مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره دوم، ۱۳۸۸
صفحات ۸۰-۷۳

Original Article

ارزیابی تکنولوژی ریزآرایه های الیگونوکلئوتیدی در تشخیص باکتری‌های پاتوژن منتقله از طریق غذا

میثم سرشار[۱]، دکتر عباس دوستی[۲]، دکتر انیس جعفری[۳]، دکتر نادر شاهرخی[۳*]

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، [۲]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد،
[۳]بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: روش های سنتی در تشخیص باکتری های پاتوژن منتقله از طریق غذا بسیار وقت گیر و زمان‌بر می باشند، بنابراین استفاده از روش های دقیق و قابل اطمینان در تشخیص پاتوژن های میکروبی مورد نیاز است. هدف از این پژوهش طراحی پرایمرهای یونیورسال برای تکثیر ژن *23S rDNA* و هیبریدیزاسیون ریز آرایه های الیگونوکلئوتیدی به منظور ارزیابی کارایی و عملکرد توالی *23S rDNA* در تشخیص باکتری های منتقل شونده از طریق غذا می باشد.

مواد و روش ها: با مقایسه نواحی ثابت و متغیر ژن *23S rDNA* از ۹ گونه باکتری پاتوژن منتقله از طریق غذا و با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژنی، طراحی پروب های الیگونوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار Vector NTI صورت گرفت. پروب های الیگونوکلئوتیدی برای هر گونه از باکتری ها (مجموعاً ۲۸ پروب) برای اتصال به غشای نیتروسلولزی استفاده شد. PCR از ژن مذکور با استفاده از یک جفت پرایمر یونیورسال نشان‌دار شده توسط Digoxigenin صورت گرفت. سپس محصولات بدست آمده با آرایه های نوکلئوتیدی متصل به غشای نیتروسلولزی هیبرید گردیدند.

یافته ها: در این مطالعه از اشریشیا کلی، لیستریا مونوسیتوژنز، انتروکوکوس فکالیس، ویبریو کلرا، شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انتریکا، پروتئوس ولگاریس و باسیلوس سرئوس به عنوان شایع ترین باکتری های پاتوژن منتقله از طریق غذا استفاده گردید. نتایج نشان داد که به استثنای شیگلا دیسانتری سایر باکتری ها قادر به تشخیص و شناسایی توسط ریز آرایه های الیگونوکلئوتیدی می‌باشند. حساسیت روش ریز آرایه ها 10^3 واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU) محاسبه گردید.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که *23S rDNA*، به دلیل داشتن نواحی متغیر کافی و همچنین با استفاده از پرایمرهای یونیورسال و تکثیر نواحی حفاظت شده ژن یاد شده می توان در تشخیص باکتری های پاتوژن استفاده نمود. بنابراین تکنیک ریزآرایه های الیگونوکلئوتیدی یک روش سریع و قدرتمند در تشخیص این پاتوژن ها می باشد.

واژگان کلیدی: ریز آرایه های الیگونوکلئوتیدی، پاتوژن های منتقله از طریق غذا، *23S rDNA*

دریافت مقاله: بهار ۸۸ پذیرش برای چاپ: بهار ۸۸

مقدمه

امروزه بیماری‌های منتقله از طریق غذا به دلایل متعددی در دنیا رو به گسترش هستند و همه ساله موجب ابتلا و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می‌شوند. حتی در کشورهای صنعتی و توسعه یافته هر ساله بیش از ۳۰٪ مردم به این بیماری ها مبتلا می‌گردند. عوامل گوناگونی مانند باکتری ها، ویروس ها، انگل ها، قارچ ها و برخی از سموم شیمیایی از عوامل ایجاد کننده بیماری های منتقله از طریق غذا هستند، که در بین آنها باکتری ها یکی از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین عوامل بروز این بیماری ها می‌باشند (۱، ۲، ۳ و ۴). تشخیص رایج پاتوژن‌های باکتریایی در آزمایشگاه‌های تشخیصی بر اساس کشت، مشاهده مستقیم میکروسکوپی نمونه، آزمون‌های بیوشیمیای و ایمونولوژیکی می‌باشد. تمامی این روش‌ها در

*) آدرس برای مکاتبه: بخش بیولوژی مولکولی، انستیو پاستور ایران. تلفن: ۰۹۱۲۱۱۲۵۹۹۱
پست الکترونیک: shahrokhi@pasteur.ac.ir

تشخیص باکتری‌های پاتوژن مولد این بیماری‌ها بسیار وقت گیر و زمان بر بوده و از طرفی این روش ها قادر به تشخیص هم‌زمان چندین پاتوژن نمی باشند. در بین پروتکل‌های موجود، روش‌های تشخیص سریع و هم زمان عوامل عفونی بسیار ارزشمند می باشند (۲، ۵، ۶ و ۷). یکی از این تکنیک های جدید که پیشرفت سریع و با اهمیتی داشته، تکنیک ریز آرایه های DNA(microarray DNA) می باشد. ریز آرایه های DNA امروزه در تشخیص هم زمان تعداد زیادی از میکروارگانیسم ها استفاده می شود. اما تولید تراشه های DNA و خواندن و تفسیر نتایج آن نیاز به دستگاه های پیچیده و گران قیمتی دارد که تهیه آن از عهده بسیاری از آزمایشگاه‌ها خارج است (۳، ۴، ۸ و ۹).

Hong و همکارانش در سال ۲۰۰۴ روشی را پیشنهاد کردند که نیاز به استفاده از دستگاه های پیشرفته نداشت و از حساسیت و ویژگی بالایی نیز برخوردار بود. در این روش به جای چسباندن هزاران پروب نوکلئوتیدی بر روی اسلایدهای شیشه ای یا ریز تراشه ها، تعداد محدودتری (ده ها تا صدها) پروب بر روی غشاهای نایلونی یا نیتروسلولزی سوار گردید و به جای اسکنرهای لیزری برای خواندن فلورسانس در ریز تراشه ها، از واکنش های رنگ زای قابل شناسایی با چشم غیر مسلح و یا اسکنرهای معمولی استفاده گردید (۱۰). این سیستم به محقق امکان مطالعه میزان بیان ژن و تعیین تفاوت های گسترده در ژنوم یا تغییرات توالی با مقدار کمی از نمونه را می دهد. در این شرایط بررسی و شناخت بیشتر پاتوژن ها، تشخیص سویه های جدید و ارزیابی مقاومت های آنها وجود خواهد داشت (۱۱ و ۱۲). هدف از این پژوهش، ارزیابی کارایی و عملکرد توالی *23S rDNA* در تشخیص هم زمان باکتری های بیماریزای منتقله از طریق غذا با استفاده از تکنیک ریزآرایه های الیگونوکلئوتیدی می باشد.

مواد و روش ها

الف) نمونه های مورد آزمون: نمونه های مورد آزمایش در این پژوهش شامل انواع گوشت، سبزیجات، لبنیات، صیفی‌جات و انواع نوشیدنی های تهیه شده از مراکز عرضه آنها در سطح شهر تهران بود. این مواد غذایی در آزمایشگاه با تعداد مشخصی از باکتری‌های اشریشیا کلی، لیستریا مونوسیتوژنز، انتروکوکوس فکالیس، ویبریو کلرا، شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انتریکا، پروتئوس ولگاریس و باسیلوس سرئوس، به عنوان مهم ترین عوامل باکتریایی منتقله از طریق غذا به صورت مصنوعی آلوده شد. سویه های استاندارد از کلکسیون کشت میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

ب) استخراج *DNA*: ابتدا رقت های مختلف (10^{1}-10^{6}cfu/ml) از باکتری های مورد مطالعه تهیه و به مقدار معینی از مواد غذایی مورد نظر اضافه گردید. همچنین به منظور ارزیابی توانایی تشخیص همزمان چندین پاتوژن در ماده غذایی، رقت‌های مختلفی از باکتری های مورد نظر با یکدیگر ترکیب و به مواد غذایی اضافه شد. سپس استخراج DNA از مواد غذایی یاد شده انجام گردید.

استخراج *DNA* از مواد غذایی جامد: مقدار ۱-۰/۵ گرم از هر یک از نمونه های مواد غذایی جامد را هموژنیزه کرده و ۱ میلی لیتر PBS استریل به آن اضافه و در ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی را به لوله اپندرف جدید منتقل و از آن به عنوان نمونه جهت استخراج DNA با استفاده از کیت PCR template purification ساخت شرکت Roche آلمان استفاده گردید.

استخراج *DNA* از مواد غذایی مایع: مقدار ۱۰- ۵ میلی لیتر از هر یک از نمونه های مواد غذایی مایع را به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ و پس از خارج سازی مایع رویی و حل کردن رسوب حاصل در ۱ میلی لیتر PBS استریل، از آن به عنوان نمونه جهت استخراج DNA استفاده شد. به منظور استخراج DNA، مواد غذایی مایع به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد با خارج‌سازی مایع رویی، به رسوب حاصله مقدار ۲۰۰µl از بافر لیز کننده حاوی ۱۰µl لیزوزیم با غلظت ۵ mg/ml اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۰۰µl از بافر متصل کننده (Binding buffer) به همراه ۱۰µl پروتئیناز K با غلظت ۲۰mg/ml افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد ابتدا ۱۰۰µl ایزوپروپانول اضافه نموده و پس از به هم زدن ۴۰µl از محلول Sorbant به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. پس از سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm به رسوب حاصل، بافر حذف کننده بازدارنده (Inhibitor Removal Buffer) اضافه شد و پس از به هم زدن و سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm، به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو اضافه و ورتکس گردید و به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm، سانتریفوژ و با خارج سازی محلول رویی به رسوب ۵۰µl بافر Elution اضافه شد. در نهایت پس از ۲ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰rpm، مایع

جدول ۱ : الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این مطالعه.

شماره	پروب های انتخاب شده	ترادف الیگونوکلئوتیدی (۳'→۵')
۱	کنترل منفی	CAGCGAGTGTGATATGAGTGATGAGG
۲	یونیورسال	ACGGTCCTAAGGTAGCGAAA
۳	باسیلوس سرئوس۱	GTGCTGGAAGGTTAAGGAGAGGG
۴	باسیلوس سرئوس ۲	CCGAAAATGTACCGGGGCTAAATACACC
۵	ویبرو کلرا	GTACGCTCTTGATGGTGAAGTCCC
۶	کنترل مثبت	CAGAGTGTGCGATATTGATGAAAGTG
۷	پروتئوس ولگاریس ۱	GTAGGCAGAGTGATTAGGCAAA
۸	پروتئوس ولگاریس ۲	GGAAACGGGTTAATATTCCCGTACTGGTG
۹	پروتئوس ولگاریس ۳	AGGCAGAGTGATTAGGCAAATCC
۱۰	پروتئوس ولگاریس ۴	TAAGCATGTAGGCAGAGTGATTAGGC
۱۱	سالمونلا	GAAGTGATTTACTCATGGAGCTGAAGTC
۱۲	سالمونلا انتریکا	AAATCCGGTTCACTTTAACACTGAGGCGTG
۱۳	سالمونلا انتریکا سروار آبورتوس اکوئی	TGTGTGTTCCAGGTAAATCCGGTTC
۱۴	اشریشیا کلی ۱	CTGATATGTAGGTGAGGTCCCT
۱۵	اشریشیا کلی ۲	CACGCTGATATGTAGGTGAAGTCCC
۱۶	اشریشیا کلی ۳	CTGATATGTAGGTGAAGCGACTTGCTCG
۱۷	اشریشیا کلی ۴	GCACGCTGATATGTAGGTGAAGCGACT
۱۸	استافیلوکوکوس	ACATTGTGTCTTCGAGTCGTTGATTT
۱۹	استافیلوکوکوس اورئوس ۱	TTAACGCCCAGAAGAGCCGC
۲۰	استافیلوکوکوس اورئوس ۲	AGTAGGATAGGCGAAGCGTGCGATT
۲۱	شیگلا	AAGCGACTTGCTCGTGGA
۲۲	شیگلا دیسانتری ۱	TGCGGCAGCGACACTATGT
۲۳	شیگلا دیسانتری ۲	TGAAGGTGGCCTGTGAGGGT
۲۴	شیگلا دیسانتری ۳	GGTTAGCGCAAGCGAAGCT
۲۵	انتروباکتریاسه	GATGTAACGGGGCTAAACCA
۲۶	انتروکوکوس فکالیس	AGGTTAAGAGGATGGGTTAGCTTCG
۲۷	لیستریا مونوسیتوژنز	CGTCCAAGCAGTGAGTGTGAGAAGT
۲۸	کنترل شاهد	-

رویی حاوی DNA به اپندورف جدید منتقل گردید.

ج) تکثیر ناحیه ژنی مشترک *23S rRNA*: ابتدا واکنش PCR به منظور بهینه سازی (Optimization) با کمک یک جفت پرایمر یونیورسال بر اساس نواحی محافظت شده ژن *23S rRNA* و با استفاده از DNA استخراج شده از سویه های استاندارد صورت گرفت. پرایمرهای یونیورسال بر اساس نواحی محافظت شده در داخل ناحیه ژنی *23S rDNA* (نوکلئوتید ۱۹۵۷-۱۰۵۱) انتخاب گردیدند. پرایمر جلو (F): 5'-DIG-ACCAGGATTTTGGCTTAGAAG-3' P1 متناسب با نوکلئوتید (۱۰۷۱-۱۰۵۱) و پرایمر عقب (R): P2 5'-CACTTACCCCGACAAGGAAT-3' متناسب با نوکلئوتید(۱۹۵۷-۱۹۳۸) ژن *23S rDNA* بودند (۱۰). انتهای 5' پرایمر F با رنگ Digoxigenin نشان‌دار گردید. سیکل حرارتی برای انجام آزمایش PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۴°C و در ادامه ۳۵ سیکل شامل ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه (واسرشت شدن)، ۶۰°C به مدت ۴۵ ثانیه (اتصال پرایمرها)، ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه (گسترش) و در نهایت یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه انجام گردید. برای بررسی نتایج، از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید استفاده گردید.

د) انتخاب پروب های اختصاصی باکتری‌های مورد پژوهش: با مقایسه نواحی ثابت و متغییر ژن *23S rDNA* از ۹ گونه باکتری پاتوژن منتقله از طریق غذا و با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژنی، طراحی پروب‌های الیگونوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار Vector NTI(ver.11) صورت گرفت. پروب های الیگونوکلئوتیدی برای

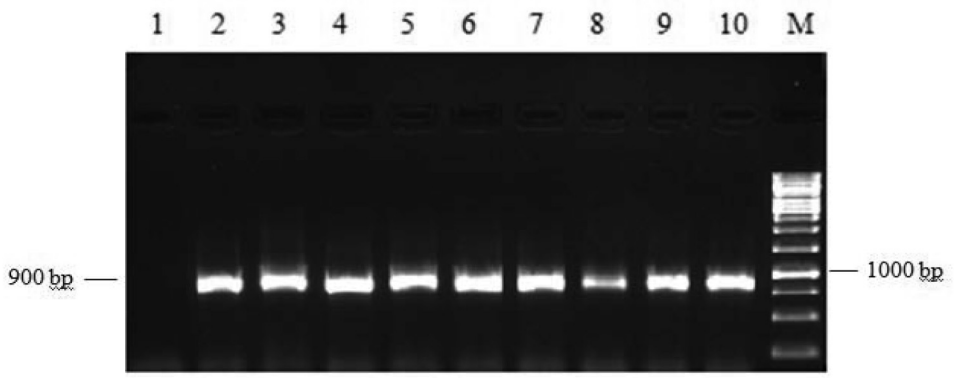
۱	۲	۳	۴	۵	۶
۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴
۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲	۱

شکل ۱: ترتیب چیدمان پروب های مورد استفاده بر مبنای جدول ۱

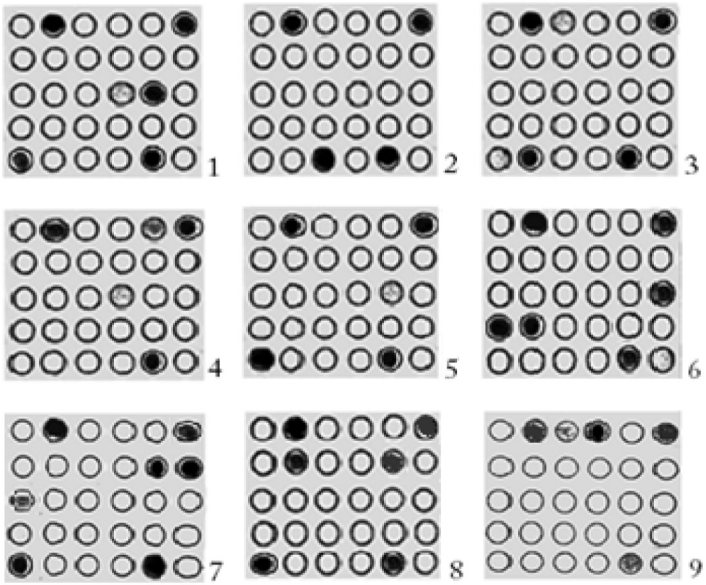
هر سویه از باکتری‌ها (مجموعاً ۲۸ پروب) به منظور اتصال به غشای نیتروسلولزی سنتز گردیدند (جدول۱). چیدمان این پروب ها و ترتیب اتصال آنها به غشای نیتروسلولزی در شکل۱ نشان داده شده است.

ه) تهیه ریزآرایه های اولیگونوکلئوتیدی: غشای نایلونی با شارژ مثبت به عنوان بستر اتصال پروب ها استفاده گردید. این غشاها را به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر قرار داده و سپس به وسیله کاغذ واتمن خشک گردید. از پروب های مورد استفاده، غلظت ۵۰ pmol/µl تهیه و آن ها را ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت و سپس ۱ میکرولیتر از آن بر روی غشا لکه گذاری گردید. غشای نایلونی در حرارت اتاق خشک شد و با استفاده از دستگاه UV Crosslinker (Hoefer, Germany) دوبار هربار به مدت ۳۰ ثانیه با انرژی معادل ۱۲۰۰۰۰ ژول در دقیقه، پروب‌ها متصل گردید. پروب های متصل نشده با دوبار شستشو در محلول SSC ۰/۵X حاوی ۰/۱SDS٪ هر بار به مدت ۲ دقیقه در ۳۷ درجه شسته شد. سپس غشا ها در حرارت اتاق خشک و آماده مصرف گردید.

و) هیبریدیزاسیون و تشخیص: برای این کار از کیت Detection DIG Nucleic Acid ساخت شرکت Roche آلمان و طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. ابتدا غشاهای نیتروسلولزی حاوی پروب های مورد نظر تهیه شده در مرحله قبل وارد پتری دیش حاوی محلول هیبریداسیون شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بدست آمده از هر یک از باکتری های مورد مطالعه را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه حرارت داده و بلافاصله در ظرف یخ قرار گرفت. سپس محصولات PCR را به محلول گرم هیبریدیزاسیون منتقل و غشاهای نیتروسلولزی به آن اضافه گردید و ۴ ساعت در ۵۰ درجه در دستگاه هیبریدیزاسیون (Techne, England) انکوبه شد. در مرحله بعد، غشاها ۴ بار بوسیله محلول شستشو (۰/۲۵X- SSC-٪۱۰SDS) هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شد. سپس ۳۰ دقیقه غشاها در بافر متوقف کننده (solution blocking) قرارداده شد و بعد به آن آنتی بادی sheep anti DIG alkaline phosphatase conjugated اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس محلول رنگ زای BCIP-NBT را به ظرف حاوی غشاهای نیتروسلولزی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در محیطی تاریک قرار گرفت. واکنش یاد شده با اضافه کردن آب متوقف و نتایج حاصل از هیبریدیزاسیون مشاهده گردید.



شکل ۲: PCR به منظور تکثیر ژن *23S rDNA* با استفاده از پرایمرهای P1 و P2: ردیف ۱کنترل منفی (فاقد DNA) و ریف های ۲ الی ۱۰ به ترتیب نتایج PCR باکتری های اشریشیا کلی، لیستریا مونوسیتوژنز، انتروکوکوس فکالیس، ویبریو کلرا، شیگلا دیسانتری، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انتریکا، پروتئوس ولگاریس و باسیلوس سرئوس می باشد. ردیفM: سایز مارکر 1kb (فرمنتاز)



شکل ۳: نتایج حاصل از هیبریدیزاسیون ریزآرایه های الیگونوکلئوتیدی. شماره های ۱ الی ۹ به ترتیب نتایج هیبریدیزاسیون بدست آمده از باکتری های ۱- اشریشیاکلی، ۲- لیستریا مونوسیتوژنز، ۳- انتروکوکو فکالیس، ۴- ویبریو کلرا، ۵- شیگلا دیسانتری، ۶- استافیلوکوکوس اورئوس، ۷- سالمونلا انتریکا، ۸- پروتئوس ولگاریس و ۹- باسیلوس سرئوس می‌باشد.

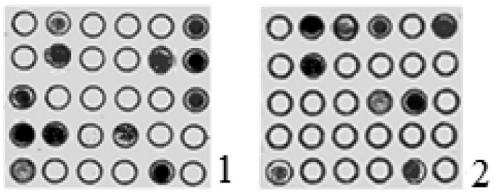
نتایج

الف) *PCR* ژن *23S rRNA*: واکنش PCR بر روی باکتری‌های مورد بررسی با استفاده از یک جفت پرایمر یونیورسال طراحی شده بر اساس نواحی محافظت شده ژن *23S rDNA* انجام شد. نتایج حاصله بیانگر وجود قطعه ژنی حدود ۹۰۰ جفت باز در تمامی باکتری های مورد مطالعه بود (شکل ۲).

ب) نتایج هیبریدیزاسیون ریز آرایه‌های الیگونوکلئوتیدی: محصول PCR حاصل از ۹ گونه باکتری مورد پژوهش به پروب‌های الیگونوکلئوتیدی اختصاصی متصل به غشای نیتروسلولزی اضافه شد. به منظور تمایز سویه های نزدیک به هم از لحاظ ژنتیکی، برای تعدادی از سویه ها از ۲ تا ۴ پروب استفاده گردید (در مجموع ۲۸ پروب) که الگوی حاصل از این پروب ها، در تفکیک سویه‌های دارای واکنش متقاطع متفاوت بود. نتایج بدست آمده نشان داد که به استثنای شیگلا دیسانتری به دلیل شباهت بسیار زیاد این باکتری با همولوژی بیش از ۹۸٪ در ژن *23S rDNA* با اشریشیا کلی، در دیگر باکتری های مورد استفاده هر پروب الیگونوکلئوتیدی تنها با یک جنس از باکتری ها و یا تمام گونه های همان جنس هیبرید می‌گردید (شکل ۳).

برای تعیین توانایی این روش در تشخیص همزمان چندین باکتری، ترکیب هایی ۲تایی و ۳تایی از باکتری های مختلف تهیه و مورد آزمایش قرار گرفت. به عنوان نمونه نتایج تشخیص همزمان ترکیب استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انتریکا و باسیلوس سروئوس (شکل ۴ شماره ۱) و ترکیب اشریشیا کلی، انتروکوک فکالیس و لیستریا مونوسیتوژنز (شکل ۴ شماره ۲) نشان داده شده است که واکنش هر باکتری با پروب اختصاصی آن در هر یک از نمونه ها مشاهده گردید.

ج) حساسیت تکنیک ریزآرایه های الیگونوکلئوتیدی: برای تعیین میزان حساسیت تکنیک ابتدا رقت‌های مختلف ($۱۰^{۱}$-$۱۰^{۶}$cfu/ml) از باکتری‌های مورد مطالعه تهیه گردید. سپس از این رقت‌های بدست آمده استخراج DNA صورت پذیرفت و سرانجام PCR از



شکل ۴: نتایج تشخیص همزمان حاصل از هیبریدیزاسیون. نمونه شماره ۱ شامل (استافیلوکوک اورئوس، سالمونلا انتریکا، باسیلوس سروئوس) و نمونه شماره ۲ شامل (اشریشیاکلی، انتروکوک فیکالیس، لیستریا مونوسیتوژنز) می باشد.

هریک از این رقت ها انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که برای داشتن یک واکنش مثبت هیبریدیزاسیون، حداقل تعداد باکتری در نمونه مورد مطالعه باید 10^3 cfu/ml (میزان حساسیت تست) باشد.

بحث

در طی دهه های گذشته رایج ترین روش‌های تشخیصی پاتوژن‌ها، بر پایه روش‌های سنتی همچون کشت بوده که این روش‌ها بر اساس رشد پاتوژن مورد نظر در محیط‌های کشت و سپس شناسایی سویه‌های میکروبی با استفاده از آزمون‌های ایمونولوژیکی و سرولوژیکی می‌باشد. با اینکه کشت میکروارگانیسم‌ها یک استاندارد طلایی در روش های تشخیصی محسوب می گردد اما به طور معمول نیازمند حداقل ۲۴ الی ۴۸ ساعت انکوباسیون نمونه می باشد. از این رو این تکنیک‌ها یک روش مناسب در تشخیص سریع پاتوژن ها نبوده و همواره روش‌های تشخیصی سریع تری مورد نیاز می‌باشند (۲، ۵، ۶ و ۷). برای شناسایی پاتوژن‌های باکتریایی ژن‌های هدف متعددی می‌توانند انتخاب گردند که عبارتند از:

۱ـ ژن‌های کدکننده اختصاصی یک توکسین یا عوامل بیماری زا.

۲ـ توالی‌های خاصی که با تغییر در دمای هیبریدیزاسیون، بتوان تفاوت‌های جزئی در میان سویه های نزدیک به هم را از نظر خویشاوندی آشکار ساخت.

۳ـ نواحی غیر کد کننده DNA مانند عناصر درج شونده (Insertion elements).

۴ـ توالی های نوکلئوتیدی محافظت شده ای که به عنوان مارکرهای فیلوژنیکی مطرح می باشند (۸).

در بین موارد یاد شده، نواحی اسید نوکلئیکی محافظت شده بیشترین کاربرد را دارند. این نواحی شامل ژن های *16S rDNA*، *23S rDNA* و فواصل بینابینی ژن های *16S-23S rDNA* یا (ITS) می باشد (۷، ۱۷، ۱۸ و ۲۰). وجود مناطق محافظت شده به همراه نواحی متغیر از ویژگی‌های این ژن ها می باشد. از دیگر فواید مهم استفاده از این ژن ها می‌توان به وجود اطلاعات عظیم آنها در بانک ژنی و دسترسی آسان به این منابع اشاره نمود (۸، ۱۳، ۱۴ و ۱۹). Fox و همکارانش در سال ۱۹۸۰ با مطالعاتی که بر روی ژن‌های *rRNA* انجام دادند به اهمیت این ژن ها در طبقه بندی باکتری‌ها و شناسایی روابط خویشاوندی و تکاملی در میان سویه‌ها پرداختند. در میکروارگانیسم‌ها *rRNA* به عنوان یک مارکر ژنتیکی ویژه کاربرد زیادی دارد (۸ و ۲۱). Anthony و همکارانش در سال ۲۰۰۲ با استفاده از تکثیر نواحی متغییر ژن *23S rRNA* و طراحی پرایمرهای یونیورسال الیگونوکلئوتیدی به تشخیص سریع باکتریمی پرداختند. آنها در این بررسی نشان دادند که این تکنیک یک روش سریع و دقیق در شناسایی طیف وسیعی از باکتری ها بوده و قادر به تشخیص همزمان چندین پاتوژن باکتریایی از یک محیط می‌باشد (۱۱). Hong و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با استفاده از تکنیک ریزآرایه های الیگونوکلئوتیدی به تشخیص سریع و دقیق عفونت های باکتریایی ناشی از غذا پرداختند. محققین یاد شده با ارزیابی ۱۴ پاتوژن مختلف، نشان دادند که برتری این تکنیک نسبت به روش‌های تشخیصی دیگر، تشخیص دقیق همزمان چندین پاتوژن است. این تکنیک می تواند تاثیرات شگرفی در درمان و کنترل عفونت های ناشی از غذا داشته باشد (۱۰). همچنین Lee و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با طراحی پروب های اختصاصی با استفاده از ژن‌های *23S rRNA* و فواصل بینابینی ژن‌های *16S-23S rRNA* و نهایتاً به کمک تکنیک ریز آرایه های DNA توانستند ۴۴ باکتری پاتوژن مهم کلینیکی را تشخیص دهند(۱۸). نتایج این پژوهش نشان داد که به علت شباهت بسیار زیاد توالی *23S rDNA* در میان برخی از سویه های باکتریایی نزدیک به هم از لحاظ ژنتیکی، ممکن است استفاده از یک پروب برای تمایز هر باکتری کافی نباشد. لذا در مواردی می‌توان به منظور تفکیک تعدادی از سویه‌ها از یکدیگر، از چندین پروب استفاده گردید. همچنین در میان سویه‌های مورد مطالعه، اشریشیا کلی و شیگلا دیسانتری از جمله مواردی بودند که به دلیل هومولوژی بسیار زیاد در نواحی متغیر در توالی *23S rRNA* با یکدیگر قابل تفکیک از یکدیگر نبودند. Anthony و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۲ در انگلستان با استفاده از تکثیر نواحی متغییر ژن *23S rDNA* و طراحی پرایمرهای یونیورسال الیگونوکلئوتیدی بر روی نمونه‌های خونی توانستند تعداد زیادی از باکتری‌های موجود در خون را تشخیص دهند. نتایج آنها در این بررسی نشان داد که پروب‌های طراحی شده در این تکنیک قادر به تفکیک تعدادی از گونه‌های خانواده انتروباکتریاسه به دلیل شباهت بسیار زیاد در توالی *23S rDNA* در این خانواده نمی‌باشد (۱۱). Wang و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ با بررسی‌هایی که بر روی ۱۳ پاتوژن مهم منتقله از طریق غذا با استفاده از تکنیک ریز آرایه‌های الیگونوکلئوتیدی انجام دادند نتایج مشابه ما را به دست آورده‌اند. این گروه نیز با وجود انتخاب پروب هاب متعدد از نواحی متغییر ژن

16S rDNA، قادر به تفکیک باکتری‌های شیگلا و اشریشیا کلی از هم به دلیل به دلیل مشابهت بسیار زیاد در توالی متغییر ژن های *16S rDNA* و *23S rDNA* نبودند (۲).به همین دلیل به منظور تفکیک این دو سویه از یکدیگر، بایستی نواحی ژنی دیگری مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه گیری

اطلاعات بدست آمده در این تحقیق نشان داد که از ناحیه *23S rDNA* به دلیل داشتن نواحی متغییر کافی و همچنین با استفاده از پرایمرهای یونیورسال و تکثیر نواحی حفاظت شده ژن *23S rDNA* می‌توان در تشخیص باکتری‌های پاتوژن استفاده نمود. بنابراین تکنیک ریزآرایه های الیگونوکلئوتیدی یک روش سریع و قدرتمند در تشخیص هم‌زمان پاتوژن‌ها می‌باشد. باید توجه داشت که بدست آوردن نتایج دقیق و قابل اعتماد، به عواملی مانند انتخاب صحیح ناحیه ژنی مورد استفاده، طراحی پروب‌های مناسب، روش استخراج DNA، و در نهایت بهینه سازی شرایط تکثیر DNA و هیبریدیزاسیون ریزآرایه ها بستگی دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین و اعضای هیئت علمی بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور ایران به خاطر تامین کلیه امکانات این تحقیق، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر محمد کارگر نیز به دلیل راهنمایی‌هایشان در انجام این تحقیق تشکر می‌گردد.

References

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food Related Illness and Death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 1999; 5(5).
2. Wang XW, Zhang L, Jin LQ, Jin M, Shen ZQ, Chao FH, Li JW. Development and application of an oligonucleotide microarray for the detection of foodborne bacterial pathogens. Appl Microbiol Biotechnol, 2007; 76(1):225-33.
3. Lauri A and Mariani PO.Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. Genes Nutr, 2009; 4:1-12
4. Masafumi Ikeda, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. Development of Phylogenetic Oligonucleotide Probes for Screening Foodborne Bacteria. journal of Health Science, 2005; 51(4) 469-476.
5. Duffy G, Kilbride B, Fitzmaurice J, Sheridan. Routine Diagnostic Tests for Food-Brone Pathogens. Agriculture and Food Development Authority. The National Food Centre Teagasc, Dunsinea, Castleknock, ISBN 1 84170 1890 January 2001.
6. Mao Z, Zheng H, Wang X , Lin Sh, BoJiang YS. DNA Microarray for Direct Identification of Bacterial Pathogens in Human Stool Samples. Digestion, 2008; 78:131-138.
7. Jin LQ, Li JW, Wang Sh Q, Chao FH, Wang XW, Yuan ZQ. Detection and identification of intestinal pathogenic bacteria by hybridization to oligonucleotide microarrays. World J Gastroenterol, 2005; 11(48):7615-7619.
8. Yoo SM, Keum KC, Yoo SY, Choi JY, Chang KH, Yoo NC, Yoo WM. Development of DNA Microarray for Pathogen Detection. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2004; 9: 93-99.
9. Pariset L, Chillemi G, Bongiorni S, SpicaVR, Valentini A. Microarrays and high throughput transcriptomic analysis in species with incomplete availability of genomic sequences. New Biotechnology. Rev. 2009; 25(5).
10. Hong BX, Jiang LF, Hu YS, Fang DY, Hui-Yu G. Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections. J Microbiol Methods, 2004; 58(3):403-11.
11. Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. J Clin

Microbiol, 2008; 38:781-8.
12. Mitterer G, Huber M, Leidinger E, Kirisits C, LubitzW, Mueller MW, Schmidt WF. Microarray based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences. J Clin Microbiol, 2004; 42:1048-57.
13. Wang RF, Beggs ML, Robertson LH, Cerniglia CE. Development of a membrane array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. Molecular and Cellular Probes, 2002; 16:341-50.
14. Wang RF, Beggs ML, Robertson LH, Cerniglia CE. Design and evaluation of oligonucleotide microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. FEMS Microbiol Lett, 2002; 213(2):175-82.
15. Uttamchandani M, Neo JL, Zhung Ong BN, Moochhala Sh. Applications of microarrays in pathogen detection and biodefence. Trends in Biotechnology, 2008; 27(1).
16. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18:583-607.
17. Giammarinaro Ph, Leroy S, Chacornac JP, Delmas J, and Talon R. Development of a New Oligonucleotide Array to Identify Staphylococcal Strains at Species Level. Journal of Clinical Microbiology, 2005; 35: 3673-80.
18. Lee DY, Shannon K, Beaudette LA. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real time quantitative PCR. J Microbiol Methods, 2006; 65(3):453-67.
19. Amann R. and Ludwig W. Ribosomal RNA targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Rev. 2000; 24: 555-65.
20. Jin DZ, Wen SY, Chen SH, Lin F, Wang SQ. Detection and identification of intestinal pathogens in clinical specimens using DNA microarrays. Mol Cell Probes, 2006; 20:337-47.
21. Fox G E, Wisotzkey J D, Jurtshuk P. How close is close: 16S rRNA sequence identify may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992; 42: 166-170.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 2, 2009

Evaluation of oligonucleotide microarray technology for the detection of foodborne bacterial pathogens

Meysam Sarshar[1], Abbas Doosti[2], Anis Jafari[3], Nader Shahrokhi[3]

[1]Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahro, Iran.
[2]Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
[3]Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Traditional methods for detection of foodborne pathogenic bacteria, which cause disease in human, are time consuming and laborious, so there is a necessity for developing a reliable and powerful method for the rapid detection of microbial pathogens in food. The aim of this study, is designing primers to amplify the DNA encoding the *23S rDNA* genes from a wide range of bacterial species and tested the ability and efficiency of *23S rDNA* sequence to detection of foodborne pathogenic bacteria.

Materials and methods: The *23S rDNA* sequences of 9 foodborne pathogenic bacterial species based on the GenBank DNA sequence database were used to design oligonucleotide probes by Vector NTI software. Oligonucleotide probes for each bacterial species (total 28 probes) were designed and applied to nitrocellulose membranes. Digoxigeni (DIG) labeled *23S rDNAs* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from bacteria using two universal primers, and were hybridized to the membrane array.

Results: Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Enterococcus faecalis, Vibrio cholerae, Shigella dysantria, Staphylococcus aurues, Salmonella enterica, Proteus vulgaris, and *Bacillus cereus* were used as the most common foodborne pathogens and results showed that except *Shigella dysantria,* the others can be detected and identified by our microarrays. The sensitivity of the microarray assay was 103 CFU of bacteria.

Conclusion: This study showed that *23S rDNA* has sufficient sequence diversity for species identification and is useful for monitoring the populations of pathogenic bacteria. Thus, the oligonucleotide microarray is a powerful tool for the rapid detection and identification of pathogens.

Keywords: Oligonucleotide microarray, foodborne pathogens, 2*3S rDNA.*

Correspondence to: Nader Shahrokhi
Tel: (+98) 912 112 5991
Email: shahrokhi@pasteur.ac.ir
Journal of Microbial World 2009, 2(2), 73-80