

*Maria Karczmarczyk, Michał Bartoszcze*

## MIKROMACIERZE DNA – NOWE NARZĘDZIE W WYKRYWANIU CZYNNIKÓW BIOLOGICZNYCH

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych  
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii  
Szef Ośrodka: Michał Bartoszcze

*Przedstawiono przykłady zastosowania mikromacierzy do identyfikacji czynników bioterrorystycznych oraz innych, wybranych mikroorganizmów, a także do badań antybiotykooporności. Mikromacierze, dzięki możliwości analizowania tysięcy genów w jednym eksperymencie, otwierają nowe możliwości w badaniach epidemiologicznych, jak np. w ustalaniu źródeł ognisk chorobowych, wykrywaniu nowych genotypów i podtypów, poznaniu geograficznego rozprzestrzeniania się czynników biologicznych itp..*

*Słowa kluczowe: mikromacierz, chip DNA, bioterroryzm*  
*Key words: microarray, DNA chip, bioterrorism*

### WSTĘP

Mikromacierze DNA (chipy DNA) są zbiorem sond molekularnych związanych ze stałym podłożem w ściśle określonym porządku, stanowiąc dwuwymiarowy układ mikroskopijnych miejsc, z określonymi sekwencjami kwasu nukleinowego. Technologia ta pozwala na wykrywanie tysięcy cząsteczek kwasów nukleinowych, dzięki możliwości przeprowadzenia wielu eksperymentów hybrydyzacyjnych w jednym czasie (1,2).

### TYPY MIKROMACIERZY DNA I METODY ICH OTRZYMYWANIA

Wyróżnia się: mikromacierze cDNA oraz mikromacierze oligonukleotydo-  
we, różniące się między sobą wielkością kwasu nukleinowego (3). Na mikromacierzach cDNA immobilizowane są stosunkowo długie cząsteczki DNA, co odbywa się przy użyciu urządzeń automatycznych na powierzchni membran, szkła lub silikonu. Technologia mikromacierzy cDNA (długość sondy 500-5000 nukleotydów) została opracowana na Uniwersytecie Stanford (2,3). Amplikony przygotowuje się używając chromosomalnego DNA jako matrycy, a następnie oczyszcza się je poprzez precypitację lub filtrację żelową (2,3). Mikromacierze oligonukleotydo-  
we są wytwarzane w procesie sterowanej światłem syntezy chemicznej *in*

*situ* lub też syntezy oligonukleotydów, z immobilizacją na stałej powierzchni. Mikromacierze z krótkimi kwasami nukleinowymi (10-80 pz) są przydatne w detekcji mutacji oraz monitorowaniu ekspresji, odkrywaniu i mapowaniu genów. Zaletą w ich przygotowywaniu jest omińnięcie etapu PCR (2,3).

W latach 90-tych opracowano technikę fotolitograficzną dla jednoczesnej syntezy dużej liczby oligonukleotydów na powierzchni stałej, wykorzystywaną w produkcji mikromacierzy o wysokiej gęstości, tj. z dużym upakowaniem sond (ponad 100000 na chip) (2,3). Substrat szklany jest najpierw kowalencyjnie modyfikowany w celu syntezy grup hydroksyalkilowych, służących do rozpoczęcia syntezy, które są następnie wydłużane linkerami chronionymi przez specjalne fotolabilne struktury. Gdy na określone pola pada światło, grupy ochronne są usuwane, dzięki czemu możliwe jest przyłączenie odpowiednich monomerów. Cykle fotodeprotekcji i przyłączania nukleotydów są powtarzane w celu utworzenia określonych sekwencji oligonukleotydowych. Chipy wyprodukowane metodą fotolitograficzną mają pojedyncze miejsca wielkości 24x24 mikronów na powierzchni 1,6 cm<sup>2</sup>, zawierają 400000 grup, z których każda zawiera około 10 mln oligonukleotydów. Metoda fotolitograficzna umożliwia produkcję chipów na podstawie baz danych, co eliminuje trudności związane z wyszukiwaniem i przechowywaniem sond (2,3).

#### ETAPY ANALIZY Z ZASTOSOWANIEM MIKROMACIERZY DNA

Eksperyment z zastosowaniem mikromacierzy DNA obejmuje: przygotowanie sond molekularnych, stabilne ich związanie do powierzchni płytki, przygotowanie i wyznakowanie próbek kwasów nukleinowych przeznaczonych do analizy, hybrydyzację próbek z sondami, odczytanie sygnału hybrydyzacji oraz analizę danych za pomocą systemów informatycznych. W celu detekcji specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych stosuje się sondy w postaci jednoniciowych fragmentów DNA o znanej sekwencji, produktów PCR-u lub oligonukleotydów. Sekwencje sond są często dobierane przy wykorzystaniu baz danych (GeneBank, UniGene). Najczęściej oligonukleotydy są wiązane kowalencyjnie do podłoża poprzez reaktywne grupy terminalne lub też drogą adsorpcji lub powinowactwa. (4).

Próbką poddawaną analizie na mikromacierzy mogą być produkty PCR, genomowy DNA, całkowity RNA, cDNA, plazmidowy DNA lub oligonukleotydy. Pierwszym etapem przygotowania próbki („target”) do diagnostyki jest zwykle jej amplifikacja (PCR) (4). Najczęściej próbki znakowane są bezpośrednio poprzez inkorporację nukleotydów znakowanych fluorescencyjnie lub radioizotopowo w procesie PCR lub RT-PCR. Znakowanie barwnikami cyjaninowymi Cy3 (zielony) i Cy5 (czerwony) jest najpowszechniejszym sposobem detekcji na mikromacierzach, zwłaszcza w analizie ekspresji genów (2,5). Stosuje się również metody pośrednie, np. z zastosowaniem biotyny i znacznika drugiego rzędu (2,5). Badana próbka nanoszona jest na mikromacierz, a poszukiwany fragment jednoniciowego kwasu nukleinowego, hybryduje ze znajdującą się na chipie sondą. W miejscach, gdzie sonda i badany DNA są komplementarne, tworzą się dwuniciowe fragmenty DNA, których obecność rejestrowana jest przez odpowiednie czytniki (fluorescencyjne, kolorymetryczne, chemiluminescencyjne, spektrometrii masowej, itp.). Dla celów kontrolnych stosuje się cząsteczki DNA różniące się w stosunku do zastosowanej sondy jednym, najczęściej centralnie położonym nukleotydem (tzw. „perfect match/mismatch pairs”), co pozwala na oszacowanie sygnału pochodzącego od niespecyficznego związanego DNA (6,2). Gen 16S rRNA jest

najszerzej stosowany jako marker stosunkowo konserwatywny wśród organizmów żywych. Jak dotychczas nie zaobserwowano zjawiska horyzontalnego transferu genów w przypadku 16S rRNA, a baza danych z sekwencjami genu 16S rRNA jest systematycznie powiększana (2). Do alternatywnych genów markerowych stosowanych w analizie należą: rpoB, recA, gyrB, groEL, atpD, geny tmRNA (7). Stosując odpowiednie sondy, identyfikuje się markery związane ze zjadliwością, a także geny oporności na antybiotyki. Przy stosowaniu mikromacierzy DNA, możliwość zwiększania liczby wykrywanych regionów DNA jest praktycznie nieograniczona, a ryzyko popełnienia błędu z każdym dodatkowym zestawem sond jest mniejsze (6,8).

#### ZASTOSOWANIE MIKROMACIERZY DNA DO MOLEKULARNEJ IDENTYFIKACJI PATOGENÓW BIOTERRORYSTYCZNYCH

Metodę mikromacierzy zastosowano do identyfikacji 18 zjadliwych mikroorganizmów wykazując jej wysoką specyficzność i czułość (6), wynoszącą około 10 fg oczyszczonego genomowego DNA i 500 fg DNA patogenu w próbce środowiskowej. Metoda ta może mieć zastosowanie w identyfikacji zarazków wywołujących zarówno infekcje naturalne, jak i użytych w atakach bioterrorystycznych (6). *Boekhuijsen* i wsp. (9) zastosowali mikromacierze do wykrywania *Francisella tularensis*, z użyciem 27 szczepów *F. tularensis*, należących do czterech różnych podgatunków (*F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*). W przeciwieństwie do innych patogenów wewnątrzkomórkowych, u *F. tularensis* nie wykryto dotychczas toksyn (9). Wspomniane podgatunki pochodzące z różnych regionów geograficznych wykazują znaczne różnice w zjadliwości. Sondy generowano poprzez amplifikację wybranych sekwencji DNA z biblioteki genomowej wysoce zjadliwego szczepu *F. tularensis* Schu S4. Analiza wzorów hybrydyzacji potwierdziła ograniczoną zmienność genetyczną w obrębie gatunku *F. tularensis* subsp. *tularensis* oraz *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Stosunkowo duże podobieństwo wykazują podgatunki *tularensis* i *mediasiatica* mimo ich różnego pochodzenia geograficznego oraz różnic w zjadliwości. W wyniku badań z zastosowaniem mikromacierzy DNA, zidentyfikowano 8 regionów genomowych (wielkości od 0,6 do 11,5 kb), zawierających 21 otwartych ramek odczytu, co pozwalało na różnicowanie pomiędzy umiarkowanie wirulentnymi szczepami *F. tularensis* subsp. *holarctica* i wysoce niebezpiecznymi szczepami należącymi do podgatunku *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Wykrycie jednego ze wspomnianych regionów genomowych umożliwiło opracowanie testu PCR pozwalającego na identyfikację wszystkich czterech podgatunków w reakcji PCR-multipleks (9). Zastosowano mikromacierze DNA do jednoczesnej detekcji i identyfikacji genów *ent*, kodujących enterotoksyny gronkowcowe. Po amplifikacji zmiennego regionu genu *ent* z zastosowaniem uniwersalnych primerów, i hybrydyzacji produktów PCR ze specyficznymi, oligonukleotydowymi sondami na chipie wykazano, że niektóre z badanych izolatów *Staphylococcus aureus* zawierają nowe warianty genów *ent*, których nie wykryto za pomocą PCR (10). Opisano metodę szybkiej detekcji niektórych czynników biologicznych o znaczeniu bioterrorystycznym z zastosowaniem mikromacierzy oligonukleotydowej, zawierającej około 1700 sond, wykorzystując oligonukleotydy komplementarne do regionów hiperzmiennych genu 16S rRNA, identyfikując także specyficzne geny zjadliwości. Skonstruowana mikromacierz zawierała również sondy do detekcji *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* oraz wielu innych bakterii i wirusów chorobotwórczych z listy Grupy

Australijskiej (Australia Group pathogens). Opracowany system charakteryzował się wysoką specyficznością, a jego czułość wyniosła około 28 pg bakteryjnego DNA. Ponieważ u wirusów nie istnieją geny odpowiadające bakteryjnym 16S i 23S rRNA, zastosowano sondy (5-10 na jeden wirus) komplementarne do regionów o wysokim potencjale różnicującym w obrębie genomu. Szczepy *Y. pestis* pochodzące z różnych regionów geograficznych, wykazują różnice genomowe, rzutujące na ich zjadliwość (11). Horyzontalny transfer genów jest jednym z mechanizmów prowadzących do ewolucyjnego wyodrębniania się nowych biowarów i genomów (12). Analizę porównawczą przeprowadzono w oparciu o mikromacierze DNA, z użyciem amplikonów, które odpowiadały 4005 genom. Były to niemal wszystkie geny *Y. pestis* CO92 oraz geny unikalne dla *Y. pestis* 91001, których sekwencje genomowe są w całości poznane. Wyniki analizy genomu 43 szczepów *Y. pestis* (11) wskazują na występowanie znacznej zmienności spowodowanej nabywaniem i utratą genów w naturalnie występujących populacjach. Szerzej badano występowanie wybranych genów, znajdujących się w obrębie polimorficznych regionów, przeprowadzając amplifikację DNA 260 izolatów *Y. pestis*. Na podstawie uzyskanych wyników, badane szczepy pogrupowano na 14 genomów (11). Badano możliwość wykorzystania mikromacierzy DNA do resekwencjonowania dużej liczby szczepów, co przy użyciu sekwencjonowania byłoby kosztowne i trudne do przeprowadzenia (13). W oparciu o mikromacierze oligonukleotydowe Affymetrix analizowano 3,1 Mb sekwencję genomową 56 szczepów *Bacillus anthracis*, gatunku wykazującego niezwykle małą zmienność genetyczną. W celu wykrycia ewentualnego genetycznego zróżnicowania w obrębie tego gatunku, wybrano izolaty pochodzące z odległych regionów geograficznych. Na każdej z mikromacierzy resekwencjonowano fragment wielkości 29212 bp lub około 0,5% genomu *B. anthracis*. Zidentyfikowano 37 mutacji punktowych, z których 24 potwierdzano niezależną metodą. Stwierdzono, że poziom zmienności sekwencji DNA w przypadku *B. anthracis* jest bardzo niski, a chromosom *B. anthracis* wykazuje mniejszą zmienność aniżeli plazmidy pXO1 i pXO2 (13). Omawiana metoda jest niezwykle wydajna i szybka w porównaniu do alternatywnych technik sekwencjonowania, chociaż jej rozpowszechnienie ogranicza w chwili obecnej wysoka cena.

Za pomocą mikromacierzy DNA wykrywano gatunki bakteryjne należące do rodzaju *Brucella* (14). W obrębie tego taksonu wyróżnia się 6 gatunków (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*). Mikromacierz DNA skonstruowano na podstawie znanej sekwencji *B. melitensis* 16M, gatunku o wysokiej zjadliwości dla ludzi. Spośród zidentyfikowanych 3198 otwartych ramek odczytu, reprezentowanych na mikromacierzy, jedynie 217 było całkowicie lub częściowo nieobecnych w genomach badanych gatunków *Brucella* sp. (14). Opisano metodę detekcji patogenów z rodzaju *Vibrio* na specyficznej gatunkowo mikromacierzy DNA. W celu detekcji i różnicowania wspomnianych bakterii, przeprowadzono amplifikację genów *vvh* i *viuB* *Vibrio vulnificus*, *ompU*, *toxR*, *tcpI* i *hlyA* *V. cholerae* oraz *tlh*, *tdh*, *trh* i 8 ORF *V. parahaemolyticus*. Uzyskano możliwość identyfikacji badanych patogennych szczepów, a także podtypów w obrębie trzech badanych gatunków *Vibrio*. Test ten może być zastosowany np. do detekcji patogennych szczepów *Vibrio* sp. m.in. w skorupiakach (15). Zastosowano mikromacierze DNA do detekcji i genotypowania patogenów skażających zasoby wody (16). Metoda pozwalała na rozróżnienie *E. coli* O157:H7, od *E. coli* O91:H2. Na mikromacierzy DNA zidentyfikowano także polimorficzne miejsca w genie *hsp70* w celu specyficznej detekcji i genotypowania pierwotniaka *Cryptosporidium parvum* (16).

W 2004 roku firma Affymetrix rozpoczęła badania nad uniwersalną mikromacierzą do szybkiej, jednoczesnej identyfikacji setek różnych bakterii i wirusów. Mikromacierz stworzyła możliwość identyfikacji 26 różnych gatunków bakterii, 10 wirusów, a także setek ich podgatunków oraz 56 genów różnych toksyn i 62 genów oporności na antybiotyki w jednym teście (17). Filogenetyczny mikrochip RNA opracowany w Argonne National Laboratory, zawiera ponad 100 sond oligonukleotydowych, specyficznych dla różnych poziomów taksonomicznych. Badaną na chipie cząsteczką jest rybosomalny RNA, występujący w komórkach w wielu tysiącach kopii, dzięki czemu możliwe jest ominięcie etapu amplifikacji metodą PCR, co skraca czas analizy. Metoda powyższa umożliwia jednoczesną detekcję różnych gatunków mikroorganizmów i stwarza szansę szybkiego badania próbek na obecność czynników biologicznych. Stwierdzono także, że umożliwia ona nawet wykrycie fragmentów wykazujących różnice w zakresie jednego nukleotydu. Metoda oparta na analogicznym chipie, pozwalała na rozróżnienie *Bacillus anthracis*, od blisko spokrewnionych gatunków z grupy *B.cereus* (18).

#### ZASTOSOWANIE MIKROMACIERZY DO IDENTYFIKACJI WYBRANYCH DROBNOUSTROJÓW CHOROBOTWÓRCZYCH

*Volokhov* i wsp. (19) zastosowali mikromacierze do detekcji i identyfikacji 6 gatunków *Listeria*, co było jedną z pierwszych prób wykorzystania technologii mikromacierzy DNA w monitorowaniu czystości mikrobiologicznej żywności. W badaniach ustalano przynależność gatunkową 53 szczepów *Listeria* sp. (szczepy referencyjne oraz izolaty kliniczne) na podstawie sekwencji genu *iap* (koduje białko p60 związane z inwazyjnością). Do amplifikacji genu *iap* użyto 2 uniwersalnych primerów, rozpoznających sekwencje konserwatywne w obrębie tego genu. Sondy (10 na gatunek) zaprojektowano biorąc pod uwagę różnice w sekwencji genu *iap* u poszczególnych gatunków. W analogiczny sposób zamplifikowano gen *hly* (koduje białko warunkujące uwalnianie bakterii z fagosomów komórki gospodarza) charakterystyczny dla hemolitycznych szczepów *Listeria* sp.. Sondy zaprojektowano na podstawie zróżnicowanego genetycznie regionu w obrębie genu *hly*, dzięki czemu możliwe było rozróżnienie pomiędzy trzema hemolitycznymi gatunkami *Listeria*. Autorzy wykrywali także geny kodujące czynniki zjadliwości specyficzne dla *L. monocytogenes* – *inlB*, *plcA*, *plcB*, *clpE*. Niespecyficznej amplifikacji uległ fragment pochodzący z *L. innocua*, jednak nie hybrydyzował on z sondami specyficznymi dla *L. monocytogenes* (19). Zastosowano nawet multipleksową amplifikację sześciu bakteryjnych genów kodujących czynniki wirulencji (*iap*, *hly*, *inlB*, *plcA*, *plcB*, *clpE*), a następnie powstałe produkty poddano hybrydyzacji z uniwersalnym chipem, zawierającym sondy specyficzne dla poszczególnych gatunków. Trzy szczepy zdiagnozowane wcześniej jako *L. welshimeri* zostały na podstawie wyników hybrydyzacji z sondami dla genów *iap* zidentyfikowane jako *L. seeligeri*. Przeprowadzono badania, których celem było określenie „patotypu” wyizolowanych szczepów *E.coli* na podstawie obecności wszystkich znanych genów kodujących czynniki wirulencji. W badaniach 91 genów (105 sond długości 117-2121pz) geny wirulencji zamplifikowano i naniesiono na szklane płytki tak, że chip składał się z ośmiu submacierzy, odpowiadających odrębnej pod względem chorobotwórczości grupie *E.coli* (EHEC, EPEC, ETEC, UPEC, MENEK, EAEC, EIEC oraz szczepy powodujące posocznicę u ludzi i zwierząt). Stwierdzono, że wzory hybrydyzacji korelowały z profilami wirulencji grup patogennych. Na podstawie analizy

wzorów hybrydyzacji DNA nieznanymi szczepami, możliwe było określenie ich patotypu, a czułość testu wyniosła 97% (20).

Wykazano, że hybrydyzacja z oligonukleotydowymi chipami pozwala na odróżnienie szczepów *E. coli* od innych patogenów wywołujących schorzenia przewodu pokarmowego (*Salmonella*, *Shigella*). Wykrywano obecność sześciu genów (*eaeA*, *slt-I*, *slt-II*, *fliC*, *rfbE*, *ipaH*) przeprowadzając najpierw multipleks PCR, a następnie hybrydyzację zamplifikowanego DNA do genospecyficznych oligonukleotydów na mikromacierzy (21). Volokhov i wsp. (22) opisali metodę identyfikacji czterech gatunków *Campylobacter* sp. o znaczeniu klinicznym. Amplifikacja specyficznych regionów w obrębie pięciu genów, a następnie analiza na mikromacierzy, gdzie każdy gen był reprezentowany przez 6 różnych sond długości 17-35 nukleotydów, pozwalała na jednoczesne rozróżnienie poszczególnych gatunków (22). Za pomocą mikromacierzy DNA badano możliwość identyfikowania SNP (Single Nucleotide Polymorphism) w konserwatywnych genach *Helicobacter pylori*, a także wykrywano geny związane z chorobotwórczością tej bakterii. Opracowano szybką metodę detekcji patogenów, powodujących infekcje pokarmowe, opartą na mikromacierzy oligonukleotydowej. Badano region genu 23S rRNA 14 bakterii wywołujących schorzenia układu pokarmowego oraz dwóch innych gatunków bakteryjnych, wykorzystując 21 oligonukleotydowych sond, specyficznych dla różnych poziomów taksonomicznych (gatunków, rodzajów, rodzin oraz jednej sondy uniwersalnej dla wszystkich bakterii). Do amplifikacji genu 23S rRNA zastosowano parę uniwersalnych primerów - P1 i P2. Test charakteryzował się wysoką czułością i specyficznością dla dziewięciu badanych patogenów, a wśród nich: *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* i *Clostridium botulinum*. W połączeniu z metodą PCR osiągnięto czułość na poziomie 10 CFU/ml. Zaletą tego testu jest możliwość obserwacji wyniku bezpośrednio „gołym okiem”, bez potrzeby zastosowania skanera, dzięki znakowaniu produktów PCR digoksygeniną, a następnie oznaczaniu ich metodą immunoenzymatyczną (23). Metodę mikromacierzy oligonukleotydowych wykorzystano do detekcji bakterii jelitowych w próbkach kału. Sondy zaprojektowano na podstawie sekwencji genu 16S rRNA dwudziestu bakterii jelitowych należących do rodzajów *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* oraz gatunków *Fusobacterium prausnitzii*, *Peptostreptococcus productus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli* i *Enterococcus faecium*. Wspomniany gen amplifikowano za pomocą dwóch uniwersalnych primerów, a do detekcji wykorzystano po trzy 40-nukleotydowe sondy specyficzne dla każdego z badanych gatunków. Stwierdzono, że zastosowanie mikromacierzy oligonukleotydowych pozwala na swoistą identyfikację bakterii, należących do gatunków dominujących w mikroflorze jelitowej (24). W innych badaniach, w oparciu o sekwencję genu *gyrB* wykrywano i różnicowano na mikromacierzy 14 blisko spokrewnionych gatunków *Mycobacterium* sp., używając w tym celu sond oligonukleotydowych komplementarnych do fragmentów genu *gyrB* unikalnych dla poszczególnych gatunków z rodzaju *Mycobacterium* (25). Wang i wsp. (26) użył 70-nukleotydowych sond do wykrywania wirusów, wywołujących choroby dróg oddechowych, projektując je na podstawie baz danych. Planuje się opracowanie biblioteki wzorów hybrydyzacji („viral barcodes”) niezbędnej dla celów diagnostycznych (26).

## ZASTOSOWANIE MIKROMACIERZY DO BADANIA ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI

Chipy firmy Affymetrix zastosowano z sukcesem do badania antybiotykooporności *Mycobacterium* sp. (27). Do identyfikacji 26 gatunków rodzaju *Mycobacterium* wykorzystano 200pz polimorficzny region genu 16S rRNA (82 unikalne sekwencje odpowiadające 54 gatunkom fenotypowym), a dla określenia oporności na rifampicynę badano 200pz sekwencję genu *rpoB* (polimerazy RNA) zawierającą potencjalnie 51 mutacji, warunkujących oporność na ten antybiotyk. Czas od momentu hodowli bakterii do amplifikacji próbki wynosił mniej niż 4h (27). Należy podkreślić, że analiza większej liczby genów znacznie zmniejsza ryzyko błędu w identyfikacji, który może być m. in. wynikiem zmienności genetycznej szczepów (19). Yu i wsp. (28) opracowali oparty na mikromacierzy test wykrywania mutacji punktowej warunkującej oporność na chinolony bakterii *E. coli*. Metoda pozwalała na zidentyfikowanie dwóch stosunkowo często występujących mutacji w genie *gyrA*, warunkujących oporność na antybiotyki z grupy chinolonów. Przy użyciu mikromacierzy badano 30 izolatów klinicznych *E. coli*, a wyniki, potwierdzone metodą standardowego sekwencjonowania DNA, były w pełni zgodne z wynikami testów fenotypowych i badaniami antybiotykowrażliwości (28).

## MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA MIKROMACIERZY W EPIDEMIOLOGII

Przy użyciu mikromacierzy DNA możliwe jest nie tylko wykrywanie mikroorganizmów, ale również identyfikacja genów kodujących różnorodne czynniki wirulencji, także w organizmach zmodyfikowanych genetycznie (1,2). Technika mikromacierzy DNA jest nową, wartościową i szybką metodą przydatną zarówno w identyfikacji patogenów bakteryjnych (17) jak i w ich genotypowaniu. Wymaga ona jednak dalszych badań w celu jej standaryzacji. Może być ona pomocna w identyfikowaniu rzadko spotykanych mikroorganizmów, a także w precyzyjniejszym określaniu pochodzenia danych szczepów. Znajomość sekwencji wielu szczepów pozwala na pełną analizę ich zróżnicowania oraz śledzenie i analizowanie ewentualnych następstw obserwowanych różnic, a także na poznanie ewolucyjnej historii organizmów (13). Mikromacierze są narzędziem, które może być wszechstronnie zastosowane w epidemiologii, jak np. w prowadzeniu dochodzenia epidemiologicznego i opracowywaniu ognisk chorób zakaźnych. Wykrywanie dużej ilości genów metodą mikromacierzy DNA może ułatwić identyfikację nowo powstających patotypów i horyzontalnie nabytych genów (18). Zastosowanie mikromacierzy DNA do resekwencjonowania pozwala ponadto na identyfikację SNP podczas jednego eksperymentu. Badania molekularne i surveillance w połączeniu z bankami sekwencji mogą oddać cenne usługi w kontroli chorób, poznaniu geograficznego rozprzestrzenienia się zarazków oraz w przypadku pojawiania się nowych zarazków i ich odmian. Metoda mikromacierzy oddała cenne usługi z chwilą pojawienia się SARS, kiedy skonstruowano platformę pozwalającą na identyfikację około 1000 znanych wirusów. Przy jej użyciu wykryto wirus mający wspólne cechy z koronawirusami, ale będący jednak zupełnie nowym, nieznanym wirusem (29). W czasach, kiedy zagrożenie bioterroryzmem jest realne, zalety tej techniki nabierają szczególnego znaczenia.

*M Karczmarczyk, M Bartoszcze*

DNA MICROARRAYS – NEW TOOL IN THE IDENTIFICATION  
OF BIOLOGICAL AGENTS

SUMMARY

This article describes the methods of sample labelling and the principles of construction and application of microarrays. The examples of microarrays' application for identification of bioterrorism agents, as well as water and food contaminating bacteria and other selected microorganisms, and also antibiotic resistance testing were presented. Due to the fact that this method allows to identify thousands of genes in one experiment, the microarray assay opens new perspectives in epidemiological studies such as determination of sources of disease outbreaks, detection of new genotypes and subtypes, and examining of the geographical spread of the biological agents.

PÍŚMIENNICTWO

1. Stenger DA, Andreadis JD, Vora GJ, i in. Potential applications of DNA microarrays in biodefense-related diagnostics. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:208-212.
2. Bodrossy L. Diagnostic oligonucleotide microarrays for microbiology. W: Blalock E, red. *A Beginner's Guide to Microarrays*. New York: KluwerAcad. Publ.;2003:43-92.
3. Heller MJ. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2002;4:129-53.
4. Call DR, Borucki MK, Loge FJ. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J Microbiol Methods* 2003;53:235-43.
5. Small J, Call DR, Brockman DJ, i in. Direct Detection of 16S rRNA in Soil Extracts by Using Oligonucleotide Microarrays. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4708-4716.
6. Wilson WJ, Strout CL, DeSantis TZ, i in. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol Cell Probes* 2002;16: 119-27.
7. Kakinuma K, Fukushima M, Kawaguchi R. Detection and identification of *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* by microarrays using the *gyrB* gene. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:721-2.
8. Chan K, Baker S, Kim CC, i in. Genomic Comparison of *Salmonella enterica* Serovars and *Salmonella bongori* by Use of an *S. enterica* Serovar Typhimurium DNA Microarray. *J Bacteriol* 2003;185:553-563.
9. Broekhuijsen M, Larsson P, Johansson A, i in. Genome-Wide DNA Microarray Analysis of *Francisella tularensis* Strains Demonstrates Extensive Genetic Conservation within the Species but Identifies Regions That Are Unique to the Highly Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:2924-31.
10. Sergeev N, Volokhov D, Chizhikov V, i in. Simultaneous Analysis of Multiple Staphylococcal Enterotoxin Genes by an Oligonucleotide Microarray Assay. *J Clin Microbiol* 2004;42:2134-43.
11. Zhou D, Han Y, Song Y, i in. DNA Microarray Analysis of Genome Dynamics in *Yersinia pestis*: Insights into Bacterial Genome Microevolution and Niche Adaptation. *J Bact* 2004;186:5138-46.
12. Radnedge L, Agron PG, Worsham PL, i in. Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiol* 2002; 148:1687-98.
13. Zwick ME, Mcaffee F, Cutler DJ, i in. Microarray-based resequencing of multiple *Bacillus anthracis* isolates. *Genome Biology* 2004;6:R10.
14. Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, i in. Comparative Whole-Genome Hybridization Reveals Genomic Islands in *Brucella* Species. *J Bact* 2004;186:5040-51.



15. Panicker G, Call DR., Krug MJ, i in. Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:7436-44.
16. Straub TM, Quinonez-Diaz MD, Valdez CO, i in. Using DNA microarrays to detect multiple pathogen threats in water. *Water Supply* 2004;2:107-14.
17. New Pathogen Identification Microarray to Offer Most Comprehensive Single Test for Biodefense. Affymetrix News Release. 19/10/04 ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))
18. Donlon M. Biosensors – the tool for fast detection. *The ASA Newsletter* 2005;107: 16-18.
19. Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, Identification of *Listeria* Species by Microarray-Based Assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:4720-28.
20. Bekal S, Brousseau R, Masson L, i in. Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *J Clin Microbiol* 2003;41:2113-25.
21. Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, i in. Microarray Analysis of Microbial Virulence Factors. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3258-63.
22. Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K, i in. Microarray-Based Identification of Thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4071-80.
23. Hong B, Jiang L, Hu Y, i in. Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections. *J Microbiol Methods* 2004;58: 403-11.
24. Wang R, Beggs ML, Robertson LH, i in. Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *FEMS Microbiol Lett* 2002;213:175-82.
25. Fukushima M, Kakinuma K, Hayashi H, i in. Detection and Identification of *Mycobacterium* Species Isolates by DNA Microarray. *J Clin Microbiol* 2003;41:2605-15.
26. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, i in. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;24:15687-92.
27. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, i in. *Mycobacterium* Species Identification and Rifampin Resistance Testing with High-Density DNA Probe Arrays. *J Clin Microbiol* 1999;37:49-55.
28. Yu X, Susa M, Knabbe C, i in. Development and Validation of a Diagnostic DNA Microarray To Detect Quinolone-Resistant *Escherichia coli* among Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:4083-91.
29. Robertson BH, Nicholson JKA. New Microbiology Tools for Public Health and Their Implications. *Annu Rev Public Health* 2005;26:281-302.

Otrzymano: 18.07.2006 r.

**Adres autora:**

Maria Karczmarczyk  
Ośrodek Diagnostyki i Zwalczenia Zagrożeń Biologicznych  
Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii  
Ul. Lubelska 2  
24-100 Puławy  
e-mail: [mariakarczmarczyk@o2.pl](mailto:mariakarczmarczyk@o2.pl)