

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

Hamed Tahmasebi¹,
Sanaz Dehbashi²,
Mohammad Reza Arabestani^{3,4}

¹ MSc in Medical Microbiology, 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 10⁴ CFU bacteria and detecting bacteria for the *mecA* gene up to 10³ 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)

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^{۳،۴}

چکیده

سابقه و هدف: آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا (HRM) یکی از حساس ترین و دقیق ترین روش ها 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 روش ها: در این مطالعه تجربی، از سویه های استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC 33592 و ATCC 25923 استفاده شد. جهت شناسایی استافیلوکوک اورئوس از ژن *ITS*، و مقاومت به متی سیلین از ژن *mecA* استفاده گردید. با استفاده از نرم افزارهای 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.

یافته ها: حساسیت آنالیتیکی روش PCR با استفاده از پرایمر *ITS* قادر به شناسایی 10^4 CFU باکتری بوده و برای ژن *mecA* تا 10^3 CFU باکتری را تشخیص داد. حساسیت آنالیتیکی روش HRM نیز برای پرایمر ژن *ITS* تا رقت 10^{-2} CFU و پرایمر ژن *mecA* تا رقت 10^{-5} CFU قدرت شناسایی باکتری را داشته است. در تجزیه و تحلیل نتایج HRM نیز کم ترین مقدار خطا در منحنی ها 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 $86 \pm 0/5$ درجه سلسیوس و برای ژن *mecA* مقدار $81 \pm 0/5$ 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

عفونت های بیمارستانی به عنوان یک مشکل عمده جهانی مطرح بوده و استافیلوکوک اورئوس، یکی از مهم ترین باکتری های ایجاد کننده این عفونت ها می باشد که به دلیل استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های مختلف، مقاومت گسترده ای پیدا کرده است (۱،۲). استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) که توسط یک

E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد رضا عربستانی: همدان- دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی

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

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 HRM (High Resolution Melting) و MCA (Melting Curve Analysing) 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 تکثیر PCR است که در یک لوله در بسته انجام می‌شود و آنالیز تغییرات ژنتیکی (SNPs، موتاسیون‌ها و متیلاسیون‌ها) در محصولات PCR را مقدور می‌سازد (۱۱).

HRM نمونه‌های 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 دیگر 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 می‌کند (۱۲، ۱۶، ۱۷). 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 می‌کند. 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

قطعه کروموزومی تحت عنوان *SCCmec* ایجاد می‌شود طی چند دهه اخیر افزایش قابل توجهی داشته است (۳). ژن *mecA* پروتئینی تحت عنوان PBP2a تولید می‌کند که تمایل کمی برای اتصال به داروهای بتالاکتام دارد، و توسط این داروها مهار نمی‌گردد (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 عمدتاً 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 *rsm* کنترل می‌گردد که نقش مهمی در تنظیم ژن *ITS* در این باکتری دارد و بر اساس چیدمان اسید آمینه‌های مختلف می‌تواند گونه‌های مختلف استافیلوکوک را توسط آن تشخیص داد (۸، ۹). 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 مهارتی 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 (۱۱، ۱۲). Real-Time PCR نیز دارای ویژگی‌های مختلفی است

بین بردن این خطاها استفاده کرد. همچنین می‌توان، با استفاده از رقت‌های چند گانه 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 ATCC33592 و ATCC25923 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 برات (sigma-aldrich، آمریکا) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35 ± 2 درجه سانتی‌گراد انکوبه (Mermert، 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 آن‌ها 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 $10^8 \times 1/5$ باکتری می‌باشد، با ثابت در نظر گرفتن ضریب، رقت ها به ترتیب به صورت 10^6 ، 10^5 ، 10^4 ، 10^3 ، 10^2 ، 10^1 ، 10^0 ، 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} (با معیار CFU برای تمامی رقت‌ها) تهیه گردید. در صورت شناسایی باکتری در غلظت‌های 10^7 و 10^4

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
<i>ITS</i>	<i>ITS-F</i>	F: GTTAGAGCGCAGCCCTGATA	86 ± 0.5	۱۵۵	(۱۳)
	<i>ITS-R</i>	R: AATGGTGGAGACTAGCGGGA			
<i>mecA</i>	<i>MECA-F</i>	F: GGCTCAGGTACTGCTATCCAC R:	81 ± 0.5	۲۹۷	(۱۳)
	<i>MECA-R</i>	AACGTTGTAACCCACCCAAGA			

حساسیت آنالیتیکی با کتری 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 86 ± 0.5 درجه سلسیوس و برای ژن *mecA* دمای 81 ± 0.5 درجه سلسیوس تعیین شد و اختصاصیت آنالیتیکی بر مبنای شناسایی باکتری در همه رقت با یک دما (با خطای ± 0.5 درجه سلسیوس) مشخص گردید (۱۱).

آماده سازی پرایمرها و واکنش PCR

پرایمرها 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 میکرو لیتر از DNA های رقیق شده و ۲ میکرو لیتر از هر پرایمر به غلظت ۲۰ پیکو 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 ۲۰ پیکو 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 نرم افزارهای HRM Software v3.0.1 و StepOne Software v2.3 استفاده شد.

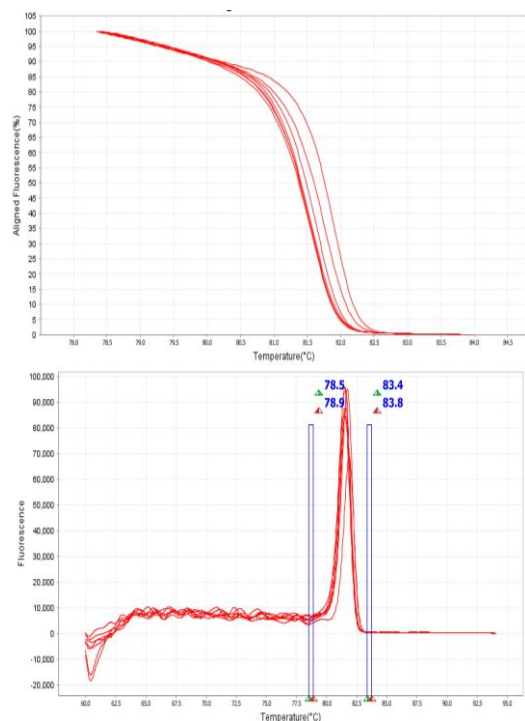
تعیین توالی محصولات

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 روش های مورد مطالعه، مورد استفاده قرار گرفت. داده های به دست آمده، با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ (IBM، آمریکا) مورد بررسی، تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای این منظور از روش های 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.

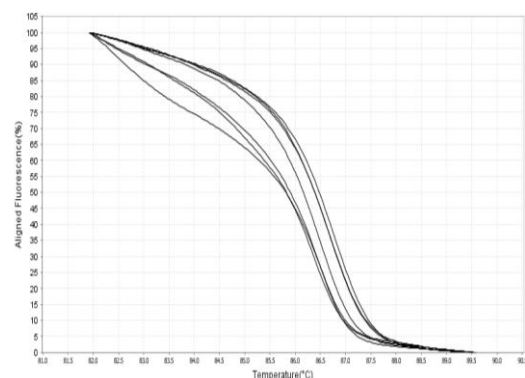
یافته ها

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، ژن های *ITS* و *mecA* برای رقت های مختلف تکثیر شدند. نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵

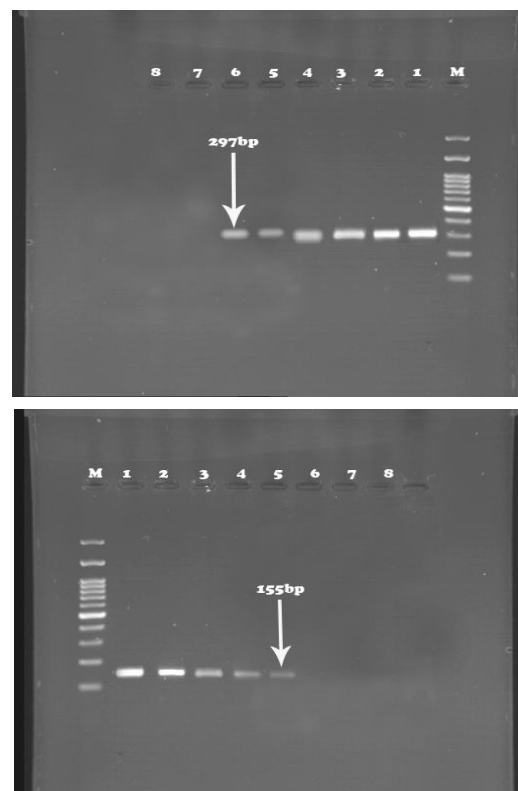
مشاهده شد به طوری که، با در نظر گرفتن نزدیک ترین بازه دمایی به منظور تجزیه و تحلیل، دمای ذوب برای ژن *mecA* مقدار ITS مقدار 86 ± 0.5 درجه سلسیوس و برای ژن *mecA* مقدار 81 ± 0.5 درجه سلسیوس بدست آمد. نتایج دما و تعیین توالی اختصاصیت بالای روش HRM را نشان داده است. نمودار شماره ۱ منحنی HRM حاصل از تکثیر 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

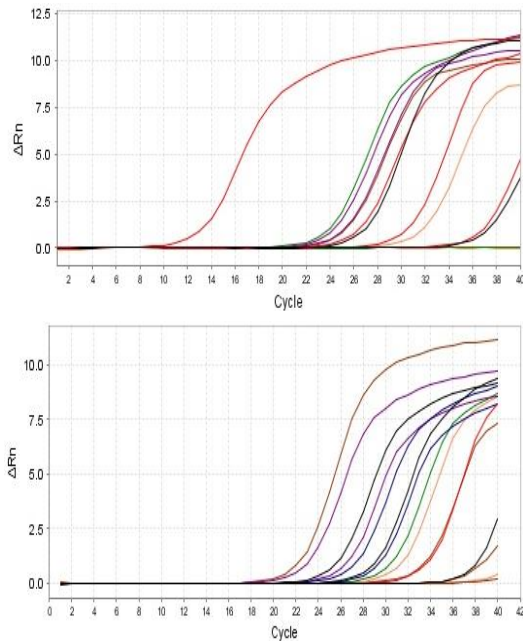


درصد نشان داد که حساسیت آنالیتیکی روش PCR برای ژن *ITS* تا رقت 10^4 CFU و برای ژن *mecA* تا رقت 10^3 CFU بوده است. اختصاصیت این روش نیز با تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده از تعیین توالی مشخص شد (تصویر شماره ۱).



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

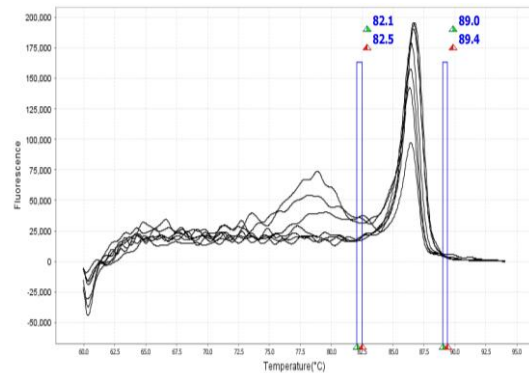
نتایج حاصل حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکی روش HRM بر اساس نتایج حاصل از تکثیر و آنالیز نمودارهای به دست آمده در آزمون HRM، حساسیت آنالیتیکی روش HRM برای پرایمر ژن *ITS* تا رقت 10^{-2} CFU و پرایمر ژن *mecA* تا رقت 10^{-5} CFU، قدرت شناسایی باکتری را داشته است. در تجزیه و تحلیل نتایج HRM نیز کمترین مقدار خطا در منحنی ها ذوب DNA



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

بحث

استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و روش های تشخیص آن، ارتباط مستقیمی در کنترل عفونت های منتشره حاصل از این باکتری دارد. روش رایج تشخیص این باکتری و سویه های مقاوم آن که بر مبنای تست های بیوشیمیایی می باشد، که در کنار وقت گیر بودن، ممکن است با خطا نیز همراه باشد (۱۹،۱۸). از این رو، برای به حداقل رساندن زمان تشخیص و خطای تست های مورد استفاده، به کارگیری روش های حساس تر و اختصاصی تر 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 می توان با صرف کمترین زمان ممکن سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک را شناسایی کرد. شاید چنین قلمداد شود که استفاده از روش هایی هم چون HRM با وجود روش های ساده تر و ارزان تر مانند MCA چندان منطقی نباشد، اما نباید این نکته را فراموش کرد که روند انجام تست HRM چندین هدف مختلف را دنبال می کند که



نمودار شماره ۴: منحنی HRM حاصل از تکثیر ژن *ITS* استافیلوکوک اورئوس

بر اساس دمای حاصل از ذوب DNA و مصرف مقادیر فلورسنت محیطی، میزان مصرف فلورسنت با رقت های 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 کاملاً 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).

منحنی های حاصل از تکثیر ژن های *ITS* و *mcaA* نیز در رقت های مختلف، CT های مختلفی نشان دادند، به طوری که در غلظت استوک نیم مک فارلند کم ترین مقدار CT نشان داده شد و در رقت های بعدی مقادیر CT به تناسب رقت ها افزایش بیش تری داشت. برای ژن *mcaA* آغاز تکثیر از CT با مقدار ۱۱ و برای ژن *ITS* از CT با مقدار ۱۸ شروع شد. در نمودار شماره ۳ منحنی های تکثیر ژن *mcaA* و ژن *ITS* نشان داده شده است.

نتایج حاصل از تعیین توالی

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

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 متی‌سیلین، با بررسی جایگاه‌های جهش در کنار تعیین توالی، می‌توان علت مقاومت را نیز مورد بررسی قرار داد (۲۰، ۲۱). 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 10^1 CFU باکتری بوده است. در این مطالعه پرایمرهای طراحی قدرت شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* تا رقت 10^{-3} و برای مقاومت به متی‌سیلین 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 می‌توان 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 (۲۳، ۲۴). 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 نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده، متفاوت است. در مطالعه حاضر، از پروتکل دو مرحله‌ای استفاده گردید که تفاوت الگوی نوکلئوتیدی 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 نوکلئوتیدی 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 گاهی تفاوت‌هایی در نتایج ممکن است دیده شود. از مهم‌ترین دلایل آن می‌توان 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 می‌روند. 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 می‌گیرد 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 سپتیمی یا باکتری می‌به پزشک مراجعه نماید و یا دچار عفونت‌های منتشره *استافیلوکوک* 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،

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 می‌کند.

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

- 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.
- 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)
- Tahmasebi H, Zeiny 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).
- 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.
- 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 Zanzan Univ Med Sci* 2018; 26(116): 75-87 (Persian).
- 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.

- 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-Dalooi 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. Zeininger J, Pietzka AT, Stöger A, Kornschöber 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.

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.