

Letter to editor "Applying High-quality DNA Melting Curve Analysis
in Identifying *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant Strains "

Ramezan Ali Ataee

Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hospital Research Development Committee, Applied Microbiology Research Center, System Biology, Poisoning Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

نقد به مقاله "آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا (HRM) به منظور
شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس و سویه مقاوم به متی سیلین "

رمضانعلی عطایی

استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، کمیته توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان، مرکز تحقیقات میکروب شناسی کاربردی، سیستم بیولوژی، انستیتوی سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

سردبیر محترم

با آن که حوزه مقاومت به متی سیلین از اهمیت زیادی برخوردار بوده ولی مطالعات ناقص فراوانی در این خصوص گزارش شده است (1). با آن که روش high-resolution melting curve analysis برای تشخیص بسیاری از ژن های پروکاریوتی و یوکاریوتی گزارش شده است (2-4)، نویسندگان محترم به جای Resolution و اژه quality را به کار برده و به عنوان یک روش بسیار حساس برای تشخیص استافیلوکوکوس آرنوس مطرح کرده اند، درحالی که این روش برای تشخیص بسیاری از ژن ها کاربرد دارد. بنابراین، لازم است به نکاتی اشاره شود:

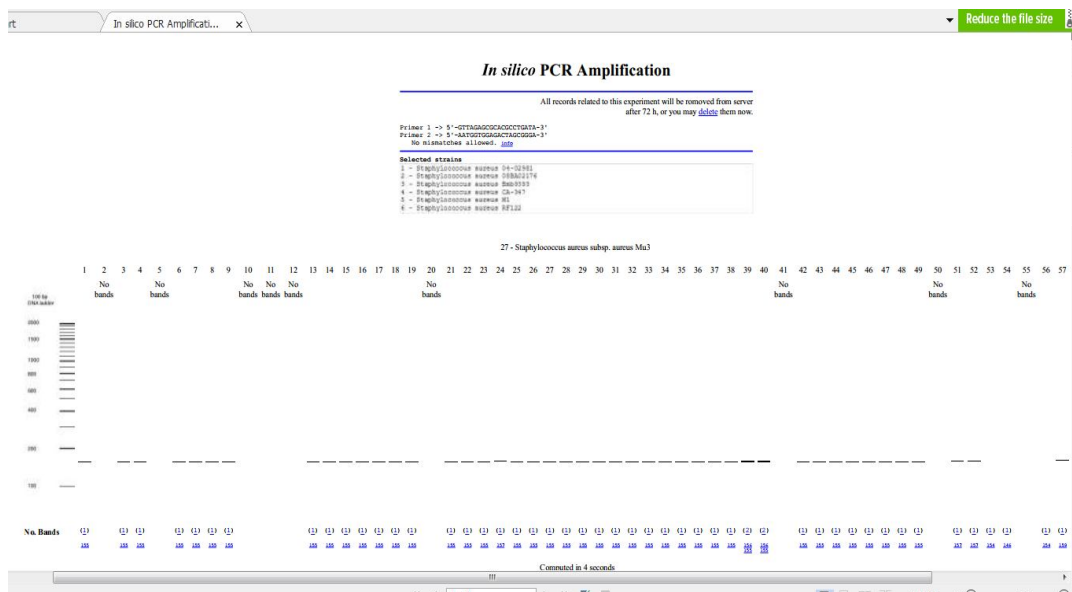
1- عنوان مقاله: در عنوان مقاله، آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا به منظور شناسایی استافیلوکوکوس آرنوس ذکر شد. این روش برای شناسایی سایر باکتری ها نیز کاربرد دارد و افزایش کیفیت ذوب به درجه خلوص و ترکیب بازهای DNA استخراج شده بستگی دارد و نه چیز دیگر. هم چنین، ابهام دیگری در عنوان وجود دارد زیرا، معلوم نیست باکتری مورد نظر به متی سیلین مقاوم بوده و یا دو باکتری مجزا از هم هستند. از عنوان این گونه استنباط می شود که مطالعه فوق از دو سویه

استافیلوکوکوس آرنوس، یکی مقاوم به متی سیلین و دیگری حساس بوده است.

2- مقدمه: جستجو در پای مد نشان می دهد طی 10 سال گذشته حدود 27 عنوان مقاله در خصوص متی سیلین چاپ شده از ایران وجود دارد که به خوبی و به طور شایسته از آن ها بهره گیری نشده است. هم چنین در مقدمه از ژن ITS نام برده و به رفرنس شماره هفت ارجاع داده است که تناسب ندارد.

از 60 تا سویه استافیلوکوکوس معرفی شده در سایت in silico؛ 9 سویه استافیلوکوکوس آرنوس فاقد ژن ITS هستند (تصویر شماره 1) و مشخص نیست که آیا همه سویه هایی که این ژن را دارند به متی سیلین مقاوم باشند و یا درصد مقاومت آن ها یکسان باشد.

3- مواد و روش ها: رقت های ارایه شده مناسب نمی باشند. زیرا، ذکر شده است که از سوسپانسیون معادل استاندارد 0/5 مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ CFU/ml) رقت های ذکر شده در زیر را 10^{-6} ، 10^{-7} ، 10^{-8} ، 10^{-9} ، 10^{-10} ، 10^{-11} ، 10^{-12} ، 10^{-13} ، 10^{-14} و 10^{-5} تهیه نموده است که مناسب نیستند.



تصویر شماره 1: واکنش PCR مجازی با پرایمرهای استفاده شده در مطالعه فوق توسط نرم افزار in-silico

12 رقت ذکر شده از یک ژن نشان‌دهنده اختصاصیت نیست، اختصاصیت زمانی ایجاد می‌شود که پرایمر مورد نظر به قطعات ژنی سایر باکتری‌ها یا سایر ژن‌ها به غیر از استافیلوکوکوس نهچسبد.

4- یافته‌ها: در نتایج حساسیت برای ژن *ITS* ده هزار باکتری و برای ژن *mecA* هزار سلول باکتری بیان شده است و در شکل نیز نشان داده شده است. در حالی که حساسیت روش تشخیص این ژن‌ها در حد 10 سلول باکتری گزارش شده است (5). بیان این اعداد قابل قبول نیست، از طرفی محقق محترم می‌توانست با اسکن نمودن غلظت باندها و یا تعیین غلظت DNA موجود در هر یک از رقت‌ها و مقایسه با منابع موجود تعداد CFU را به طور دقیق محاسبه نماید.

اگر خواننده فرض نماید که این غلظت‌ها نماینده تعداد سلول باکتری در هر میلی‌لیتر باشد. سوسپانسیون ده به توان صفر (10^0) یعنی یک عدد باکتری در هر میلی‌لیتر، حال اگر آن را 10، 100، 1000 و 10000 برابر رقیق نمایند چند عدد باکتری یا به عبارت دیگر چند CFU در هر میلی‌لیتر بوده است؟

معلوم نیست رقت 10^7 از استاندارد 0/5 مک فارلند تهیه شده یا از چیز دیگری؟ به همین ترتیب معلوم نیست رقت 10^4 و 10^{-4} دارای چند عدد سلول باکتری بوده‌اند؟ شایسته است محقق محترم ژن استخراج شده از هر رقت را اندازه‌گیری و غلظت DNA را برای هر رقت بیان کند تا بتواند به طور دقیق حساسیت کار را بیان نماید.

مدل ارایه شده برای اختصاصیت صحیح نیست، مگر این‌که برای آن رفرنس و دلیل علمی ذکر شده باشد. هر

References

1. Ataee RA. Bias in methicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(12): e25973 (Persian).
2. Forghani F, Wei S, Oh DH. A Rapid Multiplex Real-Time PCR High-Resolution Melt Curve

Assay for the Simultaneous Detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Food. J Food Prot 2016; 79(5): 810-815.

3. Mayerhofer B, Stoger A, Pietzka AT, Fernandez HL, Prewein B, Sorschag S, et al. Improved protocol for rapid identification of certain spa types using high resolution melting curve analysis. *PloS one* 2015; 10(3): e0116713.
4. Wong YP, Chua KH, Thong KL. One-step species-specific high resolution melting analysis for nosocomial bacteria detection. *J Microbiol Methods* 2014; 107: 133-137.
5. Ataee RA, Karami A, Sorouri Zanjani R, Bagheri M. Standardization of the molecular method for detection of the ent D in *Staphylococcus aureus* isolated from human Infections: And sequence Determination. *ZUMSJ* 2012; 20(78): 1-12 (Persian).
6. Ericksen B, Wu Z, Lu W, Lehrer RI. Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(1): 269-275.

Reply to Letter to editor "Applying High-quality DNA Melting Curve Analysis in Identifying *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant Strains"

Mohammad Reza Arabestani

Associate Professor, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

پاسخ به نقد مقاله "آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا (HRM) به منظور شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس و سویه مقاوم به متی سیلین"

محمد رضا عربستانی

دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
مرکز تحقیقات بروسلاز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

سردبیر محترم

بنابراین هم در مقدمه مقاله منابع شماره 11، 12، 14، 16 و هم در قسمت بحث مقاله، منابع شماره 22 الی 26 در زمینه تکنیک HRM صحبت کرده‌اند که به خوبی از آن‌ها استفاده شده است. در رفرنس شماره 7 نواحی بین 16S-23 S rRNA مورد بررسی قرار گرفته است که منظور همان نواحی ITS می‌باشد.

ناحیه ITS برای شناسایی جنس و گونه باکتری استافیلوکوکوس آرنوس استفاده می‌شود، نه برای شناسایی ژن مقاومت به متی سیلین، که البته ممکن است بعضی از سویه‌های استافیلوکوکوس آرنوس دارای ژن mec نیز باشند و بعضی ژن mec را نداشته باشند، بنابراین ممکن است ارتباطی بین ژن ITS و مقاومت به متی سیلین وجود نداشته باشد.

3- مواد و روش ها: در ارتباط با رقت‌های به کار رفته در انجام مطالعه لازم است ذکر شود که، همان‌طوری که در صفحه شماره 86 مقاله قسمت روش کار، بخش حساسیت و اختصاصیت پرایمرها اشاره شده

ضمن تشکر از خواننده محترم و ارائه نظرات ارزشمند ایشان، توجه خواننده عزیز را در خصوص موارد ذکر شده به نکات ذیل جلب می‌نمایم:

1- عنوان مقاله: البته که تکنیک high-resolution melting curve analysis (HRM) برای شناسایی بسیاری از ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی با توجه به این که این مطالعه برای شناسایی و تشخیص باکتری استافیلوکوکوس آرنوس و ژن مقاوم به متی سیلین در استافیلوکوکوس آرنوس مورد استفاده قرار گرفته است، با این عنوان معرفی شده است.

2- مقدمه: در خصوص عدم بهره‌گیری از مقالات چاپ شده از ایران طی ده سال اخیر که منتقد محترم به آن اشاره نموده‌اند باید ذکر شود که با توجه به این که هدف شناسایی باکتری استافیلوکوک و سویه مقاوم به متی سیلین با روش high-resolution melting curve analysis (HRM) بوده، نه اپیدمیولوژی سویه‌های مقاوم به متی سیلین آن،

است، تمامی رقت‌های تهیه شده بر مبنای 0/5 مک‌فارلند صورت گرفته است و حداقل مقدار آن CFU/ml 0/00015 یا همان $1/5 \times 10^{-4}$ در نظر گرفته شده است. لزوماً تهیه رقت‌های کم‌تر از 100 جهت تعیین میزان حساسیت بوده است که برخی دیگر از محققین از جمله Ericksen نیز از این رقت‌ها استفاده کرده‌اند (1). همان‌طوری که مستحضر هستید برای تهیه رقت بایستی OD یا جذب نوری DNA نیز اندازه‌گیری شود که با دستگاه نانودراپ این کار انجام شده است.

در خصوص مدل ارائه شده برای اختصاصیت در مطالعه حاضر باید اشاره شود که، جهت تعیین اختصاصیت پرایمر *ITS* و *mecA* در روش HRM، دمای ذوب پرایمر مورد استفاده برای سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس آرنوس* مقاوم به متی‌سیلین مورد

ارزیابی قرار گرفت و با رسیدن به دمای 86 و 81 درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای پرایمرهای *ITS* و *mecA* اختصاصیت پرایمرها مشخص شد. البته، با استفاده از سایر باکتری‌ها در کنار سویه‌های استاندارد به عنوان کنترل منفی، پرایمرهای مورد نظر قادر به شناسایی سایر باکتری‌ها در این دما نبودند. در این جا صرفاً به خاطر جلوگیری از پیچیدگی تصاویر، شکل‌هایی اختصاصی برای این دو ژن یعنی *ITS* و ژن *mecA* آورده شده و از ذکر تصاویر دیگر خودداری شده است.

4- یافته‌ها: در تصویر شماره 1 که اعداد بالا ذکر شده، تصویر مربوط به ژل آگارز می‌باشد که همان‌گونه که مستحضر هستید قدرت تفکیک ژل آگارز در مقایسه با روش Real TimePCR بسیار پایین‌تر می‌باشد که یک امر بدیهی است.

References

1. Ericksen B, Wu Z, Lu W, Lehrer RI. Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(1): 269-275.