JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2019; 21(7)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

A New Approach to Identify and Determine the Relationship between *MecA* Gene Mutations Based on HRM with Clinical Species in *Staphylococcus aureus* Isolates

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

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.
2. Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
3. Nutrition Health Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: *28 April 2018*

Accepted: *07 July 2018*

Published online: *04 February 2019*

Keywords

DNA melting curve

Genetic mutation

HRM

Methicillin resistance staphylococcus aureus

**** Corresponding Author:***

Mohammad Reza Arabestani; P.O. Box 65178-3-8736, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

Fax: *+98 81 3838 0130*

Email: *mohammad.arabestani@gmail.com*

ABSTRACT

Background and Aim: Gene mutation in *Staphylococcus aureus* is one of the most important causes of antibiotic-resistant strains. The High Resolution Melting Curve (HRM) analysis of DNA method can detect these mutations very high quality. The purpose of this study was to evaluate the role of clinical sample type in the occurrence of nucleotide mutations in the mecA gene of *S. aureus* by HRM method.

Materials and Methods: In this experimental study, 43 clinical isolates of S. aureus were used. To detect possible mutations, isolates with *mecA* gene were replicated and sequenced. Then, analysis was performed using StepOne Software v2.3 and HRM v3.0.1 software. Sequencing results were used as gold-standard.

Ethical Considerations: This study with research ethics code IR.UMSHA.REC.1396.637 has been approved by research ethics committee at Hamadan University of Medical Sciences.

Findings: Of 43 clinical isolates of S. aureus, 11 isolates (25.58%) had *mecA* gene and 32 isolates (47.41%) lacked the *mecA* gene. According to different clinical samples, 3 isolates (27.27%) were resistant to methicillin from blood samples, 2 isolates (18.18%) from urine specimens, 2 isolates (18.18%) from wound samples, 2 isolates (18.18%) of the catheter samples, 1 isolate (9.09%) of the abscess and 1 isolate (9.09%) were separated from the nose swab. In the meanwhile, isolates from the wound and urine had the highest mutation in the adenine amino acid as A → T, A → G, A → C, and A → X. Isolates taken from blood have mutations in Guanine amino acid as G → A.

Conclusion: There was a significant relationship between type of mutation and type of clinical specimen in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates.

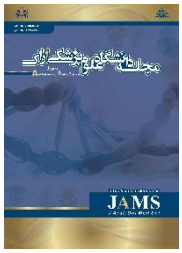
© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:

Tahmasebi H., Dehbashi S., Arabestani MR. A New Approach to Identify and Determine the Relationship between *MecA* Gene Mutations Based on HRM with Clinical Species in *Staphylococcus aureus* Isolates. J Arak Uni Med Sci. 2019; 21(7): 68-79.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

JAMS
مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره بیست و یک، شماره هفت، بهمن و اسفند ۱۳۹۷
journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

رویکردی جدید جهت شناسایی و تعیین ارتباط جهش‌های ژنی *mecA* بر مبنای HRM با نوع نمونه بالینی در ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس

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

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۲. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۳. مرکز سلامت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۶

تاریخ انتشار: ۹۷/۱۱/۱۵

واژگان کلیدی

استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین

جهش ژنی

منحنی ذوب DNA

HRM

***نویسنده مسئول:**

محمد رضا عربستانی

آدرس پستی: ایران، همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، کد پستی ۸۷۳۶-۳-۶۵۱۷۸.

نمابر: 0130 3838 81 98+

E-mail:
mohammad.arabestani@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: جهش ژنی در استافیلوکوک اورئوس از مهم‌ترین دلایل ایجاد سویه‌های مقاوم آنتی‌بیوتیک است. روش آنالیز منحنی ذوب DNA با قدرت تفکیک بالا (HRM)می‌تواند ای جهش‌ها را با کیفیت بسیار بالایی شناسایی کند. هدف از این مطالعه، ارزیابی نقش نوع نمونه بالین در بروز جهش‌های نوکلئوتیدی در ژن *mecA* استافیلوکوک اورئوس به روش HRM بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از ۴۳ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس استفاده شد. جه شناسایی جهش‌های احتمالی، ایزوله‌های دارای ژن *mecA* شناسایی و ژن مربوطه تعیین توالی ش سپس، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای StepOne v2.3 و HRM v3.0.1 انج شد. نتایج تعیین توالی به عنوان استاندارد طلایی مورد استفاده قرار گرفت.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1396.637 در کمیته اخلا پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به تصویب رسیده است.

یافته‌ها: از ۴۳ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس، ۱۱ ایزوله (۲۵/۵۸ درصد) دارای ژن *mecA* ۳۲ ایزوله (۴۷/۴۱ درصد) فاقد ژن *mecA* بودند. با توجه به نمونه‌های بالینی مختلف، ۳ ایزو (۲۷/۲۷ درصد) مقاوم به متی‌سیلین از نمونه خون، ۲ ایزوله (۱۸/۱۸ درصد) از نمونه ادرار، ۲ ایزو (۱۸/۱۸ درصد) از نمونه زخم، ۲ ایزوله (۱۸/۱۸ درصد) از نمونه کاتاتر، ۱ ایزوله (۹/۰۹ درصد) آبسه و ۱ ایزوله (۹/۰۹ درصد) هم از سواپ بینی جدا شد. در این بین، ایزوله‌های گرفته شده از زخ و ادرار دارای بیشترین جهش در اسیدآمینه آدنین به‌صورت A→T، A→G، A→C و A→X مشاهده شد. ایزوله‌های جدا شده از خون داری جهش در اسید آمینه گوانین به‌صورت G→A بودند.

نتیجه‌گیری: ارتباط معنی‌داری بین نوع جهش و نوع نمونه بالینی در ایزوله‌های استافیلوکو اورئوس مقاوم به متی سیلین دیده شد.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

استافیلوکوک اورئوس، یکی از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد که به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کرده است (۱). تولید بتالاکتاماز توسط این باکتری سبب مقاومت به گروه‌های سفالوسپورینی و بتالاکتامی و ظهور سویه‌های جدید شده است (۲). استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) که توسط قطعه ژنی کروموزومی به‌نام *mecA* که برروی کاست *SCCmec* قرار گرفته است، از سال ۱۹۶۰ ظهور پیدا کرد (۳). ژن *mecA* پروتئینی تحت عنوان PBP2a تولید می‌کند که تمایل کمی برای اتصال به داروهای بتالاکتام دارد و توسط این داروها مهار نمی‌شود. پس، با استفاده از این ژن و شناسایی آن در ایزوله‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس، می‌توان مقاومت به متی سیلین را در آن‌ها مشخص کرد (۴). در بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی و کاهش حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی در استافیلوکوک اورئوس، عوامل مختلفی دخالت دارند. اما دو مکانیزم عمده، مسئول پیدایش و گسترش سویه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که یکی جهش و دیگری انتقال ژن‌های مقاومت می‌باشد. در میان باکتری‌ها انتقال ژن‌های مقاومت اغلب از طریق پلاسمید انجام می‌گیرد. مقاومت ذاتی به ساختار باکتری مربوط بوده و در اکثر موارد به وجود ژن‌های کروموزومی بستگی دارد. استفاده از روش‌های سریع و دقیق در شناسایی این جهش‌ها و سویه‌های مقاوم می‌تواند نقش مهمی در مسیر درمان داشته باشد.

با این حال، روش‌های شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک به طور کل به دو دسته فنوتیپی و ژنوتیپی تقسیم‌بندی می‌شوند. روش‌های آگلوتیناسیون لاتکس، انتشار از دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم، تعیین حداقل غلظت مهاری سفوکسیتین جز فنوتیپی به شمار می‌روند (۵). از مهم‌ترین روش‌های ژنوتیپی، PCR و تکنیک‌های وابسته به آن می‌باشد که امروز 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 (۶، ۷). 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 (۸).

در سال ۲۰۰۳ دانشگاه ایداهو ایالات متحده یک روش حساس و دقیق به‌نام آنالیز منحنی ذوب DNA با قدرت تفکیک بالا (HRM) را معرفی کرد که روشی جدید و همگن بعد از تکثیر PCRاست که در یک لوله دربسته انجام می‌شود (۶). در این روش آنالیز تغییرات ژنتیکی (SNPs، موتاسیون‌ها و متیلاسیون‌ها) در محصولات PCR شده فراهم می‌گردد. HRM نمونه‌های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و حجم GC متمایز می‌سازند (۹). آنالیز HRM شامل تکثیر ژن موردنظر در قطعات ۱۸۰ تا۲۶۰ جفت بازی در واکنشی است که محتوی رنگ متصل‌شونده به DNA دو رشته ای فلورسنت می‌باشد (۱۰). اساس کار این تکنیک بر پایه استفاده از الگو و رفتار ذوب رشته‌های DNA در یک دمای مشخص است که وابستگی زیادی به پرایمر مورد استفاده دارد. در تعریف دمای ذوب DNA، به دمایی که در آن نیمی از رشته‌های DNA به‌صورت تک رشته و نیمی دیگه به صورت دورشته باشند، دمای ذوب یا Melting گفته می‌شود. الگوی تک رشته شدن برای DNA کاملا اختصاصی است و جایگاه و توالی ژن مورد مطالعه، این اختصاصیت و حساسیت را مشخص می‌کند (۷، ۱۱، ۱۲).

روش HRM برای تعیین ژنوتیپ نمونه ها، محصولات PCR را تعیین توالی کرده و با توجه به نتایج به‌دست آمده ایزوله‌ها را مورد ارزیابی قرار می‌دهند و بنابراین نیازی به پروب نیست. برای نمونه، اگر تغییر A>C را در یک توالی در نظر بگیریم، در حالت کلی ژنوتیپ‌هایی که با آن مواجه هستیم به صورت A/C، A/A و C/C خواهد بود. الگوی منحنی برای حالت‌های A/A و C/C یکسان بوده و شکل C/C یک درجه بالاتر خواهد بود (۷).

برای به‌دست آوردن نمودار استاندارد در روش HRM، ایزوله استاندارد در کنار ایزوله‌های مجهول مورد آزمون قرار گرفته و در کنار هم تجزیه و تحلیل می‌شوند. الگوی درمانی بسیاری از باکتری‌ها با توجه به نوع نمونه بالینی متفاوت است. این تفاوت به دلیل وجود متغیرهایی است که در اعضای درگیرشده توسط باکتری‌ها حضور دارند و می‌توانند برخی ژن‌های مقاومتی را

دچار تغییر کنند. شناسایی این ژن‌ها و جهش‌هایشان می‌تواند کمک موثری به پزشک در تعیین سویه‌های مقاوم به دارو داشته باشد و مسیر درمان را کوتاه‌تر کند. هدف مطالعه حاضر، یافتن جهش‌های ژنی *mecA* در سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین در ایزوله‌های بالینی مختلف است تا بتوان دقت و سرعت آن را به روش تعیین توالی مقایسه کرد.

۲. مواد و روش‌ها

کشت، جداسازی و تعیین سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

در این مطالعه تجربی، ۴۳ ایزوله استافیلوکوک اورئوس از نمونه‌های بالینی مختلف که شامل خون، ادرار، زخم پوستی، کاتاتر، آبسه و سواپ بینی بودند جداسازی شدند و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، کواگولاز، کشت بر روی مانیتول و DNAas تایید شدند. سویه‌های مقاوم به متی‌سلین در ابتدا توسط نوارهای E-test سفوکسیتین (لیوفلیچم، ایتالیا) مشخص شدند. بدین صورت که ایزوله‌های با حداقل غلظت مهاری ≤ ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند. سپس این نمونه‌های مقاوم از نظر مولکولی ارزیابی شدند (۳).

استخراج DNA ژنومی

به منظور استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج DNA (Sinaclon، ایران) استفاده گردید. به طور خلاصه، بعد از کشت اولیه ایزوله‌ها، چند کلنی داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (sigma-aldrich، آمریکا) حل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار (N-Bioteck، آلمان)، گرمخانه‌گذاری شد. با سانتریفیوژ کردن ۱/۵ سی سی از محیط براث حاوی باکتری در ۴۵۰۰ دور در دقیقه، مراحل بعدی توسط پروتکل کیت مورد استفاده پی‌گیری شد.

انتخاب سایت هدف و طراحی پرایمر

سایت‌های هدف انتخاب شده برای سویه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین ژن *mecA* تعیین شد (۸).

شناسایی ژن *mecA* در استافیلوکوک اورئوس

برای انجام واکنش PCR به ازای هر رقت ۱۲ میکرولیتر از مستر میکس (Ampliqon آلمان)، ۱ میکرولیتر از DNAهای رقیق شده و ۲ میکرولیتر از هر پرایمر به غلظت ۲۰پیکومولار مخلوط گردید. برای تکثیر ژن‌های موردنظر از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf(آلمان) با تنظیمات سیکل دمایی به‌صورت شوک حرارتی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و تعداد ۲۵ سیکل به‌صورت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه اعمال شد. دمای انلینگ برای هر دو ژن ۵۹ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه تعیین شد. طویل شدن نهایی هم در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. در تمامی تست‌های صورت گرفته از سویه استافیلوکوک اورئوس ATCC33591 به عنوان سویه استاندارد کنترل مثبت و از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923برای کنترل منفی استفاده شد.

انجام آزمون آنالیز منحنی ذوب DNA (MCA)

جهت انجام آزمون آنالیز منحنی ذوب DNA، با در نظر گرفتن رقت اولیه محلول نیم مک فارلند که مقدار CFU $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری می‌باشد، رقت‌های مورد استفاده به ترتیب به صورت $۱۰^{۷}$ ، $۱۰^{۶}$ ، $۱۰^{۵}$ ، $۱۰^{۴}$ ، $۱۰^{۳}$ ، $۱۰^{۲}$ ، $۱۰^{۱}$ ، $۱۰^{۰}$ ، $۱۰^{-۱}$ ، $۱۰^{-۲}$ ، $۱۰^{-۳}$ و $۱۰^{-۴}$ (با معیار CFU برای تمامی رقت‌ها) تهیه گردید. این آزمون جهت ارزیابی اولیه پرایمر مورداستفاده از نظر حساسیت و اختصاصیت طراحی شد، به‌صورتی‌که در غلظت‌های $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{-۴}$ حساسیت آنالیتیکی و با تعیین دمای ذوب و اتصال DNA و پرایمرها، اختصاصیت تعیین شد.

انجام آزمون آنالیز منحنی ذوب DNA با قدرت تفکیک بالا (HRM) و تعیین جهش

در این مطالعه از دستگاه Real-Time PCR (ABI-StepOne Plus، آمریکا) استفاده شد. تمامی مراحل کار در سه تکرار صورت گرفت. تنظیمات مورداستفاده به‌صورت سه مرحله بود: چرخه دمایی با مقادیر ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵

دقیقه و ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه. بازه دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سلسیوس به منظور تعیین دمای ذوب و خوانش متوالی با Ramp دمایی ۰/۳درجه سلسیوس لحاظ گردید.

محلول نهایی به منظور انجام آزمون HRM در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۴ میکرولیتر مستر میکس HRM HighRox(Solid-Biodyns، کره)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۲۰پیکومولار) و ۱ میکرولیتر DNA الگو از غلظت‌های مختلف 10^{-4} و 10^{-7} بود. حجم باقی مانده با محلول DEPC جبران شد. تمامی مراحل با استفاده از نرم‌افزارهای StepOne Software نسخه ۲,۳ و HRM Software نسخه ۳,۰,۱ صورت گرفت.

تعیین توالی محصولات

محصولات به‌دست آمده از تکثیر ژن *mecA* به منظور داشتن استاندارد طلایی جهت شناسایی جهش‌ها، (شرکت Bioneer، کره، توسط شرکت پیشگام) تعیین توالی شدند.

تجزیه و تحیل داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور از روش های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) استفاده شد. هم‌چنین از نرم افزار Chromas نسخه ۵,۱ و BioEdit نسخه ۷,۰۱ برای آنالیز نتایج حاصل از تعیین توالی پرایمرهای طراحی‌شده استفاده شد.

۳. ملاحظات اخلاقی

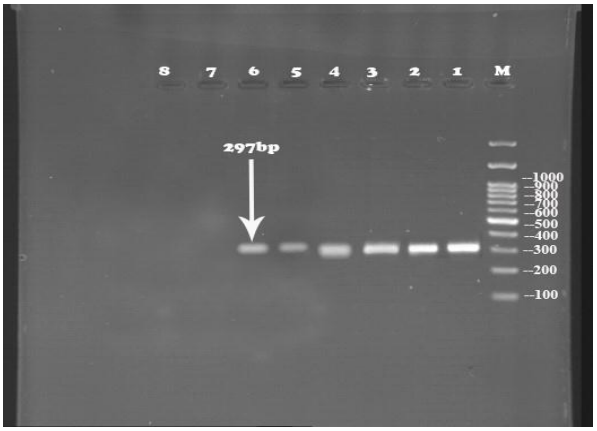
این مطالعه با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1396.637 توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به تصویب رسیده است.

۴. یافته‌ها

نتایج حاصل از فراوانی استافیلوکوک اورئوس در نمونه‌های بالینی مختلف

از ۴۳ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس، ۱۱ ایزوله (۲۵/۵۸ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند که به عنوان مقاوم به متی سیلین و ۳۲ ایزوله (۴۷/۴۱ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری کمتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند که به عنوان استافیلوکوک اورئوس حساس به متی سیلین در نظر گرفته شدند. با توجه به نمونه‌های بالینی مختلف، ۳ ایزوله (۲۷/۲۷ درصد) مقاوم به متی‌سیلین از نمونه خون، ۲ ایزوله (۱۸/۱۸ درصد) از نمونه ادرار، ۲ ایزوله (۱۸/۱۸ درصد) از نمونه زخم، ۲ ایزوله (۱۸/۱۸ درصد) از نمونه کاتاتر، ۱ ایزوله (۹/۰۹ درصد) از آبسه و ۱ ایزوله (۹/۰۹ درصد) هم از سواپ بینی جدا شد.

از ۴۳ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس، ۱۱ ایزوله (۲۵/۵۸ درصد) دارای ژن *mecA* و ۳۲ ایزوله (۴۷/۴۱ درصد) فاقد ژن *mecA* بودند. این نتایج با نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهاری با استفاده از آنتی بیوتیک سفوکسیتین به روش E-test کاملا همخوانی داشت. هم‌چنین همه ۱۱ ایزوله‌ای که از نظر مقاومت به متی سیلین به روش فنوتیپی مثبت شده بودند، حامل ژن *mecA* بودند (شکل۱).



شکل۱. تصویر ژل الکتروفورز ۱/۵درصد مربوط به تکثیر ژن *mecA* (سمت راست) با طول ۲۹۷ جفت باز. چاهک ۱تا۵ ایزوله‌های مثبت از نظر حضور ژن *mecA*. چاهک ۶: کنترل مثبت، چاهک ۷: کنترل منفی. M: مارکر با طول ۱۰۰ جفت باز.

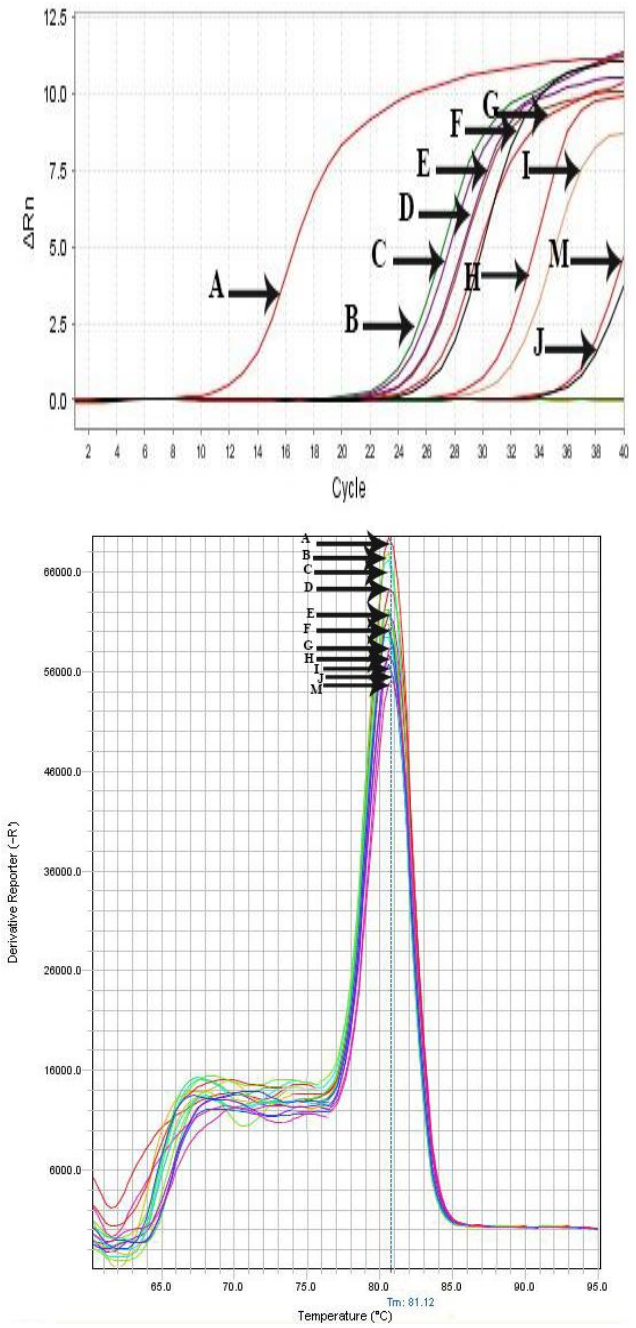
نتایج حاصل از روش MCA

نتایج حاصل از تکثیر و آنالیز نمودارهای به‌دست آمده در آزمون MCA بدین صورت بود که حساسیت و اختصاصیت پرایمرهای مورداستفاده برای *mecA* تا رقت 10^{-5} CFU قدرت شناسایی

باکتری را داشت. هم‌چنین با در نظر گرفتن نزدیک‌ترین بازه دمایی به منظور تجزیه و تحلیل، دمای ذوب برای ژن *mecA* مقدار ۰/۵± ۸۱ درجه سلسیوس به‌دست آمد.

نتایج دما و تعیین توالی اختصاصیت بالای پرایمر طراحی شده در روش MCA را نشان داد.

منحنی‌های حاصل از تکثیر ژن *mecA* نیز در رقت‌های مختلف CTهای مختلفی را نشان دادند. بدین صورت که در غلظت استوک نیم مک فارلند کمترین مقدار CT نشان داده شد. اما در رقت‌های بعدی مقادیر CT به تناسب رقت‌ها افزایش بیشتری داشت. برای ژن *mecA* آغاز تکثیر از CT با مقدار ۱۱ شروع شد. این عدد مربوط به غلظت استوک که دارای 10^8 DNA بود به‌دست آمد. در ادامه CTهای به‌دست آمده که ۲۰ و ۲۲ بود و تا CT با مقدار ۳۵ ادامه داشت، مربوط به سایر غلظت‌های DNA از مقدار 10^7 تا 10^{-4} بود (شکل ۲).

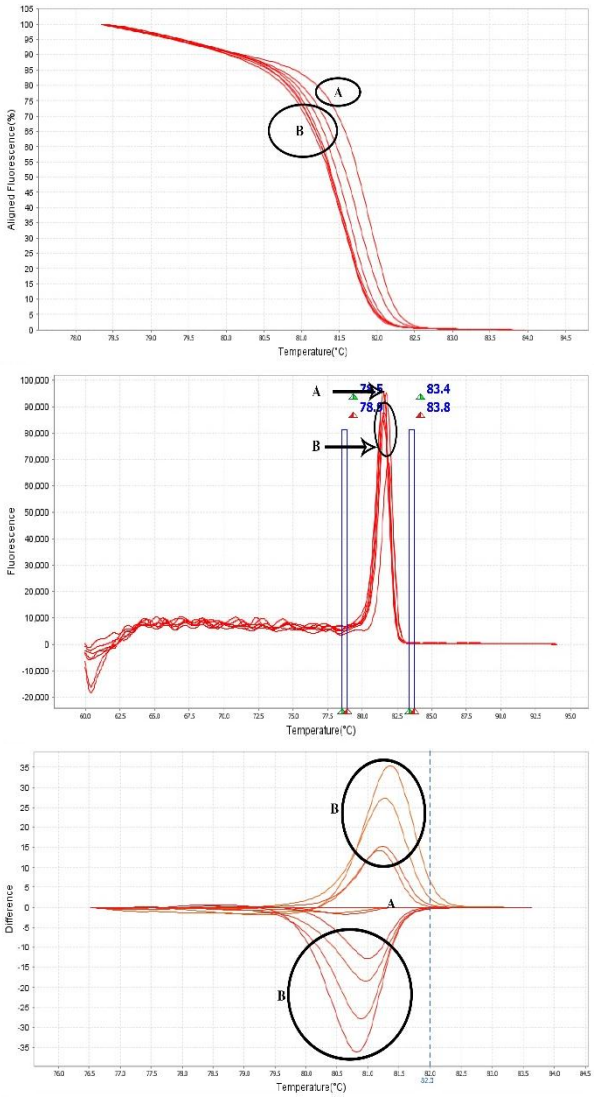


شکل ۲. منحنی‌های تکثیر (شکل بالا) و ذوب (شکل پایین) ژن *mecA* جهت مشخص کردن حساسیت و اختصاصیت پرایمر موردنظر در رقت‌های مختلف DNA. منحنیA: غلظت 10^8 (منحنی استاندارد)، منحنی B: غلظت 10^7، منحنی C: غلظت 10^6، منحنی D: غلظت 10^5، منحنی E: غلظت 10^4، منحنی F: غلظت 10^3، منحنی G: غلظت 10^2، منحنی H: غلظت 10^1، منحنی I: 10^0 و 10^{-1}، منحنی J: 10^{-2}، منحنی M: 10^{-3} و 10^{-4}.

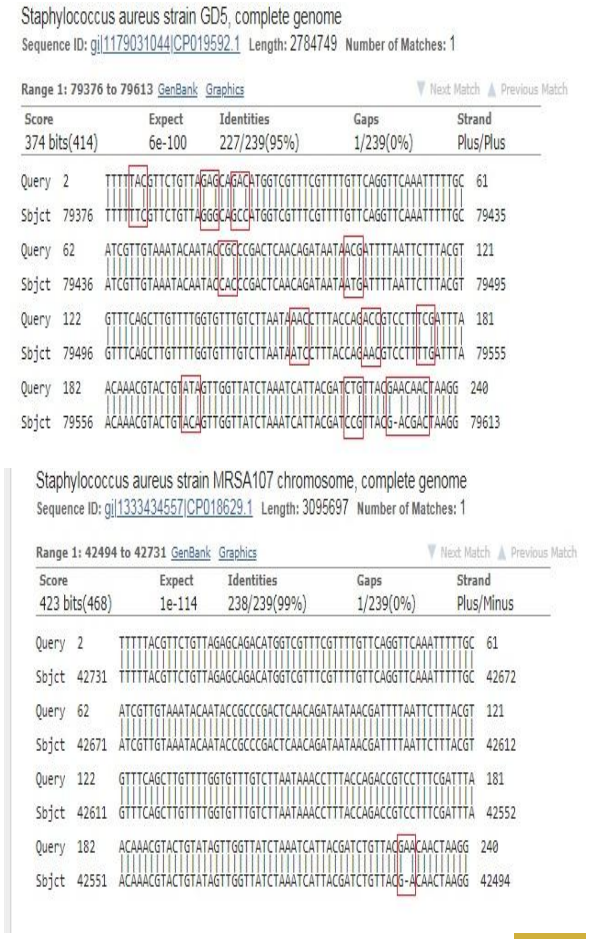
نتایج حاصل از روش HRM و جهش ها

منحنی‌های HRM حاصل از ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های زخم بدین صورت بود که پرایمر ژن *mecA* تا رقت CFU 10^{-5}قدرت شناسایی باکتری را داشت. در سه پلات

مربوط به داده‌های به‌دست آمده منحنی ذوب DNA با کمترین مقدار اختلاف همه رقت‌های یک سویه از باکتری جدا شده از نمونه‌های بالینی را شناسایی کرد. هم‌چنین نمودارهای آنالیز دمایی پیش ذوب و پس ذوب DNA نیز مشخص کرد که همه رقت‌های مربوط به یک ایزوله به خوبی تشخیص داده شدند. منحنی شاخص اختلاف نیز به‌صورت بازه‌های منفی و مثبت از مقادیر فلورسانت به‌دست آمد. به این صورت که هر چه غلظت مورد مطالعه کمتر بود، مقدار فلورسنت محیط نیز با مصرف بافرهای محیطی کمتر شدند که نشان از حساسیت این روش در تعیین اختلاف‌ها حتی در غلظت کم را داشت (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳. منحنی HRM حاصل از تکثیر ژن *mecA* عامل مقاومت به متی‌سیلین در نمونه‌های زخم. منحنی A: نمونه استاندارد (استافیلوکوک اورئوس ATCC33591). نمودارB: ایزوله‌های مجهول مقاوم به متی سیلین.



شکل ۴. نتایج تعیین توالی حاصل از ژن *mecA* عامل مقاومت به متی سیلین در نمونه‌های زخم

ایزوله‌های بالینی جدا شده از زخم نیز در رقت‌های مختلف دارای کمترین خطا در تشخیص جهش‌های مورد بررسی بودند. به نحوی که در پلات‌های مختلف منحنی‌های HRM، منحنی ذوب، منحنی پیش ذوب و پس ذوب دارای کمتری میزان اختلاف بودند. نمودار اختلاف سنجی نیز در رقت‌های مختلف مقادیر متفاوتی از فلوروسنت را نشان داد.

با در نظر گرفتن بازه خطای دمایی ۰/۱ درجه سلسیوس مشخص شد که ایزوله‌های مورد بررسی در غلظت استوک نیم مک فارلند دارای جهش‌های مختلف در بازهای G، A و C بودند که بر اساس منحنی‌های ذوب DNA، منحنی مقادیر پیش ذوب و پس ذوب و منحنی اختلاف فلوروسنت این اختلاف مشاهده شد. بدین صورت که بر اساس دمای حاصل از ذوب DNA و اتصال مقادیر فلوراسنت محیطی به ژنوم، میزان مصرف فلورسانت با رقت‌های موردمطالعه رابطه مستقیم داشت.

بدین‌صورت‌که در ایزوله‌های دارای میزان بیشتر جهش، مقدار مصرف فلورسنت به حداکثر خود رسیده بود قله حاصل از نمودارهای به‌صورت کاملا کشیده نمایش داده شد.

نتایج حاصل از تعیین توالی

همه ایزوله‌های تعیین توالی شده که حامل ژن *mecA* بودند، در پایگاه داده شناسایی شدند. در این بین، ایزوله‌های گرفته شده از زخم و ادرار دارای بیشترین جهش در اسیدآمینه آدنین به‌صورت A→T، A→G، A→C و A→X مشاهده شد (جدول ۱). ایزوله‌های گرفته شده از خون داری جهش در اسید آمینه گوانین به‌صورت G→A بودند. این در حالی بود که ایزوله‌های مورد مطالعه از نمونه‌های ابسه و سواپ بینی فاقد هر گونه جهش بودند.

جدول ۱. نتایج حاصل از جهش‌های مختلف در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس

ردیف	استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین				p
	ایزوله مورد مطالعه	جهش مورد مطالعه	تغییر اسید آمینه	نوع نمونه	
۱	SA-19	جابجایی، حذف،	A→T A→X A→G A→C	زخم	<۰/۰۵
۲	SA-32	جابجایی	A→T A→X A→G A→C C→A G→T C→A G→X	زخم	<۰/۰۵
۳	SA-105	حذف	A→T	خون	<۰/۰۵
۴	SA-106	حذف	A→T A→T	خون	<۰/۰۵
۵	SA-31	جابجایی	A→T A→T A→T	ادرار	<۰/۰۵
۶	SA-9	حذف	A→X	خون	<۰/۰۵
۷	SA-151	حذف	A→X	کاتاتر	<۰/۰۵
۸	SA-94	حذف	A→X	ابسه	<۰/۰۵
۹	SA-51	حذف	A→X	سواپ بینی	<۰/۰۵
۱۰	SA-81	حذف	A→X	کاتاتر	<۰/۰۵
۱۱	SA-181	حذف	A→X	کاتاتر	<۰/۰۵

۵. بحث

در مطالعه حاضر با استفاده از روش HRM جهش‌های موجود در ژن *mecA* ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی قرار گرفت که نشان از بروز جهش‌های مختلف در ایزوله‌های زخم و ادرار بود. این در حالی بود که بیشترین جهش از نوع متیلاسیون و تبدیل باز آدنین به سایر بازها و حتی حذف گزارش شد. در مطالعاتی که هرشبرگ و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشور آمریکا انجام دادند مشخص شد که شایع‌ترین جهش ها در باکتری‌ها از نوع جهش‌های تبدیل بازهای C و G به سایر بازها می‌باشد (۱۳). در مطالعاتی که مونیتا و آریاس در سال ۲۰۱۶ در کلمبیا بر روی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی بر روی باکتری‌های مختلف انجام دادند، مطرح کردند که حضور، دخالت و نقش پررنگ جهش‌های ژنتیکی به عنوان یکی از مهم‌ترین دلایل ظهور سویه‌های مقاوم به دارو می‌باشد. این در حالی بود که تغییرات حاصله در برخی نوکلئوتیدها و به دنبال آن برخی اسیدآمینه‌ها و ایجاد تغییر در سایت‌های هدف دارو، شرط اصلی در مقاومت‌های وابسته به تغییرات سایت هدف دارو اعلام شد (۱۴). استافیلوکوک‌های اورئوس مورد بررسی از ایزوله‌های بالینی مختلف بودند و محتمل بودن ارتباط جهش ژنی و نوع ایزوله بالینی تا حدی به چالش کشیده شد. زیرا براتچیکوف و همکاران در سال ۲۰۱۱ در لیتوانی مطرح کردند که نوع جهش ژنی و ارتباط آن با ایزوله بالینی و تفاوت بازهای نولکئوتیدی یکی از موضوعات مهمی است که در زمینه تشخیص مطرح می‌باشد، به نحوی که تفاوت و اختلاف در قرارگیری بازهای نولکئوتیدی می‌تواند نتایج تست‌های حساسی مانند HRM را تحت تاثیر خود قرار دهد که 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 زیرسویه‌های جدید مواجه شد که این به نوبه خود یکی از برتری‌های این روش به شمار می‌رود. البته در مطالعه ما به دلیل استفاده از سویه‌های استاندارد اثبات چنین موضوعی امکان‌پذیر نبود (۱۵).

کاربونل و همکاران در سال ۲۰۱۵ شناسایی جهش‌های ژنی موجود را با چند روش مختلف مورد بررسی قرار دادند و حساسیت و دقت روش HRM در کنار روش‌هایی مانند تعیین توالی و سایر روش‌های حساس تایید شد. در مطالعه حاضر نیز با استفاده از تعیین توالی ایزوله‌های مورد بررسی، مشخص شد که روش HRM حساسیت و دقتی مشابه روش استاندارد تعیین توالی دارد (۱۶). 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 (۱۷، ۱۸). در مطالعاتی که ژیائو و همکاران در سال ۲۰۱۴ در چین انجام دادند، چندین باکتری مختلف را 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 بود. در مطالعه ما پرایمرهای طراحی قدرت شناسایی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین مقدار 10^{-4} ثبت شد (۱۹).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که ایزوله‌های خون دارای جهش‌های حذف و ایزوله‌های مربوط به نمونه‌های قابل کنترل‌تر و یا کمتر مواجه شده با مواد ضدعفونی کننده و محیط، جهش‌هایی از نوع حذف داشتند. این موضوع را شاید چنین بتوان شرح داد که ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس دخیل در عفونت‌های پوست و ادراری، به دلیل قرابت به طیف گسترده‌ای از سایر باکتری‌ها می‌باشد و این موضوع می‌تواند ژن‌هایی که روی قطعات متحرک قرار گرفته اند را دستخوش تغییر قرار دهد. ژن *mecA* روی کاست ژنی *SCCmec* که به‌صورت متحرک است، می‌باشد، بنابراین این ویژگی ژنی می‌تواند دخالت سایرباکتری‌ها در مورد مهاجم‌ترشدن و یا مقاوم‌تر شدن آن را رقم بزند (۲۲-۱۹). پیکاوار و همکاران در سال ۲۰۱۵ در کشور استرالیا و هاریونو و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که روش HRM در تعیین جهش‌های نولکئوتیدی یکی از حساس‌ترین روش‌های مورد استفاده است. رویکردی جدید در استفاده از روش‌های نو با حساسیت و دقت بالا می‌تواند مسیر مطالعات و پژوهش‌های باکتری‌شناسی را در جهت رسیدن به یک جایگاه بسیار موثر در زمینه درمان ایجاد کند (۲۳، ۲۴). در پژوهش حاضر مشاهده شد که سویه‌های استافیلوکوک اورئوس دارای فنوتیپ مقاوم به متی سیلین با حداقل غلظت مهاری بالا همگی حاوی ژن *mecA* بودند. در برخی مطالعات مطرح شده است که حضور و فعالیت برخی جهش‌های ژنی می‌تواند با الگوی فنوتیپی در ارتباط باشد. در برخی مطالعات حساسیت روش کشت و HRM با یکدیگر مقایسه شده است که در نهایت کم خطا بودن روش HRM نسبت به کشت به اثبات رسید (۲۵). در بررسی‌های صورت گرفته توسط کرائوزیک و همکاران در سال ۲۰۱۶ 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 آنتی بیوتیک مشخص شد که روش‌های مبتنی بر کشت ممکن است در برخی موارد تشخیص خطای بالایی را به همراه داشته باشند و در نهایت سبب بروز مثبت و منفی‌های کاذب شوند. از این رو، استفاده از روش HRM و تجزیه و تحلیل آن بر مبنای فوتیپ مقاومتی می‌تواند این خلا موجود در تشخیص را از بین ببرد، به نحوی که با مشاهده سویه‌های دارای گستره‌ی حداقل غلظت مهاری ۱۶ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌توان به‌صورت پیش‌فرض برخی جهش‌ها را تا حدی پیش بینی کرد (۲۸-۲۶).

۶. نتیجه‌گیری

تکنیک HRM در مطالعه ما مشخص کرد که ارتباط معنی‌داری بین نوع نمونه بالینی آلوده به استافیلوکوک اورئوس و هم‌چنین مقادیر و نوع جهش‌های ژنی وجود دارد. علاوه بر این، چنین می‌توان استنباط کرد که استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین به دلیل دارا بودن کاست‌های ژنی بسیار متنوع و با الگوپذیری بالا، می‌تواند با سهولت بیشتری دچار تغییرات معنی‌دار و یا بی‌معنی جهشی در ژن‌های خود شود. این امر، زمینه‌ساز ظهور سویه‌های مقاوم به متی سیلینی می‌شوند که حتی در برابر برخی آنتی بیوتیک‌های دیگر نیز مقاومت می‌کنند. گرچه باید به این نکته اشاره کرد که مطالعه بر روی پلی مورفیسم‌های ژنی و شناسایی SNPها از مهم‌ترین مواردی

است که می‌توان با روش HRM به آن اشاره کرد. از محدودیت‌های این مطالعه، عدم شناسایی SNPهای ژنی بود که توصیه می‌گردد در مطالعات آینده شناسایی SNP ژنی با توجه به متغیرهای مختلف در ایزوله‌های بالینی صورت گیرد.

۷. تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی دانشجویی با شماره ۹۶۰۹۲۸۶۰۸۱ است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان ابراز می‌دارند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

هیچگونه تعارض منافعی توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Nasiri MJ, Goudarzi H, Sajadi Nia R, Dabiri H. Molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from patients with bacteremia based on MLST, SCCmec, spa, and agr locus types analysis. Microb Pathog. 2017; 104:328-35.
2. 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):590-7.
3. Tahmasebi H, Zeyni B, Dehbashi S, Motamedi H, Vafaeefar 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): 1062-7.
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 pathogens. 2017; 13(1):e1006110.
5. 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):116-26.
6. Arabestani MR, Tahmasebi H, Zeyni B. Diagnostic Value of Melting Curve Analysis Based on Multiplex-Real Time PCR in Identification of Enterococci Species. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2017; 26(145):234-47.
7. 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.
8. 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 Journal 2017; 19(4):877-86.
9. 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 Sciences Journal. 2012; 21(4):233-7.
10. Noori-Daloii MR, Faraji K. High Resolution Melt Analysis (HRM) and its Strategic Applications Especially in Molecular Genetics. Quarterly of Horizon of Medical Sciences. 2016; 22(1):77-88.
11. 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. Journal of microbiological methods. 2013;92(2):99-102.
12. Tong SYC, Giffard PM. Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2012; 50(11):3418-21.
13. Hershberg R, Petrov DA. Evidence That Mutation Is Universally Biased towards AT in Bacteria. PLoS genetics. 2010;6(9):e10011.۱۵
14. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiology spectrum. 2016; 4(2):10.1128.
15. Bratchikov M, Mauricas M. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for Salmonella spp. genotyping: HRM application for Salmonella spp. subtyping. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2011; 71(3):192-200.
16. Carbonell P, Turpin MC, Torres-Moreno D, Molina-Martinez I, Garcia-Solano J, Perez-Guillermo M, et al. Comparison of allelic discrimination by dHPLC, HRM, and TaqMan in the detection of BRAF mutation V600E. The Journal of molecular diagnostics : JMD. 2011; 13(5):467-73.
17. 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. Applied and

environmental microbiology. 2012; 78(9):3352-60.

18. 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. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2014; 14(2):147-57.

19. 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):1960-72.

20. Wang J, Ren X, Bai X, Zhang T, Wang Y, Li K, et al. Identification of gene mutation in patients with osteogenesis imperfect using high resolution melting analysis. Scientific reports. 2015; 5:13468.

21. Ngoi ST, Thong KL. High Resolution Melting Analysis for Rapid Mutation Screening in Gyrase and Topoisomerase IV Genes in Quinolone-Resistant Salmonella enterica. BioMed research international. 2014; 2014:8.

22. Carillo S, Henry L, Lippert E, Girodon F, Guiraud I, Richard C, et al. Nested High-Resolution Melting Curve Analysis: A Highly Sensitive, Reliable, and Simple Method for Detection of Jak2 Exon 12 Mutations—Clinical Relevance in the Monitoring of Polycythemia. The Journal of Molecular Diagnostics. 2011; 13(3):263-70.

23. Haryono SJ, Datasena IGB, Hariadi A, Mulyarahardj R. High Resolution Melting (HRM) Analysis for Genetic Changes in BRCA1/2 gene. Journal of the Medical Sciences (Berkala ilmu Kedokteran). 2017; 48:(4).

24. Pecavar V, Blaschitz M, Hufnagl P, Zeinzinger J, Fiedler A, Allerberger F, et al. High-resolution melting analysis of the single nucleotide polymorphism hot-spot region in the rpoB gene as an indicator of reduced susceptibility to rifaximin in Clostridium difficile. Journal of medical microbiology. 2012; 61(Pt 6):780-5.

25. Forghani F, Wei S, Oh D-H. 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. Journal of food protection. 2016; 79(5):810-5.

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. Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists. 2007; 56(2):65-70.

27. Long SW, Olsen RJ, Mehta SC, Palzkill T, Cernoch PL, Perez KK, et al. PBP2a Mutations Causing High-Level Ceftaroline Resistance in Clinical Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014; 58(11):6668-74.

28. Fasihi Y, Fooladi S, Mohammadi MA, Emaneini M, Kalantar-Neyestanaki D. The spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates by High Resolution Melting (HRM) analysis. Journal of medical microbiology. 2017; 66(9):1335-7.