NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/42 , 2021

Scan online to view this article

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

Mohammad Hashemzadeh [1,2], Aram asareh zadegan dezfuli [*1] , Sara Afzal zadeh[3]

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 nocariasis 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 nocardiasis 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 nocardiasis 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 neocardiosis 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, Nocardiasis, bronchitis, sputum, IAU science

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

Corresponding author:
Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Email: aramasareh836@yahoo.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۲ - بهار ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

جداسازی و شناسایی گونه‌های *نوکاردیا* از نمونه‌های شست وشوی برونش و خلط بیماران مشکوک به نوکاردیازیس با استفاده از روش مولکولی مبتنی‌بر توالی PCR در استان خوزستان

محمد هاشم زاده[۱،۲]، آرام عصاره زادگان دزفولی[۱*]، سارا افضل زاده[۳]

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳- گروه بیماری‌های عفونی، بیمارستان آموزشی رازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز ، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: *نوکاردیا* عضوی از خانواده نوکاردیاسه است که۵۴ گونه برای انسان بیماری‌زا هستند. با توجه‌به اینکه مطالعه‌های کمی در خصوص شیوع نوکاریازیس در استان خوزستان انجام گرفته است هدف از انجام این مطالعه جداسازی و شناسایی گونه‌های *نوکاردیا* از نمونه‌های شست‌وشوی برونش و خلط بیماران مشکوک به نوکاردیازیس با استفاده از روش مولکولی PCR در استان خوزستان است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی تعداد ۱۷۸ نمونه شست‌وشوی برونش و ۱۰۰ نمونه خلط از بیماران مشکوک به نوکاردیازیس در طی مدت ۱سال جمع‌آوری گردیده و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی شهر اهواز جهت شناسایی دقیق فرستاده شدند سپس از شناسایی از طریق PCR ردیابی ژن‌های 16 S rRNA، NG وBet انجام گرفت و محصولات PCR تعیین توالی گردید .

یافته‌ها: در این مطالعه ۲۷۸ نمونه شامل ۱۷۸ نمونه شست‌وشوی برونش و ۱۰۰ نمونه خلط اخذ شده از بیماران مشکوک به نوکاردیوزیس مورد بررسی قرار گرفتند. .نتایج تعیین توالی نشان داد که ۲۷ مورد از نمونه‌ها از نظر گونه-های *نوکاردیا* مثبت بود. از ۷ نمونه شست‌و شوی برونش، ۶ مورد متعلق‌به گونه *N . Nova* و ۱ مورد متعلق‌به گونه *N.farcinica*. است. ۲۰ نمونه مربوط به خلط و۸ متعلق‌به *N. cyriacigeorgica* ۴نمونه مربوط به *N.farcinica*. ۳ نمونه مربوط‌به *N. asteroides* و۵ نمونه مربوط‌به *N. nova* بود.

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. نوکاردیوزیس نباید به‌عنوان یک بیماری غیرمعمول تلقی شود هم‌چنین در مطالعه ما نشان داده شد که شاخص بالایی از از نظر شیوع بالینی به‌خصوص در بیماران نقص ایمنی و بیماران ریوی و مبتلا به سل دارد.

واژه‌های کلیدی: *نوکاردیا*، تعیین توالی،نوکاردیازیس، برونش، خلط، IAU science

مقدمه

نویسنده مسئول:
دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
پست الکترونیکی: aramasareh836@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۰۳

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

نوکاردیا عضوی از خانواده نوکاردیاسه و از دسته اکتینومایست‌های هوازی هستند که گرم مثبت، هوازی اجباری، کاتالازمثبت، غیرمتحرک، نیمه اسیدفست و کند رشد بوده و در محیط‌های کشت و بافت‌ها اغلب تشکیل فیلامنت‌هایی را تشکیل می‌دهند که به عناصرکوکسی و به شکل باسیل تبدیل می‌شوند (۱) .تاکنون بیش از ۱۰۹ گونه *نوکاردیا* 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 حضورداشته 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 آنجایی‌که بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، بدخیمی‌های هماتولوژیک، گیرندگان پیوند اعضاء، ایدز، مصرف طولانی مدت کورتیکواستروئیدها، الکلیسم مزمن و دیابتی‌ها، دچار کمبود سلول T هستند، این بیماران مستعد ابتلا به نوکاردیوزیس ریوی هستند (۵). نوکاردیوزیس 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 (نوکاردیوز سیستمیک) را مبتلا کند. شایع‌ترین عوامل آن *نوکاردیا آستروئیدس* و *نوکاردیا برازیلینسیس* است. در بیماران مبتلا به نوکاردیوز مغزی، میزان مرگ و میر تا ۸۰٪ می‌رسد. در سایر اشکال بیماری، میزان مرگ و میر حتی درصورت درمان مناسب تا ۵۰٪ می‌رسد (۷،۸). علائم بالینی و ویژگی‌های رادیولوژیک نوکاردیوزیس ریوی شبیه بیماری سل ریوی است، اما پیشرفت آن نسبت‌به بیماری سل سریع‌تر بوده و دوره بیماری چند ماه است. ضایعه ریوی ناشی از نوکاردیوزیس ریوی موضعی و بدون علائم بالینی همراه با آبسه و گاهی به‌صورت پنومونی دیده می‌شود. دراغلب موارد، عفونت‌های نوکاردیوزیس به‌علت فقدان علائم کلینیکی ویژه به‌صورت صحیح و سریع تشخیص داده نمی‌شود (۹). روش‌های تشخیصی مولکولی به‌علت دارا بودن سرعت بالا جایگاه مهمی در تکنیک‌های تشخیصی نوین دارند. کاربرد این تکنیک‌ها در بیماری‌هایی مانند نوکاریازیس از اهمیت خاصی برخوردار است. PCR مبتنی‌بر توالی یکی از مؤثرترین روش‌ها برای شناسایی عفونت‌های *نوکاردیا* است. این روش شامل تقویت DNA با پرایمرهای اختصاصی جنس است. در این روش، توالی نوکلئوتیدی ارگانیسم با توالی‌های مرجع مقایسه و شناسایی می‌شود (۱۰). *نوکاردیا* باکتری کند رشد بوده و برای شخیص سریع و دقیق آن و هم‌چنین برای درمان، از روش‌های مولکولی که در مقایسه با کشت از سرعت، دقت، حساسیت و اختصاصیت بالاتری در شناسایی گونه‌های *نوکاردیا* برخوردار هستند استفاده می‌شود. با توجه‌به این‌که سل در ایران اندمیک است و تحت کنترل است اما به‌خاطر همسایگی ایران با کشورهای همسایه در چند سال اخیر جنگ را تجربه کرده‌اند باز هم احتمال ورود آن از مرزها وجود دارد و با توجه‌به این‌که سل از راه تنفس سرایت می‌کند کسانی که واکسن آن را دریافت کرده‌اند نیز بین ۳ تا ۸۰ درصد در معرض ابتلا به آن قرار دارد. با توجه‌به این‌که مطالعه‌های کمی در خصوص شیوع نوکاریازیس در استان خوزستان انجام گرفته است هدف از انجام این مطالعه جداسازی و شناسایی گونه‌های *نوکاردیا* از نمونه‌های شست وشوی برونش و خلط بیماران مشکوک به نوکاردیازیس با استفاده از روش مولکولی PCR در استان خوزستان است.

مواد و روش‌ها

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

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

روش اســـتخراج DNA

برای استخراج DNA اسید نوکلوئیک از کیت کیاژن (QlAamp DNA Mini Kit-QIAGEN) استفاده شد.از سویه استاندارد N. brasiliensis PTCC1422 تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران به‌عنوان 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 PCRبرای ردیابی ژن های 16 S rRNA، NG وBet

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 rRNAو پرایمرهای BetFو 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′)	۱۵۰۰bp	رفرنس ۱۲
BetF BetR	5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3' 5' -CTGGGCATGGAGTCCTGTGG-3'	۲۰۴ bp	رفرنس ۶
NG1 NG2	5'-ACCGACCACAAGGGGG-3' 5'-GGTTGTAAACCTCTTTCGA-3'	۵۹۸ bp	رفرنس ۶

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 میکروتیوپ‌ها، 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 برروی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد Safe stain منتقل گردید و پس از الکتروفورزتوسط دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. از DNA سویه N. Brasiliensis PTCC1422 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر برای ژن NG1,2 و BetFR به‌روشDuplex PCR

انجام PCR طبق مراحل ذکر شده انجام گرفت. پس از اطمینان از بسته بودن درب میکروتیوپ‌ها، 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 برروی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد Safe stain منتقل گردید. پس از تخلیص از روی ژل، جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال نموده و نتایج تعیین توالی به‌وسیله نرم‌افزار Mega5 آنالیز 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 .

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

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 ۱۳۹۹-۱۳۹۸مورد 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 بـا پرایمر اختصاصی جنس و گونه *نوکاردیا* و نـشان داد که ۲۷ مورد از نمونه‌ها از نظر گونه‌های نوکاردیا مثبت بود ۲۶۱ مورد (۹۳٪) منفی گزارش شدند. از ۷ نمونه شست‌و شوی برونش ، ۶ مورد متعلـق‌بـه گونـه *N . Nova* و ۱ مورد متعلق‌به گونه .*N.farcinica* است. ۲۰ نمونه مربوطبه خلط و ۸ مورد متعلق‌به *N. cyriacigeorgica*، ۴ نمونه مربوطبه .*N.farcinica*، ۳ نمونه مربوطبه *N. asteroides* و۵ نمونه مربوطبه *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 به‌ترتیب ساکن شهرهای دزفول و امیدیه،۲ نفر ساکن لالی، ۲ نفر ساکن مسجدسلیمان و۲ نفر ساکن آبادان بودند.

جدول۲- توزیع فراوانی نوکاردیازیس برحسب گروه‌های سنی مختلف در بیماران مبتلا به نوکاردیازیس

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

همان‌طور که مشاهده می‌شود بیش‌ترین گروه سنی متعلق‌به 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 نوکاردیوزس، ۲۵۱ بیمار دارای بیماری زمینه‌ای هستندکه آمار بسیار بالایی است. در مورد نوکاردیوزس 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 (جدول۳). هم‌چنین در جدول ۴ نوع نمونه براساس جنسیت را در ۲۷ بیمار نشان می‌دهد.

بحث

بررسی شیوع گونه‌های *نوکاردیا* در نمونه‌های بالینی، به‌دلیل شناسایی و درمان سخت این باکتری بسیار اهمیت دارد. در بسیاری از مطالعه‌های انجام گرفته در ایران شناسایی باکتری به‌درستی 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 به‌دنبال آن

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

جدول۳- بیماری‌های زمینه‌ای، گونه *نوکاریا* و نوع نمونه در بیماران مبتلا به نوکاردیوزیس

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

(۶/۲۷) *N. cyriacigeorgica* و (۳/۲۷) *N. asteroides* و (۱/۲۷) *N.farcinica* به‌ترتیب 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. asteroides* و *N. cyriacigeorgica* بیش‌تر گزارش شده‌اند (۱۳،۱۴). برخلاف نتایج ما در مطالعه Wauters و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیش‌تر ایزوله-های جداشده از بیماران *N.farcinica* (۴۴٪) و 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 نسبت‌به دارو های درمانی کاهش می‌دهد. نوکاردیوزیس در کشورهای در حال توسعه مانند ایران که بیماری‌هایی مانند سل به-صورت اندمیک بوده به‌دلیل 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 به‌دلیل 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 خوزستان، به بررسی نوکاردیازیس در افراد مشکوک به سل در شهر اهواز پرداختند که در این مطالعه از دو روش کشت و هم PCR به‌صورت هم‌زمان برای شناسایی *نوکاردیا* استفاده کردند. از ۱۵۷، نمونه‌های مثبت با رنگ‌آمیزی اسید فست، کشت و PCR برای ما به‌ترتیب برای ۶٪ ، ۱۰٪ و ۷٪ نمونه گزارش شد، در حالی‌که 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 اذعان داشتند روش‌های فنوتیپی همانند کشت به‌دلیل 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 *نوکاردیای* جدا شده از نظر بالینی تأکید دارد. هم‌چنین روش‌های مولکولی PCR مبنتی تعیین

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

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 Alfaresi 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 به‌ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۰٪ گزارش کردند (۲۴). Bafghi Fatahi و همکاران در سال ۲۰۱۶ در ایران، تهران در مطالعه‌ای به شناسایی گونه‌ای *نوکاردیا* از نمونه‌های مختلف بالینی به‌روش‌های مختلف مولکولی پرداختند. برای شناسایی دقیق در سطح گونه از روش (RFLP)Restriction fragment length polymorphism با استفاده ازژن hsp65 و توالی کامل ژن 16S rRNAاستفاده کردند. بیست و هفت ایزوله *نوکاردیا* در نتایج آزمون‌های فنوتیپی *N.asteroides complex* , *N. otitidiscaviarum* *N. nova,* و *Nocardia spp* را نشان می‌دادند. توالی ژن 16S rRNA *نوکاردیا* *N.cyriacigeorgica*، *N. otitidiscaviarum*، *N. cardiafarcinica*، *N. transvalensis*و *N. nova* 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 دارد. برای مطالعه بهتر ویژگی‌های بالینی، بیماری-زایی، تشخیص و روش‌های درمانی، مطالعه‌های آینده نگر بیش‌تری از ایران لازم است. در حالی‌که با تأکید بر تکنیک‌های مولکولی مبتنی‌بر توالی بر تشخیص باکتری تا سطح جنس نسبت‌به شناسایی دقیق و تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی به‌کار 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

منابع

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. Pleuroplumonary 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, Pieniazek NJ. Latest advances and trends in PCR-based diagnostic methods. InTextbook-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 relevantnocardia 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, Mirsaeidi 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, Vaneechoutte 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

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- Schlaberg 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.42.3.3]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-01]