* 16(3), 325-332.
- Clark, D. P. & Pazdernik, N. J. (2013), Chapter 6 - Polymerase Chain Reaction, in David P. Clark & Nanette J. Pazdernik, ed., 'Molecular Biology (Second Edition)', Academic Press, Boston, pp. 163-193.
- Cooney, S.; O'Brien, S.; Iversen, C. & Fanning, S. (2014), Bacteria: Other Pathogenic Enterobacteriaceae – Enterobacter and Other Genera, in Yasmine Motarjemi, ed., 'Encyclopedia of Food Safety', Academic Press, Waltham, pp. 433-441.
- Dhaliwal, A. (2013), 'DNA Extraction and Purification', *MATER METHODS* 3, 191.
- Dingle, T. C. & MacCannell, D. R. (2015), Chapter 9 - Molecular Strain Typing and Characterisation of Toxigenic *Clostridium difficile*, in Andrew Sails & Yi-Wei Tang, ed., 'Current and Emerging Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections', Academic Press, pp. 329-357.
- Duan, R.; Xu, H.; Gao, S.; Gao, Z. & Wang, N. (2020), 'Effects of Different Hosts on Bacterial Communities of Parasitic Wasp *Nasonia vitripennis*', *Frontiers in Microbiology* 11.
- Dymond, J. S. (2013), Chapter Twenty-Three - Explanatory Chapter:

- Quantitative PCR, in Jon Lorsch, ed., 'Laboratory Methods in Enzymology: DNA', Academic Press, pp. 279-289.
- Elkins, K. M. Elkins, K. M., ed. (2013), DNA Extraction, Academic Press, San Diego.
 - Eslami, G.; Khalatbari Limaki, S.; Ehrampoush, M.; Gholamrezaei, M.; Hajimohammadi, B. & Oryan, A. (2017), 'Comparison of Three Different DNA Extraction Methods for *Linguatula serrata* as a Food Born Pathogen', Iranian Journal of Parasitology 12, 236-242.
 - Evans, J. D. & Schwarz, R. S. (2011), 'Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health', Trends in Microbiology 19(12), 614-620.
 - Farkas, D. H. & Holland, C. A. (2009), Chapter 3 - Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation, in Raymond R. Tubbs & Mark H. Stoler, ed., 'Cell and Tissue Based Molecular Pathology', Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 19-32.
 - Foster, J. T.; Bull, R. L. & Keim, P. S. (2011), Chapter 19 - Ricin Forensics: Comparisons to Microbial Forensics, in Bruce Budowle; Steven E. Schutzer; Roger G. Breeze; Paul S. Keim & Stephen A. Morse, ed., 'Microbial Forensics (Second Edition)', Academic Press, San Diego, pp. 315-326.
 - Franz, C. M. A. P. & Holzapfel, W. H. (2006), 20 - Enterococci, in Yasmine Motarjemi & Martin Adams, ed., 'Emerging Foodborne Pathogens', Woodhead Publishing, pp. 557-613.
 - Fritsch, R. J. & Krause, I. (2003), ELECTROPHORESIS, in Benjamin Caballero, ed., 'Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)', Academic Press, Oxford, pp. 2055-2062.
 - Giraffa, G. (1999), ENTEROCOCCUS, in Richard K. Robinson, ed., 'Encyclopedia of Food Microbiology', Elsevier, Oxford, pp. 617-624.
 - Gomes, A. & Korf, B. Robin, N. H. & Farmer, M. B., ed. (2018), Genetic Testing Techniques, Elsevier.
 - Gundogan, N. (2014), Klebsiella, in Carl A. Batt & Mary Lou Tortorello, ed., 'Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)', Academic Press, Oxford, pp. 383-388.
 - Gurung, K.; Wertheim, B. & Falcao Salles, J. (2019), 'The microbiome of pest insects: it is not just bacteria', Entomologia Experimentalis et Applicata 167(3), 156-170.
 - Hagemann, I. S. Kulkarni, S. & Pfeifer, J., ed. (2015), Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing, Academic Press, Boston.
 - Hanlon, C. A. & Nadin-Davis, S. A. (2013), Chapter 11 - Laboratory Diagnosis of Rabies, in Alan C. Jackson, ed., 'Rabies (Third Edition)', Academic Press, Boston, pp. 409-459.
 - Hoy, M. A. (2019), Chapter 13 - Insect Population Ecology and Molecular Genetics, in Marjorie A. Hoy, ed., 'Insect Molecular Genetics (Fourth Edition)', Academic Press, , pp. 515-561.
 - Hunt, J. H. & Toth, A. L. (2017), Sociality in wasps, Cambridge University Press.
 - Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. (2018), 'First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase

- (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid', Alexandria Journal of Medicine 54(4), 287-293.
- Isbir, T.; Kirac, D.; Demircan, B. & Dalan, B. (2013), Gel Electrophoresis, in Stanley Maloy & Kelly Hughes, ed., 'Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)', Academic Press, San Diego, pp. 165-167.
 - Jalali, M.; Zaborowska, J. & Jalali, M. (2017), Chapter 1 - The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR, in Morteza Jalali; Francesca Y. L. Saldanha & Mehdi Jalali, ed., 'Basic Science Methods for Clinical Researchers', Academic Press, Boston, pp. 1-18.
 - Joseph, L. J. Weiss, R. E. & Refetoff, S., ed. (2016), Setting Up a Laboratory, Academic Press, San Diego.
 - Jurtshuk, P. J. Baron, S., ed. (1996), 4. Bacterial Metabolism, University of Texas Medical Branch at Galveston.
 - K. E. I. M., PAUL (2005), CHAPTER 5 - Bacterial Pathogens, in Roger G. Breeze; Bruce Budowle & Steven E. Schutzer, ed., 'Microbial Forensics', Academic Press, Burlington, pp. 99-107.
 - Kohanski, M.; Dwyer, D. & Collins, J. (2010), 'How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks', Nature reviews. Microbiology 8, 423-35.
 - Kouzuma, A. & Watanabe, K. Moo-Young, M., ed. (2011), Molecular Approaches for the Analysis of Natural Attenuation and Bioremediation, Academic Press, Burlington.
 - Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
 - Lee, D. & Hain, P. (2002), 'Electrophoresis: How Scientists Observe Fragments of DNA',
 - Lee, J. C.-I.; Hsieh, H.-M. & Tsai, L.-C. (2013), DNA and Endangered Species, in Jay A. Siegel; Pekka J. Saukko & Max M. Houck, ed., 'Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)', Academic Press, Waltham, pp. 409-412.
 - Lorenz, T. (2012), 'Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies', Journal of visualized experiments: JoVE 63, e3998.
 - Maddocks, S. & Jenkins, R. (2017), Chapter 4 - Quantitative PCR: Things to Consider, in Sarah Maddocks & Rowena Jenkins, ed., 'Understanding PCR', Academic Press, Boston, pp. 45-52.
 - Magalhães, R.; Mena, C.; Ferreira, V.; Silva, J.; Almeida, G.; Gibbs, P. & Teixeira, P. (2014), Bacteria: *Listeria monocytogenes*, in Yasmine Motarjemi, ed., 'Encyclopedia of Food Safety', Academic Press, Waltham, pp. 450-461.
 - Mahony, J. B. & Chernesky, M. A. (1995), 10 - Multiplex Polymerase Chain Reaction, in Danny L. Wiedbrauk & Daniel H. Farkas, ed., 'Molecular Methods for Virus Detection', Academic Press, San Diego, pp. 219-236.
 - Mariani, S. & Bekkevold, D. (2014), Chapter Fourteen - The Nuclear Genome: Neutral and Adaptive Markers in Fisheries Science, in Steven X. Cadrin; Lisa A. Kerr & Stefano Mariani, ed., 'Stock Identification Methods (Second Edition)', Academic Press, San Diego, pp. 297-327.
 - Marmiroli, N. & Maestri, E. (2007), Chapter 6 - Polymerase chain reaction

- (PCR), in Yolanda Picó, ed., 'Food Toxicants Analysis', Elsevier, Amsterdam, pp. 147-187.
- Martinez, R. M. Maloy, S. & Hughes, K., ed. (2013), *Pneumonia Bacteria*, Academic Press, San Diego.
 - McFrederick, Q. S.; Cannone, J. J.; Gutell, R. R.; Kellner, K.; Plowes, R. M. & Mueller, U. G. (2013), 'Specificity between lactobacilli and hymenopteran hosts is the exception rather than the rule', *Applied and Environmental Microbiology* 79(6), 1803-1812.
 - Mittal, B.; Chaturvedi, P. & Tulsyan, S. (2013), Restriction Fragment Length Polymorphism, in Stanley Maloy & Kelly Hughes, ed., 'Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)', Academic Press, San Diego, pp. 190-193.
 - Mozzi, F. (2016), Lactic Acid Bacteria, in Benjamin Caballero; Paul M. Finglas & Fidel Toldrá, ed., 'Encyclopedia of Food and Health', Academic Press, Oxford, pp. 501-508.
 - Naum, M. & Lampel, K. A. (2011), Analytical Methods | DNA-Based Assays, in John W. Fuquay, ed., 'Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)', Academic Press, San Diego, pp. 221-225.
 - O'Neill, K. M. (2019), Wasp Diversity and Classification, Cornell University Press.
 - Ong, H. S. (2019), Comparative Genomics Analysis, in Shoba Ranganathan; Michael Gribskov; Kenta Nakai & Christian Schönbach, ed., 'Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology', Academic Press, Oxford, pp. 425-431.
 - Pavyn, I. Beljān, E. & Maiden, M. C. J. (2009), 'Multilocus Sequence Typing', , 129--140.
 - Pusceddu, M.; Mura, A.; Floris, I. & Satta, A. (2018), 'Feeding strategies and intraspecific competition in German yellowjacket (*Vespula germanica*)', *PLoS ONE* 13(10).
 - Rajkovic, A. (2016), *Staphylococcus: Food Poisoning*, in Benjamin Caballero; Paul M. Finglas & Fidel Toldrá, ed., 'Encyclopedia of Food and Health', Academic Press, Oxford, pp. 133-139.
 - Reece, J. B.; Meyers, N.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V.; Jackson, R. B.; Cooke, B. J. & Campbell, N. A. Campbell, N. A., ed. (2015), Chapter 7. Membrane Structure and Function, Vol. I, Pearson Frenchs Forest, NSW.
 - Reed, H. C. & Landolt, P. J. (2018), *Ants, wasps, and bees (hymenoptera)*, Elsevier.
 - Reeson, A. F.; Jankovic, T.; Kasper, M. L.; Rogers, S. & Austin, A. D. (2003), 'Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*', *Insect Molecular Biology* 12(1), 85-91.
 - Rogers, L.; Power, K.; Gaora, P. & Fanning, S. (2016), *Escherichia coli and Other Enterobacteriaceae: Occurrence and Detection*, in Benjamin Caballero; Paul M. Finglas & Fidel Toldrá, ed., 'Encyclopedia of Food and Health', Academic Press, Oxford, pp. 545-551.
 - Scull, J. C. (2014), Nucleic Acid Extraction Techniques, in Linda M.

- McManus & Richard N. Mitchell, ed., 'Pathobiology of Human Disease', Academic Press, San Diego, pp. 4059-4063.
- Sharma-Kuinkel, B.; Rude, T. & Fowler, V. (2016), 'Pulse Field Gel Electrophoresis.', *Methods in molecular biology* 1373, 117-30.
 - Shen, C.-H. Shen, C.-H., ed. (2019), *Amplification of Nucleic Acids*, Academic Press.
 - Shen, C.-H. Shen, C.-H., ed. (2019), *Techniques in Sequencing*, Academic Press.
 - Shetty, P. J. (2020), 'The Evolution of DNA Extraction Methods', *American Journal of Biomedical Science & Research* 8 (1).
 - Solomon, D. A. Perry, A. & Brat, D. J., ed. (2018), *Integrating Molecular Diagnostics with Surgical Neuropathology*, Elsevier.
 - Suenami, S.; Konishi Nobu, M. & Miyazaki, R. (2019), 'Community analysis of gut microbiota in hornets, the largest eusocial wasps, *Vespa mandarinia* and *V. simillima*', *Scientific Reports* 9(1).
 - Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
 - Thairu, Y.; Nasir, I. & Usman, Y. (2014), 'Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases', *Sub-Saharan Afr J Med* 1(4), 168--174.
 - Truskinovsky, A. M.; Dick, J. D. & Hutchins, G. M. (2001), 'Fatal infection after a bee sting', *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32(2), E36-38.
 - Váradi, L.; Luo, J. L.; Hibbs, D. E.; Perry, J. D.; Anderson, R. J.; Orenga, S. & Groundwater, P. W. (2017), 'Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future', *Chem. Soc. Rev.* 46, 4818-4832.
 - Wages, J. M. (2005), POLYMERASE CHAIN REACTION, in Paul Worsfold; Alan Townshend & Colin Poole, ed., 'Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)', Elsevier, Oxford, pp. 243-250.
 - Wang, X.; Jordan, I. K. & Mayer, L. W. (2015), Chapter 29 - A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology, in Yi-Wei Tang; Max Sussman; Dongyou Liu; Ian Poxton & Joseph Schwartzman, ed., 'Molecular Medical Microbiology (Second Edition)', Academic Press, Boston, pp. 517-536.
 - Wanger, A.; Chavez, V.; Huang, R. S. P.; Wahed, A.; Actor, J. K. & Dasgupta, A. (2017), Chapter 12 - Overview of Molecular Diagnostics Principles, in Audrey Wanger; Violeta Chavez; Richard S. P. Huang; Amer Wahed; Jeffrey K. Actor & Amitava Dasgupta, ed., 'Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology', Elsevier, , pp. 233-257.
 - Wertz, J. E. & Low, K. B. (2017), *Genetics, Microbial (general)*☆, Elsevier.
 - Whary, M. T.; Baumgarth, N.; Fox, J. G. & Barthold, S. W. (2015), Chapter 3 - Biology and Diseases of Mice, in James G. Fox; Lynn C. Anderson; Glen M. Otto; Kathleen R. Pritchett-Corning & Mark T. Whary, ed., 'Laboratory Animal Medicine (Third Edition)', Academic Press, Boston, pp. 43-149.
 - WILCZYNSKI, S. P. (2009), CHAPTER 7 - Molecular Biology, in Noel Weidner; Richard J. Cote; Saul Suster & Lawrence M. Weiss, ed., 'Modern Surgical

- Pathology (Second Edition)', W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 85-120.
- Wright, C. M. (2015), Chapter 5 - Long Noncoding RNAs and Cancer, in Steven G. Gray, ed., 'Epigenetic Cancer Therapy', Academic Press, Boston, pp. 91-114.
 - Yeruham, I.; Braverman, Y. & Schwimmer, A. (1998), 'Wasps are the cause of an increasing mastitis problem in dairy cattle in israel', Veterinary Quarterly 20(3), 111-114.
 - Zerbini, F. M.; da Silva, F. N.; Urquiza, G. P. C. & Basso, M. F. (2014), Chapter 8 - Transgenic Plants, in Aluizio Borem & Roberto Fritsche-Neto, ed., 'Biotechnology and Plant Breeding', Academic Press, San Diego, pp. 179-199.
 - Zytynska, S. E. & Meyer, S. T. (2019), 'Effects of biodiversity in agricultural landscapes on the protective microbiome of insects – a review', Entomologia Experimentalis et Applicata 167(1), 2-13.
 - Μπαλατσούρας, Γ.. (2006), Μικροβιολογία Τροφίμων, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΒΡΥΟ.

Αναφορές από Ιστοσελίδες

- Anon, 2020. Culture Media. Available at: <https://bio.libretexts.org/@go/page/28940> [Accessed June 12, 2021].
- Anon, 2021. Ribosomes. Available at: <https://bio.libretexts.org/@go/page/3130> [Accessed June 13, 2021].
- Antibiotic Resistance in Bacteria, labtestsonline.org, Accessed: 2021 <https://labtestsonline.org/articles/antibiotic-resistance-bacteria>
- Bailey, Regina. "Gram Positive vs. Gram Negative Bacteria." ThoughtCo. <https://www.thoughtco.com/gram-positive-gram-negative-bacteria-4174239> (accessed June 12, 2021).
- BGBLB (Brilliant Green Bile Lactose Broth) #3578024, bio-rad.com, Accessed:2021, <https://www.bio-rad.com/en-gr/sku/3578024-bgblb-brilliant-green-bile-lactose-broth?ID=3578024>
- BRILLIANT GREEN BILE BROTH, amylmedia.com Accessed: 2021, <https://amylmedia.com.au/orders/brilliant-green-bile-broth/>

- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. "Restriction enzyme." Encyclopedia Britannica, May 18, 2020. <https://www.britannica.com/science/restriction-enzyme>.
- Chauhan, T., Different Types of DNA Extraction Methods, 2018, genericeducation.co.in, Accessed: 2021, <https://geniceducation.co.in/different-types-of-dna-extraction-methods/>
- DNA QUANTIFICATION METHODS, METHODS BASED ON ABSORBANCE, Berthold.com, Accessed: 2021, <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/applications/dna-quantification/methods/>
- Durham, J., Antibiotic resistance in E. coli bacteria, sciencephotolibrary.com, Accessed: 2021, <https://www.sciencephoto.com/media/296752/view/antibiotic-resistance-in-e-coli-bacteria>
- Lamb, R., How Wasps Work, howstuffworks.com, Accessed: 2021, <https://animals.howstuffworks.com/insects/wasp1.htm>
- Loftus, S., Southern Blot, National Human Genome Research Institute, Accessed: 2021, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Southern-Blot>
- Media, quizlet.com, Accessed: 2021, <https://quizlet.com/160005861/media-flash-cards/>
- Module 6: Metabolic Pathways, Electron Transport Chain, lumenlearning.com, Accessed: 2021, <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-electron-transport-chain/>
- National Vital Statistics System. Underlying cause of death data, 1999–2017 <https://wonder.cdc.gov/ucd-icd10.html>
- Oriental Hornet (*Vespa orientalis*), inaturalist.ca, Access: 2021, <https://inaturalist.ca/taxa/83801-Vespa-orientalis>
- Rogers, K.. "Gel electrophoresis." Encyclopedia Britannica, April 28, 2017. <https://www.britannica.com/science/gel-electrophoresis>.
- Sagar Aryal, Catalase Test- Principle, Uses, Procedure, Result Interpretation with Precautions, microbiologyinfo.com, Accessed: 2021, <https://microbiologyinfo.com/catalase-test-principle-uses-procedure-result-interpretation-with-precautions/>
- Shields, P. and Cathcart L. , 2016, Oxidase Test Protocol, American Society for Microbiology https://asm.org/getattachment/00ce8639-8e76-4acb-8591-0f7b22a347c6/oxidase-test-protocol-3229.pdf?fbclid=IwAR3Y0UGSj7mlg-G20q4ZNqFmNItCvZSrXtauhrVQ0q69_uMa7B7HIeco43M
- Staphylococcus aureus, microbiologyinpictures.com, Accessed: 2021, <https://www.microbiologyinpictures.com/staphylococcus%20aureus.html>
- Tankeshwar, A. Pus Sample: Collection, Processing, Staining and Culture, microbeonline.com, Accessed: 2021, <https://microbeonline.com/pus-sample-collection-staining-culture/>

- Taylor TA, Unakal CG. Staphylococcus Aureus. [Updated 2020 Aug 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. [Figure, Gram stain of Staphylococcus aureus. Contributed by Scott Jones, MD] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/figure/article-29453.image.f1/>
- Types of Restriction Endonucleases, international.neb.com, Accessed: 2021, <https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases/types-of-restriction-endonucleases>
- van Treuren, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Wageningen University and Research, Accessed: 2021, <https://www.wur.nl/en/show/Random-Amplified-Polymorphic-DNA-RAPD.htm>
- Vespula germanica, alchetron.com, 2018, <https://alchetron.com/Vespula-germanica>