جداسازی و شناسایی گونه‌های نوکاردیا از نمونه لاواژ بیماران برونکوسکوپی شده به‌روش کلاسیک و مولکولی

سیامک حیدرزاده[۱]، محمدرضا پورمند[۱]
امیر قاسمی[۱]، حسین زرین فر[۲]
ساسان صابر[۳]، طاهره سوری[۴]
سیدحسین میرهندی[۲]
مصطفی حسینی[۵]، محمدخلیفه‌قلی[۱]
نادیا مردانی[۱]، سید سعید اشراقی[۱*]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت
۲- گروه قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت
۳- گروه آموزشی داخلی ریه، بیمارستان شریعتی
۴- گروه بیماری‌های پوست، بیمارستان رازی
۵- گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان قدس، خیابان پورسینا، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن: ۸۸۹۹۴۸۲۳-۰۲۱
E-mail: eshraghs@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۶/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: نوکاردیوز ریوی یک عفونت نادر و بالقوه تهدیدکننده حیات است که به‌وسیله گونه‌های بیماری‌زای نوکاردیا ایجاد می‌شود. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و تشخیص نوکاردیا با استفاده از روش‌های متداول و به‌دنبال آن ارزیابی روش‌ها و توسعه و بهینه‌سازی یک روش سریع و جدید به‌منظور شناسایی گونه‌های بالینی نوکاردیا بود. ***روش بررسی:*** در این مطالعه، ۱۸۰ نمونه لاواژ از بیماران بستری در بیمارستان دکتر شریعتی تهران طی ۱۲ ماه (خرداد ۱۳۸۹ تا خرداد ۱۳۹۰) جمع‌آوری گردید. از این تعداد، ۱۰۳ بیمار (۵۷/۲۲٪) مرد و ۷۷ بیمار (۴۲/۷۸٪) زن بودند. نمونه‌ها در آزمایشگاه کشت و کلنی‌های رشدیافته خالص‌سازی و تعیین گونه شدند. هم‌چنین پرایمرهای NG1 و NG2 برای تکثیر قطعه ۵۹۸ جفت باز 16S rRNA اختصاصی جنس نوکاردیا استفاده شد. ***یافته‌ها:*** پس از کشت نمونه‌ها و خالص‌سازی آن‌ها پنج سوش خالص به‌دست آمد (۲/۷۸٪). بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی و اختصاصی، هر پنج نمونه متعلق به *نوکاردیا آستروئیدس* کمپلکس بود. هم‌چنین پس از استخراج DNA و انجام آزمایش PCR بر روی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده، ۱۹ نمونه (۱۰/۵۶٪) توسط این آزمایش مثبت تشخیص داده شد. ***نتیجه‌گیری:*** تشخیص سریع و دقیق گونه‌های نوکاردیا برای درمان عفونت‌های شدید و نیز پیش‌گیری از ایجاد آبسه مغزی، ضروری است. این مطالعه نشان داد که روش PCR در مقایسه با کشت و تست‌های بیوشیمیایی حساسیت و دقت بالاتری در شناسایی نوکاردیا دارا می‌باشد. با توجه به سرعت، دقت، حساسیت و اختصاصی بودن بالای روش‌های مولکولی، بهتر است در آینده از این تکنیک به‌همراه سایر متدهای فنوتیپیک در تشخیص نوکاردیا در آزمایشگاه‌ها، مراکز درمانی و تحقیقاتی استفاده نماییم.

کلمات کلیدی: نوکاردیا، تشخیص، جداسازی، نمونه مایع شستشوی ریوی، روش کشت و مولکولی.

مقدمه

نوکاردیاها (Nocardiae) گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، غیر متحرک، نیمه اسیددوست و کاملاً هوازی می‌باشند. این باکتری‌ها در اکوسیستم محیط زیست شامل هوا، خاک، آب و غیره حضور دارند و قادرند از طریق دستگاه تنفسی و زخم‌های پوستی به بدن انسان وارد شده و باعث بروز نوکاردیوز ریوی، جلدی مخاطی و سیستمیک گردند. نوکاردیاها از خاک سراسر دنیا قابل جداسازی بوده و باعث عفونت‌های جدی در انسان به‌ویـژه در افراد دچار نقص سیستم ایمنی می‌شوند. شایع‌ترین اشکال بالینی عفونت‌های نوکاردیایی شامل عفونت‌های تنفسی، عصبی، جلدی، زیرجلدی، جلدی- لنفاوی و مایستومایی می‌باشد.[۱-۳] بیش‌ترین علت ابتلای به نوکاردیوز ریوی اختلال در عملکرد سیستم ایمنی است که این نقص به‌علت‌های متعدد نظیر بیماری‌های مزمن، عفونت‌های سیستمیک، پیوند اعضا، ایدز، سیروز کبدی، بدخیمی‌های خونی، دیابت، اعتیاد به الکل و یا استفاده از کورتیکواستروییید رخ می‌دهد.[۴-۶] تشخیص قطعی نوکاردیوز به‌دلیل فقدان علایم بالینی مشخص و بر پایه مشاهدات مستقیم و کشت میکروبی بسیار مشکل و اغلب طولانی و زمان‌بر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-03]

است و تشخیص قطعی را اغلب با تأخیر روبرو می‌نماید. بنابراین روش‌های تشخیصی جدید بر پایه متدهای نوین مولکولی که بسیار سریع و دقیق می‌باشد، دشواری‌ها و اشتباهات احتمالی تشخیص نوکاردیا را کاهش می‌دهد.[۷و۸] از طرفی، به‌دلیل افزایش مقاومت گونه‌های نوکاردیا به آنتی‌بیوتیک‌ها و مشکلات روش‌های کشت آزمایشگاهی مانند بطئی‌الرشد بودن نوکاردیا، آلودگی‌های احتمالی محیط کشت باکتری توسط سایر میکروارگانیسم‌ها و یا عدم رشد برخی از گونه‌ها، ضرورت روی‌آوری به روش‌های آزمایشگاهی سریع، حساس و دقیق برای شناسایی نوکاردیاها را دو چندان می‌کند.[۹و۱۰] روش‌های مولکولی از دهه ۱۹۹۰ توسعه یافتند که بر این اساس دگرگونی‌های زیادی در تشخیص باکتری حاصل شد به‌طوری که دشواری‌های موجود در روش‌های زمان‌بر فنوتیپیک و کموتاکسونومیک برای تشخیص نوکاردیا از سایر باکتری‌ها به‌ویژه اکتینومایست‌های هوازی مانند رودوکوکوس، گوردونه و تسوکامورلا و نیز مایکوباکتریوم را به‌شدت کاهش داد.[۱۱] هدف از انجام این مطالعه، جداسازی و تشخیص نوکاردیا در بیماران بستری در بیمارستان دکتر شریعتی تهران با استفاده از روش مولکولی (PCR) و روش‌های سنتی (مشاهده لام مستقیم، کشت و روش‌های بیوشیمیایی) و نیز مقایسه این دو روش با همدیگر بود. هم‌چنین ارزیابی روش‌های متداول و توسعه و بهینه‌سازی آن‌ها جهت تشخیص سریع و دقیق نوکاردیا بود.

روش بررسی

مواد مصرفی: محیط‌های آزمایشگاهی، مواد شیمیایی، معرف‌ها، کیت استخراج DNA (MTB) و مواد مصرفی برای انجام PCR از نمایندگی‌های شرکت‌های Merck، Sigma، Difco، Fermentas و Roche در ایران تهیه گردید. در این مطالعه که یک بررسی مقطعی (Cross sectional) بود، طی ۱۲ ماه (خرداد ۱۳۸۹ تا خرداد ۱۳۹۰)، تعداد ۱۸۰ نمونه مایع شستشوی برونش که اصطلاحاً نمونه لاواژ یا بال Bronchoalveolar Lavage (BAL) گفته می‌شود از بیماران بستری در بیمارستان دکتر شریعتی تهران پس از تکمیل پرسش‌نامه جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها توسط پزشک متخصص ریه در پروسه تشخیص و در خلال انجام عمل برونکوسکوپی تهیه گردیده بود. در حدود پنج میلی‌لیتر از نمونه را در شرایط استریل داخل لوله‌های فالکون در پیچ‌دار ریخته و بلافاصله در کنار فلاسک حاوی یخ قرار داده و حداکثر ظرف دو ساعت پس از نمونه‌برداری به آزمایشگاه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال دادیم. نمونه‌ها در آزمایشگاه به دو قسمت تقسیم گردید. بخشی از آن جهت جداسازی نوکاردیا به‌روش فنوتیپک آزمایشگاهی و بخش دیگر برای انجام آزمایشات مولکولی در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است برای انجام بررسی‌های مولکولی هزینه اضافی از بیماران دریافت نگردید.

الف: کشت: نمونه‌ها در داخل آزمایشگاه روی محیط ژلوز خون‌دار (Blood agar) و سابورودکستروزآگار (SDA) کشت داده شدند و سپس در دو دمای ۳۷ °C و ۴۵ °C گرم‌خانه‌گذاری (Incubation) گردیدند. این پلیت‌ها بعد از سه روز مورد بازدید قرار گرفته و با توجه به کند رشد بودن برخی از گونه‌های نوکاردیا، در صورت عدم مشاهده کلنی، گرم‌خانه‌گذاری به‌مدت ۱۴ روز ادامه پیدا می‌کرد. هم‌چنین کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت، بعد از بررسی‌های مورفولوژیک و رنگ‌آمیزی گرم، جهت بررسی‌های بیوشیمیایی و تعیین گونه توسط آزمون‌های کاتالاز، اوره‌آز، هیدرولیز اسیدهای آمینه و کازیین مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور، کلنی‌های رشد یافته در محیط‌های ژلوز خون‌دار و سابورودکستروزآگار، مجدداً در محیط‌های اوره‌آز، تیروزین، هیپوگزانتین، گزانتین و کازیین کشت داده شدند تا از لحاظ هیدرولیز ساپلیمنت‌ها و نیز تولید اوره‌آز مورد ارزیابی قرار گیرند. در مورد تیروزین، هیپوگزانتین، گزانتین و کازیین وجود هاله در اطراف کلنی، نشان‌دهنده هیدرولیز آن‌ها و مثبت بودن آزمایش؛ و عدم وجود هاله در اطراف کلنی نشان‌گر عدم هیدرولیز و منفی بودن آزمایش بود. هم‌چنین تغییر رنگ محیط اوره، از رنگ قرمز به زرد بیان‌گر مثبت بودن تست (تولید اوره‌آز) و در صورت عدم تغییر رنگ محیط، نشان‌گر منفی بودن تست می‌باشد.

ب: بررسی مولکولی: استخراج DNA: روش استخراج DNA با توجه به ویژگی‌های ترکیب دیواره سلولی نوکاردیا، انتخاب شد. برای استخراج DNA نوکاردیا از نمونه‌های بالینی، از کیت آماده‌سازی نمونه تنفسی MTB ساخت کارخانه (Roche) استفاده شد. قبل از استخراج DNA باکتری، در ابتدا نمونه‌ها را پیش تیمار نمودیم، برای این منظور نمونه‌های ریوی را با دور ۸۰۰۰rpm به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-03]

کرده و سپس مایع رویی را بیرون ریخته، سپس به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سدیمان (رسوب حاصل از سانتریفیوژ) را با ۲۵۰ میکرولیتر سالین بافر فسفاته (PBS) مخلوط کردیم. با افزودن ۴۰ میکرولیتر پروتیناز K، این مخلوط را به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۵ °C گرم‌خانه‌گذاری نمودیم. سپس، به‌منظور غیرفعال‌سازی پروتیناز K، این سوسپانسیون را در دمای ۹۵ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری کردیم. نمونه‌ها را مجدداً با دور ۸۰۰۰rpm به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ نموده و با تخلیه مایع رویی، DNA باکتری را توسط کیت MTB، (MTB respiratory specimen preparation; Roche, Germany) استخراج نمودیم. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که این پروتکل در آزادسازی DNA نوکاردیا و نیز جلوگیری از مهارکننده‌های واکنش PCR موثر است.

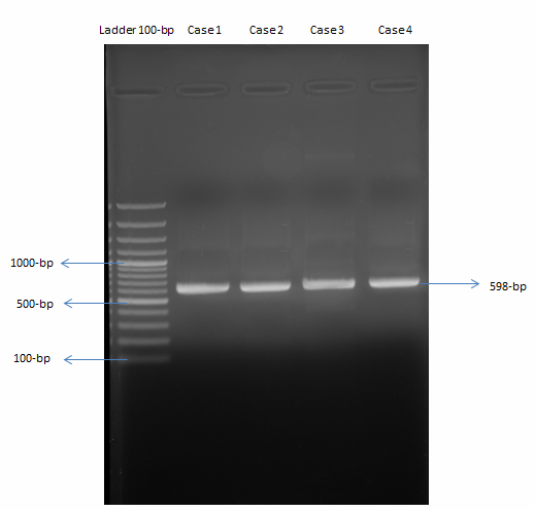
انجام PCR: مواد مصرفی برای انجام PCR شامل آب مقطر (۱۷/۵µl)، بافر PCR 10x (۲/۵µl)، MgCl2 (۱µl)، dNTP (۱µl)، پرایمر فوروارد (۱µl)، پرایمر ریورس (۱µl)، آنزیم Taq پلیمراز (۰/۵ میکرولیتر) و DNA نمونه استخراج‌شده (پنج میکرولیتر) بود. با استفاده از پرایمرهای NG1 (5-ACCGACCACAAGGGGG-3) و NG2 (5-GGTTGTAAACCTCTTTCGA-3)، قطعه ۵۹۸–bp از ژن 16S rRNA اختصاصی جنس نوکاردیا تکثیر یافت. تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت که موفق به تکثیر قطعه مورد نظر شدیم؛ مراحل دمایی آن، به‌شرح زیر می‌باشد:

مراحل	تکثیر اولیه	تعداد سیکل
دناتوره شدن اولیه	پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه	یک سیکل
دناتوره شدن	۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه	
اتصال	۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه	۳۰ سیکل
تکثیر	دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه	
تکثیر نهایی	۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه	یک سیکل

الکتروفورز: محصول PCR (PCR Product) با استفاده از ژل آگارز ۱٪ (wt/vol) الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۷µg/ml)، در زیر اشعه UV مشاهده گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۸۰ نمونه از بیماران بستری در بیمارستان دکتر شریعتی تهران در طی ۱۲ ماه جمع‌آوری گردید. از این تعداد، ۱۰۳ بیمار (۵۷/۲۲٪) مرد و ۷۷ بیمار (۴۲/۷۸٪) زن بودند. محدوده سنی بیماران بین ۱۶تا ۸۶ سال بود که از این تعداد ۹۴ نفر (۵۳/۸۸٪) سن بالای ۵۰ سال داشتند. اکثر بیماران به‌علت تنگی‌نفس بستری شده بودند. در بررسی ۱۸۰ نمونه در روش کشت پنج مورد مثبت و همین نمونه‌ها با روش مولکولی ۱۹ مورد مثبت تشخیص داده شد. در جدول ۱ مشخصات بالینی بیماران مبتلا به نوکاردیوز به تفکیک آورده شده است. پس از کشت هر یک از نمونه‌ها در دو محیط ژلوز خون‌دار و سابورودکستروزآگار، پنج نمونه (۲/۷۸٪) در هر دو محیط رشد کردند. بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی، هر پنج نمونه متعلق به نوکاردیا آسترووییدس کمپلکس بودند. هم‌چنین پس از استخراج DNA و انجام آزمایش PCR بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۱۹ نمونه (۱۰/۵۶٪) توسط روش مولکولی (PCR) مثبت تشخیص داده شد. در شکل ۱، وجود باند ۵۹۸–bp نشان‌دهنده مثبت بودن نتیجه PCR برای تشخیص نوکاردیا است.



شکل-۱: تکثیر قطعه ۵۹۸ جفت باز 16S rRNA اختصاصی جنس نوکاردیا با پرایمرهای NG2 و NG1 در ژل آگارز ۱٪ پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید

بحث

با توجه به زمان‌بر بودن آزمایشات فنوتیپی (آزمایش میکروسکوپی، کشت و تست‌های بیوشیمیایی) برخی اوقات نوکاردیوز، بعد از انتشار

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-03]

جدول-۱: مشخصات بالینی بیماران مبتلا به نوکاردیوز

ردیف	علت بستری شدن	علایم بالینی	سن	جنس	کشت	PCR
۱	تنگی‌تنفس	از کار افتادگی ریه، جراحی قلب	۴۵	مرد	منفی	مثبت
۲	تنگی‌تنفس	سرفه	۶۴	زن	منفی	مثبت
۳	تنگی‌تنفس	التهاب ریوی، درد قفسه صدری، کاردیومیوپاتی دیابتی، تحت همودیالیز	۶۸	مرد	منفی	مثبت
۴	تنگی‌تنفس	تب، سرفه، هموپتزی، آنتی‌بیوتیک درمانی، رژیم دیابتی	۵۸	زن	منفی	مثبت
۵	تنگی‌تنفس	سرفه، درد قفسه صدری	۷۶	مرد	مثبت	مثبت
۶	تنگی‌تنفس	آسم	۳۳	مرد	منفی	مثبت
۷	تنگی‌تنفس	آسم، سرفه، دارای پولیپ بینی، التهاب ریوی	۵۰	مرد	مثبت	مثبت
۸	تنگی‌تنفس	سرفه، هموپتیزی، مصرف کورتون، مبتلا به دیابت و پمفیگوس ولگاریس	۳۴	مرد	منفی	مثبت
۹	تنگی‌تنفس	اختلال مزمن کلیوی، CRF	۶۷	مرد	منفی	مثبت
۱۰	تنگی‌تنفس	سرفه خشک، نکروز، آنتراکوز، آنتی‌بیوتیک درمانی	۸۲	زن	منفی	مثبت
۱۱	تنگی‌تنفس	سرفه، تب و لرز، خلط خونی، کاهش وزن	۵۹	مرد	منفی	مثبت
۱۲	تنگی‌تنفس	آسم، تنگی شدید برونش، گرفتگی صدا	۵۲	زن	مثبت	مثبت
۱۳	تنگی‌تنفس	آسم، التهاب ریوی	۳۳	زن	منفی	مثبت
۱۴	تنگی‌تنفس	سرفه و تعریق زیاد، مصرف کورتون	۴۶	زن	منفی	مثبت
۱۵	تنگی‌تنفس	برونشیت مزمن، سرفه خلط‌دار، هموپتیزی	۵۴	مرد	مثبت	مثبت
۱۶	تنگی‌تنفس	سرفه، تب، سینوزیت، خلط، آرتریت، ضایعات پوستی، مصرف کورتون	۴۱	مرد	منفی	مثبت
۱۷	تنگی‌تنفس	سرفه، تب و لرز، آمبولی ریوی، برونشیت مزمن، آنتراکوز، آنتی‌بیوتیک درمانی	۷۰	مرد	مثبت	مثبت
۱۸	تنگی‌تنفس	سرفه، تعریق شبانه، کاهش اشتها	۱۶	زن	منفی	مثبت
۱۹	تنگی‌تنفس	سرفه، آنتی‌بیوتیک درمانی	۵۶	مرد	منفی	مثبت

سویه‌های باکتری به سایر ارگان‌ها و یا بعد از فوت بیمار تشخیص داده می‌شود.[۱۲-۱۴] بنابراین برای درمانگاه‌ها و کلینیک‌ها اتخاذ یک درمان مناسب و سریع در مراحل اولیه بیماری سخت و دشوار است. با این حال، شروع زودهنگام و مناسب درمان ضد میکروبی باعث کاهش میزان مرگ‌و میر زیادی از بیماران مبتلا به نوکاردیوزیس می‌شود، که این امر وابسته به‌تشخیص سریع عفونت نوکاردیایی است.[۱۵و۱۶] تا به‌حال، تأیید تشخیص نوکاردیا نیازمند جداسازی ارگانیسم از نمونه‌های بالینی بود. اما اعتقاد بر این است که این روش استاندارد طلایی، فاقد حساسیت است.[۱۷] در حالی‌که گونه‌های نوکاردیا می‌توانند در انواع مختلفی از محیط‌های کشت رشد یابند، اما جداسازی آن‌ها از نمونه‌های بالینی مشکل می‌باشد، زیرا که نمونه‌های بالینی (به‌خصوص نمونه‌های ریوی) معمولاً دارای کمپلکس پیچیده‌ای از فلور نرمال هستند، هم‌چنین گونه‌های نوکاردیا نسبت به سایر باکتری‌ها و قارچ‌های آلاینده محیط کشت، رشد آهسته‌تری دارند. این باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌توانند از رشد گونه‌های نوکاردیا جلوگیری کنند و یا این‌که در صورت رشد باکتری نوکاردیا در محیط کشت ممکن است به‌علت وجود کلنی‌های سایر میکروارگانیسم‌های آلاینده، از نظر دور بمانند. روش‌های مولکولی با تکثیر اختصاصی DNA باکتری نوکاردیا، حتی اگر چندین نوع از باکتری‌های آلاینده و کلونیزه‌کننده در نمونه‌های انسانی حضور داشته باشند، از این مشکلات جلوگیری می‌کند.[۷و۱۸] هم‌چنین درمان ضد میکروبی تجربی قبل از نمونه‌گیری (به‌خصوص در موارد آبسه مغزی یا پوستی) نیز می‌تواند از رشد نوکاردیا پیش‌گیری کند و یا رشد این باکتری را به تأخیر بیندازد. روش‌های مولکولی تحت تأثیر زنده بودن یا نبودن باکتری قرار نمی‌گیرند و می‌توان با انجام این آزمایشات، حتی پس از شروع شیمی‌درمانی با آنتی‌بیوتیک‌های فعال، باکتری‌ها را تشخیص دهیم.[۷] بر طبق چندین کار تحقیقاتی، گونه‌هایی از نوکاردیا که فاقد دیواره سلولی هستند با بیماری‌زایی، عفونت نهفته و عود بیماری بعد

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-03]

از درمان آنتی‌بیوتیکی در ارتباط بوده‌اند.[۱۹-۲۵] داده‌های اخیر نشان می‌دهد که چنین اشکالی از جنس نوکاردیا می‌توانند در ایجاد علایمی شبیه بیماری پارکینسون نقش داشته باشند.[۲۶-۲۸] بنابراین به‌منظور کشف، درک و نظارت دقیق اثرات گونه‌های نوکاردیا بر روی محیط زیست و در بیماران لازم است که روش‌هایی توسعه یابند که قادر به تشخیص گونه‌های نوکاردیا باشند. تکنیک‌های مولکولی مانند PCR، یکی از روش‌های اختصاصی هستند که ممکن است به‌چنین مطالعاتی کمک نمایند.[۲۹-۳۱] تکثیر اسید نوکلییک با استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص نوکاردیا بسیار مفید می‌باشند زیرا این روش‌ها، محدودیت‌های کشت را ندارند و موجب تشخیص سریع و مطمئن بیماری نوکاردیوز می‌شوند. توانایی نوکاردیا در ایجاد عفونت‌هایی شبیه عفونت‌های سایر باکتری‌ها (از جمله سل) موجب تأخیر تشخیص سریع این باکتری می‌شود و این امر می‌تواند منجر به افزایش مرگ‌و میر در بسیاری از موارد شود،[۳۲] و از آنجایی‌که بعضی از گونه‌های نوکاردیا، غیرقابل کشت هستند و برخی گونه‌ها به‌آهستگی رشد می‌کنند؛ بنابراین، تشخیص عفونت‌های نوکاردیایی به‌وسیله کشت و سایر روش‌های فنوتیپیک می‌تواند تا دو هفته به‌طول انجامد، و هم‌چنین ممکن است محیط کشت در اثر رشد بیش از حد یک ارگانیسم آلوده‌کننده (قبل از رشد نوکاردیا) آلوده شود،[۹] در نتیجه نوکاردیوز می‌تواند یکی از علل غیرشایع ولی مهم عوارض و مرگ و میر در بیماران مبتلا به نقص ایمنی باشد. با توجه به‌سرعت، دقت، حساسیت و اختصاصیت بالای روش‌های مولکولی، بهتر است در آینده از این تکنیک به‌همراه سایر متدهای فنوتیپیک در تشخیص نوکاردیا در آزمایشگاه‌ها، مراکز درمانی و تحقیقاتی استفاده نماییم.

References

1. Beaman BL, Saubolle MA, Wallace RJ. Nocardia, Rhodococcus, Streplomyces, Oerskovia and other aerobic actinomycetes of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ. Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press; 1995. p. 379-99.
2. Boiron P, Provost F, Chevrier G, Dupont B. Review of nocardial infections in France 1987 to 1990. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11(8):709-14.
3. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saúl A, Macotela Ruíz E. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac Med Mex* 1992;128(4):477-81.
4. Eshraghi SS TM, Namaki S, Mirshafiey A. Nocardia. *J Chinese Clin Med (JCCM)* 2009;4:48-66.
5. Eshraghi S. Nocardiosis. *J Tashkhis Azmayeshgahi (J Lab Diag)* 1999;3:34-6. [Persian]
6. Baldi BG, Santana AN, Takagaki TY. Pulmonary and cutaneous nocardiosis in a patient treated with corticosteroids. *J Bras Pneumol* 2006;32(6):592-5.
7. Couble A, Rodríguez-Nava V, de Montclos MP, Boiron P, Laurent F. Direct detection of Nocardia spp. in clinical samples by a rapid molecular method. *J Clin Microbiol* 2005;43(4):1921-4.
8. Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant Nocardia species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J Clin Microbiol 1999;37(1):99-102.
9. Tatti KM, Shieh WJ, Phillips S, Augenbraun M, Rao C, Zaki SR. Molecular diagnosis of Nocardia farcinica from a cerebral abscess. Hum Pathol 2006;37(8):1117-21.
10. Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC Jr, Blacklock Z, Gibson JL, Wallace RJ Jr. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including Actinomadura, Gordona, Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, and Tsukamurella isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35(4):817-22.
11. Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant Nocardia species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37(1):99-102.
12. Koffi N, Aka-Danguy E, Ngom A, Kouassi B, Yaya BA, Dosso M. Prevalence of nocardiosis in an area of endemic tuberculosis. *Rev Mal Respir* 1998;15(5):643-7.
13. Lucas SB, Hounnou A, Peacock C, Beaumel A, Kadio A, De Cock KM. Nocardiosis in HIV-positive patients: an autopsy study in West Africa. *Tuber Lung Dis* 1994;75(4):301-7.
14. Reis MA, Costa RS, Ferraz AS. Causes of death in renal transplant recipients: a study of 102 autopsies from 1968 to 1991. *J R Soc Med* 1995;88(1):24-7.
15. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994;7(3):357-417.
16. McNeil MM, Ray S, Kozarsky PE, Brown JM. Nocardia farcinica pneumonia in a previously healthy woman: species characterization with use of a digoxigenin-labeled cDNA probe. *Clin Infect Dis* 1997;25(4):933-4.
17. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994;7(3):357-417.
18. Subhash HS, Christopher DJ, Roy A, Cherian AM. Pulmonary nocardiosis in human immunodeficiency virus infection: a tuberculosis mimic. *J Postgrad Med* 2001;47(1):30-2.
19. Kohbata S. Tinctorial properties of spherical bodies in broth cultures of Nocardia asteroides GUH-2. *Microbiol Immunol* 1998;42(3):151-7.
20. Beaman BL, Bourgeois AL, Moring SE. Cell wall modification resulting from in vitro induction of L-phase variants of Nocardia asteroides. *J Bacteriol* 1981:148(2):600-9.
21. Beaman BL, Burnside J, Edwards B, Causey W. Nocardial infections in the United States, 1972-1974. *J Infect Dis* 1976;134(3):286-9.
22. Kohbata S. Tinctorial properties of spherical bodies in broth cultures of Nocardia asteroides GUH-2. *Microbiol Immunol* 1998;42(3):151-7.
23. Beaman BL. The possible role of L-phase variants of Nocardia in chronic infections. *Zentbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Abt Suppl* 1981;11:221-7.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-03]

24. Beaman BL. Nocardiosis: Role of the cell wall deficient state of Nocardia. In: Dominique GJ, editor. Cell Wall Defective Bacteria: Basic Principles and Clinical Significance. Reading, PA: Addison-Wesley Inc; 1982. p. 231-55.
25. Beaman BL. The cell wall as a determinant of pathogenicity in Nocardia: The role of L-forms in pathogenesis. In: Ortiz-Ortiz L, Bojalil L, Yakoleff V, editors. Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Orlando, FL: Academic Press; 1984. p. 89-104.
26. Chapman G, Beaman BL, Loeffler DA, Camp DM, Domino EF, Dickson DW, et al. In situ hybridization for detection of nocardial 16S rRNA: reactivity within intracellular inclusions in experimentally infected cynomolgus monkeys and in Lewy body-containing human brain specimens. *Exp Neurol* 2003;184(2):715-25.
27. Díaz-Corrales FJ, Colasante C, Contreras Q, Puig M, Serrano JA, Hernández L, et al. Nocardia otitidiscaviarum (GAM-5) induces parkinsonian-like alterations in mouse. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(4):539-48.
28. Tam S, Barry DP, Beaman L, Beaman BL. Neuroinvasive Nocardia asteroides GUH-2 induces apoptosis in the substantia nigra in vivo and dopaminergic cells in vitro. *Exp Neurol* 2002;177(2):453-60.
29. Harper-Owen R, Dymock D, Booth V, Weightman AJ, Wade WG. Detection of unculturable bacteria in periodontal health and disease by PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1469-73.
30. Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(10):3513-5.
31. Wang H, Chen Z. Observations of properties of the L-form of M. tuberculosis induced by the antituberculosis drugs. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001;24(1):52-5.
32. Khan BA, Duncan M, Reynolds J, Wilkes DS. Nocardia infection in lung transplant recipients. *Clin Transplant* 2008;22(5):562-6.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-03]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 9, December 2011: 581-587

The identification of *Nocardia* in BAL specimens of bronchoscopic patients by using classical and molecular methods

Siamak Heidarzadeh M.Sc.[1]
Mohammad Reza Pourmand Ph.D.[1]
Amir Ghasemi Ph.D.[1]
Hossein Zarrinfar Ph.D.[2]
Sasan Saber M.D.[3]
Tahereh Soori M.D.[4]
Seyyed Hossein Mirhendi Ph.D.[2]
Mostafa Hosseini Ph.D.[5]
Mohammad Khalifehgholi Ph.D.[1]
Nadia Mardani B.Sc.[1]
Seyyed Saeed Eshraghi Ph.D.[1*]

1- Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Pulmonary Infection, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Infectious Diseases, Razi Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Qods St., Poursina St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88994823
E-mail: eshraghs@tums.ac.ir

Received: June 19, 2011 Accepted: September 14, 2011

Abstract

Background: Nocardiosis is a rare and potentially life-threatening infection caused by several species of the *Nocardia* genus. The objective of this study was to develop and evaluate a rapid and new method to clinically identify relevant *Nocardia* species. Rapid and accurate diagnosis of *Nocardia* species is essential for the treatment of severe infections and prevention of cerebral abscess.

Methods: One hundred and eighty patients, 103 (57.22%) male and 77 (42.78%) female, with severe symptomatic pulmonary infection were studied in the course of a 12-month period in Dr. Shariati Teaching Hospital affiliated to Tehran University of Medical Sciences in 2010. The specimens were cultured and identified using microbiological and biochemical tests. Polymerase chain reaction (PCR) was used to directly identify the organism in the broncoalveolar lavage samples collected from the patients. NG1 and NG2 primers were used to amplify a *Nocardia* genus-specific 598-bp fragment of 16S rRNA.

Results: Nineteen samples (10.56%) were positive with PCR and 5 samples (2.78%) with conventional methods. All samples with positive cultures were also positive by PCR.

Conclusion: The results of this study showed that PCR has a high sensitivity and accuracy for the detection of *Nocardia* compared with culture and biochemical tests. Considering the rapidity, precision, high sensitivity and specificity of molecular techniques, use of these techniques is suggested in conjunction with conventional methods for the detection of *Nocardia* phenotypes in clinical laboratories and research centers.

Keywords: Broncoalveolar lavage, identification, culture, molecular diagnosis, *Nocardia*.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-03]