مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۹/هفته اول اسفند ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲۵

تشخیص باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا با استفاده از آنالیز ژن 23S rDNA

میثم سرشار[۱]، دکتر رضا رنجبر[۲]، دکتر نادر شاهرخی[۳]، دکتر نورخدا صادقی‌فرد[۴]، احمد حسنی[۵]، زهره نصرابادی[۶]، فاطمه پورعلی[۷]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ژن‌های DNA ریبوزومی با داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد همچون حضور در تمامی سلول‌های میکروارگانیسم‌ها، وجود مقادیر بالایی از این ژن‌ها در سلول و همچنین وجود نواحی محافظت‌شده یک کاندیدای مناسب جهت شناسایی طیف بالایی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی توالی محافظت شده و اختصاصی ژن 23S rDNA به عنوان یک هدف DNA در افتراق و غربالگری باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا بود.

روش‌ها: سویه‌های باکتریایی اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا از کلکسیون کشت میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. استخراج DNA از سویه‌های مورد نظر با استفاده از روش جوشاندن صورت گرفت. پس از بررسی منابع و اطلاعات موجود در بانک ژنی، ترادفی از نواحی محافظت‌شده‌ی ژن 23S rDNA و نواحی اختصاصی درون ژنی آن با توجه به هم‌ردیفی توالی‌ها، در نرم‌افزار AlignX از مجموعه‌ی نرم‌افزار Vector NTI انتخاب شد و PCR (Polymerase chain reaction) انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از هم‌ردیفی قطعه‌ی اختصاصی ژن 23S rDNA در هر یک از باکتری‌های مورد بررسی بیانگر وجود قطعه‌ی ژنی به اندازه‌ی حدود ۸۸۰ جفت باز در تمامی باکتری‌های مورد مطالعه بود. پروب‌های اختصاصی طراحی‌شده در هر یک از باکتری‌های اشریشیا کلی، سالمونلا انتریکا و شیگلا دیسانتری وجود باندهای ۲۲۶، ۴۴۴ و ۷۷۶ جفت بازی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که توالی 23S rDNA انتخاب شده در این پژوهش با توجه به محصولات به دست آمده‌ی حاصل از تکثیر آن، ناحیه‌ای مناسب و کارامد جهت افتراق و غربالگری سویه‌های باکتریایی اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا می‌باشد.

واژگان کلیدی: ژن 23S rDNA، باکتری‌های پاتوژن، Vector NTI

ارجاع: سرشار میثم، رنجبر رضا، شاهرخی نادر، صادقی‌فرد نورخدا، حسنی احمد، نصرابادی زهره، پورعلی فاطمه. **تشخیص باکتری‌های اشریشیاکلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا با استفاده از آنالیز ژن 23S rDNA.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۹): ۲۳۴۳-۲۳۳۳

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران
۳- استادیار، بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشیار، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۶- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
۷- کارشناس، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رضا رنجبر
Email: ranjbar@bmsu.ac.ir

مقدمه

در طی دهه‌های گذشته، رایج‌ترین روش‌های تشخیصی پاتوژن‌ها بر پایه‌ی روش‌های سنتی همچون کشت بوده است. این روش‌ها بر اساس رشد پاتوژن مورد نظر در محیط‌های کشت و سپس شناسایی سویه‌های میکروبی با استفاده از آزمون‌های ایمونولوژیکی و سرولوژیکی می‌باشد (۳-۱). در بسیاری از موارد، این نوع روش‌های تشخیصی اختصاصی نیستند و در عین حال زمان‌بر و پر زحمت نیز می‌باشند. بنابراین همواره نیاز به روش‌هایی اختصاصی‌تر، سریع‌تر و حساس‌تر از روش‌های سنتی احساس می‌گردد (۴-۳).

در سال ۱۹۸۰ با مطالعاتی که بر روی ژن‌های rRNA انجام گردید، به اهمیت این ژن‌ها در تشخیص عوامل میکروبی، شناسایی روابط خویشاوندی و تکاملی در میان سویه‌ها پی برده شد. rRNAها به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد، یک مارکر مناسب جهت تشخیص باکتری‌ها می‌باشند. این ژن‌ها در تمام سلول‌های زنده یافت می‌شوند؛ به طوری که در یک سلول باکتری در حال رشد، بیش از 10^4 تا 10^5 کپی از ژن‌های 5S rRNA، 16S rRNA، 23S rRNA را می‌توان یافت (۶-۵). مقادیر فراوانی از ژن‌های rRNA در اکثر سلول‌ها، عدم حذف این ژن‌ها طی فرایند انتقال افقی ژن، دارا بودن یک اندازه‌ی مناسب حدود ۱۵۰۰ تا ۳۰۰۰ نوکلئوتید برای 16S و 23S و همچنین وجود مناطق حفاظت‌شده به همراه نواحی متغیر از مزیت‌های این ژن‌ها می‌باشد. از این رو استفاده از ژن‌های rRNA یک هدف مناسب جهت شناسایی میکروارگانیسم‌های مهم پزشکی می‌باشد. از طرفی وجود اطلاعات عظیم این ژن‌ها در بانک ژنی و دسترسی آسان به این منابع از دیگر ویژگی‌های این ژن‌ها می‌باشند که می‌توان به آن‌ها اشاره کرد (۹-۵). Wilson و همکاران اولین بار با استفاده از ژن‌های rRNA به عنوان پروب‌های الیگونوکلئوتیدی، به مقایسه‌ی توالی 16S rRNA و 23S rRNA در سویه‌های سالمونلا و مقایسه‌ی آن با سایر باکتری‌ها پرداختند (۱۰). انتخاب مناسب و دقیق ژن‌های هدف در روش‌های تشخیصی مولکولی، بسیار حایز اهمیت است. اولین قدم در این کار، بررسی اطلاعات عظیم توالی میکروارگانیسم‌ها در بانک ژنی می‌باشد که یک منبع قدرتمند در طراحی پرایمرها و پروب‌های مورد استفاده در یک تکنیک مولکولی است (۱۳-۱۰). جهت انتخاب ژن‌های هدف در طراحی پرایمرها و پروب‌ها می‌بایست از یک توالی مناسبی استفاده گردد که بتوان با مقایسه‌ی این توالی در میان سویه‌های مختلف، ژن‌های هدف را به درستی انتخاب نمود. بنابراین در روش‌های مولکولی بر پایه‌ی اسید نوکلئیک، انتخاب ژن‌هایی که در بین تمامی سویه‌ها حاوی مناطق محافظت‌شده‌ای باشند که بتوان با استفاده از این ژن‌ها، طیف زیادی از میکروارگانیسم‌ها را تشخیص داد، بسیار حایز اهمیت است (۱۴-۱۲). جهت طراحی پروب‌های اختصاصی برای یک میکروارگانیسم، ژن‌های موجود در هر پاتوژن، باید بر اساس یک خصیصه یا نشان ویژه‌ای از آن میکروارگانیسم تعیین گردد (۱۷-۱۴). توالی‌های کدکننده‌ی اختصاصی یک توکسین یا عوامل ویرولانس، نواحی غیر کدکننده‌ی DNA مانند عناصر درج شونده (Insertion elements) و توالی‌های اسید نوکلئوتیدی محافظت شده‌ای که به عنوان مارکرهای فیلوژنتیکی مطرح هستند، از ژن‌های

هدف مناسبی می‌باشند که می‌توانند جهت شناسایی پاتوژن‌های بیماری‌زا انتخاب گردند (۱۹-۱۷، ۱۲). مطالعات مختلف نشان می‌دهد، ژن‌های 16S rDNA، 23S rDNA، فواصل بینابینی ژن‌های (ITS) یا 16S-23S rDNA، ژن‌های کدکننده‌ی بتاگالاکتوزیداز، RNA پلیمراز، فاکتور طویل‌سازی Tu (Elongation factors Tu)، F1F0 ATPase، پروتئین RecA و پروتئین‌های شوک حرارتی از ژن‌های هدف مناسب در تشخیص و شناسایی میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (۲۱-۲۰، ۱۷، ۱۲). با وجود تمامی این ژن‌های هدف، به دلیل حضور rDNAها در تمامی سلول‌های میکروارگانیسم‌ها، حضور مقادیر بالایی از این ژن‌ها در سلول و همچنین وجود نواحی محافظت شده در بین آن‌ها، از کاندیداهای اولیه و مناسب می‌باشد (۲۳-۲۲، ۱۹-۱۸، ۱۶، ۵).

در بین بیماری‌های عفونی، عفونت‌های روده‌ای بعد از عفونت‌های تنفسی، از شایع‌ترین مشکلات پزشکی جوامع محسوب می‌گردند (۲۴). در میان عوامل باکتریایی، اشریشیا کلی (۲۶-۲۵)، شیگلا (۳۲-۲۷) و سالمونلا انتریکا (۳۷-۳۳) در زمره‌ی مهم‌ترین عوامل ایجادکننده‌ی عفونت‌های گوارشی و روده‌ای محسوب می‌گردند. هدف از این مطالعه، ارزیابی توالی ژن‌های 23S rDNA به عنوان نواحی دارای توالی اختصاصی مناسب، جهت افتراق و غربالگری پاتوژن‌های باکتریایی اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا بود.

روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، کشت و شمارش آن‌ها: در تحقیق حاضر سویه‌های باکتریایی اشریشیا کلی (PTCC 1533)، شیگلا دیسانتری (PTCC 1188) و سالمونلا انتریکا (PTCC 1709) از کلکسیون کشت میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و مورد بررسی قرار گرفت. هر یک از باکتری‌ها، طبق روش‌های استاندارد در ۵ میلی‌لیتر محیط BHI broth تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس، از هر سویه‌ی باکتری رقت‌های سریالی تهیه شد و شمارش (با استفاده از روش شمارش کلونی) به عمل آمد. همچنین، محیط‌های کشت از نظر خالص بودن کنترل شدند. سپس، ژنوم هر نمونه با استفاده از روش جوشاندن، استخراج و غلظت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد.

تکثیر نواحی عمومی و متغیر ژن 23S rDNA: ابتدا واکنش PCR (Polymerase chain reaction) به منظور بهینه‌سازی (Optimization) با کمک یک جفت پرایمر یونیورسال بر اساس نواحی محافظت شده‌ی ژن 23S rDNA و با استفاده از DNA استخراج شده از سویه‌های استاندارد صورت گرفت. پرایمر Forward: F: 5'-ACCAGGATTTTGGCTTAGAAG-3' متناسب با نوکلئوتید (۱۰۷۱-۱۰۵۱) و پرایمر reverse: R: 5'-CACTTACCCCGACAAGGAAT-3' متناسب با نوکلئوتید (۱۹۵۷-۱۹۳۸) ژن 23S rDNA انتخاب شد (۲۱). پروب‌های اختصاصی بر اساس نواحی متغیر توالی 23S rDNA، هر یک از عوامل میکروبی انتخاب گردید و از پروب‌های اختصاصی هر یک از سویه‌های مورد نظر به عنوان پرایمر Forward جهت انجام PCR در نظر گرفته شد (جدول ۱).

نحوه‌ی انتخاب پرایمر عمومی و پروب‌های اختصاصی: پس از بررسی منابع و اطلاعات موجود در

جدول ۱. پروب‌های مورد استفاده در این مطالعه

نام پروب	ترادف الیگونوکلئوتیدی	اندازه‌ی محصول (جفت باز)
سالمونلا انتریکا	5'-AAATCCGGTTCACTTTAACACTGAGGCGTG-3'	۴۴۴
اشریشیا کلی	5'-CACGCTGATATGTAGGTGAAGTCCC-3'	۲۲۸
شیگلا دیسانتری	5'-TGAAGGTGGCCTGTGAGGGT-3'	۷۷۶

بانک ژنی، ترادفی از بخش مناسب ژن 23S rDNA و نیز پرایمرهای اختصاصی درون ژنی برای باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا انتخاب شد و مورد بررسی قرار گرفت. ترادف پرایمرهای انتخابی در جدول ۱ ارائه شده است. بدین صورت که پس از بررسی ترادف ژن 23S rDNA، با توجه به هم‌ردیفی توالی‌ها در نرم‌افزار AlignX از مجموعه‌ی نرم‌افزار Vector NTI advance11، پرایمرهای عمومی از قسمت ثابت (۲۱) و پروب‌های اختصاصی، از قسمت‌های متغیر ژن 23S rDNA (طراحی‌شده در این مطالعه) انتخاب شدند (جدول ۱).

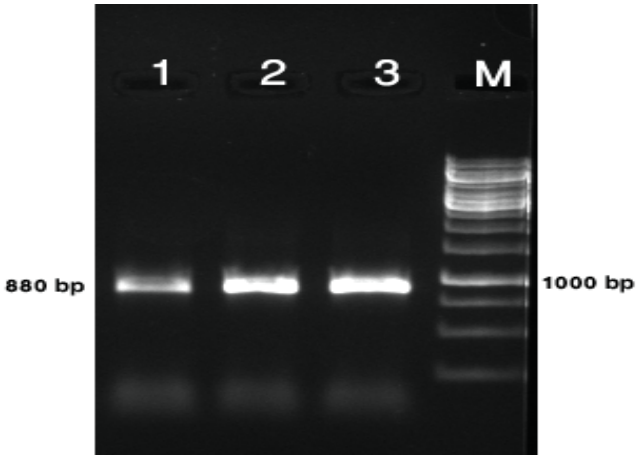
سپس برای تعیین میزان هومولوژی ناحیه‌ی انتخاب‌شده با ژنوم سایر میکروارگانیزم‌ها، با BLAST کردن در بانک ژنی NCBI و ddbj مرحله‌ی طراحی تأیید گردید. سیکل حرارتی برای انجام آزمایش PCR شامل یک مرحله‌ی واسرشت شدن اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (واسرشت شدن)، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (اتصال پرایمرها)، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه جهت گسترش و در نهایت یک مرحله‌ی گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه انجام شد. برای بررسی نتایج، از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم برماید استفاده گردید.

یافته‌ها

بهینه‌سازی شرایط دمایی و اتصال پروب و پرایمرها: پرایمر یونیورسال قادر بود در مرحله‌ی اول واکنش وجود ژنوم باکتری را در محیط نشان دهد. در تمام موارد پس از رنگ‌آمیزی و مشاهده‌ی صفحات ژل، باندهای یکنواخت با اندازه‌ی یکسان حدود ۸۸۰ جفت باز حاصل شد که نشان‌دهنده‌ی تکثیر بخش مورد نظر از ژن 23S rDNA بود. نتایج بهینه‌سازی چرخه‌ی دمایی برای باکتری‌های مورد بررسی به این ترتیب بود که دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بهترین باند برای پرایمر عمومی و در هر یک از پروب‌های اختصاصی درون ژنی 23S rDNA باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا، به ترتیب ۶۸، ۷۰ و ۷۲ درجه مشاهده گردید.

نتایج حاصل از PCR قطعه‌ی یونیورسال ژن 23S rDNA: واکنش PCR بر روی باکتری‌های مذکور با استفاده از یک جفت پرایمر یونیورسال طراحی شده بر اساس نواحی محافظت شده‌ی ژن 23S rDNA، انجام شد. نتایج حاصل بیانگر وجود قطعه‌ی ژنی به اندازه‌ی حدود ۸۸۰ جفت باز در تمامی باکتری‌های مورد مطالعه بود (شکل ۱).

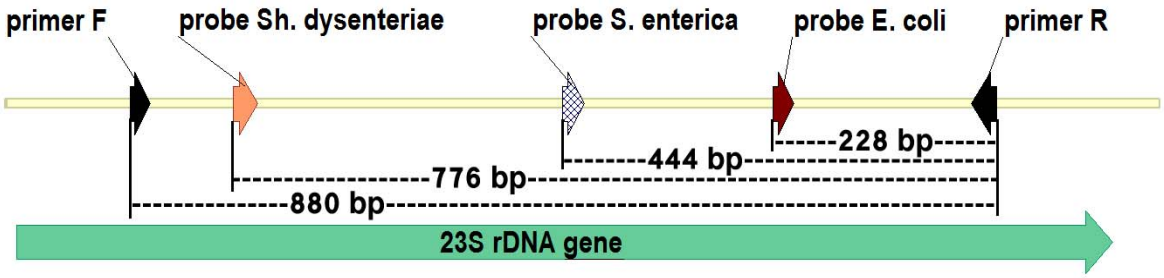
بررسی توالی و نتایج حاصل از PCR قطعه‌ی اختصاصی ژن 23S rDNA: نتایج حاصل از هم‌ردیفی



شکل ۱. PCR از نواحی عمومی ژن 23S rDNA

ردیف‌های ۱ تا ۳ به ترتیب نتایج PCR باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا می‌باشد.

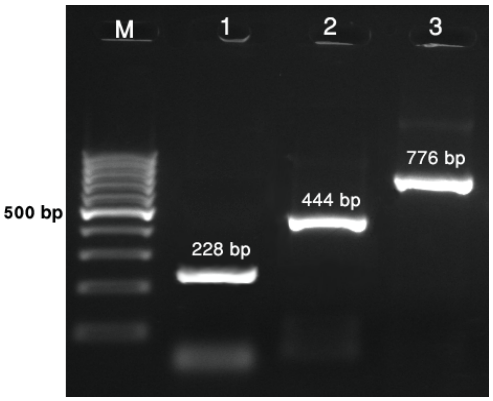
ردیف M: سایز مارکر ۱ کیلو بازی (فرمنتاز)



شکل ۲. نقشه‌ی ترسیم‌شده‌ی توالی ژن 23S rDNA با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI

قطعه‌ی اختصاصی ژن 23S rDNA هر یک از باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI و در نهایت مقایسه‌ی آن با سایر میکروارگانیزم‌ها با BLAST در بانک ژنی NCBI و ddbj نشان داد که پروب‌های انتخاب شده با توجه به اندازه‌ی باندهای متفاوت، به خوبی قادر به افتراق هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه بود. محل انتخاب پرایمر و پروب‌های اختصاصی در شکل ۲ که بر اساس داده‌های حاصل از نرم‌افزار Vector NTI ترسیم گردیده است، نشان داده شده است.

در شکل ۳، نتایج حاصل از PCR هر یک از عوامل میکروبی مورد مطالعه آورده شده است.



شکل ۳. انجام PCR از نواحی اختصاصی ژن 23S rDNA

ردیف‌های ۱ تا ۳ به ترتیب نتایج PCR اختصاصی ژن 23S rDNA باکتری‌های اشریشیا کلی، سالمونلا انتریکا و شیگلا دیسانتری می‌باشد. ردیف M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)

بحث

افزایش بیماری‌های عفونی و خطرات ناشی از آن‌ها بی‌درنگ نیازمند ایجاد روش‌های تشخیصی سریع و دقیق در شناسایی و تشخیص پاتوژن‌ها می‌باشد. اگرچه امروزه از روش‌های میکروبیولوژیک کلاسیک برای شناسایی و جداسازی بسیاری از پاتوژن‌ها استفاده می‌شود، اما تشخیص میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با استفاده از روش‌های سنتی محدودیت‌های فراوانی دارد که از جمله‌ی این محدودیت‌ها می‌توان به زمان‌بر بودن کشت میکروارگانیسم‌ها در روش‌های مبتنی بر کشت و همچنین ناکارامد بودن روش‌های سرولوژیکی و ایمونولوژیکی به دلیل پر هزینه بودن، وجود نتایج مثبت کاذب، تکرار بیش از حد و همچنین پر زحمت بودن آن‌ها اشاره کرد (۴۱-۳۸، ۲-۱). از این رو، روش‌های سنتی تشخیصی یک روش مناسب در تشخیص سریع پاتوژن‌ها نیستند و روش‌های مولکولی مبتنی بر ویژگی‌های ژنومی میکروارگانیسم‌ها، در مقایسه با روش‌های قدیمی بسیار حساس‌تر و سریع‌تر می‌باشند (۴۰-۳۹، ۴-۳). در روش‌های مولکولی تشخیصی میکروارگانیسم‌ها و انتخاب توالی هدف مناسب از نکات کلیدی در افتراق پاتوژن‌های باکتریایی از یکدیگر می‌باشد. بنابراین مقایسه‌ی توالی ژنومی جهت انتخاب ناحیه‌ی اختصاصی در هر عامل میکروبی، می‌باید در محل مناسب ژن و به صورت دقیق انتخاب گردد (۴۰، ۲۰، ۱۶-۱۵، ۱۱).

بررسی‌های نرم‌افزاری توالی پروب و پرایمرهای انتخاب‌شده از ژن 23S rDNA در این مطالعه نشان داد، علاوه بر این که پروب‌های اختصاصی انتخاب شده جهت تشخیص عوامل باکتریایی، منحصر به همان سویه‌ی باکتریایی می‌باشد، بلکه BLAST پروب‌های اختصاصی در بانک ژنی نیز نشان داد که توالی انتخاب شده به عنوان پروب در هر یک از پاتوژن‌های مورد نظر نیز از نواحی محافظت شده‌ی آن عامل می‌باشد که در سایر عوامل پاتوژن غیر اختصاصی است.

یکی از ویژگی‌های استفاده از ژن‌های rDNA شناسایی عامل باکتریایی از نمونه‌ی مشکوک به آلودگی، بدون نیاز به کشت آن عامل در محیط‌های اختصاصی می‌باشد. مشاهده‌ی قطعه‌ای از ژن‌های rDNA همانند ژن‌های 23S rDNA و 16S rDNA پس از آمپلی‌فیکاسیون آن با استفاده از PCR در نمونه‌ی مورد بررسی، دلالت بر آلودگی آن نمونه به عوامل باکتریایی می‌باشد. سپس با بررسی توالی‌های اختصاصی ژن‌های rDNA از عوامل باکتریایی و در نهایت طراحی پروب‌های اختصاصی از نواحی محافظت شده‌ی آن، بدون نیاز به کشت می‌توان به صورت مستقیم به تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از ژنوم میکروارگانیسم پرداخت و با مشاهده‌ی اندازه‌ی باند مورد انتظار، به نوع عامل باکتریایی مشکوک پی برد (۴۲، ۴۰-۳۹، ۱۱-۱۰).

ژن‌های 23Sr RNA در مقایسه با ژن‌های 16S rRNA، با داشتن توالی‌های اختصاصی بیشتر به دلیل اندازه‌ی بزرگ‌تر، جهش‌های منحصر به فرد و همچنین گوناگونی بالا در توالی خود از اهمیت خاصی در بررسی‌های فیلوژنتیکی میکروارگانیسم‌ها برخوردار هستند. از طرفی، مطالعات نشان می‌دهد که ژن‌های 23Sr RNA با داشتن مناطق محافظت شده اجازه‌ی طراحی پرایمرهای بسیاری از مناطق مختلف محافظت‌شده‌ی این ژن را می‌دهند (۳۹، ۱۳-۱۲، ۳).

تکرارپذیری ژن در ژنوم پروکاریوت‌های غیر معمول می‌باشد، در حالی که ژن‌های rRNA دارای تکرارپذیری بالا می‌باشند؛ به طوری که در یک ژنوم پروکاریوتی از یک تا بیش از پانزده کپی از این ژن وجود دارد.

از طرفی، تغییرات تکاملی میکروارگانیسم‌ها به طور معمول در ژن‌های rRNA تأثیرگذار نیست و این ژن‌ها کمتر دچار تغییر و تحول در توالی خود می‌شوند. برای مثال در ژنوم اشریشیاکلی، هفت اپرون از ژن‌های rRNA وجود دارد که حتی در صورت حذف شش مورد از این اپرون‌ها، تنها یک اپرون کافی است تا به تولید بیش از ۵۰ درصد از rRNA سلول بپردازد. این مسأله نشان دهنده‌ی این است که حتی در صورت حذف چند اپرون ژن rRNA، بازهم توالی این ژن‌ها محافظت شده باقی می‌ماند و در مطالعات فیلوژنتیکی و تشخیصی میکروارگانیسم‌ها ارزش بسیار بالایی دارد (۴۳، ۱۸، ۱۶، ۵).

Pei و همکاران در یک مطالعه‌ی جامع و گسترده به گوناگونی ژنتیکی و ویژگی‌های منحصر به فرد ژن‌های 23S rDNA در ۱۸۴ ژنوم پروکاریوتی پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که ژن‌های 23S rDNA در داخل ژنوم یک سویه‌ی خاص منحصر به فردی هستند که در نتیجه‌ی استرس‌های ساختاری وارد بر میکروارگانسیم در شرایط مختلف می‌باشد. این درحالی است که توالی‌های ساختاری این ژن‌ها در سویه‌های مختلف گوناگون و دارای تفاوت‌هایی در توالی DNA می‌باشد (۴۳).

Soull و همکاران به تشخیص مولکولی چهار Serovar از سالمونلا با استفاده از ویژگی‌های ژن‌های rRNA پرداختند. در این مطالعه با استفاده از تفاوت‌های ساختاری دومین‌های انتهایی ژن‌های 23S rRNA و 16S-23S rRNA و با طراحی پروب‌های اختصاصی برای هر یک از چهار سروارهای سالمونلا، به بررسی ویژگی‌های توالی ژن‌های rRNA در این سروارها و در نهایت مقایسه‌ی این توالی، به تشخیص سریع این عوامل پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تکثیر نواحی یونیورسال از ژن‌های rRNA همانند 23S rRNA و 16S-23S rRNA و در نهایت انتخاب پروب‌های اختصاصی و منحصر به فرد درون این نواحی، با توجه به گوناگونی بالای این ژن‌ها در میان باکتری‌ها و حتی سروارهای مختلف یک جنس، یک ابزار کارامد در تشخیص و شناسایی عوامل باکتریایی می‌باشد (۳۹).

Tsiodras و همکاران به بررسی گوناگونی توالی ژن‌های 23S rRNA و مقایسه‌ی این توالی در روابط خویشاوندی سویه‌های مختلف انتروکوکوس در مقایسه با ژن‌های 16S rRNA پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که بهترین توالی جهت افتراق و تمایز سویه‌های مختلف انتروکوکس، توالی مابین ۲۰۸۰ الی ۲۳۸۰ جفت بازی از ژن 23S rRNA که در دومین V قرار دارد، می‌باشد. این ناحیه، قطعه‌ی مناسب جهت انتخاب پروب‌های اختصاصی برای هر یک از سویه‌های انتروکوکوس است.

از طرفی، نتایج آنالیز فیلوژنتیکی دومین مورد نظر در ژن 23S rRNA با نتایج حاصل از بررسی ژن 16S rRNA مشابه بود. با این وجود نتایج نشان داد که برخی سویه‌های انتروکوکوس با قرابت ژنتیکی نزدیک به هم، تنها توسط توالی ژن 16S rRNA قابل

افتراق از یکدیگر بودند (۴۴).

در این مطالعه، آنالیز توالی 23S rDNA باکتری‌های اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا نشان داد، انتخاب پروب‌های اختصاصی هر سویه در میان نواحی محافظت شده‌ی ژن‌های rDNA بسیار حایز اهمیت است؛ به طوری که نتایج PCR و بررسی تفاوت‌های نوکلئوتیدی باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد توالی 23S rDNA انتخاب شده در این ناحیه، توانایی افتراق‌دهی مناسبی برای بسیاری از باکتری‌های پاتوژن دارد. با توجه به این که تشخیص رایج پاتوژن‌های باکتریایی در آزمایشگاه‌های تشخیصی اغلب بر پایه‌ی روش‌های سنتی تشخیصی است و بسیاری از این روش‌ها غیر اختصاصی و زمان‌بر هستند، در نتیجه استفاده از ویژگی‌های ژنومی و بررسی‌های مولکولی اختصاصی که قادر به تشخیص و افتراق سریع عوامل بیماری‌زای باکتریایی باشند، بسیار حایز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که توالی 23S rDNA انتخاب شده در این پژوهش با توجه به محصولات به دست آمده‌ی حاصل از تکثیر آن، ناحیه‌ای مناسب و کارامد جهت افتراق و غربالگری سویه‌های باکتریایی اشریشیا کلی، شیگلا دیسانتری و سالمونلا انتریکا می‌باشد. بررسی قدرت تشخیص و افتراق دهی سایر عوامل بیماری زای باکتریایی با استفاده از ژن‌های 23S rDNA پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسؤولین بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور ایران به دلیل تأمین سویه‌های استاندارد و از همکاران محترم آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، جناب آقای دکتر هاشمی مدنی و سرکار خانم سفیری کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Yamamoto Y, Yamada A. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray. Jpn J Infect Dis 2007; 60(6): 355-61.
2. Wang XW, Zhang L, Jin LQ, Jin M, Shen ZQ, An S, et al. Development and application of an oligonucleotide microarray for the detection of food-borne bacterial pathogens. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 76(1): 225-33.
3. Sarshar M, Doosti A, Jafari A, Shahrokhi N. Evaluation of oligonucleotide microarray technology for the detection of food-borne bacterial pathogens. J Microbial World 2009; 2(2): 73-80. [In Persian].
4. Jin LQ, Li JW, Wang SQ, Chao FH, Wang XW, Yuan ZQ. Detection and identification of intestinal pathogenic bacteria by hybridization to oligonucleotide microarrays. World J Gastroenterol 2005; 11(48): 7615-9.
5. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P, Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int J Syst Bacteriol 1992; 42(1): 166-70.
6. Yoo SM, Keum KC, Yoo SY, Choi JY, Chang KH, Yoo NC, et al. Development of DNA microarray for pathogen detection. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2004; 9(2): 93-9.
7. Wang RF, Kim SJ, Robertson LH, Cerniglia CE. Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. Mol Cell Probes 2002; 16(5): 341-50.
8. 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.
9. Amann R, Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial

ecology. FEMS Microbiol Rev 2000; 24(5): 555-65.
10. Wilson WJ, Strout CL, DeSantis TZ, Stilwell JL, Carrano AV, Andersen GL. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. Mol Cell Probes 2002; 16(2): 119-27.
11. Kim HJ, Park SH, Lee TH, Nahm BH, Kim YR, Kim HY. Microarray detection of food-borne pathogens using specific probes prepared by comparative genomics. Biosens Bioelectron 2008; 24(2): 238-46.
12. Cook KL, Layton AC, Dionisi HM, Fleming JT, Sayler GS. Evaluation of a plasmid-based 16S-23S rDNA intergenic spacer region array for analysis of microbial diversity in industrial wastewater. J Microbiol Methods 2004; 57(1): 79-93.
13. Kumar RM. The widely used diagnostics. "DNA microarrays" - a review. Am J Infect Dis 2009; 5(3): 214-55.
14. Chou CC, Chen CH, Lee TT, Peck K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. Nucleic Acids Res 2004; 32(12): e99.
15. Maynard C, Berthiaume F, Lemarchand K, Harel J, Payment P, Bayardelle P, et al. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. Appl Environ Microbiol 2005; 71(12): 8548-57.
16. Yoo SM, Lee SY. Diagnosis of pathogens using DNA microarray. Recent Pat Biotechnol 2008; 2(2): 124-9.
17. Garcia-Martinez J, Martinez-Murcia A, Anton AI, Rodriguez-Valera F. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some Escherichia coli strains of the ECOR collection and E. coli K-12. J Bacteriol 1996; 178(21): 6374-7.
18. Gurtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology 1996; 142 (Pt 1): 3-16.
19. Hamid ME, Roth A, Landt O, Kroppenstedt RM, Goodfellow M, Mauch H. Differentiation between Mycobacterium farcinogenes and Mycobacterium senegalense strains based on 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. J Clin Microbiol 2002; 40(2): 707-11.
20. Giammarinaro P, Leroy S, Chacornac JP, Delmas J, Talon R. Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3673-80.
21. Hong BX, Jiang LF, Hu YS, Fang DY, Guo HY. Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections. J Microbiol Methods 2004; 58(3): 403-11.
22. 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 2000; 38(2): 781-8.
23. Mitterer G, Huber M, Leidinger E, Kirisits C, Lubitz W, Mueller MW, et al. Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1048-57.
24. Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Yazdi JZ, Morovvati S, Jonaidi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. Pak J Biol Sci 2007; 10(7): 1138-40.
25. Anvarinejad M, Farshad S, Ranjbar R, Giammanco GM, Alborzi A, Japoni A. Genotypic Analysis of E. coli Strains Isolated from Patients with Cystitis and Pyelonephritis. Iran Red Crescent Med J 2012; 14(7): 408-16.
26. Farshad S, Ranjbar R, Japoni A, Hosseini M, Anvarinejad M, Mohammadzadegan R. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from children in Jahrom, Iran. Arch Iran Med 2012; 15(5): 312-6.
27. Ranjbar R, Hosseini MJ, Kaffashian AR, Farshad S. An outbreak of shigellosis due to Shigella flexneri serotype 3a in a prison in Iran. Arch Iran Med 2010; 13(5): 413-6.
28. Filliol-Toutain I, Chiou CS, Mammina C, Gerner-Smidt P, Thong KL, Phung DC, et al. Global Distribution of Shigella sonnei Clones. Emerg Infect Dis 2011; 17(10): 1910-2.
29. Ranjbar R, Soltan-Dallal MM, Pourshafie MR, Mammina C. Antibiotic resistance among Shigella serogroups isolated in Tehran, Iran (2002-2004). J Infect Dev Ctries 2009; 3(8): 647-8.
30. Ranjbar R, Soltan Dallal MM, Talebi M, Pourshafie MR. Increased isolation and characterization of Shigella sonnei obtained from hospitalized children in Tehran, Iran. J Health Popul Nutr 2008; 26(4): 426-30.
31. Ranjbar R, Mammina C, Pourshafie MR, Soltan-Dallal MM. Characterization of endemic Shigella boydii strains isolated in Iran by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profile, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. BMC Res Notes 2008; 1: 74.
32. Ranjbar R, Aleo A, Giammanco GM, Dionisi AM, Sadeghifard N, Mammina C. Genetic relatedness among isolates of Shigella sonnei carrying class 2 integrons in Tehran, Iran, 2002-2003. BMC Infect Dis 2007; 7: 62.

33. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of Salmonella enterica. Jpn J Infect Dis 2010; 63(6): 417-21.
34. Ranjbar R, Giammanco GM, Farshad S, Owlia P, Aleo A, Mammina C. Serotypes, antibiotic resistance, and class 1 integrons in Salmonella isolates from pediatric cases of enteritis in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2011; 8(4): 547-53.
35. Ranjbar R, Sarshar M. Genetic diversity of clinical strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium. J Mil Med 2012; 14(2): 143-7. [In Persian].
36. Ranjbar R, Sadeghifard N. Characterization of genetic diversity among clinical strains of Salmonella enterica serovar infantis by ribotyping method. J Zanjan Univ Med Sci 2012; 20(81): 75-84. [In Persian].
37. Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, Plano MR, Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing nontyphoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2010; 7(1): 91-5.
38. Ranjbar R, Sarshar M, Morovvati S. Study of ribotype patterns of Salmonella enterica serovar enteritidis strains isolated in Tehran, Iran. J Isfahan Med Sch 2012; 30(180): 238-47. [In Persian].
39. Soull A, Ben Nejma M, Elfray Rhim A, Mastouri M, Bel Hadj Jrad B, Makhlouf M, et al. Molecular identification of four Salmonella serovars isolated from food in Tunisia based on the sequence of the ribosomal RNA genes. Afr J Microbiol Res 2012; 6(35): 6454-61.
40. Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. Curr Issues Mol Biol 2007; 9(1): 21-39.
41. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. Clin Chim Acta 2006; 363(1-2): 206-20.
42. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 32-9.
43. Pei A, Nossa CW, Chokshi P, Blaser MJ, Yang L, Rosmarin DM, et al. Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. PLoS One 2009; 4(5): e5437.
44. Tsiodras S, Gold HS, Coakley EP, Wennersten C, Moellering RC, Jr., Eliopoulos GM. Diversity of domain V of 23S rRNA gene sequence in different Enterococcus species. J Clin Microbiol 2000; 38(11): 3991-3.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 05.11.2012
Vol. 30, No. 219, 1st Week, March 2013
Accepted: 14.01.2013

Detection of *Escherichia Coli, Salmonella Enterica* and *Shigella Dysenteriae* by Analysis of 23S Ribosomal DNA Gene

Meysam Sarshar MSc[1], Reza Ranjbar PhD[2], Nader Shahrokhi PhD[3], Noorkhoda Sadeghifard PhD[4], Ahmad Hassani MSc[5], Zohreh Nasrabadi MSc[6], Fatemeh Poorali[1]

Original Article

Abstract

Background: Ribosomal DNA (rDNA) genes contain signature structures which are unique for groups of organisms. Considering their great number in cells and their protected areas, they render ideal targets for specific nucleic acid probes. The present study aimed to investigate the capability of some specific regions of *23S rDNA* gene as a DNA target for differentiation and screening of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Shigella dysenteriae*.

Methods: Bacterial reference strains used in this study were *E. coli*, *S. enterica* and *Sh. dysenteriae* that were provided by the centers for microbial culture collection (CMCC) at Pasture Institute of Iran. DNA extraction was performed by boiling method. Alignment of the *23S rDNA* sequences of bacterial species was performed by using AlignX (a component of Vector NTI Advance 11.0) and areas displaying sequence divergence among species were used for designing universal primers and individual bacteria specific probe.

Findings: The universal polymerase chain reaction (PCR) products of each bacterial species showed bands of approximately 880 bp to be being equivalent to the fragment size of *23S rDNA* gene. Different size bands of *23S rDNA* probes were produced and included 228 bp for *E. coli*, 444 bp for *S. enterica*, and 776 bp for *Sh. dysenteriae*.

Conclusion: Comparative sequence analysis of variable and specific regions of *23S rDNA* genes among the studied bacterial species showed that we were able to amplify specific target among universal region for the detection of many enteric pathogenic bacteria.

Keywords: 23S ribosomal DNA, Pathogenic bacteria, Vector NTI

Citation: Sarshar M, Ranjbar R, Shahrokhi N, Sadeghifard N, Hassani A, Nasrabadi Z, Poorali F. **Detection of *Escherichia Coli, Salmonella Enterica* and *Shigella Dysenteriae* by Analysis of 23S Ribosomal DNA Gene.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(219): 2333-43

1- Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
5- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
6- Department of Microbiology, School of Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran
Corresponding Author: Reza Ranjbar PhD, Email: ranjbar@bmsu.ac.ir