مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره 173 خرداد سال 1398 (180-176)

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 *استافیلوکوک 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 ژن‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی گزارش شده است(4-2)، نویسندگان محترم به جای Resolution واژه quality را به کار برده و به عنوان یک روش بسیار حساس برای تشخیص *استافیلوکوکوس آرئوس* مطرح کرده‌اند، درحالی‌که این روش برای تشخیص بسیاری از ژن‌ها کاربرد دارد. بنابراین، لازم است به نکاتی اشاره شود:

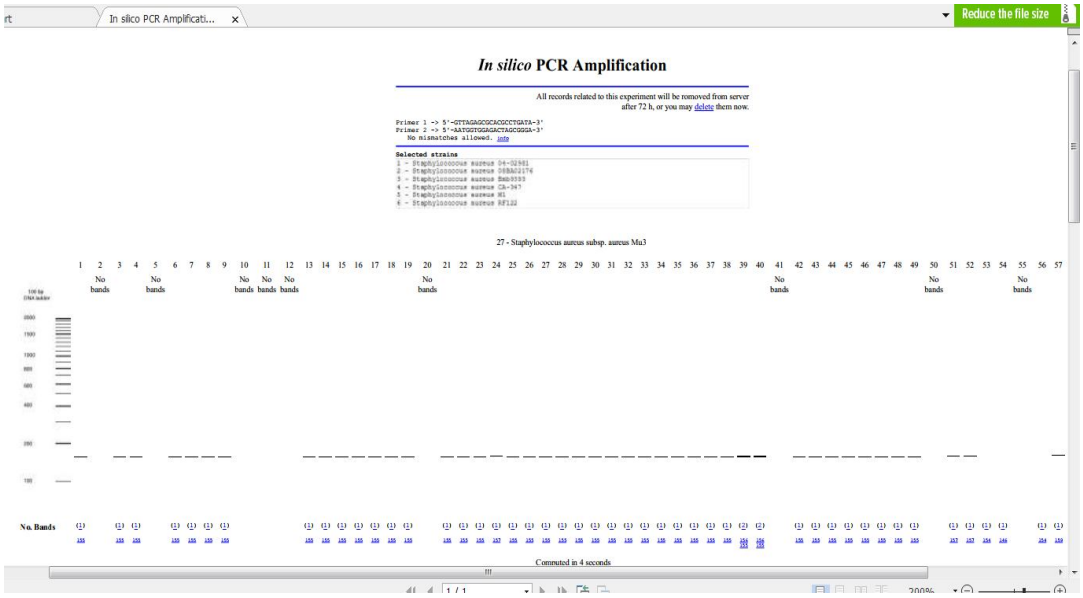
1- *عنوان مقاله :* در عنوان مقاله، آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا به منظور شناسایی *استافیلوکوکوس آرئوس* ذکر شد. این روش برای شناسایی سایر باکتری‌ها نیز کاربرد دارد و افزایش کیفیت ذوب به درجه خلوص و ترکیب بازهای DNA استخراج شده بستگی دارد و نه چیز دیگر. هم‌چنین، ابهام دیگری در عنوان وجود دارد زیرا، معلوم نیست باکتری مورد نظر به متی‌سیلین مقاوم بوده و یا دو باکتری مجزا از هم هستند. از عنوان این گونه استنباط می‌شود که مطالعه فوق از دو سویه *استافیلوکوکوس آرئوس*، یکی مقاوم به متی‌سیلین و دیگری حساس بوده است.

2- *مقدمه :* جستجو در پاپ مد نشان می‌دهد طی 10 سال گذشته حدود 27 عنوان مقاله در خصوص متی‌سیلین چاپ شده از ایران وجود دارد که به خوبی و به طور شایسته از آن‌ها بهره‌گیری نشده است. هم‌چنین 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 آرئوس* 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 :* رقت‌های 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) رقت‌های ذکر شده در زیر را 10^{-5}، 10^{-4}، 10^{-3}، 10^{-2}، 10^{-1}، 10^{0}، 10^{1}، 10^{2}، 10^{3}، 10^{4}، 10^{5}، 10^{6}، 10^{7} و 10^{-4} تهیه نموده است که مناسب نیستند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-13]



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

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 میلی لیتر 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 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* نچسبد.

4- *یافته ها* : 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 ژن ها در حد 10 سلول باکتری گزارش شده است(5). بیان این اعداد قابل قبول نیست، ازطرفی 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.

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-13]

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, Baghery 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-13]

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 *استافیلوکوک اورئوس* و سویه مقاوم به متی سیلین "

محمد رضا عربستانی

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

سردبیر محترم

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 این‌که این مطالعه برای شناسایی و تشخیص باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* و ژن مقاوم به متی سیلین در *استافیلوکوکوس آرئوس* 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 این‌که هدف شناسایی باکتری استافیلوکوک و سویه مقاوم به متی‌سیلین با روش high-resolution melting curve analysis (HRM) بوده، نه اپیدمیولوژی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین آن، 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 آرئوس* استفاده می‌شود، نه برای شناسایی ژن مقاومت به متی‌سیلین، که البته ممکن است بعضی از سویه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* دارای ژن *mec* نیز باشند و بعضی ژن *mec* را نداشته باشند، بنابراین ممکن است ارتباطی بین ژن *ITS*, و مقاومت به متی‌سیلین 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-13]

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. لزوما تهیه رقت‌های کم‌تر از 100 جهت تعیین میزان حساسیت بوده است که برخی دیگر از محققین از جمله Ericksen نیز از این رقت ها 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 آرئوس* مقاوم به متی‌سیلین مورد ارزیابی قرار گرفت و با رسیدن به دمای86 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 صرفا 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- *یافته ها :* در تصویر شماره 1 که اعداد بالا ذکر شده، تصویرمربوط 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-07-13]