

## مقایسه سه روش مختلف جداسازی جنس نوکاردیا از خاک بیمارستان‌های استان اصفهان و

### شناسایی بر اساس روش‌های فنوتیپی و مولکولی

حسینعلی راهدار<sup>۱</sup>، داوود آزادی<sup>۲</sup>، عباس داعی ناصر<sup>۳</sup>، حسن شجاعی<sup>۴\*</sup>

#### خلاصه

مقدمه: نوکاردیاهای باکتری‌های گرم مثبت، هوازی، اسیدفست نسبی و فرصت طلب هستند و یکی از عوامل ایجاد عفونت‌های سیستمیک در سراسر جهان به شمار می‌روند. به دلیل این که زیستگاه اصلی این باکتری‌ها، خاک و گرد و غبار است و بیماران مبتلا به نقص ایمنی در بیمارستان‌ها، شانس ابتلای بالایی به این باکتری‌های فرصت طلب 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 فرصت طلب امری ضروری در کنترل این عفونت‌ها می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، تعیین روش مناسبی برای جداسازی و شناسایی نوکاردیاهای از منابع محیطی بیمارستان‌ها بود.

روش: در این مطالعه، تعداد ۳۰ نمونه خاک بیمارستان‌های استان اصفهان با استفاده از روش‌های سریال رقتی، روش Paraffin baiting (McClung's carbon free broth with paraffin bait) 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 نوکاردیاهای 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 میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران ۲- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، 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 میکروبیولوژی، 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 اکتینوباکتیریا طبقه بندی می شود (۱). این باکتری ها گرم مثبت، بدون اسپور، فیلامنت دار، منشعب، هوازی اجباری و تا حدودی کند رشد هستند (۲). نوکاردیایاها به عنوان یکی از ارگانیسیم های ساپروفیت خاک، علاوه بر نقش مهمی که در تغییر و تبدیل مواد آلی دارای سلولز ایفا می کنند، به دلیل ایجاد متابولیت های ثانویه مانند آنتی بیوتیک، دارای اهمیت صنعتی می باشند (۳، ۴). علاوه بر آن، اغلب نوکاردیایاها به صورت ساپروفیت در منابع طبیعی محیط زیست به ویژه خاک، آب های شیرین و شور و بقایای در حال فساد گیاهان به سر می برند و می توانند در ایجاد بیماری های فرصت طلب انسانی و حیوانی ایفای نقش نمایند (۱۲-۵، ۲). شواهد زیادی نشان داده است که منابع خاک بیمارستان ها حاوی نوکاردیایاها می باشند و می توانند به عنوان منبع انتقال عفونت به بیماران بستری در بیمارستان در نظر گرفته شوند (۱۳). وجود نوکاردیایا در منابع محیطی بیمارستان ها ممکن است منجر به ایجاد عفونت های بیمارستانی گردد. اگرچه قرار گرفتن در معرض این باکتری ها به طور متداول رخ می دهد، اما میزان بروز بیماری های منتقل شونده از منابع خاک بیمارستان ها در عفونت های 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 می گیرد و منجر به ایجاد ذات الریه نوکاردیایی می شود. در عین حال، عفونت های دیگری مانند ضایعات پوستی، کراتیت چشمی و آبسه مغزی نیز با فراوانی کمتر توسط نوکاردیایاها بروز می کند (۱۷-۱۵). شواهد کافی برای انتقال انسان به انسان این باکتری در دست نیست و در بیشتر موارد به صورت

ایزوله در انسان ها 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 عفونت های نوکاردیایی از طریق ذرات گرد و غبار و یا سیستم های تهویه انتشار می یابند و این امر به نوبه خود می تواند سبب انتقال عوامل نوکاردیایی به هوای داخل اتاق بستری و ایجاد عفونت (مانند عفونت ریوی) در بیماران گردد (۲۰، ۱۹).

اکتینومایسیت های هوازی در خاک مناطق مختلف جهان یافت می شوند و تحت تأثیر شاخص های متعدد محیطی و اکولوژیک مانند دما، پوشش گیاهی و... قرار دارند (۲۱). زیستگاه اصلی نوکاردیایاها، خاک می باشد و خاک و گرد و غبار در مکان هایی مانند بیمارستان ها که با بیماران دارای نقص سیستم ایمنی در ارتباط است، می تواند به عنوان منبع اصلی انتقال این گونه بیماری های فرصت طلب محسوب شود. مطالعات بسیاری نقش نوکاردیایاها موجود در خاک را در ایجاد عفونت در بیماران نشان داده اند. این مطالعات تأکید بسیاری بر ضرورت شناسایی وجود نوکاردیایاها در این منابع و پیدا کردن راه حل برای کنترل این آلودگی ها دارند (۱۳). میزان جداسازی نوکاردیایا در پاتیلای 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 سانتی گراد 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 آنتی بیوتیک و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، میزان جداسازی را ۱۹/۱ درصد محاسبه کردند (۲۱).

روش سریال رقتی: برای جداسازی نوکاردیا از خاک با استفاده از روش سریال رقتی بدین صورت عمل شد که ۱ گرم خاک به ۱۰ میلی لیتر 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 میلی لیتر از سوسپانسیون خاک با پپیت استریل به ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد تا رقت ۰/۰۱ درصد ایجاد شود. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل شد تا رقت ۰/۰۰۱ درصد حاصل گردد.

در مرحله بعد، ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ روی محیط کشت ساتن (Merck، آلمان) به همراه آنتی بیوتیک کانامایسین (Mast، انگلیس) (۲۵ میلی گرم بر لیتر) و نیستاتین (۰/۵ گرم 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 سانتی گراد انکوبه گردید (۲۶).

روش (McClung's carbon free broth with paraffin) Paraffin baiting technique ابتدا ۱ گرم از خاک در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر درون لوله استریل مخلوط شد و پس از ۵ دقیقه مخلوط کردن، ۱ میلی لیتر 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 سانتی گراد انکوبه گردید. هنگامی که کلنی‌های سفید و رنگی مشکوک به نوکاردیا روی میله پارافینی مشاهده شد، کلنی تک برای خالص سازی بر روی محیط ساتن آگار حاوی ضد قارچ نیستاتین کشت داده شد (۲۷).

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

شناسایی نوکاردیا در منابع مختلف محیطی از جمله محیط‌های پرخطری همچون بیمارستان‌ها، می تواند اطلاعات سودمندی در زمینه توانایی بیماری زایی، ویرولانسی، 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 (۲۴، ۲۵). شناسایی و جداسازی نوکاردیاهای از منابع محیطی مانند خاک به دلیل پیچیدگی‌های تشخیصی و جداسازی این باکتری‌ها و همچنین، اهمیت بالینی و صنعتی که نوکاردیاهای 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 سانتی متری) و مکان‌های سایه‌دار بیمارستان توسط قاشق چوبی و استریل جمع آوری 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 سانتی گراد نگهداری گردید. pH خاک قبل از کشت نمونه‌ها با ایجاد سوسپانسیون ۱ گرم خاک در ۵ میلی لیتر آب مقطر به وسیله pH متر اندازه گیری شد (۲۱). در نهایت نمونه‌ها با سه روش مورد بررسی قرار گرفتند.

مذکور، آنزیم پروتئیناز K (سیناژن) (غلظت نهایی ۲ میلی گرم 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 سانتی گراد قرار داده شد.

مرحله لیز سلولی با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول گوانیدیوم تیوسیانات به میکروتیوب قبل 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 سانتی گراد 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 سانتی گراد 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).

دمای اتاق انکوبه گشت. سپس، سوسپانسیون محلول به وسیله پیپت به لوله استریل دیگری منتقل شد. محلول آنتی بیوتیک استرپتومايسين 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 میلی لیتر) (۵۰ میکرومتر) شامل نیستاتین (۰/۵ گرم بر لیتر) و کانامایسین (۲۵ میلی گرم بر لیتر) در محیط ساتن آگار کشت خطی داده شد و نمونه‌ها به مدت ۲ تا ۳ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۲۱). رنگ آمیزی 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 جمع آوری 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 سانتی گراد 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 ته نشین به دست آمده وارد مرحله استخراج DNA گردید.

۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE حاوی آنزیم لیزوزیم (غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، شرکت Roche) به رسوب به دست آمده افزوده شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار گرفت. بعد از مدت زمان

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

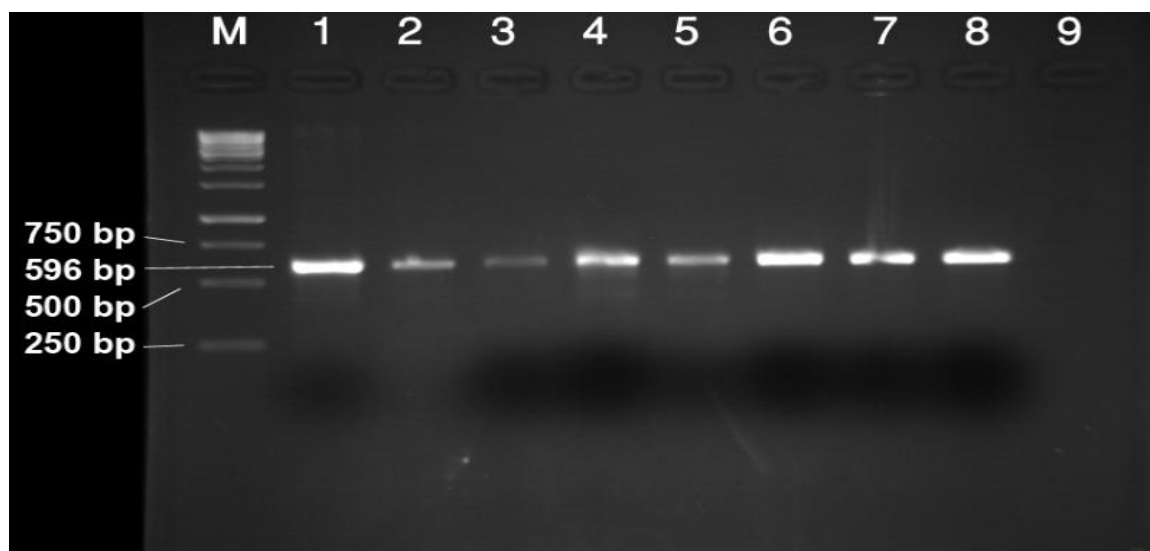
مراحل	دنا تورا سیون اولیه	تقویت			خنک کردن
		دنا تورا سیون	باز پخت (آبیل کردن)	گسترش میکروبی	
دما	۹۵ درجه سانتی گراد	۹۴ درجه سانتی گراد	۵۸ درجه سانتی گراد	۷۲ درجه سانتی گراد	۷۲ درجه سانتی گراد
زمان	۳ دقیقه	۱۲ ثانیه	۱۵ ثانیه	۴۵ ثانیه	۱۰ دقیقه
دوره	۱ دوره	-	۳۳ دوره	-	۱ دوره

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 (NGING2) 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 سانتی گراد را نداشتند.

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 سانتی گراد و pH نمونه‌ها ۷/۸۳ بود. با استفاده از روش سریال رقتی، ۱۱ ایزوله (۳۶ درصد) جداسازی شد؛ در حالی



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 نوکاردیاهای می‌باشد.



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

## بحث

از آنجایی که منبع اصلی نوکاردیاهای 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 مسئولان کنترل عفونت‌های بیمارستانی شده است (۲۹-۳۴).

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 آئروسول به انسان را نشان دادند (۱۳). میزان شیوع نوکاردیا در مناطق مختلف بین ۵-۵۰ درصد گزارش شده است (۳۵). هدف از مطالعه حاضر، ایجاد روش مناسبی برای تعیین نوکاردیاهای 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 ونکوماپسین،

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 پاتیلای 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

مانع رشد نوکاردیاهای کند رشد می‌شوند، تعیین یک روش مناسب برای جداسازی نوکاردیاهای اهمیت زیادی دارد. از آنجایی که همه نوکاردیاهای قادر به استفاده از پارافین نیستند و همچنین، بعضی گونه‌های پودوموناس بر روی پارافین رشد می‌کنند و مانع رشد نوکاردیاهای می‌شوند، روش Paraffin bait مناسب نبود. از طرف دیگر، در روش Slip-bait 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 این که 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 پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره ۳۹۲۴۸۹ می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله از گروه میکروبی‌شناسی و ویروس‌شناسی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

### References

- Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H, Trujillo M, Ludwig W, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. 2<sup>nd</sup> ed. New York, NY: Springer Science & Business Media, 2012.
- Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on

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 نوکاردیاهای و رشد سریع سایر گونه‌ها، نوکاردیاهای اغلب تشخیص داده نمی‌شوند (۳۸). در مطالعه حاضر استرپتومایسین در محیط حاوی کانامایسین جداسازی نشد که این امر به علت حساس بودن استرپتومایسین‌ها به این آنتی‌بیوتیک است و محیط دارای کانامایسین و ضد قارچ نیست، 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 این که دمای بهینه رشد اکثر نوکاردیاهای ۲۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۳۹)، این امر موجب افزایش جداسازی در مطالعه حاضر شد.

### نتیجه‌گیری

به دلیل پیچیدگی‌های تشخیصی نوکاردیاهای و همچنین تنوع باکتری‌های موجود در خاک که تند رشد هستند و

current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2): 259-82.

- 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 Geneesk* 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, Adiatova 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](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.<sup>1</sup>, Davood Azadi, M.Sc.<sup>2</sup>, Abbas Daeinaser, B.Sc.<sup>3</sup>, Hasan Shojaei, Ph.D.<sup>4\*</sup>

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