مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم ، شماره بیست و یکم - زمستان ۱۳۹۴

Research Article
مقاله تحقیقی

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 فارماسیتیوکال 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 16S rRNA ، *gyrB* و *secA1* 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 برونکوآلوئولار (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. arthritidis* (۱ ایزوله) ، *N. kruczakiae* (۱ ایزوله) ، *N.nova* (۱ایزوله) و *N. veteran* (۱ایزوله).

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

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 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 آبسه مغز، و باکتریمی 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).

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

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 ۱۶S rRNA (۲۵)، زیرواحد A از pre- translocase protein (*secA*۱) 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. درهمان زمان ۱۴ایزوله 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 ایزونیازید 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 ماکروسکوپی و میکروسکوپی، رشد در درجه حرارت های مختلف و تست هایی مانند رشد در لیزوزیم، رشد در $45^{\circ}C$، 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 rRNA ، *gyrB* و *secA*۱

DNA ژنومی از کشت های میکروبی با استفاده از کیت استخراج DNA (کیت Qiagen، CA، USA) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج شد و در $20^{\circ}C$- تا زمان استفاده ذخیره گردید.

ژن ۱۶S rRNA از ایزوله ها با استفاده از پرایمر pA (۳-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-۵) و pI (۳-TGCACACAGGCCACAAGGGA-۵) برای هر ایزوله تکثیر شد(۲۵)وسپس قطعات تکثیر شده تعیین توالی شد.تکثیر و تعیین توالی دو ژن gyrB و secA۱ برای هر سویه توسط روش مک - تاگارت و همکاران انجام شد(۲۰۱۰). پرایمرهای Noc-gyrB-F (۳-CTTCGCCAACACCATCAACAC-۵) و Noc-gyrB-R (۳-TGATGATCGACTGGACCTCG-۵) برای تکثیر ۴۸۰ جفت باز از ژن gyrB و پرایمر های secA۱-F۴۷ (۳-GCGACGCCGAGTGGATGG-۵) و secA۱-ConR۲ (۳-TTGGCCTTGATGGCGTTGTTC-۵) برای تکثیر و تعیین توالی ۴۴۰ جفت باز از ژن secA۱ 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 بازیابی 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 ۱۶S rRNA 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 ۱۶S rRNA، *gyrB* و ژن *secA*۱ 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 بتا (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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

داده شده است. ۲۵ نفر از بیماران (۵۴/۳٪) زن بودند/ محدوده سنی بیماران ۸۸-۱۸ 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) در۴ بیمار (۸/۷٪) مشاهد 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 استرپتومایسس 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 asteroids 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*۱ 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-۰۰۰۱۱، APN-۰۰۰۲۸،APN-۰۰۰۳۱،APN-۰۰۰SM۲۵، APN-۰۰۰۲۶،APN-۰۰۰SM۳۰،APN-۰۰۰۱۲، APN-۰۰۰۴۷، APN-۰۰۰۴۸،APN-۰۰۰۴۹ و APN-۰۰۰۷۱ با اطمینان بالا به وسیله تجزیه و تحلیل توالی ای از ژن ۱۶S rRNA، *N. asteroids* (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).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

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	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. otitidiscaviarum*
9	BAL	(F (64	Kidney transplant recipient	Fever, cough	Irregular nodular lesions	Tb	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. farcinica*
10	BAL	(M (59	COPD	Fever, cough	Cavitation	Tb	*Nocardia sp*	*N. asteroids*	*N. asteroides*
11	Wound infection	(F (62	HIV	Fever, weight loss	NA	Mycetoma	*Streptomyces sp*	*N. asteroids*	*N. asteroides*
12	BAL	(M (34	Chronic lymphocytic leukemia	Dyspnea, cough	Pleural effusion	Tb	*Nocardia sp*	*N. asteroids*	*N. asteroides*
13	Biopsy	(M (19	Soft tissue abscess	Subcutaneous nodules	ND	Mycetoma	*Nocardia sp*	*N. asteroids*	*N. cyriacigeorgica*
14	Blood	(M (44	BMT	Fever, weight loss	ND	ND	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. otitidiscaviarum*
15	BAL	(F (71	Chronic bronchitis	Dyspnea, cough	Bilateral involvement	Tb	Fungi	*N. asteroids*	*N. cyriacigeorgica*
16	Blood	(F (47	BMT	Fever, weight loss	ND	Fungal infection	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. otitidiscaviarum*
18	Sputum ((3	(F (66	COPD	Dyspnea	Consolidative with pleural	Tb	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. farcinica*
22	BAL	(F (71	HIV	Fever, cough	Pleural effusions	Tb	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. farcinica*
23	Soft tissue biopsy	(M (45	Healthy	-	-	ND	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. nova*
24	Oral ulcers	(M (32	Pamphlgus	Oral ulcers	-	ND	*Streptomyces sp*	*N. blacklockiae*	*N. wallacei*
25	Blood	(F (47	HIV	Fever	ND	ND	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. farcinica*
28	BAL	(F (72	Recurrent CMV, HIV	Fever, cough	Cavitation	Tb	*Nocardia sp*	*N. asteroids*	*N. asteroides*
29	BAL	(F (71	Healthy	Fever, cough	Infiltrates	Tb	*Nocardia sp*	*Nocardia sp*	*N. farcinica*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

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

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.

ایزوله ها شامل APN-۰۰۰۳۲، APN-۰۰۰۱۵، APN-۰۰۰۱۳، APN-۰۰۰۶۶، APN-۰۰۰۵۵، APN-۰۰۰۳۹، APN-۰۰۰SM۶۲، APN-۰۰۰۷۷ و APN-۰۰۰۶۹ 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-۰۰۰۹، APN-۰۰۰۱۳۹۰ و APN-۰۰۰۱۸ به عنوان N. farcinica ایزوله) سومین گونه تکرار شده از نوکاردیا در مطالعه حاضر مشخص شدند. طیف تنوع نوکلئوتیدی در میان گونه های N. farcinica محدود بود (فقط ۱ یا ۲ جفت باز). دیگر ایزوله ها با استفاده از ژن ۱۶S rRNA به عنوان N. wallacei (ایزوله)، ۳) N. otitidiscaviarum ایزوله)، ۳) N. carnea ایزوله)، ۲) N. nova ایزوله)، ۱) N. abscessus ایزوله)، ۱) N. arthritidis ایزوله)، ۱) N. kruczakiae ایزوله) و ۱) N. veteran ایزوله) شناسایی شدند.

تجزیه و تحلیل gyrB و secA۱

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 secA۱ 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 secA۱ مشاهده شد. شناسایی ایزوله های بالینی N. asteroids ،N.

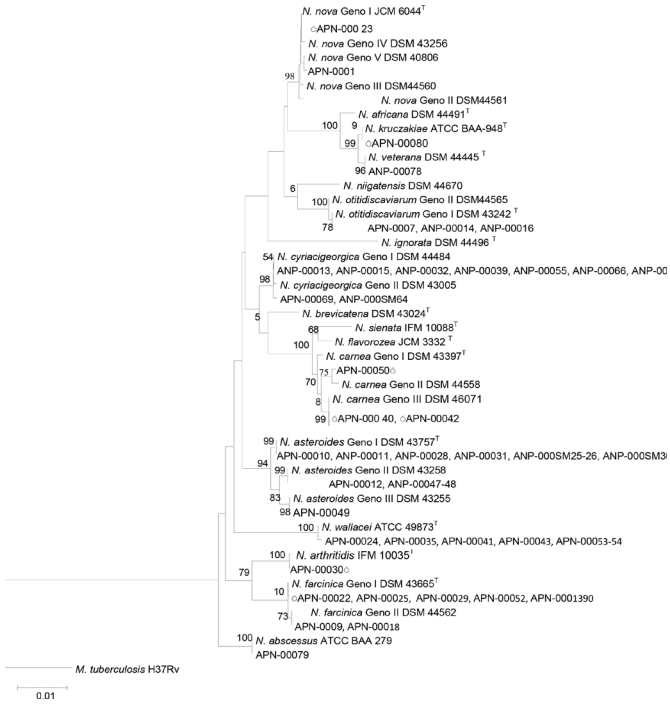
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

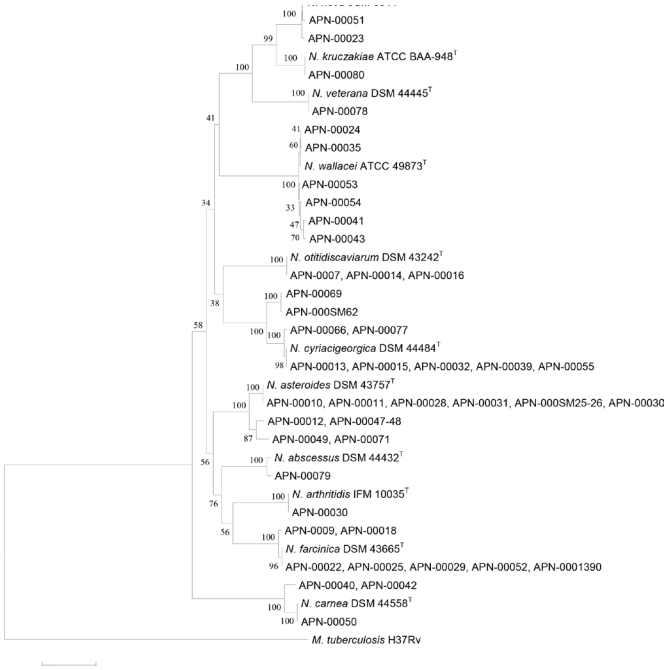
N. farcinica ، N. carnea ، cyriacigeorgica و N. nova مطابق با یافته ای شناسایی با ژن ۱۶S rRNA بود. در شرایطی که ایزوله های متعلق به N. wallacei، تفاوت قابل ملاحظه ای بین ژنوتیپ ژن ۱۶S rRNA و gyrB و secA۱ نشان دادند (جدول ۱).

شناسایی بر اساس MLSA

در میان تمام ۴۶ گونه، تنوع بین ۰-۲۴۶ در بین محدوده توالی ژن ۱۶ S rRNA-gyrB-secA۱ 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 اطمینان۹۹٪ - ۱۰۰٪ را میسر ساخت (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: درخت تکاملی و رابطه فیلوژنتیکی ایزوله های مورد بررسی در این مطالعه بر اساس توالی ژن ۱۶S rRNA



تصویر شماره ۲: درخت تکاملی و رابطه فیلوژنتیکی ایزوله های مورد بررسی در این مطالعه بر اساس MLSA توالی ژن های secA۱ ، gyrB ،۱۶S rRNA

بحث

به دلیل گزارش های مکرر و اهمیت عفونت های نوکاردیا، نیاز افزاینده 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 طاقت فرسا هستند و قطعی نمی باشند (۵، ۲۶). اگر چه تعیین توالی ژن ۱۶ S rRNA، 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 (۱۶ S rRNA ، gyrB ، secA۱ ، hsp۶۵ و rpoB) MLSA یک روش قابل اعتماد برای شناسایی است. با این حال استفاده از سه ژن (۱۶ S rRNA- gyrB-secA۱) در غالب MLSA به عنوان روشی قابل اعتماد مورد تاکید است(۲۲). در مطالعه حاضر، ۴۶ سویه های بالینی نوکاردیا با استفاده از سه ژن (۱۶ S rRNA- gyrB-secA۱) در غالب MLSA مورد شناسایی قرار گرفتند. ژنوتیپ های مختلف از N. asteroids ، N. farcinica، N. carnea ، N. cyriacigeorgica

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

otitidiscaviarum و N. nova بر اساس ژن ۱۶ S rRNA گزارش شده گردید. ناهمگنی درون گونه ای هم چنین بر اساس تجزیه و تحلیل SNP ژن gyrB و secA۱ تشخیص داده شد، که نسبتا بیش تر از توالی ژن ۱۶S rRNA (جدول ۲) بود. با این حال، اهمیت تنوع درون گونه ای میان ایزوله ها و علایم بالینی در هاله ای از ابهام باقی مانده است . ارتباط بین نوکاردیوز و بیماری های زمینه ای به خوبی مشخص شده است (۲۷ ، ۴ ، ۲۲). در مطالعه ما، دربسیاری از موارد بیماری های زمینه ای و درمان با داروهای کورتونی با بیماری نوکاردیوز مرتبط بود. مطالعه جاری مانند گزارش های دیگر نشان داد که بیماری نوکاردیوز ریوی و منتشره به طور عمده در بیماران دچار نقص ایمنی مشاهده می شود (۲۲ ، ۲۰). در سال های اخیر، نوکاردیوز به طور فزاینده در ایران گزارش شده است (۳ ، ۲۹)، با این حال در بسیاری از آن ها شناسایی ایزوله های 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 های بالینی ما N. cyriacigeorgica (۹ایزوله ، ۱۹,۵٪) بود. عفونت ناشی از این گونه ها از ایران بر اساس روش فنوتیپی و روش توالی یابی ۱۶S rRNA قبلا گزارش شده است (۲۹). گزارشات متعددی از این گونه در ژاپن و تایلند (۳۲ ، ۱۸) و ایالات متحده آمریکا (۱۳) و اسپانیا (۲۲ ، ۲۳) منتشر شده است. در مطالعه حاضر، هفت ایزوله N. farcinica برای اولین بار از ایران گزارش می گردد. گزارش های 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 و ٪۲۱/۶ ایزوله های نوکاردیا در فرانسه (۴)، ژاپن (۱۷)، تایلند (۲۴)، بلژیک (۱۰ ، ۳۱)، آلمان (۲۸) واسپانیا (۲۲) را شامل شده است. شش ایزوله ازایزوله های بالینی N. wallacae تشخیص داده شدند که اولین گزارش این گونه از نمونه های بالینی ایران 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 های بالینی N. wallacae است. داده های ما شواهدی را ارائه میدهد که N. wallacae قادر به ایجاد عفونت در انسان های دارای نقص سیستم ایمنی است. در این مطالعه یک ایزوله از بیوپسی مغز استخوان از یک بیمار مبتلا به سندرم هموفیلی به عنوان N. abscessus شناخته شد. عفونت هایی توسط N. abscessus از مناطق مختلف از قبیل ژاپن (۱۹)، آلمان (۱۴)، آرژانتین (۸) و اسپانیا (۲۲ ، ۲۳) گزارش شده است. در این مطالعه سه ایزوله به عنوان N. otitidiscaviarum شناسایی شدند. دو ایزوله از نمونه های خون دو دریافت کننده مغز استخوان و یکی از آبسه زیر جلدی از بیمار بهبود یافته به دست آمد. بر اساس یافته های این مطالعه N. otitidiscaviarum قادر به ایجاد عفونت هم در اشخاص دارای نقص سیستم ایمنی و سالم از نظر سیستم ایمنی می باشد. در این مطالعه برای اولین بار N. arthritidis ، N. carnea، N. kruczakiae،N.nova و N. veterana از نمونه های بالینی در ایران جدا شد. داده های این مطالعه شواهد بیش تری برای بیماری زایی N. kruczakiae ، N. arthritidis و N. veteran به عنوان عوامل بیماری زای نادر همانند سایر مطالعات فراهم آورد (۱۸ ، ۷ ، ۱۲).

نتیجه گیری

بر اساس این مطالعه، N. asteroids شایع ترین پاتوژن مسبب نوکاردیوز و پس ازآن N. farcinica ، N. cyriacigeorgica و N. wallacei در ایران بودند. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که گونه هایی مانند N. abscessus ، N. arthritidis، N. carnea ،N.kruczakiae ،N.nova ،N.otitidiscaviarum و N. veteran نیز می توانند باعث ایجاد بیماری شوند. این مطالعه نشان داد که نوکاردیوز می تواند به وسیله گونه های مختلف نوکاردیا ایجاد شود و الگوریتم آزمایشگاهی بر اساس شناسایی فنوتیپی گونه های 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 های مبتنی بر تعیین توالی و ترجیحا MLSA بر اساس ژنهای gyrB ، ۱۶S rRNA و secA۱ می باشد.

سپاسگزاری

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

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, Stackebrankt 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]

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 Multicenter 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 rRAN 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 cyriacigeorgici sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2001 ; 51, 1419-1423.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.6.21.11.0]