● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۱، ص ۵۴-۴۴، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

مقایسه سه روش مختلف جداسازی جنس نوکاردیا از خاک بیمارستان‌های استان اصفهان و شناسایی بر اساس روش‌های فنوتیپی و مولکولی

حسینعلی راهدار[۱]، داوود آزادی[۲]، عباس داعی ناصر[۳]، حسن شجاعی[۴*]

خلاصه

مقدمه: نوکاردیاها، باکتری‌های گرم مثبت، هوازی، اسیدفست نسبی و فرصت‌طلب هستند و یکی از عوامل ایجاد عفونت‌های سیستمیک در سراسر جهان به شمار می‌روند. به‌دلیل این‌که زیستگاه اصلی این باکتری‌ها، خاک و گرد و غبار است و بیماران مبتلا به نقص ایمنی در بیمارستان‌ها، شانس ابتلای بالایی به این باکتری‌های فرصت‌طلب دارند و همچنین، پیچیدگی‌هایی که در جداسازی و تشخیص این باکتری‌ها وجود دارد، شناسایی و کنترل منابع محیطی نوکاردیا به منظور پیشگیری از وقوع بیماری‌های فرصت‌طلب امری ضروری در کنترل این عفونت‌ها می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، تعیین روش مناسبی برای جداسازی و شناسایی نوکاردیاها از منابع محیطی بیمارستان‌ها بود.

روش: در این مطالعه، تعداد ۳۰ نمونه خاک بیمارستان‌های استان اصفهان با استفاده از روش‌های سریال رقتی، (McClung's carbon free broth with paraffin bait) Paraffin baiting و Slip-buried بررسی شد. نمونه‌ها در هر سه روش در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس جهت تأیید جنس نوکاردیا، PCR (Polymerase chain reaction) قطعه ۵۶۹ جفت بازی از ژن 16s rRNA مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۳۰ نمونه خاک بیمارستان‌های استان اصفهان، ۱۱ ایزوله (۳۶ درصد) به روش سریال رقتی، ۷ ایزوله (۲۳ درصد) به روش Paraffin bait و ۶ ایزوله (۲۰ درصد) به روش Slip-buried جداسازی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش Paraffin bait به علت استفاده بعضی از باکتری‌های خاک مانند پسودوموناس از پارافین موجود در محیط و وجود رقابت بین این گونه‌ها با نوکاردیاها و همچنین عدم استفاده همه گونه‌های نوکاردیا از پارافین، مناسب نیست. همچنین، روش Slip-buried به علت حساس بودن بعضی از گونه‌های نوکاردیا به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده، دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. به دلیل این که دو روش مذکور توانایی شناسایی تمام گونه‌های نوکاردیای موجود در نمونه‌ها را ندارند، روش سریال رقتی به علت عدم این محدودیت‌ها، روش مطلوبی تشخیص داده شد. همچنین، به دلیل غیر فعال بودن بعضی از گونه‌های نوکاردیا و مدت زمان طولانی، روش‌های فنوتیپی و مولکولی به عنوان روشی سریع در تشخیص و تأیید این گونه‌ها از ارجحیت و اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: نوکاردیا، منابع خاکی بیمارستان‌ها، روش‌های مولکولی، روش‌های جداسازی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران ۲- دانشجوی دکتری، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران ۳- کارشناس، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران ۴- استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** H_shojaei@idrc.mui.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۹/۲۶ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۴/۲/۶ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۴/۲/۱۶

مقدمه

نوکاردیا عضوی از خانواده نوکاردیاسه و از راسته کورینه باکتریاسه است و در دسته اکتینوباکتریا طبقه‌بندی می‌شود (۱). این باکتری‌ها گرم مثبت، بدون اسپور، فیلامنت‌دار، منشعب، هوازی اجباری و تا حدودی کند رشد هستند (۲). نوکاردیاها به عنوان یکی از ارگانیسم‌های ساپروفیت خاک، علاوه بر نقش مهمی که در تغییر و تبدیل مواد آلی دارای سلولز ایفا می‌کنند، به دلیل ایجاد متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک، دارای اهمیت صنعتی می‌باشند (۴، ۳). علاوه بر آن، اغلب نوکاردیاها به صورت ساپروفیت در منابع طبیعی محیط زیست به ویژه خاک، آب‌های شیرین و شور و بقایای در حال فساد گیاهان به سر می‌برند و می‌توانند در ایجاد بیماری‌های فرصت‌طلب انسانی و حیوانی ایفای نقش نمایند (۱۲-۵، ۲).

شواهد زیادی نشان داده است که منابع خاک بیمارستان‌ها حاوی نوکاردیاها می‌باشند و می‌توانند به عنوان منبع انتقال عفونت به بیماران بستری در بیمارستان در نظر گرفته شوند (۱۳). وجود نوکاردیا در منابع محیطی بیمارستان‌ها ممکن است منجر به ایجاد عفونت‌های بیمارستانی گردد. اگرچه قرار گرفتن در معرض این باکتری‌ها به طور متداول رخ می‌دهد، اما میزان بروز بیماری‌های منتقل شونده از منابع خاک بیمارستان‌ها در عفونت‌های تنفسی، پوستی و بافت نرم بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی رو به افزایش است (۱۴).

از نظر تعامل میکروب با بیمار، ابتلا به عفونت نوکاردیایی اغلب از طریق استنشاق صورت می‌گیرد و منجر به ایجاد ذات‌الریه نوکاردیایی می‌شود. در عین حال، عفونت‌های دیگری مانند ضایعات پوستی، کراتیت چشمی و آبسه مغزی نیز با فراوانی کمتر توسط نوکاردیاها بروز می‌کند (۱۷-۱۵). شواهد کافی برای انتقال انسان به انسان این باکتری در دست نیست و در بیشتر موارد به صورت ایزوله در انسان‌ها وجود دارد. هرچند شیوع آن به گرد و خاک آلوده وابسته است (۱۸). در ارتباط با نحوه انتقال عفونت بیمارستانی، باید به این موضوع اشاره نمود که عفونت‌های نوکاردیایی از طریق ذرات گرد و غبار و یا سیستم‌های تهویه انتشار می‌یابند و این امر به نوبه خود می‌تواند سبب انتقال عوامل نوکاردیایی به هوای داخل اتاق بستری و ایجاد عفونت (مانند عفونت ریوی) در بیماران گردد (۲۰، ۱۹).

اکتینومایسیت‌های هوازی در خاک مناطق مختلف جهان یافت می‌شوند و تحت تأثیر شاخص‌های متعدد محیطی و اکولوژیک مانند دما، پوشش گیاهی و... قرار دارند (۲۱). زیستگاه اصلی نوکاردیاها، خاک می‌باشد و خاک و گرد و غبار در مکان‌هایی مانند بیمارستان‌ها که با بیماران دارای نقص سیستم ایمنی در ارتباط است، می‌تواند به عنوان منبع اصلی انتقال این‌گونه بیماری‌های فرصت‌طلب محسوب شود. مطالعات بسیاری نقش نوکاردیاهای موجود در خاک را در ایجاد عفونت در بیماران نشان داده‌اند. این مطالعات تأکید بسیاری بر ضرورت شناسایی وجود نوکاردیاها در این منابع و پیدا کردن راه‌حل برای کنترل این آلودگی‌ها دارند (۱۳). میزان جداسازی نوکاردیا در پاتیالای هند با استفاده از روش Paraffin bait، ۸ درصد گزارش شده است (۲۲).

رسولی و همکاران از روش Paraffin bait در محیط SAD (Sabouraud dextrose agar) و نوترینت آگار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده کردند و میزان جداسازی را ۱۷ درصد گزارش نمودند (۲۳). کچویی و همکاران در تحقیق خود بر روی خاک اصفهان با استفاده از روش Slip-buried در محیط BHI agar (Brain Heart Infusion) حاوی آنتی‌بیوتیک و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان جداسازی را ۱۹/۱ درصد محاسبه کردند (۲۱).

شناسایی نوکاردیا در منابع مختلف محیطی از جمله محیط‌های پرخطری همچون بیمارستان‌ها، می‌تواند اطلاعات سودمندی در زمینه توانایی بیماری‌زایی، ویرولانس، چگونگی پراکندگی و انتشار، منابع بالقوه محیطی و اکولوژیک آن‌ها و در نهایت نقش آن‌ها در عفونت‌های بیمارستانی و کنترل اپیدمیولوژیک برای دست‌اندرکاران فراهم نماید (۲۵، ۲۴). شناسایی و جداسازی نوکاردیاها از منابع محیطی مانند خاک به دلیل پیچیدگی‌های تشخیصی و جداسازی این باکتری‌ها و همچنین، اهمیت بالینی و صنعتی که نوکاردیاها دارند، بسیار مهم است. بنابراین، هدف مطالعه حاضر، تعیین روش مناسبی برای جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از خاک بود.

روش بررسی

حجم نمونه با استفاده از فرمول برآورد نسبت و با در نظر گرفتن فراوانی تشخیص نوکاردیا در مطالعه به صورت زیر محاسبه گردید (۲۳):

$$n = \frac{z_{(1-\frac{\alpha}{2})^2} \times p(1-p)}{d^2} = 30$$

بررسی حاضر بر روی ۳۰ نمونه خاک از بیمارستان‌های استان اصفهان انجام گرفت. نمونه‌ها از سطح خاک (عمق ۳ تا ۵ سانتی‌متری) و مکان‌های سایه‌دار بیمارستان توسط قاشقک چوبی و استریل جمع‌آوری گردید و پس از ثبت دما، به داخل کیسه نایلونی تمیز و ضخیم استریل انتقال داده شد. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. pH خاک قبل از کشت نمونه‌ها با ایجاد سوسپانسیون ۱ گرم خاک در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به وسیله pHمتر اندازه‌گیری شد (۲۱). در نهایت نمونه‌ها با سه روش مورد بررسی قرار گرفتند.

روش سریال رقتی: برای جداسازی نوکاردیا از خاک با استفاده از روش سریال رقتی بدین صورت عمل شد که ۱ گرم خاک به ۱۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی استریل ۲۵ درصد(نرمال سالین) اضافه گردید و محلول ۰/۱ درصد رقیق شده به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک با پیپت استریل به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد تا رقت ۰/۰۱ درصد ایجاد شود. ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل شد تا رقت ۰/۰۰۱ درصد حاصل گردد.

در مرحله بعد، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ روی محیط کشت ساتن (Merck، آلمان) به همراه آنتی‌بیوتیک کانامایسین (Mast، انگلیس) (۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) و نیستاتین (۰/۵گرم در لیتر) و یک محیط بدون کانامایسین (فقط دارای نیستاتین) (Mast، انگلیس) ریخته شد و پس از ۱۵ دقیقه، محیط‌های کشت به مدت ۲ تا ۳ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (۲۶).

روش (McClung's carbon free broth with paraffin) Paraffin baiting technique: ابتدا ۱ گرم از خاک در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون لوله استریل مخلوط شد و پس از ۵ دقیقه مخلوط کردن، ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی به محیط Carbon free broth (Merck، آلمان) حاوی میله پارافینی اضافه و به مدت ۲ تا ۳ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. هنگامی که کلنی‌های سفید و رنگی مشکوک به نوکاردیا روی میله پارافینی مشاهده شد، کلنی تک برای خالص‌سازی بر روی محیط ساتن آگار حاوی ضد قارچ نیستاتین کشت داده شد (۲۷).

روش Slip-buried: ۳ تا ۵ گرم نمونه خاک جمع‌آوری شده به ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه گردید و ۳ دقیقه روی Shaker قرار داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در

دمای اتاق انکوبه گشت. سپس، سوسپانسیون محلول به وسیله پیپت به لوله استریل دیگری منتقل شد. محلول آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و کلرامفنیکل (Mast، انگلستان) به نصف حجم مایع رویی اضافه و به مدت ۱ تا ۳ دقیقه Shaker شد. پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. یک قطره (۰/۰۵ میلی‌لیتر) (۵۰ میکرومتر) شامل نیستاتین (۰/۵ گرم بر لیتر) و کانامایسین (۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط ساتن آگار کشت خطی داده شد و نمونه‌ها به مدت ۲ تا ۳ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۲۱). رنگ‌آمیزی گرم و کانیون و تست لیزوزیم و بیوشیمیایی بر روی کلنی‌هایی که خالص سازی شده بود، انجام گرفت (۲).

برای استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از روش استاندارد، تغییراتی جهت سهولت در لیز شدن دیواره صورت گرفت؛ به طوری که برای تهیه توده میکروبی از ۲ یا ۳ پلیت کشت ساتن که دارای رشد مناسب و تازه نوکاردیا بودند، استفاده گردید. تمام کلنی‌های رشد یافته به کمک یک لوپ استریل از سطح محیط کشت جمع‌آوری و به درون ۲ یا ۳ میکروتیوب حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) ریخته شد. نمونه‌های نوکاردیای موجود در میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط آسپتیک و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا غیر فعال و فاقد آلودگی شود. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی خارج و ته‌نشین به دست آمده وارد مرحله استخراج DNA گردید.

۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE حاوی آنزیم لیزوزیم (غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، شرکت Roche) به رسوب به دست آمده افزوده شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. بعد از مدت زمان مذکور، آنزیم پروتئیناز K (سیناژن) (غلظت نهایی ۲ میلی‌گرم بر میکرولیتر) و محلول SDS (Sodium dodecyl sulfate) ۲۰ درصد (غلظت نهایی ۲ درصد) به سوسپانسیون فوق افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

مرحله لیز سلولی با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول گوانیدیوم تیوسیانات به میکروتیوب قبلی و مخلوط نمودن آن و سپس انکوباسیون آن در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، کامل شد. سوسپانسیون حاوی توده میکروبی لیز شده روی یخ قرار گرفت و به آن ۲۵۰ میکرولیتر محلول آمونیوم استات اضافه و به آهستگی مخلوط گردید. سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. در مرحله بعد، ۵۰۰ میکرولیتر محلول فنل- کلروفرم- ایزو آمیل الکل به سوسپانسیون سلولی لیز شده افزوده شد و پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه، با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید.

فاز رویی دوباره به لوله تمیزی منتقل و معادل ۲/۵ برابر حجم آن الکل اتیلیک مطلق اضافه و چند بار وارونه شد تا DNA رسوب نماید. DNA رسوب یافته به لوله دیگری انتقال یافت و سه بار با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد و جهت خشک شدن، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به هر نمونه DNA استخراج شده، ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE افزوده شد و پس از کنترل کمی و کیفی، در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۴).

سپس با به کارگیری روش PCR (Polymerase chain reaction) و استفاده از پرایمرهای NG1(5-ACCGACCACAAGGGG-3) و NG2(5-GGTTGTAACCTCTTCGA-3) (Metabion، آلمان) از ژن 16S rDNA، برنامه جدول ۱ جهت شناسایی جنس نوکاردیای جدا شده از منابع محیطی بیمارستان‌ها انجام گرفت (۲۸).

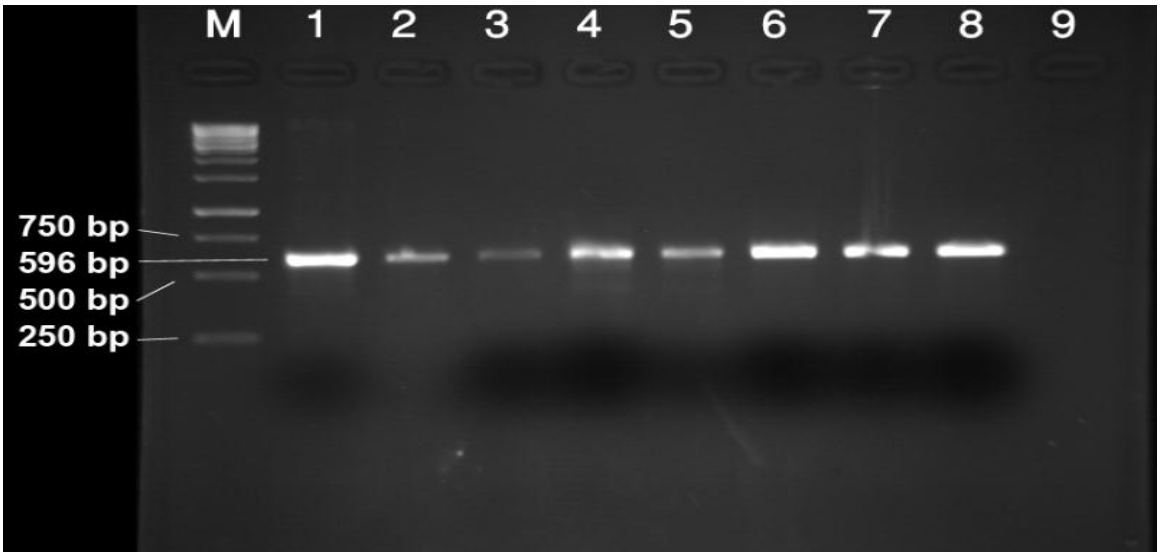
جدول ۱. *برنامه واکنش PCR (Polymerase chain reaction) برای تعیین جنس نوکاردیا*

مراحل	دناتوراسیون اولیه	تقویت			گسترش نهایی	خنک کردن
		دناتوراسیون	بازپخت (آنیل کردن)	گسترش میکرویی		
دما	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۹٤ درجه سانتی‌گراد	۵۸ درجه سانتی‌گراد	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۲۵ درجه سانتی‌گراد
زمان	۳ دقیقه	۱۲ ثانیه	۱۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	۱۰ دقیقه	۱ دقیقه
دوره	۱ دوره	–	۳۳ دوره	–	۱ دوره	۱ دوره

در نهایت قطعه حاصل شده از روش PCR، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در ولتاژ ۹۵ میلی‌ولت الکتروفورز گردید و باند به دست آمده در جایگاه ۵۹۶ جفت باز ظاهر شد. از DNA نشانگر ۱ کیلو جفت باز به عنوان نشانگر اندازه قطعات استفاده شد.

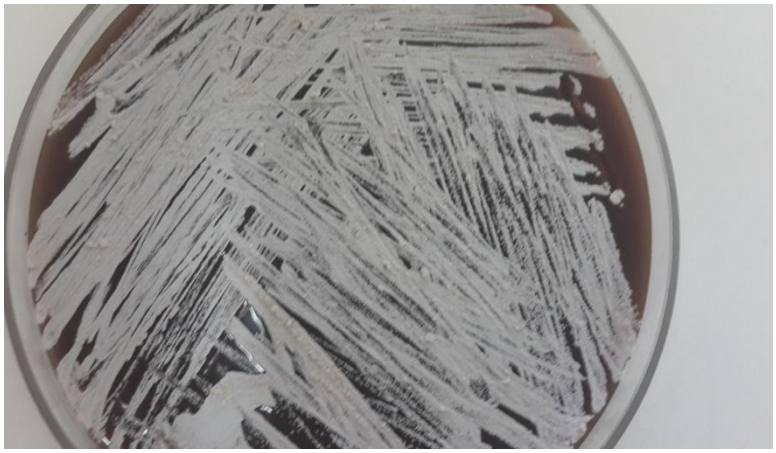
نتایج

دمای خاک بررسی شده در مطالعه حاضر، ۱۴ درجه سانتی‌گراد و pH نمونه‌ها ۷/۸۳ بود. با استفاده از روش سریال رقتی، ۱۱ ایزوله (۳۶ درصد) جداسازی شد؛ در حالی که حاصل روش Paraffin bait، ۷ ایزوله (۲۳ درصد) و حاصل روش Slip-buried، ۶ ایزوله (۲۰ درصد) بود. این ایزوله‌ها با استفاده از تست مقاومت به لیزوزیم و پرایمر اختصاصی (NG1NG2) جنس نوکاردیا که پس از انجام مراحل PCR، قطعه‌ای به اندازه ۵۹۶ جفت باز حاصل نمود، تشخیص داده شد (شکل ۱). نوکاردیاهای جداسازی شده دارای پیگمان سفید (۱۴)، نارنجی (۳)، کرم رنگ (۱) و زرد (۱) بودند (شکل ۲). تست مقاومت به لیزوزیم برای همه آن‌ها مثبت بود و بعضی از گونه‌ها توانایی رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد را نداشتند.



شکل ۱. *الکتروفورز قطعه‌ای از محصول 16s rRNA (۵۹۶ جفت باز) نمونه‌های ایزوله شده از خاک*

ستون M شامل اندازه نشانگر DNA ۱ کیلو بازی، ستون ۱ شامل کنترل مثبت نوکاردیا استروئیدس ATCC 14759، ستون ۹ شامل کنترل منفی و ستون ۲ تا ۸ شامل نوکاردیاها می‌باشد.



شکل ۲. *کلنی‌های رشد یافته نوکاردیا بر روی محیط کشت بلاد آگار (Blood agar)*

بحث

از آن‌جایی که منبع اصلی نوکاردیاها خاک است، بنابراین این باکتری‌ها می‌توانند با ایجاد عفونت منتشر در بیمارانی که به ضعف سیستم ایمنی مبتلا هستند (مانند مبتلایان به ایدز، سرطان‌ها، پیوند اعضا و بیماران کلیوی)، باعث بروز مشکلاتی شوند. البته گزارش‌هایی مبتنی بر بروز عفونت در افراد دارای سیستم ایمنی طبیعی نیز وجود دارد. از سوی دیگر، تحقیقات متعددی در خصوص شیوع عفونت در بیماران بستری در بیمارستان‌ها وجود دارد که موجب نگرانی مسؤولان کنترل عفونت‌های بیمارستانی شده است (۳۴-۲۹).

Kageyama و همکاران گونه‌های نوکاردیای جداسازی شده از خاک را از نمونه‌های بالینی نیز جدا کردند و چرخه انتقال از خاک به هوا و به دنبال آن از طریق استنشاق آئروسل به انسان را نشان دادند (۱۳). میزان شیوع نوکاردیا در مناطق مختلف بین ۵۰-۵ درصد گزارش شده است (۳۵، ۲۲). هدف از مطالعه حاضر، ایجاد روش مناسبی برای تعیین نوکاردیاها از منابع خاک بیمارستان‌ها بود که نوکاردیا با هر سه روش جداسازی شد. روش سریال رقتی با استفاده از محیط‌های کشت ساتن آگار با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین، نیستاتین و نالیدیکسیک اسید در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۲۹ درصد ایزوله، نتایج قبل قبول‌تری داشت. van Gelderen و همکاران با استفاده از روش Paraffin bait، ۲۸ گونه نوکاردیا استروئیدس، ۳ گونه نوکاردیا برازیلینسیس و ۲ گونه نوکاردیا کاویه را جداسازی کردند (۳۶).

میزان جداسازی نوکاردیا در پاتیالای هند با استفاده از روش Paraffin bait، ۸ درصد گزارش شد (۲۲). مطالعه Khan و همکاران در گزارش اولین جداسازی نوکاردیا استروئیدس از خاک کویت به روش Paraffin baiting، میزان جداسازی را ۴۱ درصد گزارش نمودند که البته از محیط‌های کشت BHI آگار حاوی آنتی‌بیوتیک و SDA و انکوبه در دو دمای ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده کردند (۲۷). تحقیق کچویی و همکاران بر روی خاک اصفهان، میزان جداسازی را با استفاده از محیط BHI آگار حاوی آنتی‌بیوتیک و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با روش Slip-buried، ۱۹/۱ درصد گزارش کردند (۲۱). مطالعه آقامیریان و غیاثیان در قزوین با استفاده از محیط‌های BHI آگار و SDA و روش Slip-buried در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، میزان جداسازی نوکاردیا را ۴۰/۶ محاسبه نمود (۳۷). رسولی و همکاران در مطالعه خود از روش Paraffin

bait و محیط نوترینت آگار و SAD و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده کردند و میزان جداسازی، ۱۷ درصد به دست آمد (۲۳).

به دلیل ماهیت کند رشد بودن نوکاردیاها و رشد سریع سایر گونه‌ها، نوکاردیاها اغلب تشخیص داده نمی‌شوند (۳۸). در مطالعه حاضر استرپتومایسس در محیط حاوی کانامایسین جداسازی نشد که این امر به علت حساس بودن استرپتومایسس‌ها به این آنتی‌بیوتیک است و محیط دارای کانامایسین و ضد قارچ نیستاتین، نسبت به محیط حاوی ونکومایسین و نالیدیکسیک اسید در روش سریال رقتی، محیط مناسب‌تری برای جداسازی نوکاردیا تشخیص داده شد. جستجو در منابع معتبر علمی نشان می‌دهد که مطالعه‌ای در رابطه با جداسازی نوکاردیا از منابع محیطی بیمارستان صورت نگرفته است و اطلاعات در این زمینه کافی نیست. با توجه به این‌که دمای بهینه رشد اکثر نوکاردیاها ۲۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۳۹)، این امر موجب افزایش جداسازی در مطالعه حاضر شد.

نتیجه‌گیری

به دلیل پیچیدگی‌های تشخیصی نوکاردیاها و همچنین تنوع باکتری‌های موجود در خاک که تند رشد هستند و مانع رشد نوکاردیاهای کند رشد می‌شوند، تعیین یک روش مناسب برای جداسازی نوکاردیاها اهمیت زیادی دارد. از آن‌جایی که همه نوکاردیاها قادر به استفاده از پارافین نیستند و همچنین، بعضی گونه‌های پسودوموناس بر روی پارافین رشد می‌کنند و مانع رشد نوکاردیاها می‌شوند، روش Paraffin bait مناسب نبود. از طرف دیگر، در روش Slip-buried، بعضی از گونه‌های نوکاردیا به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کلرامفنیکل حساس هستند و این امر نشان می‌دهد که دو روش مذکور دارای محدودیت‌هایی هستند. بنابراین، روش سریال رقتی بهترین روش برای جداسازی نوکاردیا بود. همچنین، به دلیل این‌که بعضی از گونه‌های نوکاردیا از لحاظ بیوشیمیایی غیر فعال هستند، روش‌های مولکولی روش مناسب و سریعی برای شناسایی جنس نوکاردیا می‌باشند.

سپاسگزاری

مقاله حاضر برگرفته از پایانامه کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره ۳۹۲٤۸۹ می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. بدین‌وسیله از گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H, Trujillo M, Ludwig W, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. 2nd ed. New York, NY: Springer Science & Business Media, 2012.
2. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2): 259-82.
3. Cercenado E, Marin M, Sanchez-Martinez M, Cuevas O, Martinez-Alarcon J, Bouza E. In vitro activities of tigecycline and eight other antimicrobials against different Nocardia species identified by molecular methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(3): 1102-4.

4. Kurup PV, Sandhu RS. Isolation of Nocardia caviae from Soil and Its Pathogenicity for Laboratory Animals. *J Bacteriol* 1965; 90(3): 822-3.

5. Arifuzzaman M, Khatun MR, Rahman H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(29): 4615-9.

6. Sazak A, Sahin N, Camas M. Nocardia goodfellowii sp. Nov. and Nocardia thraciensis sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; 62(Pt 6): 1228-34.

7. Trichet E, Cohen-Bacrie S, Conrath J, Drancourt M, Hoffart L. Nocardia transvalensis keratitis: an emerging pathology among travelers returning from Asia. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 296.

8. Castelli JB, Siciliano RF, Abdala E, Aiello VD. Infectious endocarditis caused by Nocardia sp.: histological morphology as a guide for the specific diagnosis. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(4): 384-6.

9. Arends JE, Stemerding AM, Vorst SP, de Neeling AJ, Weersink AJ. First report of a brain abscess caused by Nocardia veterana. *J Clin Microbiol* 2011; 49(12): 4364-5.

10. Masaki T, Ohkusu K, Ezaki T, Miyamoto H. Nocardia elegans infection involving purulent arthritis in humans. *J Infect Chemother* 2012; 18(3): 386-9.

11. Sahu SK, Sharma S, Das S. Nocardia scleritis—clinical presentation and management: a report of three cases and review of literature. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2012; 2(1): 7-11.

12. Amatya R, Koirala R, Khanal B, Dhakal SS. Nocardia brasiliensis primary pulmonary nocardiosis with subcutaneous involvement in an immunocompetent patient. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(1): 68-70.

13. Kageyama A, Yazawa K, Kudo T, Taniguchi H, Nishimura K, Mikami Y. First isolates of Nocardia abscessus from humans and soil in Japan. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2004; 45(1): 17-21.

14. Nenoff P, Kellermann S, Borte G, Horn LC, Ponisch W, Winkler J, et al. Pulmonary nocardiosis with cutaneous involvement mimicking a metastasizing lung carcinoma in a patient with chronic myelogenous leukaemia. *Eur J Dermatol* 2000; 10(1): 47-51.

15. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection* 2010; 38(2): 89-97.

16. Bajracharya L, Gurung R. A case of nocardia keratitis treated successfully with topical amikacin. *Nepal J Ophthalmol* 2012; 4(1): 170-3.

17. Kumar VA, Augustine D, Panikar D, Nandakumar A, Dinesh KR, Karim S, et al. Nocardia farcinica brain abscess: epidemiology, pathophysiology, and literature review. *Surg Infect (Larchmt)* 2014; 15(5): 640-6.

18. Sahathevan M, Harvey FA, Forbes G, O'Grady J, Gimson A, Bragman S, et al. Epidemiology, bacteriology and control of an outbreak of Nocardia asteroides infection on a liver unit. *J Hosp Infect* 1991; 18(Suppl A): 473-80.

19. Manikandan P, Bhaskar M, Revathi R, Anita R, Abarna Lakshmi LR, Narendran V. Isolation and antimicrobial susceptibility pattern of Nocardia among

people with culture-proven ocular infections attending a tertiary care eye hospital in Tamilnadu, South India. *Eye (Lond)* 2007; 21(8): 1102-8.

20. Dekeyser S, Corroyer-Simovic B, Cachia M, Gillot C, Senneville E, Descamps D. [Nocardia otitidiscaviarum, cutaneous infection in a patient receiving long-term corticosteroid treatment]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2003; 61(2): 219-22.
21. Kachuei R, Emami M, Mirnejad R, Khoobdel M. Diversity and frequency of Nocardia spp. in the soil of Isfahan province, Iran. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(6): 474-8.
22. Goel S, Kanta S. Prevalence of Nocardia species in the soil of Patiala area. *Indian J Pathol Microbiol* 1993; 36(1): 53-60.
23. Rasouli M, Habibnia S, Heidarieh P, Fatahi M, Pourmand MR, Eshraghi S. Identification of Nocardia Species Isolated from Soil Samples of the City of Tehran, Iran, Using Phenotypic Tests. *J Isfahan Med Sch* 2013; 31(265): 45-54. [In Persian].
24. Goh KS, Legrand E, Sola C, Rastogi N. Rapid differentiation of "Mycobacterium canettii" from other Mycobacterium tuberculosis complex organisms by PCR-restriction analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10): 3705-8.
25. Baracco GJ, Dickinson GM. Pulmonary Nocardiosis. *Curr Infect Dis Rep* 2001; 3(3): 286-92.
26. Orchard VA, Goodfellow M. The selective isolation of nocardia from soil using antibiotics. *J Gen Microbiol* 1974; 85(1): 160-2.
27. Khan ZU, Neil L, Chandy R, Chugh TD, Al-Sayer H, Provost F, et al. Nocardia asteroides in the soil of Kuwait. *Mycopathologia* 1997; 137(3): 159-63.
28. Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant Nocardia species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37(1): 99-102.
29. Mari B, Monton C, Mariscal D, Lujan M, Sala M, Domingo C. Pulmonary nocardiosis: clinical experience in ten cases. *Respiration* 2001; 68(4): 382-8.
30. Hoogeveen M, Brouwer RE, Bernards AS, Soetekouw R. [Nocardiosis, an important opportunistic infection]. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2010; 154: A1177.
31. Corti ME, Villafane-Fioti MF. Nocardiosis: a review. *Int J Infect Dis* 2003; 7(4): 243-50.
32. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(3): 357-417.
33. Curry WA. Human nocardiosis. A clinical review with selected case reports. *Arch Intern Med* 1980; 140(6): 818-26.
34. Rosendale DE, Myers C, Boyko EJ, Jafek B. Nocardia asteroides cervical osteomyelitis in an immunocompetent host. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 99(3): 334-7.
35. Vetlugina LA, Adiiatova Z, Khozhamuratova SS, Rymzhanova ZA, Trenozhnikova LP, Kopytina MN. [Isolation of Actinomycetales from the soil of Kazakhstan on selective media with antibiotics]. *Antibiot Khimioter* 1990; 35(2): 3-5.
36. van Gelderen de KA, Runco de LR, Salim R. Natural occurrence of Nocardia in soil

of Tucuman: physiological characteristics. *Mycopathologia* 1987; 99(1): 15-9.

37. Aghamirian MR, Ghiasian SA. Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of Iran (2006-2007). *Open Microbiol J* 2009; 3: 53-7.
38. Pottumarthy S, Limaye AP, Prentice JL, Houze YB, Swanzy SR, Cookson BT. Nocardia veterana, a new emerging pathogen. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1705-9.
39. DSMZ. Bacterial nomenclature [Online]. [cited Sep 2014]; Available from: URL: http://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/ChiefEditors/BacterialNomenclature/DSMZ_supplem_0914.pdf

Comparison of Three Methods of Isolation of the Genus Nocardia from the Soil of Hospitals in Isfahan Province, Iran, and its Identification Based on Phenotypic and Molecular Methods

Hossein Ali Rahdar, B.Sc.[1], Davood Azadi, M.Sc.[2], Abbas Daeinaser, B.Sc.[3], Hasan Shojaei, Ph.D.[4*]

1. M.Sc. Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2. Ph.D. Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3. Infectious Disease Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4. Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

* Corresponding author; e-mail: H_shojaei@idrc.mui.ac.ir

(Received: 17 Dec 2014 Accepted: 6 May 2015)

Abstract

Background & Aims: *Nocardia* are gram-positive, aerobic, relative acid-fast, and opportunistic bacteria, and one of the causes of systematic infection around the world. The natural habitats of these bacteria are soil and dust. Hospitalized patients with immune deficiency are at high risk of transmission of opportunistic infection. Due to these facts and the complexities that exist in the isolation and identification of these bacteria, the identification and controlling of the environmental resources of *Nocardia* in order to prevent opportunistic diseases are essential in controlling such infections. The objective of this study was to determine an appropriate method for the isolation and identification of *Nocardia* from environmental sources in hospitals.

Methods: A total of 30 soil samples were collected from hospitals in Isfahan, Iran, and studied using dilution serial method, paraffin baiting (McClung's carbon free broth with paraffin bait), and slip-buried method. Samples were incubated at 28 °C in all three methods. Then, polymerase chain reaction (PCR) which recognized a 596-bp fragment of the 16S rRNA gene was used to confirm the genus *Nocardia.*

Results: From a total of 30 soil samples from hospitals in Isfahan Province, 11 *Nocardia* isolates (36%) were isolated through dilution serial method, 7 *Nocardia* isolates (23%) through paraffin baiting method, and 6 *Nocardia* isolates (20%) through slip-buried method.

Conclusion: This study showed that there are some limitations in the use of paraffin baiting method due to the use of paraffin by some soil bacteria such as Pseudomonas and the competition between these bacteria and *Nocardia,* and lack of use of paraffin by all *Nocardia* species. Moreover, the slip-buried method was not suitable in this respect due to the sensitivity of some *Nocardia* species to the antibiotics used. Thus, since these two methods were not able to identify all *Nocardia* species in samples, the dilution serial method was identified as an appropriate method. Furthermore, due to the inactivity of some species of *Nocardia* and the long duration of other methods, molecular and phenotypic methods, as rapid methods, are of high importance in the detection and confirmation of these species.

Keywords: *Nocardia,* Hospital soil resources, Molecular methods, Isolation methods

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(1): 44-54