



Scan online to view this article

Isolation and identification of *Nocardia* species from bronchial lavage and sputum specimens of patients suspected of Nocardiosis using molecular method based on PCR sequence in Khuzestan province

Mohammad Hashemzadeh^{1,2}, Aram asareh zadegan dezfuli^{*1}, Sara Afzal zadeh³

1- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2- Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

3- Department of Infectious Diseases, Razi Teaching Hospital, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences Ahvaz, Iran.

Abstract

Aim and Background: *Nocardia* is a member of the Nocardiaceae family. Due to the fact that few studies have been conducted on the prevalence of nocardiosis in Khuzestan province, the aim of this study was to isolate and identify nocardia species from bronchial lavage and sputum specimens of patients suspected of nocardiosis using molecular PCR in Khuzestan province.

Materials and Methods: In this study, 178 bronchial lavage samples and 100 sputum samples were collected from patients suspected of nocardiosis during 1 year and sent to Ahvaz Microbiology Laboratory for more accurate identification, then identified by PCR for gene tracking. 16 S rRNA, NG and Bet were performed and PCR products were sequenced.

Results: In this study, 278 samples including 178 samples of bronchial lavage and 100 samples of sputum taken from patients suspected of nocardiosis were examined. Sequencing results showed that 27 of the samples were positive for *Nocardia* species. Out of 7 bronchial lavage samples, 6 belonged to N type. Nova and 1 case belong to *N. farcinica*. 20 samples belonged to sputum and 8 belonged to *N. cyriacigeorgica*, 4 samples belonged *N. farcinica* 3 samples belonged to *N. asteroides* and 5 samples belonged to *N. nova*.

Conclusion: The present study shows the high ability of molecular methods in accurate diagnosis of species and species of *Nocardia* and the need for further study of this disease in future studies is felt more than ever.

Key word: *Nocardia*, sequencing, Nocardiosis, bronchitis, sputum, IAU science

Corresponding author:

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Email: aramasareh836@yahoo.com

نوکارديا عضوی از خانواده نوکاردياسه و از دسته اکتینومايست‌های هوازی هستند که گرم مثبت، هوازی اجباری، کاتالاز مثبت، غیرمتحرک، نیمه اسیدفست و کند رشد بوده و در محیط‌های کشت و بافت‌ها اغلب تشکیل فیلامنت‌هایی را تشکیل می‌دهند که به عناصر کوکسی و به شکل باسیل تبدیل می‌شوند (۱). تاکنون بیش از ۱۰۹ گونه نوکارديا شناسایی شده است که ۵۴ گونه برای انسان بیماری‌زا هستند. از جمله مهم‌ترین گونه‌های بیماری‌زا برای انسان : *N. nova complex*, *N. abscessus complex*, *N. transvalensis complex*, *N. farcinica*, *N. asteroides type VI (N. cyriacigeorgica)*, *N. brevicatena/N. paucivorans complex* است (۲). این باکتری‌های فرصت‌طلب، در زیستگاه‌های طبیعی مانند خاک، هوا و آب حضور داشته و سبب ایجاد عفونت در قسمت‌های مختلف بدن و ایجاد اشکال بالینی هم‌چون عفونت‌های تنفسی، جلدی، زیرجلدی، جلدی- لنفاوی، مایستومایی، عصبی و چشمی می‌گردند که اگر به‌موقع تشخیص داده و درمان نشود، در بدن پخش می‌شوند و برای انسان کشنده خواهند بود (۳،۴). از آنجایی که بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، بدخیمی‌های هماتولوژیک، گیرندگان پیوند اعضا، ایدز، مصرف طولانی مدت کورتیکواستروئیدها، الکلیسم مزمن و دیابتی‌ها، دچار کمبود سلول T هستند، این بیماران مستعد ابتلا به نوکارديوزیس ریوی هستند (۵). نوکارديوزیس بیماری نگران‌کننده جهانی است که سالانه ۱۰۰۰-۵۰۰ مورد در ایالات متحده گزارش می‌شود و میزان بروز آن در ایران مشخص نبوده و اغلب به‌صورت موردی دیده می‌شود (۶). این بیماری می‌تواند ریه یا کل بدن (نوکارديوز سیستمیک) را مبتلا کند. شایع‌ترین عوامل آن نوکارديا آستروئیدس و نوکارديا برازیلینسیس است. در بیماران مبتلا به نوکارديوز مغزی، میزان مرگ و میر تا ۸۰٪ می‌رسد. در سایر اشکال بیماری، میزان مرگ و میر حتی در صورت درمان مناسب تا ۵۰٪ می‌رسد (۷،۸).

مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد ۱۷۸ نمونه شست‌وشوی برونش و ۱۰۰ نمونه خلط از بیماران مشکوک به نوکارديازیس در طی مدت از بهمن ۱۳۹۸ تا شهریور ۱۳۹۹ از شهرهای مختلف استان خوزستان شامل (اهواز، دزفول، مسجد سلیمان، لالی، امیدیه، آبادان) جمع-

نوکارديا عضوی از خانواده نوکاردياسه و از دسته اکتینومايست‌های هوازی هستند که گرم مثبت، هوازی اجباری، کاتالاز مثبت، غیرمتحرک، نیمه اسیدفست و کند رشد بوده و در محیط‌های کشت و بافت‌ها اغلب تشکیل فیلامنت‌هایی را تشکیل می‌دهند که به عناصر کوکسی و به شکل باسیل تبدیل می‌شوند (۱). تاکنون بیش از ۱۰۹ گونه نوکارديا شناسایی شده است که ۵۴ گونه برای انسان بیماری‌زا هستند. از جمله مهم‌ترین گونه‌های بیماری‌زا برای انسان : *N. nova complex*, *N. abscessus complex*, *N. transvalensis complex*, *N. farcinica*, *N. asteroides type VI (N. cyriacigeorgica)*, *N. brevicatena/N. paucivorans complex* است (۲). این باکتری‌های فرصت‌طلب، در زیستگاه‌های طبیعی مانند خاک، هوا و آب حضور داشته و سبب ایجاد عفونت در قسمت‌های مختلف بدن و ایجاد اشکال بالینی هم‌چون عفونت‌های تنفسی، جلدی، زیرجلدی، جلدی- لنفاوی، مایستومایی، عصبی و چشمی می‌گردند که اگر به‌موقع تشخیص داده و درمان نشود، در بدن پخش می‌شوند و برای انسان کشنده خواهند بود (۳،۴). از آنجایی که بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، بدخیمی‌های هماتولوژیک، گیرندگان پیوند اعضا، ایدز، مصرف طولانی مدت کورتیکواستروئیدها، الکلیسم مزمن و دیابتی‌ها، دچار کمبود سلول T هستند، این بیماران مستعد ابتلا به نوکارديوزیس ریوی هستند (۵). نوکارديوزیس بیماری نگران‌کننده جهانی است که سالانه ۱۰۰۰-۵۰۰ مورد در ایالات متحده گزارش می‌شود و میزان بروز آن در ایران مشخص نبوده و اغلب به‌صورت موردی دیده می‌شود (۶). این بیماری می‌تواند ریه یا کل بدن (نوکارديوز سیستمیک) را مبتلا کند. شایع‌ترین عوامل آن نوکارديا آستروئیدس و نوکارديا برازیلینسیس است. در بیماران مبتلا به نوکارديوز مغزی، میزان مرگ و میر تا ۸۰٪ می‌رسد. در سایر اشکال بیماری، میزان مرگ و میر حتی در صورت درمان مناسب تا ۵۰٪ می‌رسد (۷،۸).

آوری گردیده و به آزمایشگاه میکروبی شناسی شهر اهواز جهت تأیید و شناسایی دقیق فرستاده شدند.

روش استخراج DNA

برای استخراج DNA اسید نوکلئیک از کیت کیاژن (QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN) استفاده شد. از سویه استاندارد *N. brasiliensis* PTCC1422 تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. هم‌چنین غلظت DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Eppendorf, Germany) با طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

تکثیر DNA استخراج شده از طریق PCR برای ردیابی ژن های 16 S rRNA، NG و Bet

در این روش به منظور شناسایی عوامل نوکاردیوزیس همراه با هاوسکیپینگ ژن خانه دار در نمونه های برونش از PCR با پرایمرهای شناخته شده و اختصاصی جنس نوکاردیا شامل پرایمرهای NG1 و NG2 برای تکثیر قطعه ۵۹۸ جفت باز از ژن 16 S rRNA و پرایمرهای BetF و BetR برای تکثیر قطعه ۲۰۴ جفت بازی ژن بتا اکتین موجود در نمونه های بالینی استفاده شد (۱۱،۱۲)(جدول ۱)

جدول ۱- پرایمر های مورد استفاده در این مقاله

16 S rRNA	(5'- AGA GTC CAT CMT GGC TCA A-3') (5'-AAG GGG AGG TGW TCC ARC G-3')	۱۵۰۰ bp	۱۲ رفرنس
BetF BetR	5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3' 5'-CTGGGCATGGAGTCTGTGG-3'	۲۰۴ bp	۶ رفرنس
NG1 NG2	5'-ACCGACCACAAGGGGG-3' 5'-GGTTGTAAACCTCTTTCGA-3'	۵۹۸ bp	۶ رفرنس

تهیه Master Mix و انجام PCR

جهت انجام PCR، از مسترمیکس آماده جهت جلوگیری از ایجاد آلودگی و سرعت کار استفاده گردید. حجم کلی مسترمیکس در هر آزمایش با یک حجم اضافی محاسبه گردید. سپس به میکروتیوب‌های استریل که از قبل به تعداد نمونه‌ها و کنترل مثبت و منفی نام‌گذاری شده بود، ۲۰ میکرولیتر Master Mix و ۵ میکرولیتر DNA اضافه گردید. پس از اطمینان از بسته بودن درب میکروتیوب‌ها، در دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های موردنظر از DNA های استخراج شده براساس برنامه اجرایی، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne) با شرایط حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه (واسرشت ساز ابتدایی)، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه (واسرشت سازی)، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه (اتصال پرایمر) ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۹۰ ثانیه (گسترش پرایمر) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه گسترش نهایی انجام گردید. درنهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد Safe stain منتقل گردید و پس از الکتروفورز توسط دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. از DNA سویه *N. Brasiliensis* PTCC1422 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای ژن

Duplex PCR به روش BetFR و NG1,2

انجام PCR طبق مراحل ذکر شده انجام گرفت. پس از اطمینان از بسته بودن درب میکروتیوب‌ها، در دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های موردنظر از DNA های استخراج شده براساس برنامه اجرایی، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne) با شرایط حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه (واسرشت ساز ابتدایی)، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه (واسرشت سازی)، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه (اتصال پرایمر) ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۹۰ ثانیه (گسترش پرایمر) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه گسترش نهایی انجام گردید. درنهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد Safe stain منتقل گردید.

تعیین توالی

به‌منظور شناسایی گونه‌های نوکاردیا، محصولات PCR حاوی قطعه ژن به‌طول ۵۹۸ جفت بازی و ۱۵۰۰ بازی را پس از تخلیص از روی ژل، جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال نموده و نتایج تعیین توالی به‌وسیله نرم‌افزار Mega5 آنالیز گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه اپیدمیولوژیک توصیفی، ۲۷۸ نمونه شامل ۱۷۸ نمونه شست‌وشوی برونش و ۱۰۰ نمونه خلط اخذ شده از بیماران مشکوک به نوکاردیوزیس که به‌دستور پزشک متخصص براساس علائم بالینی مشخص شده بودند در بازه زمانی سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی بیمارانی که مشکوک به نوکاردیوزیس بودند از نظر متغیرهایی مانند سن، جنس، ملیت و بیماری زمینه‌ای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در مجموع ۲۷۸ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تعیین توالی حاصل از محصولات PCR با پرایمر اختصاصی جنس و گونه نوکاردیا و نشان داد که ۲۷ مورد از نمونه‌ها از نظر گونه‌های نوکاردیا مثبت بود ۲۶۱ مورد (۹۳٪) منفی

گزارش شدند. از ۷ نمونه شست‌وشوی برونش، ۶ مورد متعلق به گونه *N. Nova* و ۱ مورد متعلق به گونه *Nfarcinica* است. ۲۰ نمونه مربوط به خلط و ۸ مورد متعلق به *N. cyriacigeorgica*، ۴ نمونه مربوط به *Nfarcinica*، ۳ نمونه مربوط به *N. asteroides* و ۵ نمونه مربوط به *N. nova* بود. از ۲۷ مورد دارای نوکاردیوزیس، ۲۴ (۹۲٪) بیمار ملیت ایرانی و ۳ (۲/۸٪) بیمار ملیت عراقی داشتند. تمام ۱۷ مورد دارای سل خارج مثبت ساکن شهر بودند و بیمار ساکن روستا در مطالعه یافت نشد. آمارهای توصیفی سن در بیماران مبتلا به نوکاردیوزیس در جدول ۲ نشان داده شده است. از نظر محل سکونت، ۱۵ (۵۵٪) بیمار ساکن شهر اهواز و ۳ (۱۱٪) بیمار به ترتیب ساکن شهرهای دزفول و امیدیه، ۲ نفر ساکن لالی، ۲ نفر ساکن مسجدسلیمان و ۲ نفر ساکن آبادان بودند.

جدول ۲- توزیع فراوانی نوکاردیازیس برحسب گروه‌های سنی مختلف در بیماران مبتلا به نوکاردیازیس

نوکاردیازیس ریوی		گروه سنی
مثبت تعداد (/)	منفی تعداد (/)	
۰ (۰٪)	۴ (۱٪)	۱۱ سال <
۰ (۰٪)	۲ (۰٪)	۱۱-۲۰ سال
۱ (۱٪)	۲۷ (۱۰٪)	۲۱-۳۰ سال
۱۴ (۵۱٪)	۵۹ (۲۳٪)	۳۱-۴۰ سال
۱ (۱٪)	۸۱ (۳۲٪)	۴۱-۵۰ سال
۳ (۱٪)	۴۹ (۱۹٪)	۵۱-۶۰ سال
۵ (۱۸٪)	۱۷ (۶٪)	۶۱-۷۰ سال
۲ (۲٪)	۸ (۳٪)	۷۱-۸۰ سال
۱ (۱٪)	۴ (۱٪)	۸۰ سال >
۲۷ (۱٪)	۲۵۱ (۹۰٪)	جمع

جدول ۴ نوع نمونه براساس جنسیت را در ۲۷ بیمار نشان می‌دهد.

بحث

بررسی شیوع گونه‌های نوکاردیا در نمونه‌های بالینی، به دلیل شناسایی و درمان سخت این باکتری بسیار اهمیت دارد. در بسیاری از مطالعه‌های انجام گرفته در ایران شناسایی باکتری به درستی انجام نشده است و هنوز از این بیماری شیوع مناسب و دقیقی گزارش نشده است. در این مطالعه گونه *N. nova* (۱۱/۲۷) بیش‌تر از دیگر گونه‌های دیگر یافت شده و به دنبال آن

همان‌طور که مشاهده می‌شود بیش‌ترین گروه سنی متعلق به ۴۰-۳۱ سال بوده است. از نظر بیماری بیماری زمینه‌ای در این مطالعه ۸۹٪ از بیماران دارای بیماری زمینه‌ای بودند در واقع از مجموع ۲۷۸ بیمار مشکوک به نوکاردیوزیس، ۲۵۱ بیمار دارای بیماری زمینه‌ای هستند که آمار بسیار بالایی است. در مورد نوکاردیوزیس بیش‌ترین موارد بیماری زمینه‌ای مربوط به عفونت ریه و عود سل و عفونت فعال توبرکلوزیس بود. در این مطالعه ۴ نفر هم‌زمان به هر دو عفونت سل و نوکاردیازیس داشتند (جدول ۳). هم‌چنین در

جدول ۳- بیماری‌های زمینه‌ای، گونه نوکاریا و نوع نمونه در بیماران مبتلا به نوکاردیوزیس

بیماری زمینه‌ای	بیماری نوکاردیازیس منفی	بیماری نوکاردیازیس مثبت	گونه نوکاریا	نوع نمونه
عود سل ریوی	۱۳۵	۱	<i>N.farcinica</i>	برونش
سل ریوی	۵۵	۱۵	<i>N. Nova</i>	برونش
سل خارج ریوی	۲۰	۴	<i>N. Nova</i>	برونش
سرطان ریه	۲۰	۴	<i>N. Nova</i>	برونش
آسم و آلرژی	۴۶	۳	<i>N. cyriacigeorgica</i>	خلط
پنومونی یا ذات‌الریه	۱۹	-	<i>N.farcinica</i>	خلط
سیگاری	۵۶	-	<i>N. asteroides</i>	خلط
مجموع	۲۵۱	۲۷	<i>N. Nova</i>	خلط

جدول ۴- بررسی نوع نمونه براساس جنسیت در بیماران مبتلا به نوکاردیازیس

نوکاردیازیس	تعداد زن	تعداد مرد	جمع
برونش	۹	۷	۱۶
خلط	۶	۵	۱۱
جمع	۷	۱۱	۲۷

خوزستان، به بررسی نوکاردیازیس در افراد مشکوک به سل در شهر اهواز پرداختند که در این مطالعه از دو روش کشت و هم PCR به صورت هم‌زمان برای شناسایی نوکاردیا استفاده کردند. از ۱۵۷، نمونه‌های مثبت با رنگ‌آمیزی اسید فست، کشت و PCR برای ما به ترتیب برای ۶٪، ۱۰٪ و ۷٪ نمونه گزارش شد، در حالی که فقط دو نمونه برای گونه‌های نوکاردیا نتایج مثبت داشتند. یکی از تفاوت‌های مهم این مقاله عدم استفاده از تعیین توالی که دو ایزوله در حد شناسایی نوع باکتری باقی ماندند. هم‌چنین مطالعه دیگر نیز بر عفونت هم‌زمان سل با نوکاریا و در مواردی دیگر HIV با نوکاریا اشاره داشتند که در مطالعه ما HIV یافت نشد (۲۰،۲۱). در اواخر سال ۱۹۹۰ Wallace و همکاران، Steingrube و همکاران برای اولین بار استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی جنس و گونه نوکاردیا پیشنهاد دادند. آن‌ها ادعان داشتند روش‌های فنوتیپی همانند کشت به دلیل نیاز به انکوباسیون طولانی و کند رشد بودن باکتری، امکان آلودگی محیط کشت را با باکتری یا قارچ‌های ساپروفیت بسیار زیاد می‌کند (۲۲،۲۳). روش‌های مولکولی برای تشخیص سریع گونه‌های نوکاردیایی از نمونه بالینی کاربردی است. تشخیص باکتری نوکاردیا در سطح گونه به‌منظور مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین توزیع جغرافیایی این باکتری اهمیت داشته و کم بودن مطالعه‌ها در این زمینه بر لزوم تشخیص سریع نوکاردیایی جدا شده از نظر بالینی تأکید دارد. هم‌چنین روش‌های مولکولی PCR مبتنی تعیین

N. cyriacigeorgica (۶/۲۷) و *N. (۳/۲۷) N. asteroides* (۱/۲۷) به ترتیب فراوانی قرار گرفتند. Famili و همکاران در ایران نیز در مطالعه‌ای مشابه نشان دادند *N. cyriacigeorgica* بیش‌تر از بقیه ایزوله‌ها جدا شده بود (۶) در دیگر مطالعه‌های انجام گرفته در ایران نیز *N. cyriacigeorgica* و *N. asteroides* گزارش شده‌اند (۱۳،۱۴). برخلاف نتایج ما در مطالعه Wauters و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیش‌تر ایزوله‌های جدا شده از بیماران *N.farcinica* (۴۴٪) بود و *N. nova* در رده بعدی قرار داشت. یکی از دلایل این تفاوت در شیوع گزارش شده، تفاوت منطقه جغرافیایی و حجم نمونه می‌تواند باشد (۱۵). البته گونه‌های نوکاردیا گزارش شده در مطالعه ما جز گونه‌های شایع در دیگر مناطق جهان است (۱۸-۱۶). در مطالعه ما ۴ بیمار هم‌زمان به هر دو عفونت سل و نوکاردیازیس بستری بودند و این مسئله میزان مرگ و میر بیماران را افزایش می‌دهد و پاسخ بیمار را نسبت به داروهای درمانی کاهش می‌دهد. نوکاردیوزیس در کشورهای در حال توسعه مانند ایران که بیماری‌هایی مانند سل به صورت اندمیک بوده به دلیل شباهت بالینی یا تشخیص داده نمی‌شوند و یا از آن‌ها چشم‌پوشی می‌شود. ویژگی‌های رادیولوژیکی بین نوکاردیوز ریوی و سل ریوی از یک طرف و از طرف دیگر به دلیل توانایی‌های ضعیف تشخیصی این بیماری در ایران یک تهدید بزرگ برای بهداشت عمومی است (۱۹). در مطالعه Ekrami و همکاران در سال ۲۰۱۵ در ایران، استان

دارد. برای مطالعه بهتر ویژگی‌های بالینی، بیماری-زایی، تشخیص و روش‌های درمانی، مطالعه‌های آینده نگر بیش‌تری از ایران لازم است. در حالی که با تأکید بر تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر توالی بر تشخیص باکتری تا سطح جنس نسبت به شناسایی دقیق و تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز به‌خاطر ایجاد زمینه اجرای این تحقیق در آزمایشگاه آن مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

توالی با اختصاصیت و حساسیت هرچه بیش‌تر نسبت-به روش‌های کشت و میکروسکوپی امکان بررسی تمام گونه‌های شناخته شده نوکاردیا را فراهم می‌کند و قادرند جنس نوکاردیا را از جنس‌های مایکوباکتریوم، کورینه باکتریوم و رودوکوکوس افتراق دهند و باعث تشخیص سریع نوکاردیوزیس قبل از پیشرفت بیماری شوند و جلوی عوارض غیرقابل برگشت و در نهایت مرگ و میر را بگیرند. همگام با مطالعه ما Alfarsi و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از روش RealTime-PCR این روش را نیز برای شناسایی گونه‌های نوکاردیا مناسب دیدند و حساسیت و اختصاصیات این روش را به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۰٪ گزارش کردند (۲۴). Bafghi Fatahi و همکاران در سال ۲۰۱۶ در ایران، تهران در مطالعه‌ای به شناسایی گونه‌های نوکاردیا از نمونه‌های مختلف بالینی به روش‌های مختلف مولکولی پرداختند. برای شناسایی دقیق در سطح گونه از روش Restriction fragment length polymorphism (RFLP) با استفاده از ژن hsp65 و توالی کامل ژن 16S rRNA استفاده کردند. بیست و هفت ایزوله نوکاردیا در نتایج آزمون‌های فنوتیپی *N. asteroides complex*, *N. otitidiscaviarum*, *N. nova*, *Nocardia spp* را نشان می‌دادند. توالی ژن 16S rRNA نوکاردیا *N. cyriacigeorgica*, *N. otitidiscaviarum*, *N. N. cardiafarcinica* و *N. nova* و *transvalensis* آنها نشان دادند و هم-چنین آنها نشان دادند که در روش RFLP برخی از گونه‌ها ممکن است تشابه داشته باشند و تعیین توالی ژن کامل 16S rRNA برای تأیید لازم است (۲۵).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان از توانای بالای روش مولکولی در تشخیص دقیق جنس و گونه نوکاردیا دارد و لزوم مطالعه بیش‌تر این بیماری در مطالعه‌های آینده بیش از پیش احساس می‌شود. هم‌چنین بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز می‌تواند در اهداف ویژه سایر مطالعه-ها باشد. نوکاردیوزیس نباید به‌عنوان یک بیماری غیرمعمول تلقی شود و در مطالعه ما نشان داده شد که شاخص بالایی از نظر شیوع بالینی به‌خصوص در بیماران نقص ایمنی و بیماران ریوی و مبتلا به سل

- 1- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016;80(1):1-43.
- 2- Duggal SD, Chugh TD. Nocardiosis: a neglected disease. *Medical Principles and Practice*. 2020;29(6):514-23.
- 3- Kothavade RJ, Dhurat RS, Mishra SN, Kothavade UR. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2013;32(2):161-88.
- 4- Beaman BL, Beaman L. Nocardia species: host-parasite relationships. *Clinical microbiology reviews*. 1994;7(2):213-64.
- 5- Luo N, Tan S, Li X, Liu S, Singh S, Chen M, Yang W, He Y, Chen C, Liang M. Pulmonary nocardiosis in a patient with pemphigus foliaceus: case report and literature review. *BMC infectious diseases*. 2021;21(1):1-6.
- 6- Famili A, Kachuei R, Mirnejad R, Mozafari N, Mirhaj Mohammad Abadi H. The identification of Nocardiosis agents in BAL samples of Patients with suspected tuberculosis admitted to hospitals in Tehran by PCR method. *yafte*. 2015; 16 (4) :79-87.
- 7- Sethy H, Meher B, Pradhan S, Patro M. Pleuropulmonary Nocardiosis in an Immunocompetent Host. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*. 2016;2(4):79-83.
- 8- Lederman ER, Crum NF. A case series and focused review of nocardiosis: clinical and microbiologic aspects. *Medicine*. 2004;83(5):300-13.
- 9- da Silva AJ, Pieniasek NJ. Latest advances and trends in PCR-based diagnostic methods. In *Textbook-atlas of intestinal infections in AIDS 2003* (pp. 397-412). Springer, Milano.
- 10- Rao X, Lai D, Huang X. A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Journal of Computational Biology*. 2013;20(9):703-11.
- 11- Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant nocardia species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1999 1;37(1):99-102.
12. Amin M, Ardaneh M, Hashemzadeh M, Dezfuli AA, JafarZadeh E. In vitro antibacterial effect of deconex and sodium hypochlorite against bacterial taxa isolated from dental units. *Infection and drug resistance*. 2019; 12:805.
- 13- Bolourchi N, Ebrahimi E, Falah J, Javadi A, Eshraghi SS. Detection of Nocardia Asteroides Complex in Clinical Isolates by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*. 2019;17(3):257-68.
- 14- Hashemi-Shahraki A, Heidarieh P, Bostanabad SZ, Hashemzadeh M, Feizabadi MM, Schraufnagel D, Mirsaiedi M. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of Nocardia species among patients with nocardiosis. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-9.
- 15- Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vanechoutte M, Delmée M. Distribution of Nocardia species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(6):2624-8.

- 16- Muricy EC, Lemes RA, Bombarda S, Ferrazoli L, Chimara E. Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: Critical aspects for bacteriological diagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2014;56(5):397-401.
- 17- Schlager R, Huard RC, Della-Latta P. *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(1):265-73.
- 18- Elsayed S, Kealey A, Coffin CS, Read R, Megran D, Zhang K. *Nocardia cyriacigeorgica* septicemia. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(1):280-2.
- 19- Baio PV, Ramos JN, dos Santos LS, Soriano MF, Ladeira EM, Souza MC, Camello TC, Ribeiro MG, Junior RH, Vieira VV, Mattos-Guaraldi AL. Molecular identification of *Nocardia* isolates from clinical samples and an overview of human nocardiosis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Dec 5;7(12): e2573.
- 20- Ekrami A, Khosravi AD, Zadeh AR, Hashemzadeh M. *Nocardia* co-infection in patients with pulmonary tuberculosis. *Jundishapur journal of microbiology*. 2014;7(12):1-4.
- 21- Pintado V, Gómez-Mampaso E, Cobo J, Quereda C, Meseguer MA, Fortún J, Navas E, Moreno S. Nocardial infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clinical microbiology and infection*. 2003;9(7):716-20.
- 22- Wallace RJ Jr, Brown BA, Blacklock Z, Ulrich R, Jost K, Brown JM, McNeil MM, Onyi G, Steingrube VA, Gibson J J *Clin Microbiol*. 1995; 33(6):1528-33
- 23- Steingrube VA, Brown BA, Gibson JL, Wilson RW, Brown J, Blacklock Z, Jost K, Locke S, Ulrich RF, Wallace RJ. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(12):3096-101.
- 24- Alfaresi M, Elkosh A. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. *Journal of medical microbiology*. 2006;55(12):1711-5.
25. Fatahi Bafghi M, Heidarieh P, Rasouli-Nasab M, Habibnia S, Hashemi-Shahraki A, Eshraghi SS. Comparison of restriction enzyme pattern analysis and full gene sequencing of 16S rRNA gene for *Nocardia* species identification, the first report of *Nocardia transvalensis* isolated of sputum from Iran, and review of the literature. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016 ;109(10):1285-98.

