ORIGINAL ARTICLE

Applying High-quality DNA Melting Curve Analysis in Identifying Staphylococcus aureus and Methicillin-resistant Strains

Hamed Tahmasebi[1],
Sanaz Dehbashi[2],
Mohammad Reza Arabestani[3,4]

[1] MSc in Medical Micobiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
[2] PhD Student in Medical Bacteriology Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[3] Associate Professor, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[4] Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

(Received February 12, 2018 ; Accepted June 2, 2018)

Abstract

Background and purpose: High Resolution Melting curve analysis DNA (HRM) is one of the most sensitive and precise methods for detecting *Staphylococcus aureus* and resistance to Methicillin. The aim of this study was to analyze the HRM for detection of methicillin-resistant *S. aureus* strains.

Materials and methods: In this experimental study, standard strains of *S.aureus* ATCC25923 and ATCC 33592 were used. To identify *S.aureus* from *ITS* gene and methicillin resistance, the *mecA* gene was used. Analysis was performed using StepOne v2.3 and HRM v3.0.1. Sequencing results were used as gold standard.

Results: The analytical sensitivity of the PCR method by *ITS* primer was capable of detecting 10^4 CFU bacteria and detecting bacteria for the *mecA* gene up to 10^3 CFU. The analytical sensitivity of the HRM method was also valid for *ITS* gene primer to dilute 10^{-2} CFU and the *mecA* gene primer up to a dilution of 10^{-5} CFU to detect bacteria. In HRM analysis, the lowest error rate was observed in the melting curves of DNA. Thus, considering the closest temperature range for analysis, the melting temperature for the *ITS* gene was 86 ± 0.5°C and for the *mecA* gene was 81± 0.5°C. The results of temperature and sequence determination proved the specificity of the HRM.

Conclusion: The HRM has high sensitivity and specificity for detecting low levels of bacteria.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistance, DNA Melting Curve, HRM

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (167): 83-93 (Persian).

* **Corresponding Author: Mohammad Reza Arabestani -** Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran (E-mail: zfotoukian@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۷ آذر سال ۱۳۹۷ (۹۳-۸۳)

آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا (HRM) به منظور شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* و سویه مقاوم به متی سیلین

حامد طهماسبی[۱]
ساناز ده باشی[۲]
محمد رضا عربستانی[۳و۴]

چکیده

سابقه و هدف: آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا (HRM) یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌ها جهت شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* و مقاومت به متی سیلین است. این مطالعه با هدف آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا، به منظور شناسایی سویه های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از سویه‌های استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ATCC25923 و ATCC 33592 استفاده شد. جهت شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* از ژن *ITS*، و مقاومت به متی‌سیلین از ژن *mecA* استفاده گردید. با استفاده از نرم‌افزارهای StepOne Software v2.3 و HRM Software v3.0.1 تجزیه و تحلیل انجام شد و نتایج تعیین توالی به عنوان گلد استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: حساسیت آنالیتیکی روش PCR با استفاده از پرایمر *ITS* قادر به شناسایی CFU 10^4 باکتری بوده و برای ژن *mecA* تا CFU 10^3 باکتری را تشخیص داد. حسایت آنالیتیکی روش HRM نیز برای پرایمر ژن *ITS* تا رقت CFU 10^{-2} و پرایمر ژن *mecA* تا رقت CFU 10^{-5} قدرت شناسایی باکتری را داشته است. در تجزیه و تحلیل نتایج HRM نیز کم‌ترین مقدار خطا در منحنی‌ها ذوب DNA مشاهده گردید به طوری که، با در نظر گرفتن نزدیک ترین بازه دمایی به منظور تجزیه و تحلیل، دمای ذوب برای ژن *ITS* مقدار ۰/۵± ۸۶ درجه سلسیوس و برای ژن *mecA* مقدار ۰/۵± ۸۱ درجه سلسیوس به دست آمد. نتایج دما و تعیین توالی اختصاصیت بالای روش HRM را نشان داد.

استنتاج: روش HRM از نظر تشخیص مقدار کم باکتری، دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می باشد.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوک اورئوس*، مقاومت به متی سیلین، منحنی ذوب DNA، HRM

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی به عنوان یک مشکل عمده جهانی مطرح بوده و *استافیلوکوک اورئوس*، یکی از مهم‌ترین باکتری‌های ایجادکننده این عفونت‌ها می‌باشد که به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، مقاومت گسترده‌ای پیدا کرده است(۱،۲). *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) که توسط یک

مولف مسئول: محمدرضا عربستانی: همدان- دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com
۱: کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲: دانشجوی دکتری باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳: دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۴: مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۱۱/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۱۱/۲۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۳/۱۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

قطعه کروموزومی تحت عنوان *SCCmec* ایجاد می شود طی چند دهه اخیر افزایش قابل توجهی داشته است(۳). ژن *mecA* پروتئینی تحت عنوان PBP2a تولید می کند که تمایل کمی برای اتصال به داروهای بتالاکتام دارد، و توسط این داروها مهار نمی گردد(۴، ۵). سویه MRSA به دو گروه سویه‌های ایجادکننده عفونت در بیمارستان (HA-MRSA) و سویه‌های ایجادکننده عفونت در جامعه (CA-MRSA) تقسیم‌بندی می‌شود که عمدتا ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بر عهده HA-MRSA است(۶). ژن *ITS* که برای اولین بار توسط Gürtler and Barrie در *استافیلوکوک اورئوس* شناسایی گردید، یک ژن دخیل در رونویسی و وابسته به توالی 16S-23S rRNA است(۷). شناسایی توالی‌های فاصله انداز در *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین توسط برخی اپرون‌ها، مانند *rrn* کنترل می گردد که نقش مهمی در تنظیم ژن *ITS* در این باکتری دارد و براساس چیدمان اسید آمینه‌های مختلف می‌تواند گونه‌های مختلف استافیلوکوک را توسط آن تشخیص داد(۹،۸). شیوع سویه‌های HA-MRSA در جامعه و انتشار هر چه بیش‌تر سویه‌های CA-MRSA که به کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مقاومت کسب کرده‌اند، شناسایی سریع و دقیق این سویه‌ها را به امری جدی تبدیل کرده است(۶). با این حال، روش‌های شناسایی مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک به طور کل به دو دسته فنوتیپی و ژنوتیپی تقسیم‌بندی می‌شود. روش‌های آگلوتیناسیون لاتکس، انتشار از دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم، تعیین حداقل غلظت مهاری سفوکسیتین جز فنوتیپی به شمار می‌روند(۱۰). از مهم‌ترین روش‌های ژنوتیپی، PCR و تکنیک‌های وابسته به آن می‌باشد که امروزه به دلیل سرعت، دقت و حساسیت بالای آن، مورد استقبال زیادی قرار گرفته است. تکنیک سنجش حضور ژن در زمان واقعی و یا Real-Time PCR، این قابلیت را داراست که حضور و فعالیت ژن‌های مختلف را در لحظه، مورد بررسی قرار دهد(۱۲،۱۱). Real-Time PCR نیز دارای ویژگی‌های مختلفی است که بنا به شرایط کاری و نوع مطالعه می‌توان آن را تعریف کرد که واحد شناسایی بر اساس دمای ذوب DNA یکی از این موارد می‌باشد(۱۳). در حال حاضر، استفاده از روش‌های مبتنی بر ذوب DNA مانند MCA (Melting Curve Analysing) و یا HRM (High Resolution Melting) به علت حساسیت و اختصاصیت بالا، استقبال خوبی از آن‌ها به منظور کارهای تشخیصی شده است. HRM، اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط دانشگاه ایداهو ایالات متحده معرفی شد. این روش، روشی جدید و همگن بعد از تکثیرPCR است که در یک لوله دربسته انجام می‌شود و آنالیز تغییرات ژنتیکی (SNPs، موتاسیون‌ها و متیلاسیون‌ها) در محصولات PCR را مقدور می‌سازد(۱۱).

HRMنمونه‌های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و حجم GC متمایز می‌سازد(۱۴). آنالیز HRM شامل تکثیر ژن مورد نظر در قطعات ۸۰ تا ۲۶۰ جفت بازی، در واکنشی است که محتوی رنگ متصل شونده به DNA دو رشته ای فلورسنت می‌باشد(۱۵). اساس کار این تکنیک بر پایه استفاده از الگو و رفتار ذوب رشته‌های DNA در یک دمای مشخص که وابستگی زیادی به پرایمر مورد استفاده دارد، استوار است. در تعریف دمای ذوب DNA، به دمایی که در آن نیمی از رشته‌های DNA به صورت تک رشته و نیمی دیگه به صورت دو رشته باشند، دمای ذوب یا Melting گفته می‌شود. الگوی تک رشته شدن برای DNA کاملاً اختصاصی می‌باشد و جایگاه و توالی ژن مورد مطالعه، این اختصاصیت و حساسیت را مشخص می کند(۱۷،۱۶،۱۲). اگر چه، استفاده از روش HRM به خودی خود، کیفیت بسیار بالایی در شناسایی ژن‌های مجهول دارد، اما استفاده از پرایمرهای اختصاصی و سایت‌های هدف مناسب نیز، نقش بسیار مهمی را در بالاتر بردن این کیفیت بازی می کند. زیرا در برخی مواقع در صورت عدم طراحی مناسب پرایمرها و دقت پایین در تعیین سایت هدف، نمی‌توان به تشخیص دقیق و درستی رسید و باید از روش‌های تکمیلی برای از

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

بین بردن این خطاها استفاده کرد. همچنین می‌توان، با استفاده از رقت‌های چندگانه و متنوع، حساسیت و اختصاصیت پرایمر های طراحی شده به طور دقیق مورد ارزیابی قرار بگیرد تا عملکرد آن در شناسایی باکتری در تعداد کم بررسی گردد(۱۲). با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این مطالعه، شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* و مقاومت به متی‌سیلین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ITS* و *mecA* می‌باشد تا بتوان روشی مناسب و با عملکرد بالا جهت تشخیص سریع این باکتری پیشنهاد داد.

مواد و روش ها

انتخاب سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس

در این مطالعه تجربی، از سویه‌های استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ATCC25923 و ATCC33592 استفاده شد. جهت آماده سازی این سویه ها، کشت اولیه بر روی محیط بلاد آگار (Merck، آلمان) با ۵ درصد خون گوسفند (آزما پرشین طب، ایران) صورت گرفت و بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته، کلنی‌های خالص مورد استفاده قرار گرفتند(۳).

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (Sinaclon، ایران) صورت گرفت. برای این کار، بعد از کشت ایزوله، چند کلنی از هر ایزوله کشت داده شده به ۵ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (sigma-aldrich، آمریکا) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه (Memmert، آلمان) گردید. ۱/۵ سی سی از محیط کشت حاصل بعد از سانتریفیوژ (Eppendorf، آلمان) در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به منظور پیشبرد سایر مراحل، آماده‌سازی شد. درون میکروتیوب‌های درب دار ۱/۵ پلاستیکی (Biofill، کره) ریخته شد و مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج سینا کلون (Sinaclon، ایران) ایران انجام گردید.

انتخاب سایت هدف و طراحی پرایمر

سایت‌های هدف انتخاب شده برای باکتری *استافیلوکوک اورئوس ITS* و برای سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین ژن *mecA* تعیین شد. با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Runner نسخه ۵، ۶ و Allel ID نسخه ۶ (Premierbiosoft، آمریکا) طراحی پرایمرها با کمک گرفتن از الگوی ژنی در بانک ژنی NCBI صورت گرفت. به منظور تعیین دمای ذوب DNA و اتصال پرایمرهای طراحی شده از نرم‌افزار Oligo 6 کمک گرفته شد. در نهایت، به منظور بررسی‌های بیوانفورماتیک پرایمر های طراحی شده، عملکرد آن ها در شناسایی سایت های مورد نظر، در بانک اطلاعاتی NCBI طی Blast مورد بررسی قرار گرفت. لیست پرایمر های مورد استفاده برای تکثیر ژن های مورد مطالعه در جدول شماره ۱ بیان شده است.

تعیین حساسیت و اختصاصیت پرایمرها

برای تعیین حساسیت پرایمر های طراحی شده، با در نظر گرفتن رقت اولیه محلول نیم مک فارلند که مقدار CFU ^{8}۱۰ x ۱/۵ باکتری می‌باشد، با ثابت در نظر گرفتن ضریب، رقت ها به ترتیب به صورت ^{7} ۱۰، ^{6} ۱۰، ^{5} ۱۰، ^{4} ۱۰، ^{3} ۱۰، ^{2} ۱۰، ^{1} ۱۰، ^{0} ۱۰، $^{-1}$ ۱۰، $^{-2}$ ۱۰، $^{-3}$ ۱۰ و $^{-4}$ ۱۰ (با معیار CFU برای تمامی رقت‌ها) تهیه گردید. در صورت شناسایی باکتری در غلظت‌های ^{7} ۱۰ و $^{-4}$ ۱۰

جدول شماره ۱: لیست پرایمر های مورد استفاده برای تکثیر ژن های مورد مطالعه

ژن	پرایمر	توالی نوکلئوتید ها	دمای ذوب	طول آمپلیکون (جفت باز)	منبع
ITS	*ITS*-F	F: GTTAGAGCGCACGCCTGATA	۸۶.۰±/۵	۱۵۵	(۱۳)
	ITS-R	R: AATGGTGGAGACTAGCGGGA			
mecA	*MECA*-F	F: GGCTCAGGTACTGCTATCCAC	۸۱±۰/۵	۲۹۷	(۱۳)
	MECA-R	R: AACGTTGTAACCACCCCAAGA			

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

حساسیت آنالیتیکی باکتری تعیین شد. جهت بدست آوردن اختصاصیت نیز، با تعیین دمای ذوب و اتصال DNA و پرایمرها، هر ۱۲ رقت در یک دمای مشخص مورد بررسی قرار گرفت. برای ژن *ITS* دمای ۰/۵± ۸۶ درجه سلسیوس و برای ژن *mecA* دمای ۰/۵± ۸۱ درجه سلسیوس تعیین شد و اختصاصیت آنالیتیکی بر مبنای شناسایی باکتری در همه رقت با یک دما (با خطای ۰/۵± درجه سلسیوس) مشخص گردید(۱۱).

آماده سازی پرایمرها و واکنش PCR

پرایمر ها در ابتدا توسط شرکت ماکرو ژن کره به سفارش شرکت پیشگام ایران سنتز گردید. به منظور تعیین حساسیت روش و اختصاصیت روش PCR از رقت‌های DNA ژنومی استفاده گردید. همه رقت‌ها در شرایط یکسان در یک واکنش دستگاهی (OneRun) برای تکثیر ژن‌های *ITS* و *mecA* مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام واکنش PCR برای هر رقت شامل ۱۲ میکرو لیتر از مستر میکس (Ampliqon آلمان)، ۱ میکرولیتر از DNA های رقیق شده و ۲ میکرولیتر از هر پرایمر به غلظت ۲۰پیکو مولار بوده است. برای تکثیر ژن های مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) با تنظیمات سیکل دمایی به صورت شوک حرارتی ۹۴ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، و تعداد ۲۵ سیکل به صورت ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه اعمال شد.

دمای انلینگ برای هر دو ژن ۵۹ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه تعیین شد. طویل شدن نهایی هم در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

پیکر بندی مراحل Real-Time PCR و آزمون HRM

در این مطالعه از دستگاه Real-Time PCR (ABI-StepOne Plus، آمریکا) استفاده گردید و تمامی مراحل کار در سه تکرار صورت گرفت. چرخه دمایی با مقادیر ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه به منظور تکثیر ژن، و مراحل تعیین دمای ذوب (Melting) در حالت خوانش متوالی با Ramp دمایی ۰/۳ درجه سلسیوس از حداقل بازه دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سلسیوس تنظیم گردید. محلول نهایی به منظور انجام آزمون HRM در حجم ۲۰ میکرو لیتر، شامل ۴ میکرو لیتر مستر میکس HRM HighRox (Solid-Biodyns، کره)، ۲ میکرو لیتر از هر پرایمر (غلظت ۲۰پیکو مولار) و ۱ میکرو لیتر DNA الگو بوده است. حجم باقی مانده با محلول DEPC (Sigma-Aldrich، آمریکا) جبران شد و در تمامی مراحل از DNA های رقیق شده استفاده گردید. در تمامی مراحل از نرم‌افزارهای StepOne Software v2.3 و HRM Software v3.0.1 استفاده شد.

تعیین توالی محصولات

محصولات به دست آمده از تکثیر ژن ها جهت تعیین توالی، توسط شرکت پیشگام ایران، به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید و نتایج حاصله، به منظور داشتن استاندارد طلایی جهت مقایسه روش‌های مورد مطالعه، مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های به دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (IBM، آمریکا) مورد بررسی، تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای این منظور از روش‌های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) استفاده شد. از نرم افزار Chromas نسخه ۱، ۵ (Technelysium، استرالیا) برای آنالیز نتایج حاصل از تعیین توالی پرایمر های طراحی شده، استفاده گردید.

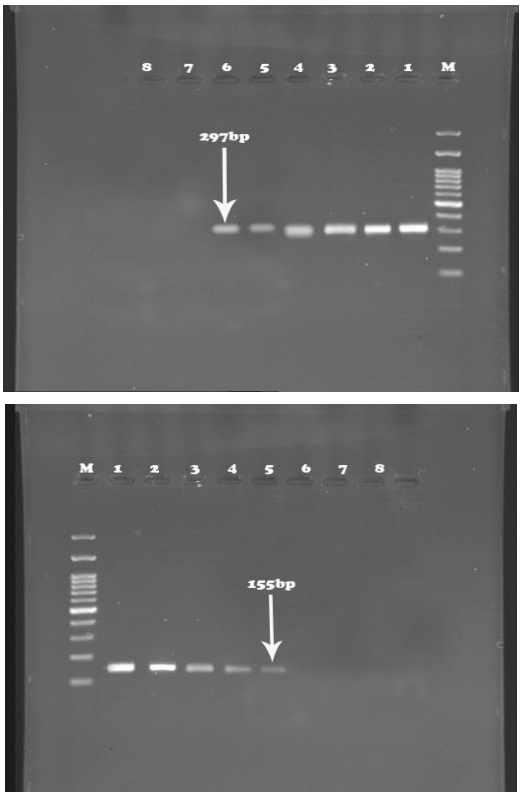
یافته ها

نتایج حاصل حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکی روش PCR

با در نظر گرفتن، غلظت نیم مک فارلند به عنوان استاندارد اولیه به منظور تعیین حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکی، ژن‌های *ITS* و *mecA* برای رقت‌های مختلف تکثیر شدند. نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

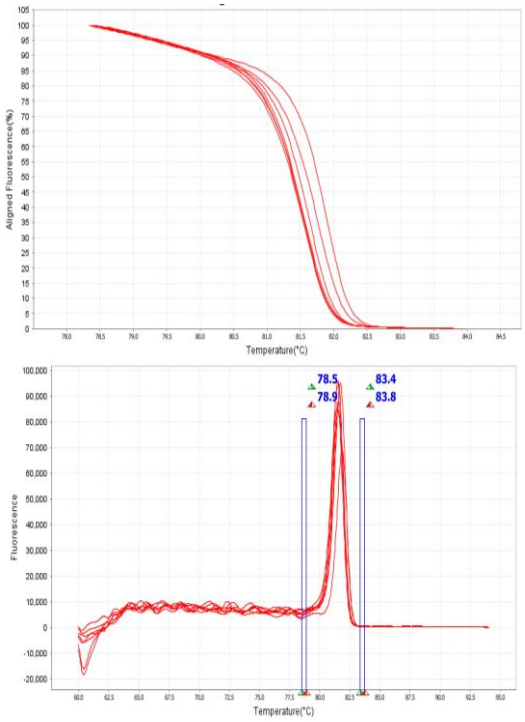
درصد نشان داد که حساسیت آنالیتیکی روش PCR برای ژن *ITS* تا رقت CFU 10^{4} و برای ژن *mecA* تا رقت CFU 10^{3} بوده است. اختصاصیت این روش نیز با تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده از تعیین توالی مشخص شد (تصویر شماره ۱).



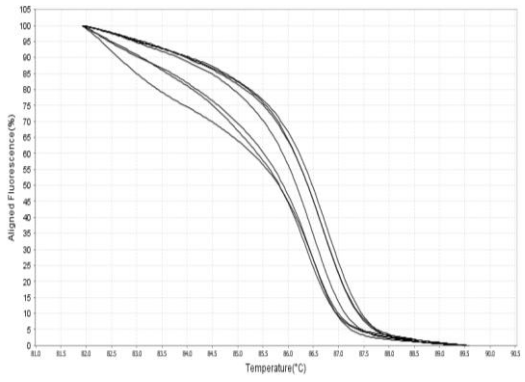
تصویر شماره ۱: تصویر ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد مربوط به تکثیر ژن *mecA* (سمت راست) با طول ۲۹۷ جفت باز و ژن *ITS* (سمت چپ) با طول ۱۵۵ جفت باز، چاهک ۱ رقت 10^{8} چاهک ۲ رقت 10^{7}، چاهک ۳ رقت 10^{6}، چاهک ۴ رقت 10^{5}، چاهک ۵ رقت 10^{4}، چاهک ۶ رقت 10^{3}، چاهک ۷ رقت 10^{2}، چاهک ۸ رقت 10^{1}، M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

نتایج حاصل حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکی روش HRM

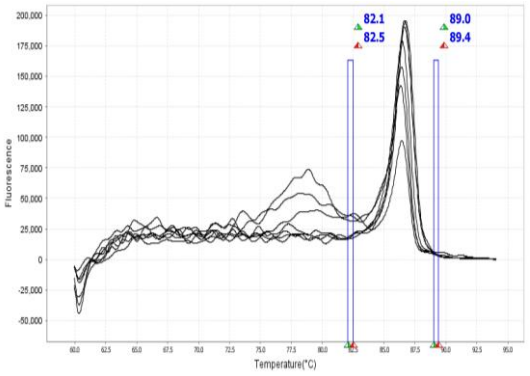
بر اساس نتایج حاصل از تکثیر و آنالیز نمودارهای به‌دست آمده در آزمون HRM، حسایت آنالیتیکی روش HRM برای پرایمر ژن *ITS* تا رقت CFU 10^{-2} و پرایمر ژن *mecA* تا رقت CFU 10^{-5}، قدرت شناسایی باکتری را داشته است. در تجزیه و تحلیل نتایج HRM نیز کم‌ترین مقدار خطا در منحنی‌ها ذوب DNA مشاهده شد به طوری که، با در نظر گرفتن نزدیک ترین بازه دمایی به منظور تجزیه و تحلیل، دمای ذوب برای ژن *ITS* مقدار ۰/۵ ± ۸۶ درجه سلسیوس و برای ژن *mecA* مقدار ۰/۵ ± ۸۱ درجه سلسیوس بدست آمد. نتایج دما و تعیین توالی اختصاصیت بالای روش HRM را نشان داده است. نمودار شماره ۱ منحنی HRM حاصل از تکثیر ژن *mecA* عامل مقاومت به متی سیلین و نمودار شماره ۲ منحنی HRM حاصل از تکثیر ژن *ITS*/*استافیلوکوک اورئوس* را نشان می دهد.



نمودار شماره ۱: منحنی HRM حاصل از تکثیر ژن *mecA* عامل مقاومت به متی سیلین



[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]



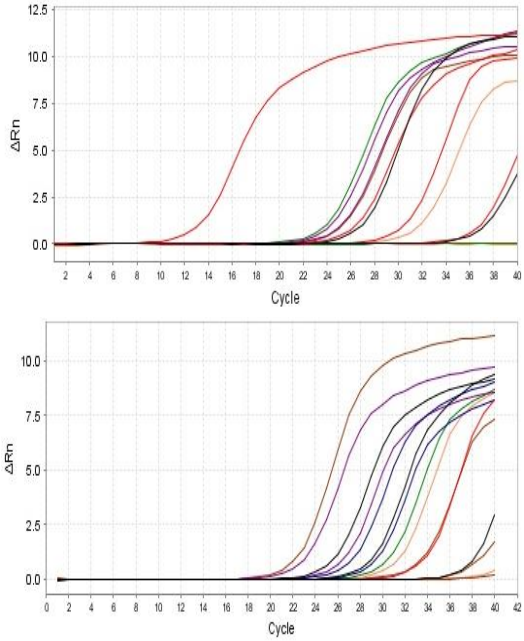
نمودار شماره ۲: منحنی HRM حاصل از تکثیر ژن *ITS استافیلوکوک اورئوس*

بر اساس دمای حاصل از ذوب DNA و مصر مقادیر فلورسنت محیطی، میزان مصرف فلورسنت با رقت‌های مورد مطالعه رابطه مستقیم داشته است به طوری که در رقت 10^{8} میزان مصرف فلورسنت به حداکثر خود رسیده و قله حاصل از نمودارها به صورت کاملا کشیده نمایش داده شد. این در حالی است که در رقت 10^{-4} و 10^{-3} مقادیر مصرف فلورسنت محیط بسیار کم بوده و نمودارهای حاصل شده دارای ارتفاع کم‌تری بودند (نمودار شماره ۱ و ۲).

منحنی‌های حاصل از تکثیر ژن‌های *ITS* و *mecA* نیز در رقت‌های مختلف، CT های مختلفی نشان دادند، به‌طوری که در غلظت استوک نیم مک فارلند کم‌ترین مقدار CT نشان داده شد و در رقت‌های بعدی مقادیر CT به تناسب رقت‌ها افزایش بیش‌تری داشت. برای ژن *mecA* آغاز تکثیر از CT با مقدار ۱۱ و برای ژن *ITS* از CT با مقدار ۱۸ شروع شد. در نمودار شماره ۳ منحنی‌های تکثیر ژن *mecA* و ژن *ITS* نشان داده شده است.

نتایج حاصل از تعیین توالی

با تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از تعیین توالی رقت‌های مختلف در بانک ژنی NCBI، همه رقت‌های ژن *mecA* با شماره دسترسی NG_047938.1 مشاهده، و همه رقت‌های ژن *ITS* نیز با شماره دسترسی CP026080.1 شناسایی شدند.



نمودار شماره ۳: منحنی های تکثیر ژن *mecA* (سمت راست) و ژن *ITS* (سمت چپ)

بحث

استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و روش‌های تشخیص آن، ارتباط مستقیمی در کنترل عفونت‌های منتشره حاصل از این باکتری دارد. روش رایج تشخیص این باکتری و سویه‌های مقاوم آن که بر مبنای تست‌های بیوشیمیایی می‌باشد، که در کنار وقت‌گیر بودن، ممکن است با خطا نیز همراه باشد(۱۹،۱۸). از این رو، برای به حداقل رساندن زمان تشخیص و خطای تست‌های مورد استفاده، به‌کارگیری روش‌های حساس‌تر و اختصاصی‌تر امری ضروری است. آنالیز نتایج حاصل از این مطالعه، قدرت و دقت روش HRM را در کنار سرعت بالای آن نشان داد. بر این اساس می‌توان با صرف کم‌ترین زمان ممکن سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را شناسایی کرد. شاید چنین قلمداد شود که استفاده از روش‌هایی هم‌چون HRM با وجود روش‌های ساده‌تر و ارزان‌تر مانند MCA چندان منطقی نباشد، اما نباید این نکته را فراموش کرد که روند انجام تست HRM چندین هدف مختلف را دنبال می‌کند که

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

یکی از آن‌ها تشخیص می‌باشد. دسته‌بندی و ژنوتایپینگ و بررسی جهش‌های احتمالی سویه‌ها از جمله مواردی است که می‌توان در کنار تشخیص به آن رسید. با انجام تست HRM و شناسایی سویه‌های مقاوم به متی سیلین، با بررسی جایگاه‌های جهش در کنار تعیین توالی، می‌توان علت مقاومت را نیز مورد بررسی قرار داد(۲۱،۲۰). در مطالعه حاضر، با هدف قرار دادن سایت‌های هدف جهت شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* و مقاومت به متی‌سیلین، حساسیت و اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده نیز با موفقیت انجام گرفت. این که، پرایمرهای اختصاصی چه نقشی در کیفیت نتایج دارند را می‌توان در برخی مطالعات مشاهده کرد. در مطالعاتی که Xiao و همکاران در سال ۲۰۱۴ در چین انجام دادند، چندین باکتری مختلف مورد آزمایش قرار داده و با استفاده از روش HRM *استافیلوکوک اورئوس* را شناسایی کردند که حداکثر توان پرایمرهای طراحی شده در آن قادر به شناسایی CFU 10^{1} باکتری بوده است. در این مطالعه پرایمرهای طراحی قدرت شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* تا رقت 10^{-3} و برای مقاومت به متی سیلین مقدار 10^{-4} ثبت شد که بدین معنا است، ژن *ITS* و *mecA* قادر به شناسایی باکتری در تعداد بسیار کم نیز می‌باشند(۲۲). از مطالعات همسو با نتایج مطالعه حاضر می توان به مطالعات Tong در سال ۲۰۰۹ در استرالیا و Wong و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مالزی اشاره کرد که به شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* با روش HRM پرداختند. در مطالعه آن‌ها حساسیت و دقت روش مورد نظر در آلودگی‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت و بیان گردید که تنظیم رقت‌های مناسب، بدست آوردن دمای دقیق ذوب DNA و هم‌چنین استفاده از پرایمرهای اختصاصی مهم‌ترین فاکتورهایی می‌باشند که باید در روش HRM مد نظر قرار گرفته شوند(۲۴،۲۳). با توجه به موارد مشابه در مطالعات ذکر شده، در مطالعاتی که Tong و همکاران در سال ۲۰۱۲ در استرالیا داشتند، در شناسایی باکتری *استافیلوکوک اورئوس* و جهش‌های ژنی، از پروتکل تک مرحله‌ای (single-step) جهت بالا بردن سرعت کار و کاهش زمان واکنش استفاده کردند. استفاده از این پروتکل بنا به طول و توالی‌های نوکئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده، متفاوت است. در مطالعه حاضر، از پروتکل دو مرحله ای استفاده گردید که تفاوت الگوی نولکئوتیدی در پرایمرهای طراحی شده، بهترین نتایج را در روش دو مرحله‌ای نسبت به روش تک مرحله‌ای نشان داده است(۱۷). اگرچه، یکی از موضوعات مهمی که در زمینه تشخیص مطرح است، تفاوت و اختلاف در قرارگیری بازهای نولکئوتیدی می‌باشد که می‌تواند نتایج تست‌های حساسی مانند HRM را تحت تاثیر خود قرار دهد. در مطالعه Bratchikov و همکاران در سال ۲۰۱۱ در لیتوانی، نشان داده شد در روش HRM گاها تفاوت هایی در نتایج ممکن است دیده شود. از مهم‌ترین دلایل آن می توان به متغیر بودن C+G در ایزوله‌های مختلف و تاثیر شرایط محیطی و غیر محیطی بر آن‌ها باشد. از این جهت، ممکن است گاهی در شناسایی سویه‌های مقاوم با استفاده از روش HRM با برخی زیر سویه‌های جدید مواجه شد که این به نوبه خود یکی از برتری‌های این روش به شمار می روند. در مطالعه حاضر به دلیل استفاده از سویه‌های استاندارد اثبات چنین موضوعی امکان پذیر نبوده است(۲۵). شاید این تصور در ذهن شکل بگیرد که مقایسه روش‌های تشخیصی که مدت‌هاست بر مبنای اصول فنوتیپی و بیوشیمیایی در بسیاری از مراکز تشخیصی انجام می گیرد با روش‌های مولکولی مدرن چندان کار مناسبی نباشد، چرا که روش‌های فنوتیپی مانند کشت، کیفیت و استاندارد خود را به اثبات رسانده‌اند. این در حالی است که بسیاری از مواقع ممکن است بیماری با یک سپتیسمی و یا باکتریمی به پزشک مراجعه نماید و یا دچار عفونت‌های منتشره استافیلوکوکی شده باشد که به درمان پاسخ نمی‌دهد، در چنین مواقعی روش‌های فنوتیپی و مبتنی بر کشت هیچ کمکی به بیمار نمی‌کنند و حتی ممکن کندی در الصاق پاسخ و تعیین نوع جنس،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

گونه و سویه باکتری، بعد از مرگ بیمار مشخص شود. لذا، با کمک گرفتن از روش‌هایی هم‌چون HRM در کنار سایر روش‌های دیگر می‌تواند ارزش اخباری هر روش را در جایگاه مناسب خود استفاده کرد. در بررسی‌های صورت گرفته توسط Krawczyk و همکاران در سال ۲۰۰۷ در روسیه با کنار هم قرار دادن روش‌های کشت و HRM و استفاده از تعیین توالی به عنوان استاندارد طلایی، در شناسایی یکی از گونه‌های استافیلوکوک مقاوم به آنتی‌بیوتیک مشخص گردید که روش‌های مبتنی بر کشت ممکن است در برخی موارد تشخیصی خطای بالایی را به همراه داشته، و در نهایت سبب بروز مثبت و منفی‌های کاذب شوند(۲۶). با توجه به مطالب ذکر شده، روش HRM دارای حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت شناسایی گونه و سویه‌های باکتریایی است، به‌طوری‌که حتی در رقت‌های بسیار کم نیز قادر به شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* می‌باشد. با در نظر گرفتن کم‌ترین و بیش‌ترین رقت مورد بررسی در این مطالعه و نتایج یکسان در تمامی رقت‌ها نشان داده شد که پرایمرهای طراحی شده در کنار روش HRM می‌تواند پزشکان را در تشخیص سریع تر عفونت و نوع باکتری کمک کند. استفاده از این روش در کنار روش‌هایی مانند کشت، نتایج به‌دست آمده را با کیفیت بیش‌تری همراه می کند.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی دانشجویی در سال ۱۳۹۶ با شماره ۹۶۰۹۲۸۶۰۸۱ و کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1396.637 می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارد.

References

1. Warren DK, Prager M, Munigala S, Wallace MA, Kennedy CR, Bommarito KM, et al. Prevalence of qacA/B Genes and Mupirocin Resistance Among Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates in the Setting of Chlorhexidine Bathing Without Mupirocin. Infect Control Hosp Epidemiol 2016; 37(5): 1-8.
2. Taheri N, Abtahi H, Amozande-Nobaveh A, Zarinfar N, Ghaznavi-Rad E. The Antibiotic Resistant Determinant of Pathogenic Bacteria Isolated from Medical Equipment and Hospital Environment in Valiasr Hospital, Arak, 2013. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(114): 60-73 (Persian)
3. Tahmasebi H, Zeiyni B, Dehbashi S, Motamedi H, Vafaeifar M, Keramat F, et al. The Study of blaZ and mecA Gene Expression in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains and the Relationship between the Gene Expression Patterns. J Isfahan Med Sch; 2017; 35(443): 1062-1067 (Persian).
4. Bleiziffer I, Eikmeier J, Pohlentz G, McAulay K, Xia G, Hussain M, et al. The Plasmin-Sensitive Protein Pls in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Is a Glycoprotein. PLoS Pathog 2017; 13(1): e1006110.
5. Dehbashi S, Tahmasebi H, Zeyni B, Arabestani M. The Relationship between Promoter-Dependent Quorum Sensing Induced Genes and Methicillin Resistance in Clinical Strains of Staphylococcus aureus. J Zanjan Univ Med Sci 2018; 26(116): 75-87 (Persian).
6. Rezai S, Peyravii Ghadikolaii F, Ahanjan M, Valadan R, Ahangarkani F, Rezai MS, et al. Prevalence of Nasal Carriage Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus with mecA Gene among Healthy Primary School Boys in North of Iran; A Cross-Sectional Study.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

Int J Pediatr 2017; 5(12): 6515-6525.

7. Gurtler V, Barrie HD. Typing of Staphylococcus aureus strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. Microbiology 1995; 141(Pt 5): 1255-1265.
8. Fujita S. Internal transcribed spacer (ITS)-PCR identification of MRSA. Methods Mol Biol 2014; 1085: 97-102.
9. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, de Lencastre Hn. Identification of Clinical Staphylococcal Isolates from Humans by Internal Transcribed Spacer PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39(9): 3099-3103.
10. Bokaeian M, Tahmasebi H, Shahraki Zahedani S. Comparison of Susceptibility Testing of E-test Strips with Cefoxitin and Oxacillin Disks in Identification of Methicillin-resistant Staphylococcus saprophyticus Strains. Qom Univ Med Sci J 2017; 11(5): 116-126 (Persian).
11. Arabestani MR, Tahmasebi H, Zeyni B. Diagnostic Value of Melting Curve Analysis Based on Multiplex-Real Time PCR in Identification of Enterococci Species. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26(145): 234-247 (Persian).
12. Chernukha IM, Minaev MY, Kurbakov KA, Bataeva DS. Detection and Identification of S. Carnosus in Starter Cultures Using Real Time PCR and Subsequent HRM Analysis of Amplification Products. Procedia Food Science 2015; 5: 38-41.
13. Heydari N, Alikhani MY, Azizi Jalilian F, Tahmasebi H, Arabestani MR. Evaluation of real time PCR for detection of clinical isolates of Staphylococcus aureus and methicillin-resistance strains based on melting curve analysis method. Koomesh 2017; 19(4): 877-886 (Persian).
14. Hosseini SJ, Nazemi A, Hashemi M, Miri Nargesi M, Sharifi SA. Application of high resolution melting technique for detection of germ line single nucleotide polymorphisms in STK11 gene among patients with various gastrointestinal cancers. Medical Science Journal 2012; 21(4): 233-237 (Persian).
15. Noori-Daloii MR, Faraji K. High Resolution Melt Analysis (HRM) and its Strategic Applications Especially in Molecular Genetics. Horizon Med Sci 2016; 22(1): 77-88 (Persian).
16. Chen JH, Cheng VC, Chan JF, She KK, Yan MK, Yau MC, et al. The use of high-resolution melting analysis for rapid spa typing on methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. J Microbiol Methods 2013; 92(2): 99-102.
17. Tong SYC, Giffard PM. Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3418-3421.
18. Arabestani MR, Abdoli Kahrizi M. Determining the Agr Gene Variety (Accessory Gene Regulator) in Susceptible and Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains in Clinical Samples and Carriers Employed in Remedial Centers. J Arak Univ Med Sci 2016; 18(11): 44-53 (Persian).
19. Bokaeian M, Tahmasebi H. Molecular Identification of Genes Responsible for Resistance to Aminoglycosides and Methicillin in Clinical Samples of Staphylococcus Aureus. J Babol Univ Med Sci 2017; 19(3): 38-46 (Persian).
20. Zeinzinger J, Pietzka AT, Stöger A, Kornschober C, Kunert R, Allerberger F, et al. One-Step Triplex High-Resolution Melting Analysis for Rapid Identification and Simultaneous Subtyping of Frequently Isolated Salmonella Serovars. Appl Environ Microbiol 2012; 78(9): 3352-3360.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]

21. Sheikh Ghomi S, Farnia P, Darbouy M. Detection of rpoB, inhA and katG Genes Mutations in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis by Real-Time PCR Based on Taqman and HRM Assays. J Ardabil Univ Med Sci 2014; 14(2): 147-157 (Persian).
22. Xiao X-l, Zhang L, Wu H, Yu Y-g, Tang Y-q, Liu D-m, et al. Simultaneous detection of Salmonella, Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus by multiplex real-time PCR assays using high-resolution melting. Food Analytical Methods 2014; 7(10): 1960-1972.
23. Wong YP, Chua KH, Thong KL. One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection. J Microb Methods 2014; 107: 133-137.
24. Tong SY, Lilliebridge RA, Holt DC, McDonald MI, Currie BJ, Giffard PM. High-resolution melting analysis of the spa locus reveals significant diversity within sequence type 93 methicillin-resistant Staphylococcus aureus from northern Australia. Clin Microbiol Infect 2009; 15(12): 1126-1131.
25. Bratchikov M, Mauricas M. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for Salmonella spp. genotyping: HRM application for Salmonella spp. subtyping. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71(3): 192-200.
26. Krawczyk B, Leibner J, Stojowska K, Bronk M, Samet A, Kur J. PCR melting profile method for genotyping analysis of vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates from Hematological Unit patients. Pol J Microbiol 2007; 56(2): 65-70.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-18]