

تنوع گونه های نوکاردیاهای بیماری زا جدا شده از بیماران

مسعود صالحی پور^۱، سعید ذاکر بستان آباد^{۱*}، شهلا رضایی^۲، عبدالرزاق هاشمی شهرکی^۳

۱- گروه میکروب شناسی و بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، تهران، ایران

۲- بخش فارماسیتیکال بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- بخش اپیدمیولوژی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: به طور سنتی *Nocardia asteroides* گونه غالب مسبب نوکاردیوز در نظر گرفته می شود. شناسایی ایزوله ها به دست آمده با استفاده از تکنیک های مولکولی نشان می دهند که جنس ها در معرض پیچیدگی طبقه بندی قابل توجه ای قرار دارند و شناسایی پایه فنوتیپی می تواند مبهم باشد. هدف از این مطالعه بررسی توزیع گونه های نوکاردیا سویه های به طور عمده بهبود یافته از بیماران مشکوک به سل، در طول دوره سه ساله بود (۱۳۸۸-۱۳۹۱).

مواد و روش ها: ایزوله های بالینی در سطح گونه با استفاده از تست های فنوتیپیک و روش ژنوتیپی شامل تجزیه و تحلیل توالی های تک و چند ژنی (MLSA) از ژن *secA* و *gyrB*، شناسایی شدند.

یافته ها: نوکاردیوز در این مطالعه در ۴۶ بیمار تشخیص داده شد. شایع ترین حالت زمینه ای پیوند عضو (۶ نفر؛ ۱۳٪)، سرطان (۶ نفر؛ ۱۳٪)، ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) (۶ نفر؛ ۱۳٪)، بیماری های ریوی مزمن غیر عفونی (۵ نفر؛ ۱۰/۸٪) و سل (۴ نفر؛ ۸/۷٪) شد. در گونه های نوکاردیا به دست آمده از ۴۶ نمونه مختلف بالینی، شایع ترین نوع لاواژ برونکوالوئولار (BAL) (۴۳/۵٪) بود. یازده گونه مختلف از نوکاردیا از بیماران شناسایی شد: *N. asteroides* (۱۲ ایزوله)، *N. cyriacigeorgica* (۹ ایزوله)، *N. farcinica* (۷ ایزوله)، *N. wallacei* (۶ ایزوله)، *N. carnea* (۳ ایزوله)، *N. otitidiscaviarum* (۳ ایزوله)، *N. abscessus* (۱ ایزوله)، *N. arthritis* (۱ ایزوله)، *N. kruszaki* (۱ ایزوله)، *N. nova* (۱ ایزوله) و *N. veteran* (۱ ایزوله).

نتیجه گیری: عفونت ناشی از گونه های نوکاردیا به نظر می رسد شایع تر از انتظار عمومی باشد. مطالعه حاضر شواهد بیش تری را ارائه می کند که گونه های نوکاردیا قادر به ایجاد طیف گسترده ای از بیماری های انسانی در افراد سالم و بیماران دارای نقص ایمنی هستند. MLSA یک روش قابل اعتماد برای شناسایی گونه های دقیق از نوکاردیاهای ایزوله شده است و برای استفاده های معمول در آزمایشگاه بالینی بیش تر امکان پذیر خواهد بود.

کلید واژه ها: نوکاردیا، عفونت، شناسایی، MLSA

مقدمه

مهمی در فروپاشی مواد گیاهی آلی دارند. نوکاردیا به طور فزاینده ای به عنوان عوامل عفونی از بیماران مبتلا به سیستم ایمنی سرکوب شده و گاهی اوقات در افراد سالم و باعث عفونت موضعی یا منتشر، اعم از ریوی و عفونت زخم به آسه مغز، و باکتری می جدا شده اند (۵). از آنجا که شایع ترین تظاهر عفونت های نوکاردیایی ذات الریه است، بیماران مبتلا به تب، کاهش وزن، سرفه، درد قفسه سینه و تنگی نفس ممکن است با سایر عفونت های ریوی مزمن مثل سل یا عفونت های قارچی مهاجم اشتباه گرفته شود (۲، ۱۶). در حالی که طبقه بندی درون جنس نوکاردیا به سرعت در حال تغییر است، شناسایی و شرح گونه های جدید ادامه می یابد. شناسایی نوکاردیا جدا شده تا سطح گونه به وسیله روش های معمول آسان نیست (۵، ۲۷).

اعضای جنس نوکاردیا هوازی، باسیل رشته ای منشعب، گرم مثبت و اسید فاست جزئی، که شامل بیش از ۹۰ گونه مختلف هستند (<http://www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html>). اما، گونه نوکاردیا به طور معمول ساپروفیت خاک اند و با این وجود نقش

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، تهران، ایران

پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۱۵

***secA* و *gyrB* , rRNA**

DNA ژنومی از کشت های میکروبی با استفاده از کیت استخراج DNA (کیت USA, CA, Qiagen) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج شد و در 20°C - تا زمان استفاده ذخیره گردید.

ژن rRNA ۱۶S از ایزوله ها با استفاده از پرایمر (۵'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-۳) pA و pI (۵'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-۳) برای هر ایزوله تکثیر شد (۲۵) و سپس قطعات تکثیر شده تعیین توالی شد. تکثیر و تعیین توالی دو ژن *gyrB* و *secA* برای هر سویه توسط روش مک - تاگارت و همکاران انجام شد (۲۰۱۰). پرایمرهای Noc-*gyrB*-F (۵'-CTTCGCCAACACCATCAACAC-۳) و Noc-*gyrB*-R (۵'-TGATGATCGACTGGACCTCG-۳) برای تکثیر ۴۸۰ جفت باز از ژن *gyrB* و پرایمرهای *secA*-F۴۷ (۵'-GCGACGCCGAGTGGATGG-۳) و *secA*-ConR۲ (۵'-TTGGCCTTGATGGCGTTGTTC-۳) برای تکثیر و تعیین توالی ۴۴۰ جفت باز از ژن *secA* مورد استفاده قرار گرفتند (۲۱).

تجزیه و تحلیل ترتیب داده

توالی به دست آمده برای هر ایزوله از جایگاه های مختلف به طور جداگانه با تمام توالی مربوط موجود به بازایی نوکاردیا از پایگاه داده GenBank با استفاده از برنامه jPhydit (۱۵) مقایسه شدند. درصد شباهت هر توالی به دست آمده با اطلاعات سویه های مرجع هر گونه از هر ژن در مقایسه با بانک اطلاعاتی تهیه شده در نرم افزار ژن rRNA ۱۶S تعیین گردید. درخت فیلوژنتیک از توالی های مورد اشاره با استفاده از روش NJ و مدل K۲P توسط نرم افزار MEGA ۴.۱ (۳۰) ترسیم شد. برای نشان دادن بهتر وابستگی ایزوله های بالینی با گونه های معتبر نوکاردیا، توالی مربوطه از ژن rRNA ۱۶S، *gyrB* و ژن *secA* با هم تلفیق و قطعه ای به طول ۲۳۴۶ جفت باز با استفاده از برنامه jPhydit (۱۵) تهیه شد، سپس درخت تکاملی بر اساس آن در برنامه MEGA ۴.۱ (۳۰) ترسیم شد.

نتایج

نقش اتیولوژیک ایزوله های جدا شده بر اساس رشد ایزوله های نوکاردیا در محیط کشت و هم چنین بر اساس حضور باسیل در لام میکروسکوپی در بسیاری از نمونه های بالینی هر بیمار قابل استنباط بود. علاوه بر این، در مورد نمونه هایی از قسمت های غیر استریل مانند خلط بودند بر اساس تکرار نمونه برداری و جداسازی مجدد در کشت خالص، قابل اثبات بود. ویژگی های و اطلاعات بالینی از ۴۶ بیمار با نوکاردیوز در جدول ۱ نشان

در ایران، که در آن سل شایع است و مورد توجه قرار می گیرد به عنوان یکی از مهم ترین چالش های بهداشت عمومی، به نقش نوکاردیا به عنوان مسبب عامل ریوی و دیگر شکل عفونت بی توجهی شده است. با توجه به اینکه اطلاعات کمی از ایران در دسترس است، هدف از مطالعه حاضر توضیح دادن طیف گونه جدا شده احتمالی تعیین جنس نوکاردیا به دست آمده از نمونه های مختلف بالینی بیماران با تست های مورفولوژیکی بود برای شناسایی قطعی و قابل اعتماد، ایزوله های بالینی از MLSA از ژن rRNA ۱۶S (۲۵)، زیر واحد A از pre-translocase protein (*secA*) و زیر واحد از یک DNA توپوایزومراز نوع دوم (*gyrB*) استفاده شد (۲۱).

مواد و روش ها

سویه های نوکاردیا

در یک مطالعه سه ساله که از ۱۳۸۸-۱۳۹۱ انجام شده است، به ترتیب ۲۲ و ۱۰ سویه مختلف نوکاردیا از بیمارانی که مشکوک به داشتن عوارض مربوط مایکوباکتریوم بودند در مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری (خوزستان، اهواز، ایران) و آزمایشگاه پزشکی سامیار (تهران، ایران) جدا شدند. در همان زمان ۱۴ ایزوله نوکاردیا بالینی مختلف از دیگر نقاط ایران (به غیر از استان تهران و خوزستان) به مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری (خوزستان، اهواز، ایران) برای شناسایی ارجاع داده شدند. تاریخچه بیماران، که ایزوله ها به آن ها تعلق داشت، در جدول ۱ خلاصه شده است. بسیاری از بیماران مبتلا به بیماری ریوی به عنوان موارد ابتلا به سل تشخیص داده می شوند و داروهای ضد سل از جمله ایزونیاژید و ریفامپیسین به مدت شش ماه تجویز می شود، که این ها یا پاسخ ندادند به درمان و یا پاسخ ضعیفی با عود دیرتر دادند.

شناسایی فنوتیپیک

سویه های نوکاردیا با منشا ریوی و یا سایر نمونه های تنفسی روی محیط کشت لوین اشتاین جانسون (LJ) جدا شده بودند در حالی که دیگر سویه ها جدا شده از سایر نمونه های بالینی بر روی محیط بلاد آگار جدا شدند. سویه ها برای سرعت رشد، ویژگی های مورفولوژیکی میکروسکوپی و میکروسکوپی، رشد در درجه حرارت های مختلف و تست هایی مانند رشد در لیزوزیم، رشد در 45°C ، آریل سولفاتاز (۱۴ روز)، فعالیت اوره آز و هیدرولیز آدنین، کازئین، اسکولین، هیپوزانتین، تیروزین و گزانتین و استفاده از استامید به عنوان تنها منبع کربن با توجه به روش استاندارد (۱۱) ارزیابی شدند.

شناسایی مولکولی با استفاده از تعیین توالی ژن های ۱۶S

APN-۰۰۰SM۲۵، APN-۰۰۰۳۱، APN-۰۰۰۲۸، ۰۰۰۱۱
APN-، APN-۰۰۰۱۲، APN-۰۰۰SM۳۰، APN-۰۰۰۲۶
۰۰۰۴۷، APN-۰۰۰۴۸، APN-۰۰۰۴۹، APN-۰۰۰۷۱ و APN-۰۰۰۷۱
اطمینان بالا به وسیله تجزیه و تحلیل توالی ای از ژن ۱۶S
N. asteroides rRNA (۱۲ ایزوله) به عنوان شایع ترین گونه
شناسایی شدند. تغییر های توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rRNA
در میان ایزوله های بالینی اختلاف ۰ تا ۱۱ bp را نشان داد
(اطلاعات ذکر نشده است).

داده شده است. ۲۵ نفر از بیماران (۵۴/۳٪) زن بودند/ محدوده
سنی بیماران ۱۸-۸۸ سال بود/ بسیاری از بیماران حداقل یک
بیماری زمینه ای قابل توجه مانند پیوند عضو (۶ بیمار، ۱۳٪)
، سرطان (۶ بیمار، ۱۳٪)، HIV (۶ بیمار، ۱۳٪)، بیماری های
غیر عفونی مزمن ریوی (۵ بیمار، ۱۰/۸٪) ، و سل (۴ بیمار،
۸/۷٪) داشتند/ شایع ترین نمونه بالینی BAL ۴۳٪ بود/
شایع ترین علائم بالینی تب (۶۹/۵٪) و سرفه (۴۷/۸٪) بود/
یافته های اشعه ایکس قفسه سینه شامل ارتشاح در ۱۷/۴٪
موارد و حفره در ۱۹/۶٪ دیده شد/ نوکاردیوز ریوی در ۲۷ بیمار
از ۴۶ بیمار (۵۸/۷٪)، نوکاردیوز منتشره در ۷ بیمار (۱۵/۲٪)
و بیماری های سیستم عصبی مرکزی (آبسه مغزی) در ۴ بیمار
(۸/۷٪) مشاهده شد. جدول شماره ۱: اطلاعات بالینی بیماران
دارای بیماری نوکاردیدزیس را نشان می دهد.

شناسایی گونه ها با استفاده از آزمون فنوتیپ

بر اساس شناسایی اولیه ۱۰ ایزوله بالینی نوکاردیا، به عنوان
گونه استریپتومایسس یا قارچ شناسایی شدند. براساس لام
ماکروسکوپی و با استفاده از رشد در لیزوزیم تمام ایزوله ها به
نوکاردیا گروه بندی شدند. براساس ویژگی های رشد و تست
های بیوشیمیایی، *Nocardia asteroides complex like*
شایع ترین گونه جدا شده (۴۵/۶٪) در میان ایزوله های بالینی
بود (جدول ۱). اما گونه های باقی مانده تنها تا سطح جنس
شناسایی شدند.

شناسایی گونه ها با استفاده از آزمون تعیین توالی

در مطالعه حاضر، ۴۶ سویه بالینی نوکاردیا بر اساس مستندات
پرونده پزشکی و یافته های بالینی به عنوان نوکاردیوز (۱۳۸۸
تا ۱۳۹۱) تشخیص داده شدند. در طول مطالعه، توالی سه ژن
شامل ۱۶S rRNA، *gyrB* و ژن *secA* به طور جداگانه برای
شناسایی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت شناسایی بر اساس
تلفیقی از توالی سه ژن تهیه و شناسایی قطعی گردید. نتایج
شناسایی و مقایسه آن ها در جدول شماره ۲ آورده شده است.

تجزیه و تحلیل ژن ۱۶S rRNA

در این قسمت نتایج نشان داد که ۴۶ گونه نوکاردیا ارتباط
نزدیکی با یکدیگر داشتند و از دیگر جنس ها متمایز بودند.
به طور کلی، ۹۵٪ تا ۱۰۰٪ شباهت (واگرایی درون گونه ای)
در بین ایزوله ها در مقایسه با دیگر گونه های مرتبط مشاهده
شد. تصویر شماره ۱ جایگاه تاکسونومیک ایزوله های مورد
بررسی را بر اساس تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA نشان می
دهد. همه ایزوله های بالینی نوکاردیا به وضوح تفکیک شده و
شاخه های مجزا در درخت فیلوژنتیک از ژن ۱۶S rRNA نشان
دادند. ایزوله های بالینی از جمله APN-۰۰۰۱۰، APN-

جدول شماره ۱: اطلاعات بالینی و نتیجه شناسایی ایزوله های بالینی نوکاردیا

APN000	Sample source	G/A	PMH	Main symptoms	Chest X-ray	Diagnosis by clinical findings	Primary identification	Identification by	
								Phenotypic tests	MLSA
7	Leg abscess	(F (66	Healthy	Subcutaneous abscesses	ND	Mycetoma	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>
9	BAL	(F (64	Kidney transplant recipient	Fever, cough	Irregular nodular lesions	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. farcinica</i>
10	BAL	(M (59	COPD	Fever, cough	Cavitation	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
11	Wound infection	(F (62	HIV	Fever, weight loss	NA	Mycetoma	<i>Streptomyces sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
12	BAL	(M (34	Chronic lymphocytic leukemia	Dyspnea, cough	Pleural effusion	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
13	Biopsy	(M (19	Soft tissue abscess	Subcutaneous nodules	ND	Mycetoma	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
14	Blood	(M (44	BMT	Fever, weight loss	ND	ND	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>
15	BAL	(F (71	Chronic bronchitis	Dyspnea, cough	Bilateral involvement	Tb	Fungi	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
16	Blood	(F (47	BMT	Fever, weight loss	ND	Fungal infection	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>
18	Sputum ((3	(F (66	COPD	Dyspnea	Consolidative with pleural	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. farcinica</i>
22	BAL	(F (71	HIV	Fever, cough	Pleural effusions	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. farcinica</i>
23	Soft tissue biopsy	(M (45	Healthy	-	-	ND	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. nova</i>
24	Oral ulcers	(M (32	Pamphlgus	Oral ulcers	-	ND	<i>Streptomyces sp</i>	<i>N. blacklockiae</i>	<i>N. wallacei</i>
25	Blood	(F (47	HIV	Fever	ND	ND	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. farcinica</i>
28	BAL	(F (72	Recurrent CMV, HIV	Fever, cough	Cavitation	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
29	BAL	(F (71	Healthy	Fever, cough	Infiltrates	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. farcinica</i>

30	Sputum and BAL	(M (42	HIV	Fever, general weakness and dysuria	Infiltrates	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. arthritidis</i>
31	BAL	(F (65	Kidney transplant recipient	Fever, cough	Diffuse pneumonic infiltrates	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
32	Brain abscess	(M (32	Brain abscess	FUO	NA	Nocardiosis	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
35	Leg discharges ((2	(M (49	DM	Swelling left leg, purulent wound	ND	Mycetoma	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. blacklockiae</i>	<i>N. wallacei</i>
39	BAL	(F (67	Tb	Fever, cough	Cavitation	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
40	BAL	(F (31	Healthy	Fever, cough, chest pain	Nodule	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. carnea</i>
41	Blood	(M(66	Mitral valve prosthesis	Post operative fatigue, chest pain	ND	ND	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. blacklockiae</i>	<i>N. wallacei</i>
42	BAL	(F (81	Neo	Fever, cough, chest pain	Infiltrate	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. carnea</i>
43	Sputum ((3	(M (62	Ischemic heart disease	Fever, cough	Small irregular nodular lesions	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. wallacei</i>
47	BAL	(M (67	Chronic bronchitis	Fever, cough	Diffuse pneumonic infiltrates	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
48	BAL	(M (59	Chronic bronchitis	Fever, cough	Diffuse pneumonic infiltrates	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
49	Sputum, BAL	(M (42	Follicular non-Hodgkin	Dyspnea, cough	Bilateral involvement	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
50	Brain abscess	(M (59	Brain abscess	FUO, weight loss, headache	CT scan, cerebral abscess	Nocardiosis	Fungi	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. carnea</i>
51	BAL	(F (47	Healthy	Fever, chest pain, weight loss	Cavitation	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. nova</i>
52	BAL	(F (55	Healthy	Fever, cough, chest pain	Nodule	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. farcinica</i>
53	Biopsy	(F (18	Skin graft recipient	Weakness, soft tissue abscess	NA	Nocardiosis	<i>Streptomyces sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. wallacei</i>
54	Biopsy	(F (28	Soft tissue abscess	Subcutaneous nodules	ND	Mycetoma	<i>Streptomyces sp</i>	<i>N. blacklockiae</i>	<i>N. wallacei</i>
55	BAL	(F (81	Tb	Fever, cough	Cavitation	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
56	Blood	(M (32	Liver transplant recipient	FUO	ND	ND	<i>Streptomyces sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>

69	Brain abscess	(F (64	Brain abscess	FUO, weight loss, headache	CT scan, cerebral abscess	Nocardiosis	Fungi	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
71	Sputum ((3	(F (64	Tb, HIV	Fever, cough	Cavitation	Tb	<i>Streptomyces sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
77	Brain abscess	(F (50	Multifocal brain abscesses	FUO, headache	CT scan, cerebral abscess	Nocardiosis	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
78	Sputum	(M (88	Neo	Chest pain	Cavitation	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. veterana</i>
79	Bone marrow	(M (14	Hemophili	Fever, Dyspnea, cough	ND	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. abscessus</i>
80	BAL	(F (73	Neo	Fever, chest pain, weight loss	Infiltrate	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. kruczakiae</i>
1390	Sputum ((4	(M (48	Neo	Fever, cough, chest pain	Cavitation	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. farcinica</i>
SM25	BAL	(M (63	Liver transplant recipient	Fever, cough	Small irregular nodular lesions	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
SM26	BAL	(F (42	Tb, HIV	General weakness, dysuria	Cavitation	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
SM30	BAL	(F (21	Follicular non-Hodgkin	Fever, cough	Diffuse pneumonic infiltrates	Tb	<i>Nocardia sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>
SM62	Blood	(F (46	Kidney transplant recipient	FUO	ND	ND	<i>Streptomyces sp</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>

Abbreviations: G/A, gender/age; PMH, past medical history; F, female, ND, not determined; BAL, bronchoalveolar lavage; M, Male; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HIV, human immunodeficiency virus; NA, not available; BMT, bone marrow transplantation; CMV, cytomegalovirus, FUO, fever unknown origin, DM, diabetes mellitus; Tb, tuberculosis; Neo, neoplasia, CT, computed tomography.

N. farcinica محدود بود (فقط ۱ یا ۲ جفت باز). دیگر ایزوله ها با استفاده از ژن ۱۶S rRNA به عنوان *N. wallacei* (ایزوله)، *N. otitidiscaviarum* (۳ ایزوله)، *N. carnea* (۳ ایزوله)، *N. arthritis* (۲ ایزوله)، *N. abscessus* (۱ ایزوله)، *N. nova* (۱ ایزوله)، *N. kruczakiae* (۱ ایزوله) و *N. veteran* (۱ ایزوله) شناسایی شدند.

تجزیه و تحلیل gyrB و secA

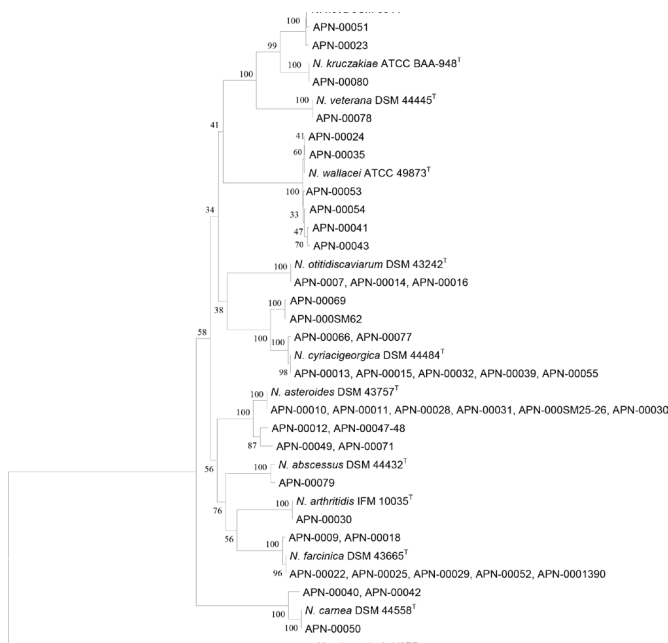
بر اساس آنالیز این دو ژن همه ایزوله های بالینی نوکاردیا به وضوح از همدیگر متمایز شدند و با تشکیل شاخه های مجزا در درخت فیلوژنتیک gyrB و secA شناسایی شدند (داده ها نشان داده نشده است). طیف تنوع نوکلئوتیدی متفاوت برای هر یک از جایگاه: ۱۰۰-۰/۰ جفت باز برای gyrB و ۷۵-۰/۰ جفت باز برای secA مشاهده شد. شناسایی ایزوله های بالینی *N. asteroides*،

ایزوله ها شامل APN-۰۰۰۱۳، APN-۰۰۰۱۵، APN-۰۰۰۳۲، APN-۰۰۰۳۹، APN-۰۰۰۵۵، APN-۰۰۰۶۶، APN-۰۰۰۶۹ و APN-۰۰۰۷۷. APN-۰۰۰SM۶۲ به عنوان *N. cyriacigeorgica* گونه غالب دوم (۹ ایزوله) شناخته شده است. طیف تنوع نوکلئوتیدی در میان گونه های *N. cyriacigeorgica* محدود بود (فقط ۱ یا ۲ جفت باز). ایزوله بالینی APN-۰۰۰SM۶۲ عدم تطابق ۱ جفت بازی و ۲ جفت بازی را با *N. cyriacigeorgica* ژنوتیپ I و II نشان داد و به عنوان ژنوتیپ جدید (III) در این گونه در نظر گرفته شد (جدول ۱). ایزوله های APN-۰۰۰۲۲، APN-۰۰۰۲۵، APN-۰۰۰۲۹، APN-۰۰۰۵۲، APN-۰۰۰۰۹، APN-۰۰۰۱۳۹۰ و APN-۰۰۰۱۸ به عنوان *N. farcinica* (۷ ایزوله) سومین گونه تکرار شده از نوکاردیا در مطالعه حاضر مشخص شدند. طیف تنوع نوکلئوتیدی در میان گونه های

N. nova ، *N. cyriacigeorgica* ، *N. carnea* ، *N. farcinica* مطابق با یافته ای شناسایی با ژن *rRNA* ۱۶S بود. در شرایطی که ایزوله های متعلق به *N. wallacei* تفاوت قابل ملاحظه ای بین ژنوتیپ ژن *rRNA* ۱۶S و *gyrB* و *secA* نشان دادند (جدول ۱).

شناسایی بر اساس MLSA

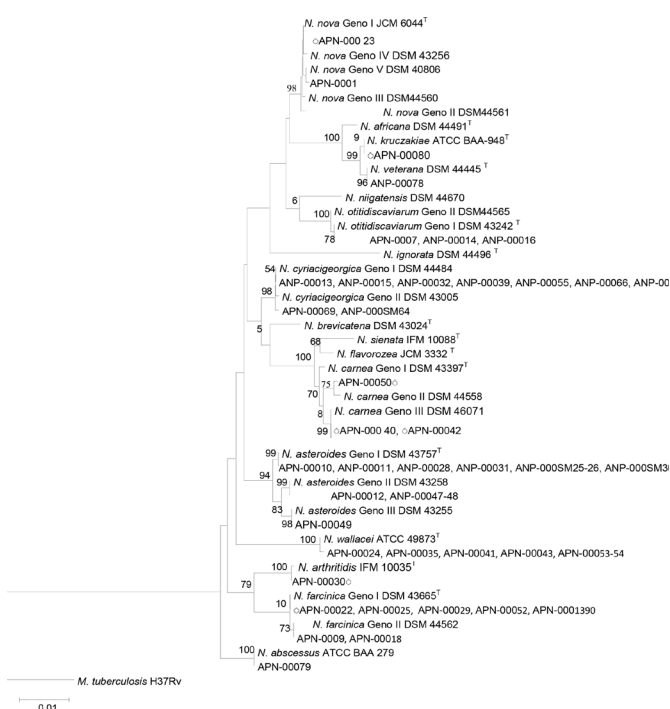
در میان تمام ۴۶ گونه، تنوع بین ۰-۲۴۶ در بین محدوده توالی ژن ۱۶ *rRNA-secA-gyrB* تفاوت نوکلئوتیدی بین سویه ها مشاهده شد. درخت تکاملی براساس این قطعه بلند تلفیق شده (شکل ۲) به وضوح شناسایی دقیق ایزوله های بالینی با اطمینان ۹۹٪ - ۱۰۰٪ را میسر ساخت (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: درخت تکاملی و رابطه فیلوژنتیکی ایزوله های مورد بررسی در این مطالعه بر اساس MLSA توالی ژن های *rRNA* ۱۶S، *gyrB*، *secA*

بحث

به دلیل گزارش های مکرر و اهمیت عفونت های نوکاردیا، نیاز افزایش یافته ای برای توصیف سریع خصوصیات ایزوله های بالینی نوکاردیا به خصوص در محیط بالینی که بیماری سل در آنجا اندمیک است وجود دارد. فراتر از رنگ آمیزی گرم و رنگ آمیزی اسید-فست نسبی، شناسایی گونه های نوکاردیا متکی بر مورفولوژیکی و واکنش های بیوشیمیایی معمولی است ولی طاققت فرسا هستند و قطعی نمی باشند (۵، ۲۶). اگر چه تعیین توالی ژن *rRNA* ۱۶S، اولین انتخاب برای شناسایی باکتری ها است (۵، ۶)، با این حال عوامل مختلفی از قبیل تنوع ژنتیکی تصادفی، انتقال افقی ژن و نوترکیبی (۹) شناسایی با استفاده از یک ژن را با چالش مواجه می کند. برای حل این مشکل، MLSA نتایج بسیار امیدوار کننده ای برای طبقه بندی پروکاریوتی و شناسایی گونه ها ارائه داده است (۹، ۱). به تازگی، تاگارت و همکاران (۲۰۱۰) پیشنهاد داده اند که پنج جایگاه *rRNA* ۱۶S، *gyrB*، *secA*، *hsp65* و *rpoB* (MLSA) یک روش قابل اعتماد برای شناسایی است. با این حال استفاده از سه ژن *secA-gyrB* (۱۶ *rRNA*) - در *rRNA* ۱۶S - غالب MLSA به عنوان روشی قابل اعتماد مورد تاکید است (۲۲). در مطالعه حاضر، ۴۶ سویه های بالینی نوکاردیا با استفاده از سه ژن *secA-gyrB* (۱۶ *rRNA*) - در غالب MLSA مورد شناسایی قرار گرفتند. ژنوتیپ های مختلف از *N. asteroides*، *N. carnea*، *N. cyriacigeorgica*، *N. farcinica*، *N.*



تصویر شماره ۱: درخت تکاملی و رابطه فیلوژنتیکی ایزوله های مورد بررسی در

این مطالعه بر اساس توالی ژن *rRNA* ۱۶S

هاى خون دو دريافت كننده مغز استخوان و يكي از آيسه زير جلدی از بیمار بهبود یافته به دست آمد. بر اساس یافته هاى اين مطالعه *N. otitidiscaviarum* قادر به ايجاد عفونت هم در اشخاص دارای نقص سيستم ايمنى و سالم از نظر سيستم ايمنى می باشد. در اين مطالعه برای اولین بار *N. arthritis*، *N. carnea*، *N. kruczakiae* و *N. nova* از نمونه هاى بالینی در ايران جدا شد. داده هاى اين مطالعه شواهد بيش تری برای بیماری زایی *N. arthritis*، *N. kruczakiae* و *N. veteran* به عنوان عوامل بیماری زای نادر همانند ساير مطالعات فراهم آورد (۱۸، ۷، ۱۲).

نتیجه گیری

بر اساس اين مطالعه، *N. asteroids* شایع ترین پاتوژن مسبب نوکاردیوز و پس از آن *N. farcinica*، *N. cyriacigeorgica* و *N. wallacei* در ايران بودند. علاوه بر اين، نتایج اين مطالعه نشان داد که گونه هاىی مانند *N. abscessus*، *N. arthritis*، *N. carnea*، *N. kruczakiae*، *N. nova*، *N. otitidiscaviarum* و *N. veteran* نیز می توانند باعث ايجاد بیماری شوند. اين مطالعه نشان داد که نوکاردیوز می تواند به وسیله گونه هاى مختلف نوکاردیا ايجاد شود و الگوریتم آزمایشگاهی بر اساس شناسایی فنوتیپی گونه هاى نوکاردیا قادر به جداسازی اختصاصی ایزوله ها تا سطح گونه است. شناسایی دقیق و قابل اعتماد از نوکاردیا تا سطح گونه در حال حاضر نیاز به روش هاى مبتنی بر تعیین توالی و ترجیحاً *MLSA* بر اساس ژنهاى *gyrB*، *16S rRNA* و *secA1* می باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند به خاطر تامین منابع مالی اين مطالعه تقدیر می گردد.

otitidiscaviarum و *N. nova* بر اساس ژن *16S rRNA* گزارش شده گردید. ناهمگنی درون گونه ای هم چنین بر اساس تجزیه و تحلیل SNP ژن *gyrB* و *secA1* تشخیص داده شد، که نسبتاً بيش تر از توالی ژن *16S rRNA* (جدول ۲) بود. با این حال، اهمیت تنوع درون گونه ای میان ایزوله ها و علايم بالینی در هاله ای از ابهام باقی مانده است. ارتباط بين نوکاردیوز و بیماری هاى زمینه ای به خوبی مشخص شده است (۲۷، ۴، ۲۲). در مطالعه ما، در بسیاری از موارد بیماری هاى زمینه ای و درمان با داروهای کورتونی با بیماری نوکاردیوز مرتبط بود. مطالعه جاری مانند گزارش هاى دیگر نشان داد که بیماری نوکاردیوز ریوی و منتشره به طور عمده در بیماران دچار نقص ايمنى مشاهده می شود (۲۲، ۲۰). در سال هاى اخیر، نوکاردیوز به طور فزاینده در ايران گزارش شده است (۳، ۲۹)، با این حال در بسیاری از آن ها شناسایی ایزوله هاى بالینی براساس بررسی میکروسکوپی، کشت و گاهی اوقات آزمایش فنوتیپی انجام شد. دوازده ایزوله (۲۶٪) به عنوان گونه شایع *N. asteroids* شناسایی شدند. در طول سال گذشته، چندین مورد از نوکاردیوز توسط *N. asteroids* از بیماری موضعی به منتشره، از دیگر نقاط جهان گزارش شده است (۴، ۲۲، ۲۳). دومین گونه غالب در ایزوله هاى بالینی ما *N. cyriacigeorgica* (۹ ایزوله، ۱۹٫۵٪) بود. عفونت ناشی از این گونه ها از ايران بر اساس روش فنوتیپی و روش توالی یابی *16S rRNA* قبلاً گزارش شده است (۲۹). گزارشات متعددی از این گونه در ژاپن و تایلند (۳۲، ۱۸) و ایالات متحده آمریکا (۱۳) و اسپانيا (۲۲، ۲۳) منتشر شده است. در مطالعه حاضر، هفت ایزوله *N. farcinica* برای اولین بار از ايران گزارش می گردد. گزارش هاى داده شده از نقاط مختلف نشان داده اند که *N. farcinica* به ترتیب ۲۳/۸٪، ۲۶/۷٪، ۳۵/۴٪، ۴۴٪، ۶۰/۳٪ و ۳۳/۳٪ ایزوله هاى نوکاردیا در فرانسه (۴)، ژاپن (۱۷)، تایلند (۲۴)، بلژیک (۱۰، ۳۱)، آلمان (۲۸) و اسپانيا (۲۲) را شامل شده است. شش ایزوله از ایزوله هاى بالینی *N. wallacei* تشخیص داده شدند که اولین گزارش این گونه از نمونه هاى بالینی ايران است. گزارشات مربوط به این گونه در جهان نیز نادر است (۲۴). بر اساس دانش ما، این اولین مطالعه گزارشی از تعداد زیادی از ایزوله هاى بالینی *N. wallacei* است. داده هاى ما شواهدی را ارائه میدهد که *N. wallacei* قادر به ايجاد عفونت در انسان هاى دارای نقص سيستم ايمنى است. در اين مطالعه یک ایزوله از بیوپسی مغز استخوان از یک بیمار مبتلا به سندرم هموفیلی به عنوان *N. abscessus* شناخته شد. عفونت هاىی توسط *N. abscessus* از مناطق مختلف از قبیل ژاپن (۱۹)، آلمان (۱۴)، آرژانتین (۸) و اسپانيا (۲۲، ۲۳) گزارش شده است. در اين مطالعه سه ایزوله به عنوان *N. otitidiscaviarum* شناسایی شدند. دو ایزوله از نمونه

منابع

1. Achtman M , and Wagner M , Microbial Diversity and the Genetic Nature of Microbial Species. Nat Rev Microbiol, 2008 ; 6, 431-440.
2. Alnaum HM , Elhassan MM , Mustafa FY and Hamid ME, Prevalence of Nocardia Species among HIV-Positive Patients with Suspected Tuberculosis. Trop Doct, 2011; 41, 224-226.
3. Asilian A , Yoosefi A and Faghihi G. Cutaneous and Pulmonary Nocardiosis in Pemphigus Vulgaris: A Rare Complication of Immunosuppressive Therapy. Int J Dermatol, 2006 ; 45, 1204-1206.
4. Boiron P, Provost F, Chevrier G and Dupont B. Review of Nocardial Infections in France 1987 to 1990. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992 ; 11, 709-714.
5. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS and Wallace Jr. Clinical and Laboratory Features of the Nocardia spp. Based on Current Molecular Taxonomy. Clin Microbiol Rev, 2006; 19, 259-282.
6. Cloud JL, Conville PS, Croft A, Harmsen D, Witebsky FG and Carroll KC. Evaluation of Partial 16S Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Nocardia Species by Using the MicroSeq 500 System with an Expanded Database. J Clin Microbiol, 2004 ; 42, 578-584.
7. Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Brown-Elliott B.A and Witebsky FG. Nocardia wallacei sp. nov. and Nocardia blacklockiae sp. nov., Human Pathogens and Members of the “Nocardia transvalensis Complex”. J Clin Microbiol, 2008 ; 46, 1178-1184.
8. Diego C, Ambrosioni JC, Abel G, Fernando B, Tomás O, Ricardo N and Jorge B. Disseminated Nocardiosis Caused by Nocardia abscessus in an HIV-Infected Patient: First Reported Case. AIDS, 2005 ; 19, 1330-1331.
9. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, et al. Re-Evaluating Prokaryotic Species. Nat Rev Microbiol, 2005 ; 3, 733-739.
10. Glupczynski Y, Berhin C, Janssens M and Wauters G. Determination of Antimicrobial Susceptibility Patterns of Nocardia spp. from Clinical Specimens by Etest. Clin Microbiol Infect, 2006; 12, 905-912.
11. Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE and Pang CHN. Nocardia coeliaca, Nocardia autotrophica, and the Nocardin Strain. Int J Syst Evol Microbiol, 1974 ; 24, 54-63.
12. Gürtler V, Smith R, Mayall BC, Pötter-Reinemann G, Stackebrandt E and Kroppenstedt RM. Nocardia veterana sp. nov., Isolated from Human Bronchial Lavage. Int J Syst Evol Microbiol, 2001 ;51, 933-936.
13. Hansen G, Swanzy S, Gupta R, Cookson B and Limaye AP. In Vitro Activity of Fluoroquinolones against Clinical Isolates of Nocardia Identified by Partial 16S rRNA Sequencing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008 ; 27, 115-120.
14. Horré R, Schumacher G, Marklein G, Stratmann H, Wardelmann E, Gilges S, De Hoog GS and Schaal KP. Mycetoma Due to Pseudallescheria boydii and Co-Isolation of Nocardia abscessus in a Patient Injured in Road Accident. Med Mycol, 2002 ; 40, 525-527.
15. Jeon YS, Chung H, Park S, Hur I, Lee JH and Chun J. jPHYDIT: A JAVA-Based Integrated Environment for Molecular Phylogeny of Ribosomal RNA Sequences. Bioinformatics, 2005 ; 21, 3171-3173.
16. Jones N, Khoosal M, Louw M and Karstaedt A. Nocardial Infection as a Complication of HIV in South Africa. J Infect, 2000 ; 41, 232-239.

17. Kageyama A, Yazawa K, Ishikawa J, Hotta K, Nishimura K and Mikami Y. Nocardial Infections in Japan from 1992 to 2001, Including the First Report of Infection by *Nocardia transvalensis*. *Eur J Epidemiol*, 2004 ; 19, 383-389.
18. Kageyama A, Torikoe K, Iwamoto M, Masuyama J, Shibuya Y, Okazaki H, Yazawa K, Minota S, Krop A, penstedt RM and Mikami Y. *Nocardia arthritidis* sp. nov., a New Pathogen Isolated from a Patient with Rheumatoid Arthritis in Japan. *J Mycol Med*, 2004 ; 42, 2366-2371.
19. Kageyama A, Hoshino Y, Yazawa K, Poonwan N, Takeshita N, Maki S and Mikami Y. *Nocardia cyriacigeorgica* Is a Significant Pathogen Responsible for Nocardiosis in Japan and Thailand. *Mycopathologia*, 2005 ;160,15-19.
20. Liu WL, Lai CC, Ko WC, Chen YH, Tang HJ, Huang YL, Huang YT and Hsueh PR. Clinical and Microbiological Characteristics of Infections Caused by Various *Nocardia* Species in Taiwan: A Multi-center Study from 1998 to 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011 ; 30, 1341-1347.
21. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M and Zhang SX. Phylogeny and Identification of *Nocardia* Species on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *J Clin Microbiol*, 2010 ; 48, 4525-4533.
22. Minero MV, Marín M, Cercenado E, Rabadán PM, Bouza E and Muñoz P. Nocardiosis at the Turn of the Century. *J Clin Microbiol*, 2009 ; 88, 250-261.
23. Muñoz J, Mirelis B, Aragón LM, Gutiérrez N, Sánchez F, Español M, Esparcia O, Gurguí M, Domingo P and Coll P. Clinical and Microbiological Features of Nocardiosis 1997-2003. *J Mycol Med*, 2007 ; 56, 545-550.
24. Poonwan N, Mekha N, Yazawa K, Thunyaharn S, Yamanaka A and Mikami Y. Characterization of Clinical Isolates of Pathogenic *Nocardia* Strains and Related Actinomycetes in Thailand from 1996 to 2003. *Mycopathologia*, 2005 ; 159, 361-368.
25. Rogall T, Flohr T and Böttger EC. Differentiation of *Mycobacterium* Species by 16S rRNA Sequencing of Amplified DNA. *J Gen Microbiol*, 1990 ; 136, 1915-1920.
26. Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D and Mauch H. Phylogeny of the Genus *Nocardia* Based on Reassessed 16S rRNA Gene Sequences Reveals under Speciation and Division of Strains Classified as *Nocardia asteroides* into Three Established Species and Two Unnamed Taxons. *J Clin Microbiol*, 2003 ;41,851-856.
27. Saubolle MA and Sussland D. Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *J Clin Microbiol*, 2003 ; 41, 4497-4501.
28. Schaal KP and Lee HJ. Actinomycete Infections in Humans—A Review. *Gene*, 1992; 15, 201-211.
29. Shojaei H, Hashemi A, Heidarieh P, Eshraghi S, Khosravi AR and Daei-Naser A. Clinical Isolation of *Nocardia cyriacigeorgica* from Patients with Various Clinical Manifestations, the First Report from Iran. *J Mycol Med*, 2011 ; 52, 39-43.
30. Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007 ; 24, 1596-1599.
31. Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M and Delmée M. Distribution of *Nocardia* Species in Clinical Samples and Their Routine Rapid Identification in the Laboratory. *J Clin Microbiol*, 2005 ; 43, 2624-2628.
32. Yassin AF, Rainey FA and Steiner U. *Nocardia cyriacigeorgica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001 ; 51, 1419-1423.