مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره سیزدهم، زمستان ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی نوکاردیا از نمونه های بالینی بیماران مشکوک به سل و تعیین هویت آنها

سعید ذاکر بستان آباد[1*] ، عبدالرزاق هاشمی شهرکی[2] ، پروین حیدریه[3]، نسرین شیخی[4] ، آرمان شریفی[5] ، معصومه سیری فرون آباد[6]

۱ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند ،پرند ،ایران
۲ استادیار، انیستیتیو پاستور ایران، تهران، ایران
۳ استادیار، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۴ کارشناس، آزمایشگاه مسعود، تهران، ایران
۵ دانشجوی کارشناسی فناوری اطلاعات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند ،پرند ،ایران
۶ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند ،پرند ،ایران

چکیده

مقدمه و هدف : نوکاردیا به عنوان یکی از جنس های مهم اکتینومیست های هوازی، ساکنین خاک می باشند که در مواردی باعث ایجاد عفونتهای خطرناک و کشندهای در افراد مس‌تعد بخصوص مبتلایان به انواع نقایص سیستم ایمنی می نمایند. تعدادی از گونه های متعلق به نوکاردیا ها می توانند عفونت های ریوی مزمن ایجاد نمایند. در این مطالعه بیماری نوکاردیوزیس ریوی در بیماران مشکوک به سل که کشت و لام میکروسکوپی آنها منفی گزارش گردیده بود، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: از تعداد ۹۰ بیمار مشکوک به سل که از نظر مایکوباکتریوم منفی بودند نمونه خلط مجدد تهیه و برای جداسازی نوکاردیا به عنوان عامل بیماری زا مورد بررسی قرار گرفتند. از روش paraffin baiting و کشت بر روی محیط کشت Blood agar برای جداسازی ایزوله های نوکاردیا استفاده شد. ایزوله های جدا شده با استفاده از روش های فنوتیپیک میکروب شناسی مورد شناسایی قرار گرفتند و هویت ایزوله ها تعیین گردید.

یافته‌ها: تعداد ۶ ایزوله بالینی نوکاردیا از بیماران مشکوک به سل که کشت و لام آنها منفی بود، جداسازی گردید. با استفاده از روش های فنوتیپیک هویت ایزوله ها نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس تعیین هویت شد و بیماران تحت درمان دارویی نوکاردیا قرار گرفتند.

نتیجه گیری: در بیماران مشکوک به سل، که از نظر کشت و لام میکروسکوپی منفی تشخیص داده می شوند، نوکاردیا به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری مزمن ریوی می تواند اهمیت داشته باشد و باید مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سل ، کشت منفی ،نوکاردیا، شناسایی

مقدمه

نوکاردیاها باکتری‌هایی بدون حرکت، فاقد اسپور، گرم مثبت، هوازی و میله‌ای شکل بوده که دارای اسید توبرکلواستاریک در دیواره سلولی خود می‌باشند. همچنین در دیواره سلولی نوکاردیا، اسیدهای مایکولیک با زنجیره کوتاه کربنی (۶۰-۴۰ کربن) وجود دارد که از ویژگی‌های عمومی این دسته از باکتری‌ها می‌باشد (۱۳). امروزه بیش از ۸۰ گونه نوکاردیایی شناسایی شده است که نوکاردیا آستروئیدس با نوکاردیا فارسنیکا از گونه های مهم متعلق به این جنس بوده که به کرات از نمونه های بالینی جداسازی می شوند (۳). نوکاردیاها به عنوان باکتری‌های ساپروفیت در منابع مختلف آبی و خاک، گرد و غبار، گیاهان و فضولات حیوانی در حال پوسیده شدن یافت می‌شوند. به دلیل اینکه نوکاردیاها به طور طبیعی در محیط یافت می‌شوند، جدا نمودن این ارگانیسم‌ها ممکن است به ویژه در نمونه‌های تنفسی به دلیل کلونیزه بودن این باکتری و عفونت غیر تهاجمی و همچنین آلودگی‌های آزمایشگاهی باشد. معیارهای کمک کننده برای تعیین اهمیت بالینی نوکاردیا جدا شده در آزمایشگاه علائم بالینی بیمار و جدا نشدن عوامل عفونی دیگری نظیر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس[1] می‌باشد (۴). در عین حال وضعیت ایمنی میزبان نیز بسیار اهمیت دارد. همچنین جداسازی نوکاردیا از نمونه‌های استریل بدن اهمیت بالایی دارد

آدرس نویسنده مسئول : دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، گروه زیست شناسی سلولی-مولکولی
Email : Zakersaeed20@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله:۹۲/۱۱/۱۵
تاریخ پذیرش:۹۲/۱۱/۲۹

1 M. tuberculosis

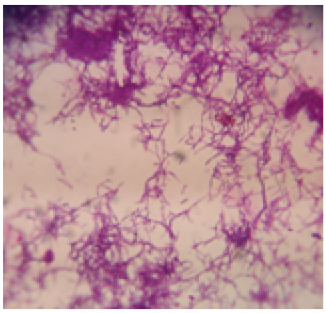
و دال بر بیماریزا بودن ایزوله جدا شده از بیمار می‌باشد. اعتقاد بر این است که برای اثبات بیماریزا بودن ایزوله جدا شده، جدا شدن متوالی ایزوله مذکور از بیمار لازم است. کلونیزه شدن بدون ایجاد بیماری در دستگاه تنفسی، در بیماران دارای برونشکتازیس[1] شامل بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس[2] دیده می‌شود. با این وجود در مواردی نیز کلونیزاسیون نوکاردیا بدون بیماری در افراد دارای برونشکتیازیس دیده می‌شود (۲، ۳، ۴، ۶، ۱۰). در ایران، جایی که بیماری سل اندمیک است، غالب بیماری های عفونی ریوی ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد (۸). با این وجود در موارد نیز علی رغم وجود علائم بالینی به نفع بیماری مزمن ریوی، در آزمایشگاه با روش های مختلف شامل لام میکروسکوپی، کشت و حتی روش های مولکولی ردی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و یا عومل عفونی مشابه پیدا نمی شود. در این مطالعه از تعداد ۱۰۰ بیمار دارای بیماری ریوی مزمن که اسمیر میکروسکوپی و کشت آنها از نظر بیماری سل منفی بودند، برای جداسازی نوکاردیا به عنوان عامل بیماری زا مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

در این تحقیق که از سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ در استان خوزستان و تهران انجام گرفت ۹۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. از تعداد ۹۰ نمونه بالینی مشکوک به بیماری سل در استان خوزرستان (۷۸ مورد) و تهران (آزمایشگاه مسعود:۱۲ مورد) که کشت و لام برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس منفی بودند تعداد ۶ ایزوله نوکاردیا جدا سازی گردید. تعداد ۵ ایزوله از نمونه های استان خوزستان و تعداد ۱ ایزوله مربوط به نمونه های آزمایشگاه مسعود بود. جدول شماره ۱ اطلاعات بالینی بیماران را نشان می دهد. برای جداسازی ۱ میلی لیتر از نمونه خلط بیمار در داخل یک محیط مایع به نام محیط عاری از کربن[3] که حاوی یک میله شیشه ای پوشانده شده با پارفین بود ریخته شد (۱۳). مهمترین ویژگی محیط مذکور به حداقل رساند رشد باکتری ها می باشد. چون تنها نوکاردیا ها می توانند از پارافین به عنوان منبع کربن استفاده نمایند، به همین دلیل در صورت وجود نوکاردیا در نمونه بالینی، کلنی هایی بر روی میله پارافینی می تواند نشان دهنده رشد نوکاردیا باشد. کلنی های رشد یافته بر روی میله پارافینی بر روی محیط کشت Blood Agar کشت داده شدند و بعد از تخلیص و رنگ آمیزی اسید فست نسبی[4] کلنی هایی که اسید فست بودند در جنس نوکاردیا قرار داده شدند تا با استفاده از تست های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گیرند. برای شناسایی دقیق هویت این ایزوله ها از تست های بیوشیمیایی مختلف استفاده گردید که عبارت بودند از: رشد در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد[5]، رشد در حضور لیزوزیم[6]، تست اوره آز[7]، آریل سولفاتاز[8]، تست هیدرولیز هیپوگزانتین[9]، اسکولین[10]، کازئین[11]، آدنین[12]، تیروزین[13]، گزانتین[14] و استفاده از استامید به عنوان منبع کربن[15] (۱۰).

نتایج

در این مطالعه ۶ ایزوله از تعداد ۹۰ نمونه بالینی مورد استفاده دارای ویژگی های اولیه جنس نوکاردیا بودند که بعد از جداسازی مورد شناسایی قرار گرفتند. غالب بیماران دارای انواعی از بیماری های ضمینه ای بودند. جدول شماره ۲ نتایج شناسایی و تعیین هویت ایزوله ها را نشان می دهد.



تصویر شماره ۱: رنگ آمیزی اسید فست نسبی از کشت خالص ایزوله های بالینی نوکاردیا

1 Bronchiectasis
2 Cystic fibrosis
3 Carbon-free
4 Partial acid fast
5 Growth at 45°C
6 Growth in lysozyme
7 Urease
8 Arylsulfatase
9 Hypoxanthine
10 Esculin
11 Casein
12 Adenine
13 Tyrosine
14 Xanthine
15 Utilization of Asetamide as the sole carbon source

در این مطالعه بر اساس ویژگی های فنوتیپیک و تست های بیوشیمیایی تعداد ۴ ایزوله به عنوان نوکاردیا آستروئیدس[16] و ۲ ایزوله به عنوان نوکاردیا والاسه ای[17] مورد شناسایی قرار گرفتند.

بحث

نوکاردیاها همانند مایکوباکتریوم‌ها یکی از مهمترین جنس‌های اکتینومیست‌های هوازی بوده که دارای انتشار جهانی بوده و غالباً از طریق هوا و در مواردی کمتر از طریق ضربه وارد بدن میزبان شده و در صورت ضعیف بودن سیستم ایمنی میزبان بیماری ایجاد می‌نمایند. بیماری‌هایی که گونه‌های متعلق به جنس نوکاردیا ایجاد می‌نمایند شامل طیفی وسیع از بیماری‌های ساده مانند عفونت‌های پوستی، بیماری‌هایی جدی مانند عفونت‌های ریوی و بیماری‌هایی کشنده مانند عفونت‌های منتشر و یا نوکاردیوز مغزی می‌باشند (۵، ۷، ۱۰، ۱۱ ، ۱۲). بدلیل اینکه نوکاردیاها عفونت‌های فرصت‌طلب و غالباً فرم ریوی ایجاد می‌نمایند و در عین حال دارای علائم بالینی غیراختصاصی می‌باشند، تشخیص کلینیکی عفونت آنها بسیار مشکل می‌باشد (۱۱). این گروه از ارگانیسم‌ها به صورت کلاسیک بر اساس مورفولوژی میکروسکوپی و ویژگی‌های فنوتیپیک مورد شناسایی قرار میگیرند. در ایران بیماری سل اندمیک بوده و غالب بیماری های ریوی مزمن ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. با این وجود بیمارانی با علائم بالینی شبیه به سل که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از آنها جدا نمی شود وجود دارند که احتمالا عوامل عفونی دیگری مانند قارچ ها و نوکاردیا ها می توانند اهمیت داشته باشند. در این مطالعه تعداد ۹۰ بیمار دارای علائم بالینی ریوی مشکوک به سل که نتیجه لام و کشت آنها منفی بود مورد مطالعه قرار گرفتند. نتیجه این مطالعه نشان داد که ۶ بیمار با سابقه دارای بیماری های ضمینه ای دارای عفونت نوکاردیایی می باشند. تعیین هویت این ایزوله ها نشان داد که غالب ایزوله ها (۴ ایزوله) متعلق به گونه نوکاردیا آستروئیدس و تعدادی نیز (۲ ایزوله) متعلق به گونه نوکاردیا والاسه ای بودند. نوکاردیا آستروئیدس دارای نقش بارزی در بیماری های عفونی انسان دارد ولیکن امروزه سایر گونه ها نیز در این جنس اهمیت بالینی بیشتر پیدا نموده اند و به کرات از بیماری های عفونی انسان گزارش می شوند (۲، ۳، ۴، ۱۰). در ایران نیز گزارشاتی از عفونت های نوکاردیایی منتشر شده است که حاکی از اهمیت موضوع دارد (۱, ۱۴). مطالعه حاضر بیشتر از این نظر مهم است که نشان می دهد نوکاردیا ها دارای نقش بارزی در بیماری های ریوی در افراد مشکوک به سل که کشت و اسمیر آنها منفی است دارند. لازم به ذکر است شناسایی گونه های مختلف نوکاردیا اگرچه با روش های معمولی نیز تا حدودی امکان پذیر است ولیکن بهتر است از روش های مولکولی نیز استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری مرکز سل و جذام اهواز و آزمایشگاه مسعود و سامیار (تهران) به جهت مساعدت در انجام این کار تحقیقاتی تشکر می نمایند.

16 *N. asteroides*

17 *N. wallacei*

جدول شماره ۱: اطلاعات بالینی بیماران

Isolates	Sample source	G/A[a]	PMH	Primery diagnosis	Main symptoms	X-ray
N1	BAL	F (64)	HTX	*Nocardia sp*	Fever and productive cough	**Irregular nodular lesions**
N2	BAL	M (59)	COPD	*Nocardia sp*	Fever and productive cough	**Cavitation**
N3	Wound infection(2)	F (62)	DM	*Streptomyces or Fungi*	NA	**NA**
N5	Sputum (3)	F (66)	COPD	*Nocardia sp*	Dyspnea and cough	**Onsolidative with pleural effusions**
N6	BAL	F (71)	NA	*Nocardia sp*	Fever and productive cough	**Pleural effusions**
N7	Oral ulcers	M (32)	Pamphlgus	*Streptomyces*	Oral ulcers	**Cavitation**

جدول شماره ۲: شناسایی ایزوله های بالینی نوکاردیا

Isolates			Production of:			Hydrolysis of:							Species by Conventional tests
	Growth in	**Growth at 45°C**	**Arylsulfatase (14**	**Urease**		**Adenine**	**Casein**	**Esculin**	**Hypoxanthine**	**Tyrosine**	**Xanthine**	**Utilization of Asetamide as the sole carbon source**	
N1	+	+	-	+		-	-	+	+	-	+	+	*N. wallacei*
N2	+	+	-	+		-	-	+	+	-	-	-	*N. asteroides*
N3	+	+	-	+		-	-	+	+	-	-	-	*N. asteroides*
N5	+	+	-	+		-	-	+	+	-	-	-	*N. asteroides*
N6	+	+	-	+		-	-	+	+	-	-	-	*N. asteroides*
N7	+	+	-	+		-	-	+	+	-	+	+	*N. wallacei*

منابع

1. Aghamirian MR, Ghiasian SA. Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of iran (2006 - 2007). Open Microbiol J. 2009;3:53-57.
2. Agterof MJ, van der Bruggen T, Tersmette M, ter Borg EJ, van den Bosch JM, Nocardiosis: a case series and a mini review of clinical and microbiological features. Neth J Med. 2007 ;65:199-202.
3. Beaman BL and Beaman L. Nocardia species: host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev, 1994. 7: 213.
4. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr. Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev. 2006. 19: 259-282.
5. Fishman J A and Rubin R H. Infection in organ-transplant recipients. N Engl J Med. 1998. 338: 1741-1751.
6. Khan BA, Duncan M, Reynolds J, Wilkes DS. Nocardia infection in lung transplant recipients. Clin Transplant. 2008;22:562-566.7
7. Bargehr J, Flors L, Leiva-Salinas C, Flohr TR, Sawyer R, Bonatti H, Hagspiel KD. Nocardiosis in solid-organ transplant recipients: spectrum of imaging findings. Clin Radiol. 2013 :68:e266-271.
8. Mirsaeidi SM, Tabarsi P, Mohajer K, Falah-Tafti S, Jammati HR, Farnia P, Mansouri SD, Masjedi MR, Velayati AA. A long delay from the first symptom to definite diagnosis of pulmonary tuberculosis. Arch Iran Med, 2007. 10:190-193.9
9. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. Infection. 2010;38:89-97.
10. Muñoz J, Mirelis B, Aragón LM, Gutiérrez N, Sánchez F, Español M, Esparcia O, Gurguí M, Domingo P, Coll P. Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997 to 2003. J Med Microbiol, 2007. 56: 545-550.11
11. Peleg AY, Husain S, Qureshi ZA, Silveira FP, Sarumi M, Shutt KA, Kwak EJ, Paterson DL. Risk factors, clinical characteristics, and outcome of Nocardia infection in organ transplant recipients: a matched case-control study. Clin Infect Dis. 2007. 44: 1307-1314.
12. Schlaberg R, Huard RC, Della-Latta P. Nocardia cyriacigeorgica, an emerging pathogen in the United States. J Clin Microbiol. 2008. 46:265-273.
13. Shawar RM, Moore DG, LaRocco MT. Cultivation of Nocardia spp. on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1990. 28(3): p. 508-512.
14. Shojaei H, Hashemi A, Heidarieh P, Eshraghi S, Khosravi AR, Daei Naser A. Clinical isolation of Nocardia cyriacigeorgica from patients with various clinical manifestations, the first report from Iran. Med Mycol J. 2011;52(1) :39-43.