ارزیابی روش تشخیصی Real Time PCR مبتنی بر آنالیز منحنی ذوب جهت تشخیص ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس* و ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین

نرگس حیدری [۱](M.Sc)، محمدیوسف علیخانی [۱](Ph.D)، فرید عزیزی جلیلیان [۱](Ph.D)، حامد طهماسبی [۲](M.Sc)، محمدرضا عربستانی [۱و۳*](Ph.D)

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۳- مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

هدف: تشخیص سریع وبه موقع *استافیلوکوک اورئوس* می‌تواند نقش قابل توجهی در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی داشته باشد. با طراحی روش‌های دقیق که دارای حساسیت و اختصاصیت قابل قبولی هستند، می‌توان شناسایی گونه و حتی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را انجام داد. هدف از این مطالعه ارزیابی روش تشخیصی Real Time PCR مبتنی بر آنالیز منحنی ذوب جهت تشخیص ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس* و ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک ذخیره شده در بانک میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان استفاده شد. طراحی پرایمر با انتخاب سایت‌های هدف و ژن *ITS* برای *استافیلوکوک اورئوس* و ژن *mecA* برای سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین صورت گرفت. جهت تعیین اختصاصیت و حساسیت آنالیتیک پرایمرهای طراحی شده از آزمون Real time PCR و روش آنالیز منحنی ذوب DNA سویه‌های مورد مطالعه استفاده شد.

یافته‌ها: اختصاصیت آنالیتیک پرایمرهای طراحی شده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب DNA جهت شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* در ۸۳/۷۹ درجه سانتی‌گراد و *استافیلوکک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در ۷۶/۶ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. حساسیت آنالیتیکی پرایمرهای طراحی شده نیز بر اساس نمودارهای حدآستانه و رقت‌های تعیین شده، برای ژن *ITS* توانایی شناسایی بیش از ۱۵ CFU باکتری و برای ژن *mecA* توانایی شناسایی بیش از ۲۵ CFU باکتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: طراحی پرایمرهای مناسب و به‌کارگیری تکنیک‌های مولکولی حساس، می‌تواند دو عامل تعیین‌کننده در طراحی روش‌های سریع و دقیق جهت شناسایی باکتری‌های مهاجمی مانند *استافیلوکوک اورئوس* باشد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکک اورئوس*، مقاومت به متی‌سیلین، Real time PCR، مقاومت داروئی

مقدمه

تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا همیشه یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های محققان بوده است [۱]. حضور و نقش پررنگ باکتری‌های بیمارستانی و گسترش روزافزون آن‌ها از یک سو و انتشار سویه‌های مقاوم در جامعه از سوی دیگر، نیاز به دقیق‌ترین و سریع‌ترین روش‌های تشخیصی را بیش از پیش

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱-۲۳۸۳۸۰۷۷

Email: mohammad.arabestani@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲

نشـان داده مـی‌دهـد [۲]. یکـی از مهـم‌تـرین بـاکتری‌هـای بیمارستانی کـه نقـش بسـیار مهمـی در تولیـد عفونـت‌هـای بیمارستانی گسترده دارد، استافیلوکوک‌ها می‌باشند [۳].

استافیلوکوک‌ها از جمله باکتری‌های بیمارستانی می‌باشـند کـه دارای خصوصـیاتی شـامل کوکسـی‌هـای گـرم مثبـت، باکتری‌هایی بدون اسـپور، بـی‌هـوازی بـوده کـه از ۴۰ گونـه مختلف تشکیل شده‌اند که از مهم‌ترین گونه‌های بیمـاری‌زا در انسان می‌توان به *استافیلوکوک اورئوس* اشـاره کـرد کـه لقـب سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص داده است [۴]. از جمله مشکلاتی که ایـن بـاکتری ایجـاد مـی‌کنـد می‌توان به آندوکاردیت، عفونت‌های بافتی اشاره کرد [۵]. ایـن در حـالی اسـت کـه، بـه دلیـل اسـتفاده بـی‌رویـه‌ی از آنتی‌بیوتیک‌هـای وسـیع الطیـف جهـت درمـان عفونـت‌هـای استافیلوکوکی، سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در ایـن جـنس ظهور کرده‌انـد کـه از ایـن بـین مقاومـت بـه متـی‌سـیلین در *استافیلوکوک اورئوس* بیش‌ترین توجه را به خـود اختصـاص داده است [۶]. مقاومت نسبت بـه متـی‌سـیلین در سـویه‌هـای استافیلوکک اورئوس مقـاوم بـه متـی‌سـیلین از طریـق یـک پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی‌سـیلین بـه نـام PBP2a کـه تمایل کمی به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی دارد، ایجاد می‌شـود [۷]. این پروتئین که توسط ژن *mecA* کدگـذاری مـی‌شـود در ناحیـه‌ی ژنومیـک بـاکتری بـه نـام کاسـت کرومـوزومی استافیلوکوکی scc mec قرار گرفته است. ژن*mecA* تقریبـاً در تمام گونه‌های استافیلوکوکی یکسان می‌باشد و به عنوان یـک نشانگر مولکولی مهم مقاومت به متی‌سیلین تبدیل شـده اسـت [۸].

روش‌های قدیمی که مبتنی بر کشت و انجام آزمایش‌هـای بیوشیمیایی طولانی و وقت‌گیر می‌باشند، در کنار سرعت کـم، گاهاً با خطای انسانی نیز مواجه مـی‌شـوند کـه تـاثیر بسـیار زیادی در گزارشات و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب دارد [۹]. با توجه به مطالب اشاره شده، معرفی و حضور برخی روش‌هـای حساس و اختصاصی‌تـر، در کنـار روش‌هـای قـدیمی حـس می‌شود. استفاده از تکنیـک Real Time PCR در سـال‌هـای اخیـر بـه یکـی از حسـاس‌تـرین و سـریع‌تـرین روش‌هـای تشخیصی–درمانی مبدل شده است [۱۰]. استفاده از این روش در حوزه تشخیصی وابسته به تکنیک‌های مختلفی می‌باشد، که یکی از آن‌ها آنالیز منحنـی ذوب DNA مـی‌باشـد [۱۱]. ایـن تسـت کـه اولـین بـار توسـط Carl Wittwers توصـیف شـد تشخیص بر مبنای رابطه بین دما و میزان دناتوراسـیون DNA را بیان می‌کند که با افزایش درجـه حـرارت دو رشـته DNA شروع به جدا شدن می‌کنند [۱۱]. منحنی ذوب که معمـولاً بـا دناتوره شدن DNA با افزایش دما مشخص می‌شود و تغییر در شیب منحنی عمل‌کرد دما را برای به‌دسـت آوردن نقطـه ذوب نشان می‌دهد و نقطه ذوب زمانی مشـخص مـی‌شـود کـه ۵۰ درصد از DNA دناتوره شده است [۱۲].

در روش آنالیز منحنی ذوب DNA می‌توان با بهره‌گیری از پرایمرهای اختصاصی، باکتری‌های مختلـف را حتـی در حـد سویه تشـخیص داد [۱۳]. در بسـیاری از مطالعـات صـورت گرفته، استفاده از این روش بر دو اصل انتخاب سـایت هـدف مناسـب و اسـتفاده از پرایمرهـای اختصاصـی بـا کـم‌تـرین همولوژی استوار می‌باشد. در مطالعاتی که زینی و همکاران در سال ۲۰۱۶ و عربستانی و همکـاران در سـال ۲۰۱۷ (هـر دو همدان) انجام دادند، نشان داده شد که اسـتفاده از سـایت‌هـای هدف مناسب جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی با حساسیت بـالا، مـی‌توانـد شناسـایی برخـی سـویه‌هـای مقاومـت بـه ونکومایسین را در گونه‌هـای مختلـف انتروکـوک میسـر کنـد [۹،۱۰]. از طرفی دیگر، شناسایی استافیلوکوک‌های اورئـوس مقاوم به متی‌سیلین که هم در جامعه و هـم در بیمارسـتان‌هـا شیوع بسیار بالایی پیدا کرده‌اند، امری بسـیار مهـم مـی‌باشـد [۱۴]. سرعت و دقت استفاده از روش‌های فنوتیپی پایه ماننـد استفاده از دیسـک‌هـای آنتـی‌بیـوتیکی از حساسـیت بـالایی برخوردار نبوده و نیاز به صرف وقت زیادی نیز مـی‌باشـند. از این رو، هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی روش تشخیصی Real Time PCR مبتنـی بـر Melting Curve Analysis جهـت تشخیص ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس* و ژن عامـل مقاومت به متی‌سیلین قرار داده شد تا با استفاده از سایت‌هـای

هدف *ITS* برای *استافیلوکوک اورئوس* و سایت هدف *mecA* برای سویه‌های استافیلوکوک اوئوس مقاوم به متی‌سیلین، به یک تشخیص دقیق و سریع رسید.

مواد و روش‌ها

انتخاب و کشت ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین: در مطالعه حاضر که به‌صورت تجربی در سال ۱۳۹۵ صورت گرفت، با استفاده از ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس* ذخیره در بانک میکروبی آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان مراحل کار طراحی شد. تمامی ایزوله‌های بالینی، توسط روش‌های استاندارد آزمایشگاهی و تست‌های بیوشیمیایی از قبیل تست کاتالاز، کوآگولاز، DNA آز و کشت بر روی مانیتول سالت آگار تایید فنوتیپی شده بودند. هم‌چنین مقاومت به متی‌سیلین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و دیسکانتی بیوتیکی سفوکسیتین (۳۰میکروگرم) تهیه شده از شرکت Mast انگلستان و طبق دستورالعمل CLSI تعیین گردید [۱۵].

استخراج DNA ژنومی: در این بررسی از کیت استخراج (سیناژن، ایران) جهت جداسازی DNA ژنومی استفاده شد. در ابتدا باکتری مورد نظر بر روی محیط سالت آگار کشت داده شده و در دمای ۲± ۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس یک کلنی از هر ایزوله به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB براث تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس لوله‌ها را خارج کرده و ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتق شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۴۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع روئی توسط سمپلر با دقت از رسوب حاصل جدا گردید و بقیه مراحل طبق پروتکل ارائه شده در کیت استخراج انجام شد. جهت تعیین کیفیت استخراج، غلظت و جذب نوری DNA خالص شده در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ تعیین گردید [۱۶].

طراحی پرایمرها: نواحی هدف انتخاب شده برای پرایمرهای استافیلوکک اورئوس ژن *ITS*، و هم‌چنین پرایمرهایی برای شناسایی سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین *mecA* تعیین شد (جدول ۱). پس از انتخاب سایت هدف جهت طراحی پرایمر، بانک‌های اطلاعاتی مربوط به هر باکتری ازسایت NCBI جستجو و تهیه گردید. بعد از انجام این مراحل جهت Alignment کردن اطلاعات مربوط به هر ژن از نرم‌افزار Mega4 استفاده شد. سپس با دادن پارامترهای مناسب به نرم‌افزار (مانند طول محصول PCR، محل قرارگرفتن پرایمرها)، پرایمرهای مربوطه طراحی گردید. جهت ارزیابی دمای Anneling و Tm پرایمرهای طراحی شده از نرم‌افزار Oligo و Gene Runner استفاده شد. بعد از طراحی پرایمرهای ذکر شده به منظور اطمینان از اختصاصی بودن عمل‌کرد آن‌ها، در بانک اطلاعاتی NCBI عمل Blast کردن با نمونه‌های انسانی، قارچی، ویروس‌ها و میکروارگانیسم‌های دیگر صورت گرفت.

تایید مولکولی پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه: جهت اطمینان از عدم همولوژی و اختصاصی بودن توالی پرایمرهای طراحی شده، آزمون PCR جهت تکثیر ژن‌های هدف در گونه‌های *استافیلوکوک اورئوس* و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین تایید شده از نظر فنوتیپی انجام گرفت. جهت اطمینان از درستی توالی‌های تعیین شده از سویه ATCC 33591به عنوان کنترل مثبت *استافیلوکوک اورئوس* و از سویه ATCC 25922 اشرشیاکلای و سویه ATCC 27853 سودوموناس آئروژینوزا به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های مورد نظر: برای انجام واکنش PCR در حجم ۲۰ لاندا به این صورت عمل شد: ۱۰ لاندا مسترمیکس (Ampliqon) آلمان، شامل (Insert red dye and stabilizer ,unit Ampliqon polymeras 2/0, 4/ MmdNTP 4, Tris-Hcl PH8.5,(NH4) SO4, 3mMMgcl2,0/2%Tween20) ۱ لاندا DNA استخراج شده و ۱ لاندا از هر پرایمر به غلظت ۱۰ پیکومولار و ۷ لاندا آب مقطر استریل داخل میکروتیوب‌های ۰/۲ ریخته شد و در نهایت تکثیر ژن مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf آلمان) انجام گرفت. برنامه چرخه حرارتی واکنشPCR برای ژن‌ها به صورت واسرشت‌سازی اولیه ۹۴

درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۱ دقیقه اتصال پرایمر دز ۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت. در نهایت یک مرحله طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد لحاظ شد. و هم‌چنین جهت اطمینان از درستی توالی‌های تعیین شده از سویه ATCC 33591 استافیلوکک اورئوس به عنوان کنترل مثبت و از سویه ATCC 25922 اشرشیااکلای و سویه ATCC 27853سودوموناس ائروژینوزا به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از انجام PCR برای ژن‌های مربوطه، محصولات PCRتوسط الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱درصد رنگ‌آمیزی شده با DNA safe stain (سیناکلون ایران) از یک‌دیگر جدا شدند. ۵ لاندا از هر محصول تکثیریافته در ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE ۰/۵ X الکتروفورز گردید. برای تعیین اندازه محصولات از ۴ لاندا مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد. در نهایت از ژل توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد.

توالی‌یابی (Sequencing): پس از طراحی پرایمرهای مورد نظر و تایید مولکولی سویه‌ها، جهت اطمینان از درستی توالی‌های تعیین شده، یک نمونه از هر محصول PCR مربوط به ژن *mecA ITS*، با همکاری شرکت پیشگام توسط شرکت Bioneer کره جنوبی توالی‌یابی شد.

تهیه رقت‌های متوالی DNA جهت سنجش حساسیت و اختصاصیت آنالیتیک پرایمرها: برای انجام آزمون حساسیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از تهیه استاندارد باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند (۱/۵×۱۰۸ CFU/ml)، اقدام به تهیه رقت سریال از ۱۰۸ تا ۱۰۱ باکتری شد و به‌صورت سه تایی (Triplicate) در سه روز متوالی برای رقت‌های تهیه شده آزمون Real Time PCR انجام شد و با استفاده از تکرارپذیری تست انجام شده، حساسیت آزمون طراحی شده به دست آمد. هم‌چنین به منظور انجام آزمون اختصاصیت پرایمرهای تهیه شده از سویه‌های کنترل مثبت باکتری‌های *استافیلوکوک اورئوس* و هم‌چنین از DNA انسان و DNA سایر باکتری‌ها از جمله سویه ATCC 19606 اسینتوباکتر بومانی، سویه ATCC 25922 اشرشیاکلای و سویه ATCC 27853سودوموناس ائروژینوزا به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای جداسازی گونه استافیوکوکوس اورئوس از آنالیز Melting curveاستفاده شد.

انجام واکنش Real time PCR: دستگاه استفاده شده در این مطالعه Real time ABI 7300 step 1 plus بود. چرخه دمایی استفاده شده در این دستگاه طی سه مرحله انجام شد که به این صورت می‌باشد. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن DNA است و در این مرحله آنزیم پلیمراز فعال می‌گردد در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مرحله دوم واکنش تکثیری DNA با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۴۰ سیکل ادامه یافت. مرحله پایانی جهت ترسیم منحنی ذوب که برای تفکیک ژن‌های مورد نیاز در این مطالعه لازم می‌باشد در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شدند. مخلوط واکنش Real time PCR شامل Master Mix PCR SYBR Green (Ampliqon) به میزان ۱۰ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر به غلظت ۱۰پیکومولار، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل می‌باشد.

روش محاسبه قدرت شناسایی باکتری توسط پرایمرهای طراحی شده: جهت تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده، ابتدا از ایزوله‌های مورد بررسی رقت استاندارد باکتریایی به غلظت نیم مک فارلند (۱/۵×۱۰۸ CFU/ml) تهیه شد. بعد از استخراج DNA با غلظت نیم فک فارلند، رقت سریالی که با نسبت‌های ۱۰۸تا ۱۰۱ (۱ لاندا DNA باکتری + ۹ لاندا آب دیونیزه) تهیه شد و نتایج حاصل به صورت منحنی‌های ذوب اختصاصی به‌دست آمد. قدرت هر پرایمر با توجه به رقت‌های شناسایی شده در منحنی تکثیر (ترشولدر) و جذب نوری به‌دست آمده مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین حساسیت

پرایمرها نیز از آنالیز منحنی ذوب و دمای اختصاصی هر پرایمر برای هر ژن استفاده شد. در نهایت، مبنای جذب نوری نیم مک فارلند بر اساس CT نمودار تکثیر به‌دست آمده در رقت‌های مختلف و فواصل این رقت‌ها محاسبه شد [۱۰].

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات به‌دست آمده از آزمون‌های PCR توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ دسته‌بندی شدند. هم‌چنین به منظور بررسی سطوح هموژی و مطابقت‌های ژنتیکی محصولات PCR به‌دست آمده جهت تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده، از نرم‌افزار کروماس نسخه ۵/۲ استفاده شد.

جدول۱: پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه جهت تکثیر ژن های *mecA* و *ITS*

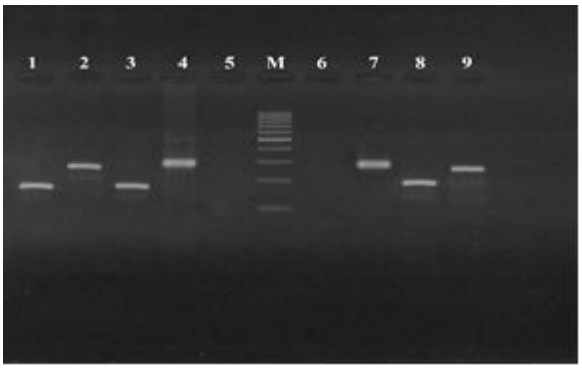
ژن مورد مطالعه	توالی	طول آمپلیکون(bp)	رفرنس
ITS	F: GTTAGAGCGCACGCCTGATA R: AATGGTGGAGACTAGCGGGA	۱۵۵	این مطالعه
mecA	F: GGCTCAGGTACTGCTATCCAC R: AACGTTGTAACCACCCCAAGA	۲۹۷	این مطالعه

نتایج

تعیین باکتری‌های مورد مطالعه: در ابتدا ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* به‌دست آمده بر اساس استاندارد CLSI تعیین مقاومت شدند. باکتری‌های کشت داده شده و تعیین فنوتیپ شده به روش انتشار از دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم (Mast انگلیس) با قطر کم‌تر از ۲۱ میلی‌متر مقاوم به متی‌سلین در نظر گرفته شد.

تایید مولکولی پرایمرهای طراحی شده: ژن‌های *ITS* و *mecA* با پرایمرهای طراحی شده برای شناسایی استافیلوکوک حساس و مقاوم به متی‌سیلین با موفقیت تکثیر شدند. محصولات به‌دست آمده جهت کنترل کیفی بر روی ژل آگارز ۱درصد با طول قطعات ۱۵۵ جفت باز برای ژن *ITS* و ۲۹۷ جفت باز برای ژن *mecA* الکتروفورز شدند (شکل۱).

حساسیت آنالیتیکی پرایمرها: با استفاده از تهیه استاندارد باکتریایی به غلظت نیم مک فارلند (۱/۵×۱۰۸ CFU/ml) رقت سریالی که با نسبت‌های ۱۰۸تا ۱۰۱ (۱ لاندا DNA باکتری + ۹ لاندا آب دیونیزه) تهیه شد و نتایج حاصل به صورت منحنی‌های ذوب اختصاصی به‌دست آمد. همه منحنی‌های ذوب تکثیری نقطه ذوب یکسانی داشتند. منحنی حاصل از تکثیر ژن *ITS* در همه رقت‌ها دمای ۸۳/۷۹ درجه سانتی‌گراد را نشان داد و منحنی حاصل از تکثیر ژن *mecA* در همه رقت‌ها دمای ۷۶٫۶ درجه سانتی‌گراد را نشان داد که این دماهای ذوب با نتایج حاصل از بلست پرایمرها در پایگاه NCBI کاملاً مطابقت داشت جدول ۲. تحلیل منحنی‌های آستانه مربوط به ژن‌های مورد مطالعه، نشان‌دهنده شروع موفق همانندسازی در سیکل‌های مختلف در همه رقت‌های تهیه شده بود (شکل ۱و۲). با به‌دست آوردن غلظت در رقت‌های ۱۰۱ تا ۱۰۸ مشخص شد که پرایمر طراحی شده برای استافیلوکک اورئوس قدرت شناسایی ۱۵ CFU باکتری و پرایمر طراحی شده برای استافیلوکک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین قدرت شناسایی ۲۵ CFU باکتری را دارد (جدول ۳).



شکل۱. نتیجه تکثیر ژن های *ITS* با طول ۱۵۵ جفت باز و *mecA* با طول ۲۹۷ جفت باز بر روی ژل آگارز۱درصد. ۱و۳ : نمونه مثبت از نظر حضور ژن *ITS*. ۲و۴ و۹: نمونه مثبت از نظر حضور ژن *mecA*. ۵: کنترل منفی ژن *mecA*. ۶: کنترل منفی ژن *ITS*. چاهک۷: کنترل مثبت ژن *mecA*، چاهک۸: کنترل مثبت ژن *ITS*. M: مارکر ۱۰۰جفت بازی.

اختصاصیت آنالیتیکی پرایمرها: اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با DNA گونه‌های متفاوت ارزیابی شد. به این منظور از نمونه DNA باکتری اشرشیاکلای برای تعیین اختصاصیت پرایمرهای *استافیلوکوک اورئوس* و همچنین برای تعیین اختصاصیت پرایمرهای *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از DNA باکتری انتروکوک استفاده شد که منحنی‌های ذوب به‌دست آمده دارای نقطه ذوب متفاوتی بودند (شکل ۳). دماهای به‌دست آمده در پایان واکنش و منحنی‌های ایجاد شده نشان‌دهنده عدم شناسایی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای دیگر باکتری‌ها بود.

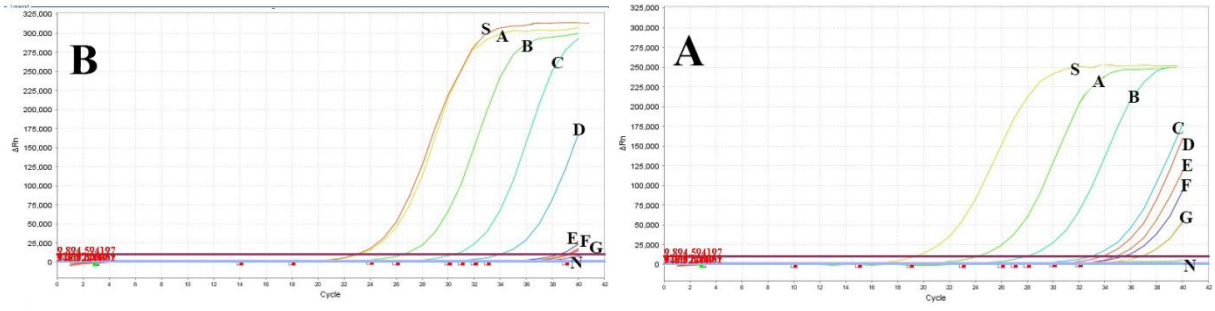
تجزیه و تحلیل: نتایج حاصل از بلست محصولات ژن *ITS* در باکتری *استافیلوکوک اورئوس* و تکثیر ژن *mecA* در باکتری *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نشان‌دهنده عدم هموژوزی پرایمرهای طراحی شده با باکتری‌های دیگر بود. همچنین نتایج Alligment نشان‌دهنده حساسیت و اختصاصیت بسیار مناسب برای شناسایی باکتری‌های مورد مطالعه بودند.

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی چرخه ترشولدر و دمای ذوب DNA استخراج شده گونه های مختلف باکتریایی جهت تعیین اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده

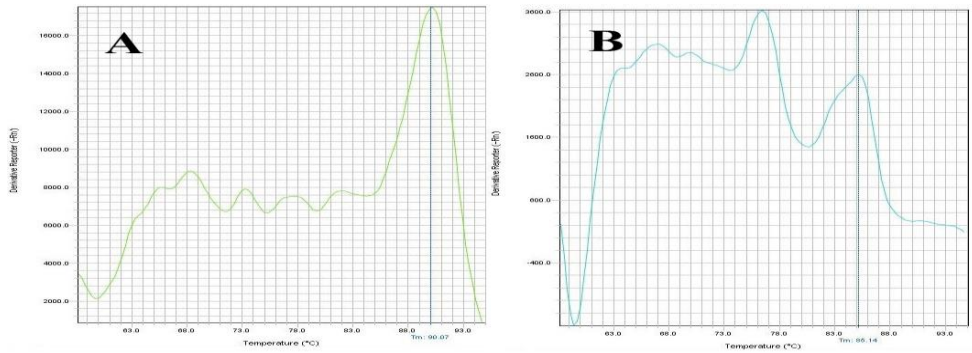
باکتری مورد مطالعه		غلظت و جذب نوری بدست آمده در رقت های مختلف							
		استوک	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
استافیلوکوک اورئوس	OD	۲/۴	۳/۲۴	۱/۸	۱/۳	۱/۲	۰/۷	۰/۵	۰/۱
	Con	ng۷/۸	ng۰/۶۹	ng۰/۳۹	pg۶/۵۴	pg۰/۶	pg۰/۶۷	pg۰/۰۴۸	pg۰/۰۰۰۵
استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین	OD	۱/۲	۱/۸	۰/۸۱	۰/۸	۰/۸۴	۰/۳۲	۱/۱	۰/۶۹
	Con	ng۶/۷۱	ng۰/۶۴	ng۰/۰۷۲	pg۰/۰۹۳	pg۰/۴۴	pg۰/۰۳۱	pg۰/۰۹۱	pg۰/۰۰۰۲۵

جدول۲: نتایج حاصل از بررسی غلظت و جذب نوری DNA استخراج شده باکتری های استافیلوکک اورئوس و استافیلوکک اورئوس مقاوم به متی سیلین در رقت های مختلف با استفاده از دستگاه نانودراپ

باکتری های مورد مطالعه							
استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین				استافیلوکوک اورئوس			
کنترل مثبت		کنترل منفی		کنترل مثبت		کنترل منفی	
استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین		انتروکوک فکالیس		استافیلوکک اورئوس		اشریشیا کلی	
Melt	CT	Melt	CT	Melt	CT	Melt	CT
۷۶/۶	۲۰/۱۵	۸۵/۱۴	۲۹/۳۴	۸۳/۷۹	۱۵/۴۴	۹۰/۰۷	۳۱/۵۲



شکل ۲. A: منحنی آستانه (ترشولدر) در رقت های مختلف برای تعیین حساسیت پرایمرهای استافیلوکوک اورئوس. B: منحنی آستانه (ترشولدر) در رقت های مختلف برای تعیین حساسیت پرایمرهای استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین. تعداد سیکل ها روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی بر روی محور عمودی نشان داده شده است. A مربوط به دمای حساسیت پرایمرهای طراحی شده در رقت ۱۰۸ می باشد. B مربوط به رقت C،۱۰۷ مربوط به رقت D،۱۰۶ مربوط به رقت ۱۰۵، E مربوط به رقت ۱۰۴، F مربوط به رقت ۱۰۳، G مربوط به رقت S.،۱۰۲: مربوط به رقت استوک(نیم مک فارلند)، N: کنترل منفی برای ژن مورد نظر.



شکل ۳. A: منحنی ذوب انتروکوک فکالیس جهت ارائه کنترل منفی برای اختصاصیت پرایمر استافیلوکک اورئوس مقاوم به متی سیلین. B: منحنی ذوب اشرشیا کلای جهت ارائه کنترل منفی برای اختصاصیت پرایمر استافیلوکوک اورئوس

بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص بر مبنای روش‌های حساس و به روزتر از قبیل Real Time PCR می‌تواند قدم موثری در تسریع خوانش نتیجه و کاهش اتلاف وقت در امر درمان باشد [۱۷]. در حال حاضر به دلیل در دسترس نبودن دستگاه Real Time PCR در تمامی آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و بیمارستانی و هم‌چنین نیاز داشتن به پرسنل مجرب، استفاده از این روش را تا حدودی محدود نموده است. از جمله تکنیک‌های وابسته به Real Time PCR، آنالیز منحنی ذوب DNA می‌باشد که با آن می‌توان ایزوله‌های مجهول را شناسایی کرد [۱۸]. در مطالعه حاضر که برای شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از تکنیک آنالیز منحنی ذوب DNA صورت گرفت، حساسیت و اختصاصیت انالیتیکی پرایمرهای طراحی شده به‌دست آمد. حساسیت پرایمرهای طراحی شده برای تشخیص *استافیلوکوک اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین بر اساس رقت‌های تهیه شده از DNA استخراج شده نیم مک فارلند، تعیین شد. پرایمر ژن *ITS* که مربوط به *استافیلوکوک اورئوس* بود توانایی شناسایی DNA باکتری از رقت‌های ۱۰۷ تا رقت ۱۰۲ را داشت. این امر با توجه به CTهای به‌دست آمده از اولین رقت شناسایی شده و آخرین رقت شناسایی شده، این پرایمر توانایی شناسایی ۱۰۲ باکتری که همسان شده با ۲۵ CFU باکتری بود را داشت. این نتایج نشان‌دهنده دقت در تهیه رقت‌های مختلف می‌باشد که اهمیت این موضوع را در روش ذوب DNA بر اساس Real Time PCR بیش از پیش نشان می‌دهد. اطلاعات به‌دست آمده از رقت‌های تهیه شده در این مطالعه و اهمیت آن را می‌توان در مطالعه‌ای که Xing-long و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی گروه متعددی از باکتری‌ها، از جمله استافیلوکک اورئوس انجام دادند دید. در این مطالعه که با روش ذوب DNA به شناسایی جنس و گونه‌های مختلف پرداخته شده بود، حساس‌ترین رقت ۱۰۱ گزارش شد که برای شناسایی استافیلوکک اورئوس شاخص مناسبی به‌حساب نمی‌آید. به‌طوری‌که بالابودن این مقدار را می‌توان در سایر باکتری‌های مطالعه صورت گرفته، دید که از این نظر با نتایج بررسی حاضر مطابقت ندارند [۱۹].

علاوه بر این یک رابطه منطقی بین میزان غلظت به‌دست آمده از DNAهای رقیق شده از نیم مک فارلند و زمان آغاز سیکل‌ها نیز به چشم می‌خورد. این تطابق را می‌توان در انتخاب سایت هدف مناسب یافت. به‌طوری‌که در روش ذوب DNA بر اساس Real Time PCR یکی از مهم‌ترین موضوعاتی که در طراحی روش باید مد نظر قرار داد، انتخاب سایت هدف مناسب و حساس جهت طراحی پرایمر می‌باشد. Forghani و همکاران در سال ۲۰۱۶ در نتایج خود نشان دادند که انتخاب یک سایت هدف مناسب در روش ذوب DNA می‌تواند که قادر به شناسایی باکتری در رقت ۱۰۱ نیز بود. انتخاب رقت‌های مناسب و دقت در انجام مراحل کار نکات شاخصی است که می‌توان به مشابه بودن این دو مطالعه به آن اشاره کرد [۲۰].

علاوه بر این، حساسیت پرایمر ژن *mecA* کم‌تر از ژن *ITS* بود. پرایمر این ژن توانایی شناسایی DNA رقیق شده در رقت ۱۰۳ را داشت و با توجه به رقت اولیه شناسایی شده توسط این پرایمر در سیکل ۲۶ منحنی تکثیر، مقادیر بیش از ۲۵ CFU باکتری را می‌تواند شناسایی کند. این امر می‌توان به دلایل مختلفی نسبت داد، از آن می‌توان به متحرک بودن لوکوس SCCmec اشاره کرد. چون سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین که توسط این پرایمر تشخیص داده نشده است ممکن است دارای گردش سویه‌ای بوده باشند. مطالعاتی که Clifford و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Yam در سال ۲۰۱۳ بر روی تعیین سویه استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین انجام دادند مشخص کرد که در پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در این موارد هم قادر به شناسایی ۱۰۲ باکتری بودند که از این نظر با مطالعه حاضر کاملاً مطابقت داشتند [۲۱]. در این مطالعات هم‌چنین با به‌دست آوردن بهترین دمای ذوب در کنار حساسیت، اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به‌طوری‌که اختصاصیت دماهای به‌دست آمده و حساسیت پرایمرهای طراحی در همه مطالعات ذکر شده و مطالعه حاضر کاملاً همخوانی داشت [۲۲].

جهت اختصاصیت سنجی پرایمرهای طراحی شده نیز با در نظر گرفتن دمای ذوب DNA، برای *استافیلوکوک اورئوس* ۸۳/۷ درجه سانتی‌گراد و برای ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین ۷۶/۶ درجه به‌دست آمد. در مطالعاتی که Bratchikov و همکاران در سال ۲۰۱۱ داشتند نشان دادند در طراحی روش‌های مختلفی که بر دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی هستند و مبنای انجام آن‌ها Real Time PCR می‌باشد، گاهی ممکن است در سویه‌های بالینی اختلافاتی در مقدار این موارد دیده شود. از مهم‌ترین دلایل آن می‌توان به متغیر بودن C+G در نمونه‌های مختلف و تاثیر مکان و حتی نوع نمونه گرفته شده اشاره کرد. از این رو اختصاص یک دمای مناسب و کلی برای همه نمونه‌های بالینی از یک سویه ممکن کمی دور از انتظار باشد و برای نمونه‌های مختلف از یک گونه هم نیاز به بهینه کردن این روش برای گرفتن نتایج بهتر باشد [۲۳].

در مطاله حاضر میزان قدرت پرایمرهای طراحی شده در شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین به ترتیب برای ژن‌های *ITS* و *mecA* به ترتیب بیش‌تر از ۱۵ و بیش‌تر از ۲۵ CFU/mL مشاهده شد. این مقادیر با در نظر گرفتن رقت‌های DNA و نسبت‌های جذب نوری و هم‌چنین CTهای به‌دست آمده در منحنی‌های تکثیر بود. با در نظر گرفتن این اعداد، می‌توان اختصاصیت و کم خطا بودن این روش را نسبت به روش‌های فونتیپی رایج مانند دیسک دیفیوژن دید. به‌طوری‌که، در مطالعاتی که Wongboot و همکاران در سال ۲۰۱۵ برای مقایسه روش disc difiuosion و Real time PCR جهت افتراق بین سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و حساس به متی‌سلین در نمونه‌های خون انجام دادند، دقت تشخیص Real time PCR مبتنی بر روش ذوب DNA برای ژن حساس به متی‌سیلین ۱ CFU/ml و برای ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین ۱۰ CFU/ml بود [۲۴]. این اختلاف در حساسیت را علاوه بر دلایل ذکر شده، می‌توان به نوع رنگ فلورسنت مورد استفاده و هم‌چنین دمای انگلینگ پرایمرها نیز نسبت داد. به‌طوری‌که در استفاده از رنگ‌های حساس‌تر مانند LC گرین و یا Eva گرین حساسیت به مراتب بالاتر و بیش‌تر خواهد بود.

حساسیت و اختصاصیت روش‌های مولکولی را می‌توان با گلد استاندارد قرار دادن تعیین توالی‌های انجام شده، تجزیه و تحلیل کرد. در بررسی‌های انجام شده توسط Skow و همکاران در سال ۲۰۰۵ که به منظور مقایسه روش‌های مولکولی و فنوتیپی صورت گرفت مشخص شد که روش‌های فنوتیپی، با حساسیت بسیار بالای خود هم، نمی‌توانند حساسیت و اختصاصیت روش‌های ژنوتیپی، خصوصاً روش‌های مبتنی بر Real Time PCR را پشت سر بگذارند. در این مطالعه که بر روی سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سلین صورت گرفته بود، مشخص شد که استفاده از روش

ذوب DNA می‌تواند در شناسایی این سویه‌های خطرناک بهتر و سریع‌تر از روش‌های فنوتیپی عمل کند [۲۵].

یکی از خصوصیات تکنیک‌های مبتنی بر ذوب DNA در روش Real Time PCR توانایی این روش در امر تایپینگ و دسته‌بندی سویه‌های مختلف می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Krawczyk و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت طراحی پروفایل ذوب را در کنار روش PFGE مورد استفاده قرار گرفت تا حساسیت آن را افزایش دهد [۲۶]. در مطالعه حاضر، پرایمرهای طراحی شده بعد از مشخص شدن دمای ذوب آن‌ها، قادر به شناسایی گونه و سویه‌های نزدیک نبودند و دارای دمایی به مراتب کم‌تر از دماهای به‌دست آمده بودند، که این امر با در نظر گرفتن حساسیت آنالیتیکی پرایمرها، می‌تواند اختصاصیت آنالیتیکی آن‌ها را نیز بیان کند.

استفاده از روش Real Time PCR در برخی مواقع دارای محدودیت‌های اجرایی می‌باشد، این محدودیت‌ها در شرایطی خود را بیش‌تر نشان می‌دهند که تعداد دفعات تکرار بالا رفته و تامین مواد اولیه جهت انجام تست، با محدودیت مواجه شود. علاوه بر این، ذوب قطعات DNA وآنالیزهای آن در صورت خطا و عدم دقت در طراحی پرایمرهای مورد استفاده و عدم انطباق دمای ذوب، می‌تواند خطای بسیار بالایی را برای محقق به همراه داشته باشد [۲۷]. در کنار چنین محدودیت‌های، روش‌های مبتنی بر Real Time PCR را می‌توان با بهینه کردن، به‌عنوان یک مسیر پیشنهادی برای از بین بردن روش‌های سنتی و قدیمی دانست. این امر با دقت و انتخاب پرایمرهای اختصاصی و برگرفتن سایت‌های هدف ویژه، می‌تواند بالاتر برود. با به‌کارگیری روش آنالیز منحنی ذوب DNA و تجزیه و تحلیل مناسب آن‌ها می‌توان جدایه‌های بالینی به‌دست آمده از سویه‌های مختلف *استافیلوکوک اورئوس* را مشخص کرد و با توجه به زمان‌بر بودن تعیین جنس و گونه کردن این باکتری با استفاده از روش‌های فنوتیپی معمول و هم‌چنین خطای احتمالی این روش‌ها، بهتر است از یک روش جایگزین که حساسیت قابل قبولی نیز دارد استفاده کرد. مطالعه حاضر که از تکنیک ذوب DNA و تفسیر نمودارهای حاصل صورت گرفت، در کنار تکنیک آنالیز منحنی ذوب با کیفیت بالا (HRM) دارای کاستی‌هایی می‌باشد که دقت و حساسیت از جمله مواردی است که می‌توان به آن اشاره کرد. توصیه می‌شود در مطالعات بعدی، علاوه بر استفاده از تکنیک آنالیز منحنی ذوب، از تکنیک HRM نیز استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان: طراحی روش Multiplex Real Time PCR به منظور تشخیص و شناسایی *استافیلوکوک اورئوس* از استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی بر اساس روش Melting Curve Analysis بر روی ایزوله‌های جداشده از نمونه‌های بالینی مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۵ به شماره ۹۴۰۴۲۳۲۲۱۲ است 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 می‌دارند.

منابع

[1] Seyed javadi SS, Alebouyeh M, Nazem Alhosseini Mojarad E, Zali MR. Frequency of class 1 integron and multidrug resistance pattern among isolates of Staphylococcus aureus from hospitalized patients and environmental samples in an intensive care unit in Tahran, Iran. Koomesh 2014; 15: 341-348.

[2] najar-peerayeh s, jazayeri moghadas a, bakhshi b. Staphylococcus epidermidis virulence factor and ability of macroscopic biofilm production. Koomesh 2016; 17: 918-923.

[3] Abdal N, Ghaznavirad E, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive Staphylococcus aurous and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. Koomesh 2014; 16: 82-89.

[4] Mehta S, Singh C, Plata KB, Chanda PK, Paul A, Riosa S, Rosato RR, Rosato AE. β-Lactams Increase the antibacterial activity of daptomycin against clinical methicillin-resistant staphylococcus aureus strains and prevent selection of daptomycin-resistant derivatives. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 6192-6200.

[5] Camussone CM, Calvinho LF. [Virulence factors of Staphylococcus aureus associated with intramammary infections in cows: relevance and role as immunogens]. Rev Argent Microbiol 2013; 45: 119-130.

[6] Poulsen MO, Jacobsen K, Thorsing M, Kristensen NR, Clasen J, Lillebaek EM, et al. Thioridazine potentiates the effect of a beta-lactam antibiotic against Staphylococcus aureus independently of mecA expression. Res Microbiol 2013; 164: 181-188.

[7] Zarei Koosha R, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mehdizadeh Aghdam E, Ghorbani Tajandareh S, Imani

Fooladi AA. Distribution of tsst-1 and mecA Genes in Staphylococcus aureus Isolated From Clinical Specimens. Jundishapur J Microbiol 2016; 9: 290-257.

[8] 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: 38-46. (Persian).

[9] Zeyni B, Arabestani M, YuosefiMashof R, Tahmasebi H. Evaluation of Real-time PCR-based DNA melting method for detection of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in clinical isolates. J Babol Univ Med Sci 2017; 19: 26-33. (Persian).

[10] 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: 234-247. (Persian).

[11] Tong SY, Xie S, Richardson LJ, Ballard SA, Dakh F, Grabsch EA, et al. High-resolution melting genotyping of Enterococcus faecium based on multilocus sequence typing derived single nucleotide polymorphisms. PLoS One 2011; 6: 291-89.

[12] Tong SY, Giffard PM. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. J Clin Microbiol 2012; 50: 3418-3421.

[13] Woksepp H, Jernberg C, Tärnberg M, Ryberg A, Brolund A, Nordvall M, et al. High-resolution melting-curve aAnalysis of ligation-mediated real-time PCR for rapid evaluation of an epidemiological outbreak of extended-spectrum-beta-lactamase-producing escherichia coli. J Clin Microbiol 2011; 49: 4032-4039.

[14] Bokaeian M, Adabi J, Zeyni B, Tahmasebi H. The Presence of aac (6 ') Ie / aph (2 "), aph (3') - IIIa1, ant (4 ') - Ia1 genes and determining methicillin resistance in staphylococcus epidermidis and staphylococcus saprophyticus strains isolated from clinical specimens. Arak Med Univ J 2017; 19: 11-25. (Persian).

[15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. CLSI document M100-18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016.

[16] Tahmasebi H, Bokaeian M, Adabi J. Coagulase-negative, Beta-lactam, antibiotic resistance, methicillin resistance. Pars Jahrom Univ Med Sci 2016; 14: 55-63. (Persian).

[17] 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.

[18] Liu Z, Zhang J, Rao S, Sun L, Zhang J, Liu R, et al. Heptaplex PCR melting curve analysis for rapid detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes. J Microbiol Methods 2015; 110: 1-6.

[19] Xiao XL, Zhang L, & Wu H, Yu YG, Tang YQ, Liu DM, LI XF. Simultaneous Detection of Salmonella, Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus by Multiplex Real-Time PCR Assays Using High-Resolution Melting. Food Analytical Methods 2014; 7: 1960-1972.

[20] 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: 810-815.

[21] Clifford RJ, Milillo M, Prestwood J, Quintero R, Zurawski DV, Kwak YI, et al. " Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR." PLoS One 2012; 7: 48558.

[22] Yam WC, Siu GK, Ho PL, Ng TK, Que TL, Yip KT, et al. Evaluation of the LightCycler methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) advanced test for detection of MRSA nasal colonization. J Clin Microbiol 2013; 51: 2869-2874.

[23] Bratchikov M, Mauricas M. Development of a multiple-run highresolution melting assay for Salmonella spp. genotyping: HRM application for Salmonella spp. subtyping. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71: 192-200.

[24] Wongboot W, Chomvarin C, Engchanil C, Namwat W, Chaimanee P, Tirapattanun A, et al. Application of sybr green real-time quantitative pcr and conventional pcr for the detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus in blood samples. Month 2016; 43: 129-134.

[25] Skow A, Mangold KA, Tajuddin M, Huntington A, Fritz B, Thomson RB, et al. Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. J Clin Microbiol 2005; 43: 2876-2880.

[26] Krawczyk B, Leibner J, Barańska-Rybak W, Samet A, Nowicki R, Kur J. ADSRRS-fingerprinting and PCR MP techniques for studies of intraspecies genetic relatedness in Staphylococcus aureus. J Microbiol Methods 2007; 71: 114-122.

[27] Robinson D, Enright M. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin- resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 92-97.

Evaluation of real time PCR for detection of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistance strains based on melting curve analysis method

Narges Heydari(MSc)[1], Mohammad Yousef Alikhani(PhD) [1], Farid Azizi Jalilian (PhD)[1], Hamed Tahmasebi (MSc)[2], Mohammad Reza Arabestani (PhD)[2,1*]

1 - Dept. of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

2 - Dept. of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

3 - Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

(Received: 5 Feb 2017; Accepted: 24 Jul 2017)

Introduction*:* Rapid and timely detection of *Staphylococcus aureus* can play a significant role in the treatment of staphylococcal infections.Impresingly, by precise designing methods which have acceptable sensitivity and specificity, can identify species and even antibiotic-resistant strains. The purpose of this study was to evaluate the real time PCR diagnostic method based on the melting curve analysis for the detection of clinical isolates of *S. aureus* and the methicilin resistance gene.

Materials and Methods*:* In this experimental study, clinical isolated of *S. aureus* was used from the Microbiology Bank of Hamadan University of Medical Sciences. The primer design was done by selecting (*ITS*) target for *S. aureus* and the *mecA* gene for methicillin-resistant strains. Real-time PCR and DNA melting curves analysis were used to determine the analytical specificity and sensitivity of the designed primers.

Results*:* The analytical specificity of the primers was 83.79 ° C for S. *aureus* and 76.6 ° C for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* respectively. The analytical sensitivity of the primers was 15 CFU/ml bacteria for *ITS* gene and 25 CFU/ml bacteria for *mecA* gene.

Conclusion*:* By selecting appropriate primers and using sensitive molecular techniques, which could be the main factors for designing of both quick and accurate method, it is possible to identify invasive bacteria such as *S. aureus*.

Keywords*: Staphylococcus Aureus*, Methicillin-Resistant, Real Time PCR, Drug Resistance.

* Corresponding author. Tel: +98 81-23838077

mohammad.arabestani@gmail.com