

Μελέτη του σχηματισμού βιοϋμενίων στο νοσοκομειακό παθογόνο και προσφάτως συγκαταλεγόμενο ως παράγοντα διατροφικού κινδύνου *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL (MRSA)

Ευθυμίου Γ., Παππά Α-Μ., Τύπας Μ.Α.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσσια 15701, Αθήνα

Τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* MRSA-τύπου (methicillin resistant) είναι στην συντριπτική τους πλειοψηφία απομονωμένα από κλινικές (HA – hospital-associated) και δευτερευόντως από εξάρσεις κρουσμάτων στην ευρύτερη πολιτεία (CA – community-associated) ή τη ζωική παραγωγή (LA – livestock-associated). Είναι ανθεκτικά στη μεθικιλίνη κι άλλες β-λακτάμες και ιδιαίτερα δύσκολο να καταπολεμηθούν. Προκαλούν από απλές δερματικές παθήσεις μέχρι θανατηφόρες συστηματικές λοιμώξεις, κι αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για ασθενείς με ανοιχτές πληγές, ιατρικά πρόσθετα ή αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα. Στελέχη *Staphylococcus aureus* MRSA-τύπου έχουν προσφάτως εντοπιστεί και σε συσκευασμένα τρόφιμα, καθιστώντας τα βακτήρια αυτά ένα νέο μέλος της οικογένειας των τροφικών παθογόνων. Το στέλεχος *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL επιλέχθηκε να μελετηθεί στην εργασία αυτή ως MRSA-θετικός αντιπρόσωπος σταφυλοκόκκου, και ως στέλεχος καλά μελετημένο σε μοριακό επίπεδο και ικανό να παράγει ικανοποιητική ποσότητα βιοϋμενίων – ιδιότητα που δεν φέρουν όλοι οι σταφυλόκοκκοι. Στο γονιδίωμα του *S. aureus* COL (MRSA) έγινε *in silico* αναζήτηση γονιδίων που συμμετέχουν στο σχηματισμό βιοϋμενίων και συγκρίθηκε η παρουσία ή απουσία τους με αυτές σε άλλα αλληλουχημένα στελέχη σταφυλοκόκκων. Σε φυσιολογικό επίπεδο, εξετάστηκε η ικανότητα του *S. aureus* COL (MRSA) να σχηματίζει βιοϋμένια σε αβιοτικές επιφάνειες ή βιοτικά μέσα όπως το εκχύλισμα του μαρουλιού, και βρέθηκε ότι στο τελευταίο αναπτύσσεται αξιοσημείωτα καλά απουσία άλλων θρεπτικών συστατικών. Μελετήθηκε το εύρος των θερμοκρασιών και του pH όπου το *S. aureus* COL (MRSA) επιβιώνει και δημιουργεί βιοϋμένια, όπως και οι επιδράσεις αλκαλικού καθαριστικού, χηλικού παράγοντα και διάφορων δισθενών κατιόντων στο σχηματισμό των βιοϋμενίων. Η πολύ καλή επιβίωση του *S. aureus* COL (MRSA) και η δημιουργία βιοϋμενίων σε εύρη pH από 5 έως 9, όπως και σε συνθήκες τροφικής ανεπάρκειας (ανάπτυξη σε αραιωμένα φυτικά εκχυλίσματα), ενδιαφέρουν ιδιαίτερα σε επίπεδο εύρεσης των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη συνωστισμένη κατάσταση επιβίωσης, συγκριτικά με την πλαγκτονική. Η διαφορική γονιδιακή έκφραση στις συνθήκες αυτές επίκειται να αναλυθεί μέσω μεταγραφωματικής ανάλυσης με χρήση συστοιχιών τύπου Affymetrix. Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από *S. aureus* COL (MRSA), το οποίο εισάγει την επίδραση λυτικού παράγοντα ειδικού για Gram θετικά βακτήρια στη διαδικασία προπαρασκευής RNA όπως προτείνεται από γνωστό εμπορικό kit.

Ευχαριστούμε το Πρόγραμμα «ΘΑΛΗΣ ‘ΒΙΟΪΜΕΝΙΑ’ Κωδ. 63.0001».

Λέξεις-κλειδιά: *Staphylococcus aureus*, MRSA, βιοϋμένια, φυτικά εκχυλίσματα, μεταγραφωματική ανάλυση

Study of biofilm formation by the hospital-acquired and recently considered as food-borne pathogen *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL (MRSA)

Efthimiou G., Pappas K.M., Typas M.A.

Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, Ilissia 15701, Athens

The vast majority of *Staphylococcus aureus* MRSA (methicillin-resistant) strains are primarily isolated from clinics (HA – hospital-associated) and to a lesser extent from the wider population (CA – community-associated) or animal farms (LA – livestock-associated). They are resistant to β -lactam antibiotics including methicillin and extremely difficult to treat. They cause from mild skin disorders to serious systemic infections, and pose as deadly threat to patients with open wounds, medical implants or compromised immune system. MRSA strains of *Staphylococcus aureus* have been recently isolated from retail foods, rendering these bacteria a new member in the family of food pathogens. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL was chosen for study in this work as an MRSA representative, as well as a strain well-studied at the molecular level and able to produce adequate amounts of biofilms – a property not shared by all staphylococci. Genes important for biofilm formation were identified in the genome of *S. aureus* COL (MRSA) by an *in silico* analysis and their presence or absence was compared with that of other sequenced staphylococci. At a physiological level, the ability of *S. aureus* COL (MRSA) to form biofilms on abiotic surfaces or biotic media such as lettuce extract was examined, and it was found that this pathogen can effortlessly grow in the latter, in absence of other nutrients. The temperature and pH range that supports survival and biofilm formation by *S. aureus* COL (MRSA) was also studied, and the effects of an alkaline detergent, a chelating agent and various bivalent cations on biofilm formation, investigated. The notable survival and biofilm formation of *S. aureus* COL (MRSA) at a pH range of 5 to 9, or in nutrient-poor environments such as dilute plant extracts, are of particular interest in this work, in terms of identifying the molecular mechanisms behind biofilm compared to planktonic lifestyle. Differential gene expression under these conditions is going to be studied by transcriptomic analysis using Affymetrix microarrays. To this end, a protocol for RNA isolation from *S. aureus* COL (MRSA) cells was developed, which introduces a lysis step suitable for Gram-positive bacteria to a commercial kit purification procedure.

We acknowledge the Network of Excellence «THALES – ‘BIOFILMS’ Pr. No. 63.0001»

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, biofilms, plant extracts, transcriptomic analysis