مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی
پاییز ۱۳۹۸، دوره ۱۷، شماره سوم، صفحه ۲۶۸ -۲۵۷

مقاله پژوهشی

شناسایی نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس با استفاده از روش Real Time PCR در ایزوله های بالینی

نگین بلورچی: کارشناس ارشد،گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
الهام ابراهیمی: دکترای تخصصی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
جلیل فلاح: دانشجوی دوره دکتری، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
علی جوادی: دانشجوی دوره دکتری، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
سید سعید اشراقی: استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران- نویسنده رابط: eshraghs@tums.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۷ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۷**

چکیده

زمینه و هدف: طیف بیماری های عفونی ناشی از نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس بسیار گسترده است.افتراق بین گونه ای اعضای جنس نوکاردیا جهت تعیین پیش آگهی، درمان مناسب و بموقع و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک ضروری است. از آن جهت که هر یک از گونه‌های نوکاردیا الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی خاص خود را دارد، دقت روش تشخیصی در درجه اول اهمیت قرار دارد. نیاز به روش های مولکولی با توجه به مزیت های آشکاری که بر روش های فنوتیپی و بیوشیمیایی دارند برای تشخیص به موقع و دقیق گونه های این کمپلکس کاملا روشن است. در این مطالعه برای اولین بار از روش Real Time PCR برای افتراق بین گونه ای نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس استفاده شد.

روش کار: از مجموع ۲۵ ایزوله بالینی مشکوک به جنس نوکاردیا، ۱۰ تعداد ایزوله با استفاده از روش ها بیوشیمیای و فنوتیپی به عنوان نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس شناسایی شدند. سپس استخراج DNA از ۱۰ ایزوله مشکوک انجام گرفت. کنترل مثبت هر سه گونه با استفاده از سویه های استاندارد تهیه شد. Real Time PCR برای هر ۱۰ ایزوله انجام شد. در نهایت محصول تکثیر شده گونه‌هایی که با Real Time PCR به عنوان نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس شناسایی شد، جهت تایید هویت برای توالی یابی فرستاده شد.

نتایج: نتایج توالی یابی نشان داد که از بین ۱۰ ایزوله بالینی مشکوک به نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس ۳ ایزوله مربوط به نوکاردیا استروئیدس کمپلکس است. ۱ گونه نوکاردیا آستروئیدس، ۱ گونه نوکاردیا فارسینیکا و ۱ گونه نوکاردیانوا یافت شد.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که روش Real Time PCR نسبت به روش های فنوتیپی و بیوشیمیایی اختصاصیت و سرعت بیش تری داشته و جهت افتراق بین گونه ای روشی کارآمد محسوب می شود.

کلمات کلیدی: نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس، Real Time PCR، ایزوله های بالینی

مقدمه

طبق آخرین تغییرات کتاب برگی(Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology)، نوکاردیا آستروئیدس، نوکاردیا فارسینیکا و نوکاردیا نوا در مجموعه نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس قرار می گیرند.نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس شایع ترین عامل عفونت های انسانی بین سایر گونه های نوکاردیا تلقی می شود (۱-٤). این موضوع در

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

بررسی ها و مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. در سال ۱۹۹۰ در ژاپن ۲۶ ایزوله بالینی نوکاردیا بررسی و تیپ بندی شد. در این بررسی شیوع نوکاردیا آستروئیدس۴۲، نوکاردیا فارسینیکا۳۱ و نوکاردیا نوا ۲۷٪ گزارش شد (۳).

افتراق بین گونه ای اعضای جنس نوکاردیا جهت تعیین پیش آگهی، درمان مناسب و به موقع و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک ضروری است. از آن جهت که هر یک از گونه های نوکاردیا الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی خاص خود را دارد، دقت روش تشخیص در درجه اول اهمیت قرار دارد. علاوه بر این، مداوای موفق بیماران بخصوص افرادی که به هر شکلی نقص و ضعف ایمنی دارند باید در سریع ترین شکل ممکن صورت گیرد (٦، ٥). برای مثال نوکاردیا فارسینیکا مقاومت زیادی به عوامل آنتی بیوتیکی از خود نشان داده است و با توجه به ویرولانس بالایی که دارد باید به سرعت از بدن حذف شود (۷). همانطور که پیش تر اشاره شد، با تشخیص فنوتیپی و بیوشیمیایی تنها بطور تقریبی می‌توان تعیین گونه کرد. برای مثال آزمایش های هیدرولیز تیروزین، هایپوگزانتین، گزانتین، کازئین و ژلاتین در مورد اعضای نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس منفی می باشد. در نتیجه به تست های تکمیلی دیگری از جمله آریل سولفاتاز و تخمیر قند برای افتراق بین گونه ای نیاز است (۵). بنابراین جهت تشخیص بین گونه ای دقیق به بیش از ۳۰ آزمایش فنوتیپی نیاز است. تعدد آزمایش های فنوتیپی به شدت وقت‌گیر بوده بطوری که تشخیص گونه نوکاردیا ممکن است از ٦ روز تا ۸ هفته بطول انجامد و در مورد بیمارانی که به سرعت به درمان احتیاج دارند چنین زمانی وجود ندارد. علاوه بر این تفسیر نتایج حاصل از آزمایش های بیوشیمیایی متغیر و گیج کننده بوده و عملا غیرممکن می باشد. به همین علت نیاز به روش های مولکولی با توجه به مزیت های آشکاری که بر روش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی دارند برای تشخیص به موقع و دقیق اعضای این خانواده کاملا روشن است (۸).

روش کار

نمونه گیری: نمونه های مشکوک به عفونت نوکاردیایی که به بیمارستان شریعتی و یا به بخش میکروب شناسی دانشکده بهداشت ارجاع داده شد جمع آوری گردید. بررسی ماکروسکوپی از جهت وجود گرانول انجام شد و نمونه های ریوی آلودگی زدایی شدند. ایزوله های بالینی جمع آوری شده در بانک میکروبی بخش میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نیز وارد مطالعه شدند. در مجموع ۲۵ ایزوله بالینی در این مطالعه بررسی شد.

رنگ آمیزی و کشت: به منظور تعیین قطعی نوکاردیا در سطح جنس و افتراق آنها از جنس های نزدیک مثل استرپتومایسس، تست مقاومت به لیزوزیم برای کلنی‌های مشکوک نوکاردیا انجام شد. در مرحله بعد، به منظور تشخیص بین گونه‌ای ایزوله‌های بالینی آزمایشات بیوشیمیایی و فنوتیپی برای ایزوله های بالینی انجام می شود.

استخراج DNA: ایزوله های نوکاردیا آستروئیدس، فارسینیکا و نوا که با استفاده از روش‌های فنوتیپی تایید شده بودند انتخاب شدند. جهت استخراج ژنوم از روش جوشاندن تغییریافته استفاده شد (برای اولین بار از این روش برای استخراج DNA نوکاردیا استفاده شد). تعدادی کلنی تازه از محیط Brain Heart Infusion (BHI Agar) Merck, Germany را در ۵۰۰ میکرولیتر آب تزریقی استریل داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتر قرار داده و از باکتری سوسپانسیون تهیه شد. سپس ۲ دقیقه سانتریفیوژ (rpm8000/min) انجام و مایع رویی خالی شد. به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر محلول سود ٤٪ افزوده و ورتکس شدید انجام شد. میکروتیوب ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه قرار داده و مجدد سانتریفیوژ (rpm8000/min) شد. مایع رویی تخلیه و ۳۰۰ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد. این مرحله دوبار تکرار شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (تریس/EDTA) به رسوب اضافه و ورتکس ملایم انجام شد. میکروتیوب ها ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده و مجدد

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

سانتریفیوژ (rpm8000/min) انجام گرفت که محلول رویی به داخل میکروتیوپ استریل منتقل شد و جهت آنالیز کمی توسط نانودراپ (ThermoFisher,USA) مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی پرایمر: در این مرحله، به جهت انتخاب بهترین ژن جهت Real time PCR، مطالعه ژن‌های کاندید که در مطالعات گذشته گزارش شده بود صورت گرفت و توالی‌های این ژن ها از بانک ژنی (NCBI) دریافت گردید. در این پروژه از ژن SecA1 (Secretory protein SecA1 gene) برای هر سه گونه نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس استفاده شد. توالی ژن‌های هدف، توسط نرم افزارMEGA جهت هم‌ردیفی آن ها و یافتن مناطق مناسب به منظور طراحی پرایمر مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم افزار Gene runner، زوج پرایمرهای از جهت تعداد و درصد بازهای C+G، نزدیکی دمای اتصال و همچنین امکان ایجاد اتصالات بین پرایمری مثل دایمر و هیرپین مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده، پرایمرهای کاندید در پایگاه داده NCBI بلاست شد. پرایمرهای طراحی شده به منظور Real Time PCR سایبر گرین شد.

تهیه کنترل مثبت نوکارد یا آستروئیدس کمپلکس: برای ساخت کنترل مثبت، در ابتدا احتیاج به یک محصول PCR است که این محصول با استفاده از واکنش PCR بر سویه‌های استاندارد نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس انجام می‌شود تا قطعه ژنی مورد نظر به اندازه کافی تکثیر شود. جهت استخراج از ژل؛ عمل الکتروفورز بر روی این محصول انجام و توسط تیغ آن قسمت از ژن مورد نظر در ژل بریده شد تا ادامه مراحل کار صورت پذیرد. برای انجام عمل استخراج از ژل از کیت NucleoSpinGel and PCR Clean Up استفاده شد. در مرحله کلونینگ از کیت Clone JET PCR Cloning استفاده شد. اولین گام برای انجام ترانسفورماسیون ساخت باکتری مستعد می باشد. در این مرحله از باکتری اشریشیا کلی DH5α استفاده شد. باکتری در محیط نوترینت براث کشت داده شد. انکوباسیون در ۳۷ درجه تا رسیدن جذب نوری محیط کشت به ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر ادامه یافت. سپس با انتقال دادن این محیط به میکروتیوپ و انجام عمل سانتریفیوژ به مدت ۳ دقیقه در دور ۹۰۰۰rpm رسوب کافی از این باکتری تهیه گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از کلسیم کلرید ۰/۲ مولار به رسوب اضافه و به مدت نیم ساعت در یخچال قرار داده شد. سپس عمل سانتریفیوژ را مجدد تکرار و مایع رویی را دور ریخته و مرحله ۲ را مجدد تکرار شد. ۵۰ میکرولیتر از کلسیم کلرید به رسوب اضافه شده.۱۰۰ میکرولیتر از باکتری مستعد به همراه ۱۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده در مرحله کلونینگ را ادغام و به مدت نیم ساعت درون یخچال قرار داده شد. پس از آن ۲ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه در یخ نگهداری شد. به محلول بالا ۱میلی لیتر از محیط نوترینت براث اضافه نموده و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه نمودیم. ترانسفورماسیون انجام شد. پس از سانتریفیوژ کردن میکروتیوب و خارج نمودن ۹۰۰ میکرولیتر از محلول رویی،۱۰۰ میکرولیتر از باقی مانده را بر دوپلیت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده و ۲۴ ساعت انکوبه شد. در صورت ایجاد تک کلنیاین کلنی را در محیط نوترینت براث کشت داده و استخراج پلازمید انجام شد.

در نهایت کنترل مثبت برای هر سه گونه نوکاردیا آستروئیدس، فارسینیکا و نوا تهیه گردید. کنترل های مثبت بطور جداگانه با پرایمر های مربوط به هر گونه PCR شدند تا از درستی اتصال پرایمر های طراحی شده به قطعه مورد نظر اطمینان حاصل شود.

Real Time PCR: بعد از تهیه کنترل مثبت از سویه های استاندارد و اطمینان از درستی اتصال پرایمر به DNA استخراج شده (با استفاده از PCR معمولی)، Real Time PCR روی ژنوم گونه های مشکوک به نوکاردیا آستروئیدس، فارسینیکا و نوا انجام گرفت. دستگاه Exicycler TM 96

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

BIONEER جهت انجام Real Time PCR استفاده شد. ابتدا صحت کار دستگاه با استفاده از کنترل داخلی تایید گردید. در مرحله اول کنترل مثبت مورد آزمایش قرار گرفت. برای اطمینان از اختصاصیت اتصال پرایمرها، DNA استخراجی چند جنس نزدیک از جمله استرپتومایسز، رودوکوکوس، گوردونه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به همراه چند سویه استاندارد از گونه های غیر آستروئیدس (شامل نوکاردیا برازیلینسیس، نوکاردیا کاویه و نوکاردیا سیرسیجرجیکا) مورد آزمایش قرار گرفت. در آخر DNA استخراج شده از ۱۰ ایزوله ای که با آزمایشات فنوتیپی به عنوان گونه های مشکوک به نوکاردیا آ ستروئیدس کمپلکس در نظر گرفته شده بودند مورد آزمایش قرار داده شدند. در هر میکروتیوب ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرو لیتر PCR SYPR Green Master mix، ۱ میکرولیتراز هر پرایمر اختصاصی و ۱ میکرولیتر از الگوی DNA و مابقی آب مقطر می باشد. کنترل منفی شامل مستر میکس و آب می باشد. چرخهٔ دمایی PCR amplification شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه،۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن ٦۰ درجه به مدت ٦۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ٦۰ ثانیه در ٤۰ سیکل انجام گرفت.

در نهایت برای اطمینان از صحت تشخیصی روش و تایید گونه های نوکاردیا آستروئیدس، فارسینیکا و نوا، محصول نهایی واکنش Real Time PCR برای توالی یابی فرستاده شد.

نتایج

نتایج حا صل از برر سی فنوتیپی: در مجموع ۲۵ ایزوله بالینی جنس نوکاردیا از نظر رنگ آمیزی، کشت و آزمایش های فنوتیپی بررسی و گونه های مشکوک به نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس تعیین شد. با استفاده از روش فنوتیپی ۱۰ ایزوله مشکوک به نوکاردیا آستروئیدسکمپلکس بین ایزوله های بالینی یافت شد. جدول ۱ نتایج حاصل از آزمایشات فنوتیپی را نشان می دهد.

نتایج حاصل از PCR کنترل های مثبت با پرایمر های طراحی شده: شکل ۱ نتیجه PCR کنترل مثبت نوکاردیا آستروئیدس، فارسینیکا و نوا را نشان می دهد. پرایمرهای طراحی شده به درستی و بدون باند غیر اختصاصی به کنترل های مثبت اتصال پیدا کرده و محصول مورد نظر از نظر طول قطعه مطابق انتظار بود.

نتایج حاصل از Real Time PCR :Real Time PCR برای ۱۰ ایزوله‌های مشکوک به نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس که در مرحله تشخیص فنوتیپی شناسایی شدند، انجام گرفت. که از این بین تنها ۳ ایزوله مربوط به نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس بود. برای اطمینان از نتایج، محصولات Real Time PCR برای توالی یابی فرستاده شدند. نتایج حاصل از توالی یابی با نتایج حاصل از Real Time PCR هم خوانی داشت. در نهایت از بین ۲۵ ایزوله نوکاردیا، ۱ گونه نوکاردیا آستروئیدس، ۱ گونه نوکاردیا فارسینیکا و ۱ گونه نوکاردیا نوا جدا شد. شکل ۲ نمودار تکثیر سه گونه را نشان می‌دهد. کنترل داخلی به همراه کنترل مثبت هریک از گونه ها بطور جداگانه و در هر ران کاری استفاده شد. هیچ واکنش غیر اختصاصی در Real Time PCR مربوط به جنس و گونه‌های غیر نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس مشاهده نشد (شکل ۳)

بحث

مطالعات مولکولی متعددی برای شناسایی نوکاریا آستروئیدس کمپکس انجام شده است. تا به اکنون روش Real Time PCR در مورد نوکاردیا تنها در دو مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است. در یک مطالعه که در سال ۲۰۰٦ در ایالات متحده عربی انجام گرفت؛ از ژن *16S rRNA* برای شناسایی جنس نوکاردیا در ۲۸ ایزوله بالینی استفاده شد. از این تعداد ۲۰ مورد نوکاردیا با استفاده از روش های فنوتیپی تشخیص داده شد در حالی که از این تعداد ۱۸ مورد نوکاردیا

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

با استفاده از روش Real Time PCR شناسایی شد. در این مطالعه از پرایمر های سایبرگرین شده استفاده شد (٦). در مطالعه ما برای اولین بار از از روش Real Time PCR برای تشخیص سه گونه نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس استفاده شده است. سه جفت پرایمر بطور جداگانه برای شناسایی گونه های فارسینیکا، آستروئیدس و نوا طراحی شد. برخلاف مطالعه ای که به آن اشاره شد، در مطالعه ما از ژن *secA1* جهت طراحی پرایمر استفاده شد. ژن *16S rRNA*برای افتراق بین گونه ای کاندید مناسبی به نظر نمی‌رسید؛ چرا که همولوژی ژن *16S rRNA* بین گونه‌های نوکاردیا به قدری بود که امکان طراحی اختصاصی پرایمر برای این مجموعه را سلب می‌کرد. در مطالعه ما، ژن *sod* و ژن*hsp65* مورد بررسی قرار گرفت. ژن (sod) Super oxide dismutase نیز به دلیل داده محدود در پایگاه داده NCBI و ژن Heat shock protein65 (hsp65) نیز به دلیل همولوژی زیاد بین اکتینومایست ها انتخاب نشدند. مرتبط با ژن hsp6، مطالعه‌ای در یونان انجام گرفت. این بررسی در ۲۰۰ بیماری که توبرکلوز بطور اولیه در آن ها شخیص داده شد بود؛ انجام گرفت. در این مطالعه ۲۷ ایزوله بالینی با استفاده از روش PCR و ژن hsp65 به عنوان نوکاردیا یا مایکوباکتریوم شناسایی شدند. در این مطالعه به جهت مقایسه اختصاصیت تشخیصی ژن hsp65، RealTimePCR با استفاده از ژن 16S rRNA برای ۲۷ ایزوله انجام شد. تنها ٤ ایزوله نوکاردیا با استفاده از *16S rRNA*و RealTimePCR شناسایی شد. نتایج نشان داد که همولوژی hsp65 در دو جنس مایکوباکتریوم و نوکاردیا به گونه ای است که اختصاصیت لازم برای افتراق بین این دو جنس را ندارد (۹). هم ردیفی انجام شده برای ژن secA1 نشان می دهد که مناطقی برای هر یک از گونه های نوکاردیا وجود دارد که با گونه های دیگر متفاوت است. در سال ۲۰۰٦ مطالعه ای جهت مقایسه کارایی دو ژن secA1 و 16S rRNA در افتراق بین گونه‌ای٤۰ ایزوله بالینی نوکاردیا انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ژن secA1 کارایی بیشتری نسبت ژن 16S rRNA در افتراق بین گونه ای دارد. هم چنین نتایج نشان داد که ژن secA1 در سویه های مختلف از یک گونه هومولوژی ۹۸ تا ۱۰۰٪ دارد. (۱۰). مطالعه ای دیگر در مورد پلی مورفیسم ژن secA1 بین گونه های نوکاردیا انجام گرفت. این مطالعه که در سال ۲۰۱۰ در چین انجام شد، نشان داد که تنوع ژنتیکی در ژن secA1 بسیار گسترده تر از ژن 16S rRNA است. به همین علت به نظر می‌رسد که ژن secA1 جهت افتراق بین گونه‌های نوکاردیایی مناسب ترین کاندید است (۱۱). یک مطالعه گسترده در رابطه با پلی مورفیسم ژن های 16SrRNA، secA1 ،hsp65، sodA، (RNApolymeraseB) rpoB و gyrB(giraseB) در گونه های نوکاردیا در سال ۲۰۱۷ در مکزیک انجام شد. آنالیز درخت فیلوژنیک مطالعه اخیر، توانایی هر یک از ژن های نام برده را در افتراق بین گونه ای نوکاردیا نشان داد. طبق نتایج بدست آمده ژن *sodA* و *gyrB* بیشترین تنوع ژنتیکی را برای افتراق گونه‌های نوکاردیایی داشت. در این آنالیز ژن *secA1* دومین ژن مناسب جهت افتراق گونه های نوکاردیا معرفی شد و ژن های *16SrRNA*، *hsp65* و *rpoB* تنوع ژنتیکی نسبتا کم تری داشتند.

نتیجه گیری

روش‌های شناسایی مبتنی بر پرایمرها و پروب های اختصاصی برای شناسایی و تشخیص سریع عوامل عفونی بسیار کارآمد هستند (۱۲). در این مطالعه برای اولین بار نوکاریا آستروئیدس کمپلکس با استفاده از روش Real Time PCR شناسایی شد. این روش با حساسیت، اختصاصیت و سرعت بالاو به دلیل وجود سیستم آنالیز الکترونیکی در دستگاه های Real time PCR؛ قابلیت پیگیری لحظه به لحظه نتایج روش مناسبی برای تشخیص بین گونه ای نوکاردیا های مهم از نظر بالینی مناسب به نظر می رسد. بعلاوه، این روش با کم ترین مقادیر DNA استخراجی نیز کارایی دارد. در مطالعه ما،

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

از بین ۲۵ ایزوله بالینی مورد بررسی ۱۰ ایزوله مشکوک نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس با استفاده از روش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی یافت شد. این در حالی بود که در روش Real time PCR تنها ۳ ایزوله به عنوان نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس شناسایی شد (جدول ۲). ایزوله شماره ۸ به عنوان نوکاردیا آستروئیدس،ایزوله شماره ۱۵ به عنوان نوکاردیا فارسینیکاو ایزوله شماره ۱۷ به عنوان نوکاردیا نوا شناسایی شد. این در حالی بود که ایزوله شماره ۸ و ۱۷ در بررسی اولیه نتایج فنوتیپی حذف شده و حتی در بین ۱۰ ایزوله مشکوک قرار نگرفتند. مقایسه نتایج حاصل از آزمایشات فنوتیپی و بیوشیمیایی و نتایج حاصل از Realtime PCR نشان داد که اختصاصیت روش های فنوتیپی و بیوشیمیایی بخصوص در تعیین گونه بسیار کم می باشد. شیوع هر سه گونه نام برده بین ۲۵ ایزوله‌های بررسی شده ٤٪ بود. طراحی پرایمرهای اختصاصی برای سایر گونه های نوکاردیایی، استفاده از پروب-های اختصاصی برای افزایش اختصاصیت روش و همچنین انتخاب ژن های اختصاصی تر برای طراحی بهینه پرایمر می-تواند موضوع مطالعات آینده باشد.

تشکر و قدردانی

از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه پاتوبیولوژی و آزمایشگاه اکتینومیست بخش باکتری شناسی دانشکده بهداشت مراتب سپاس و قدردانی را داریم.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی و فنوتیپی در ۲۵ ایزوله بالینی نوکاردیایی. ایزوله های شماره ۱، ۳، ٤، ۹، ۱۱، ۱۵، ۲۰، ۲۱، ۲٤ و ۲۵ به عنوان جنس نوکاردیا از سایر ایزوله های متمایز شدند

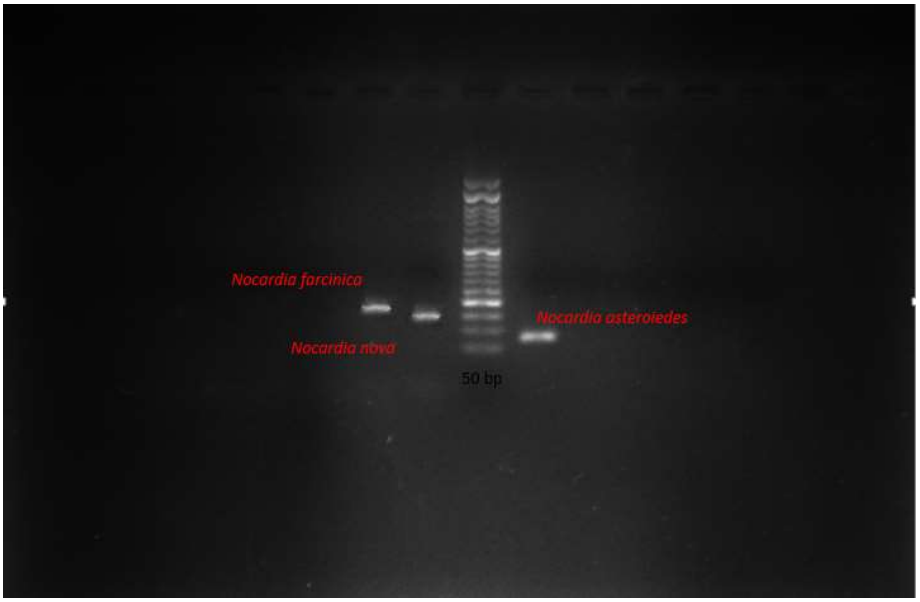
شماره	سیترات	تیترات	اوره از	کازئین	لیزوزیم	اینوزیتول	گالاکتوز	گلوکز	ترهالوز	سوربیتول	آرابینوز	مانیتول	ژلاتین	تیروزین	گزانتین	هایپوگزانتین	رشد در 45 درجه
1	-	+	+	-	R	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	+	-	R	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
4	-	-	+	-	R	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
5	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	+	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	+	-	R	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	-	+	+	-	R	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	-	+	+	-	R	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
21	-	+	+	-	R	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
23	+	+	+	+	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	+	-	R	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
25	-	-	+	-	R	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

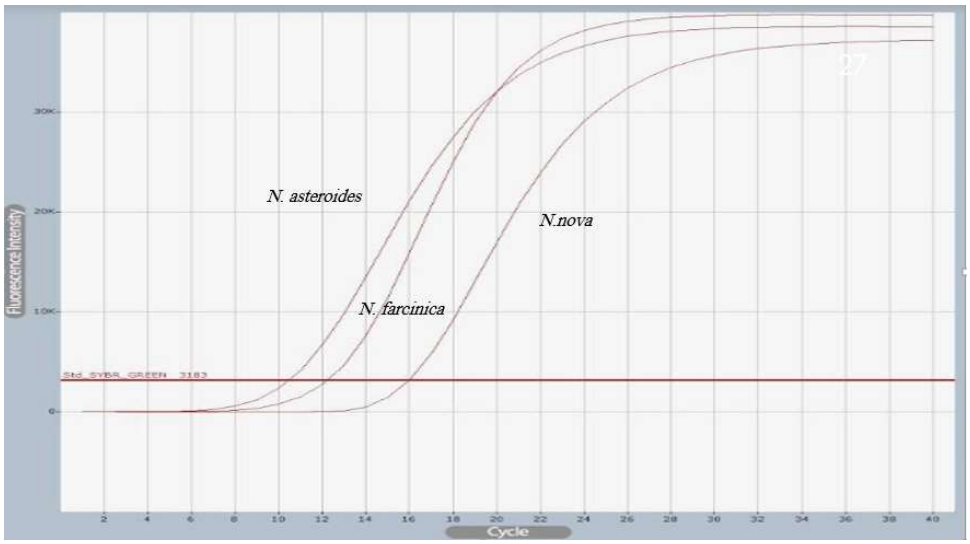
جدول ۲- مقایسه نتایج حاصل از Real Time PCR و روش فنوتیپی وبیوشیمیایی. ایزوله های شماره ۱، ۳، ٤، ۹، ۱۱، ۱۵، ۲۰، ۲۱، ۲٤ و ۲۵ با استفاده از روش فنوتیپی و بیوشیمیایی به عنوان جنس نوکاردیا از سایر ایزوله های متمایز شدند. در روش Real time PCR تنها ۳ ایزوله به عنوان نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس شناسایی شد. ایزوله شماره ۸ به عنوان نوکاردیا آستروئیدس، ایزوله شماره ۱۵ به عنوان نوکاردیا فارسینیکا و ایزوله شماره ۱۷ به عنوان نوکاردیا نوا شناسایی شد. این در حالی بود که در بررسی اولیه نتایج فنوتیپی، ایزوله شماره ۸ و ۱۷ حتی در بین ۱۰ ایزوله مشکوک قرار نگرفتند

شماره	سیترات	نیترات	اوره از	کازئین	لیزوزیم	اینوزیتول	گالاکتوز	گلوکز	ترهالوز	سوربیتول	آرابینوز	مانیتول	ژلاتین	تیروزین	گزانتین	هایپوگزانتین	رشد در 45 درجه
1	-	+	+	-	R	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
2	-	-	+	+	R	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
3	-	+	+	-	R	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
4	-	-	+	-	R	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
5	-	+	+	+	R	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	R	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
7	-	+	+	+	R	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	R	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
9	-	+	+	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	+	+	-	R	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	+	R	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
15	-	+	+	-	R	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
16	-	-	+	+	R	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
17	-	+	+	-	R	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
20	-	+	+	-	R	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
21	-	+	+	-	R	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
24	-	+	+	-	R	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
25	-	+	+	-	R	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

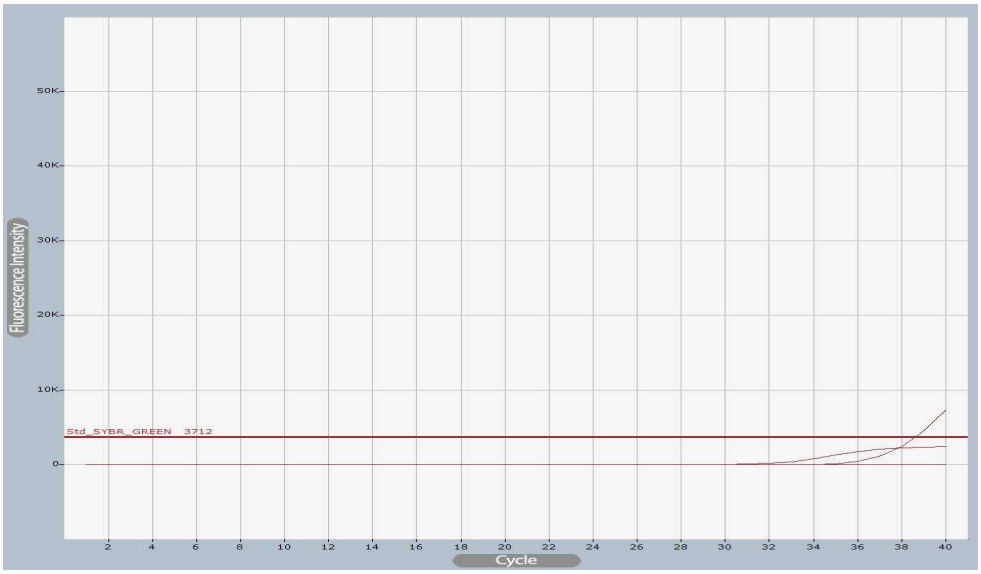


شکل۱- تایید صحت اتصال پرایمر های طراحی شده با استفاده از کنترل مثبت تهیه شده. اندازه قطعات با اندازه محصول مورد انتظار در بلاست پرایمرها تطابق داشت



شکل ۲- نتایج حاصل از Real Time PCR برای سه گونه نوکاردیا آستروئیدس، فارسینیکا و نوا. نوکاردیا آستروئیدس با C_T = ۱۰، نوکاردیا فارسینیکا C_T = ۱۲ ، و نوکاردیا نوا با C_T = ۱۶ شناسایی شد

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]



شکل ۳- نتیجه Real Time PCR منفی در جنس های استرپتومایسز، رودوکوکوس، گوردونه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به همراه چند سویه استاندارد از گونه های غیر آستروئیدس (شامل نوکاردیا برازیلینسیس، نوکاردیا کاویه و نوکاردیا سیرسیجرجیکا)

References

1. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis review of clinical and laboratory experience. Journal of clinical microbiology. 2003; 41(10):4497-501.
2. AsalbanooFamili Kachuyi R, Mirnezhad R, Mozafari N, Mohammadabadi HM. Detection of Nocardial agents in BAL of tuberculosis suspected patients by PCR. Journal of Lorestan university of medical scienses. 2014;(16).
3. Kageyama A, Yazawa K, Ishikawa J, Hotta K, Nishimura K, Mikami Y. Nocardial infections in Japan from 1992 to 2001, including the first report of infection by *Nocardia transvalensis*. European journal of epidemiology. 2004;19(4):383-9.
4. Farina C, Boiron P, Ferrari I, Provost F, Goglio A. Report of human nocardiosis in Italy between 1993 and 1997. European journal of epidemiology. 2001; 17(11):1019-22.
5. 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.
6. 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(Pt 12):1711-5.
7. Brown JM, Pham KN, McNeil MM, Lasker BA. Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. J Clin Microbiol. 2004; 42(8):3655-60.
8. Steingrube VA, Brown BA, Gibson JL, Wilson RW, Brown J, Blacklock Z, et al. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the Nocardia asteroides complex. J Clin Microbiol. 1995; 33(12):3096-101.
9. Helal ZH, Khan MI, Ashour MS, Eissa SA. Detection and characterization of *Nocardia* from patients diagnosed as tuberculosis in egypt. International journal of biomedical science : IJBS. 2008; 4(3):179-84.
10. Conville PS, Zelazny AM, Witebsky FG. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. J Clin Microbiol. 2006; 44(8):2760-6.
11. Kong F, Wang H, Zhang E, Sintchenko V, Xiao M, Sorrell TC, et al. secA1 gene sequence polymorphisms for species identification of Nocardia species and recognition of intraspecies genetic diversity. J Clin Microbiol. 2010; 48(11):3928-34.
12. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, et al. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. Current genomics. 2007;8(4):234-51.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

Detection of *Nocardia Asteroides* Complex in Clinical Isolates by Real-Time Polymerase Chain Reaction

Bolourchi N: **MSc. Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Ebrahimi E: **PhD. Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Falah J: **PhD. Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Javadi A: **PhD. Student, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Eshraghi SS: **PhD. Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran-Corresponding Author:eshraghs@tums.ac.ir**
Received: Sep 29, 2018 Accepted: Jul 29, 2019

ABSTRACT

Background and Aims: *Nocardia asteroides* complex is the most common cause of infectious diseases due to nocardiosis. Interspecies differentiation of *Nocardia* genera is essential for prognosis and timely proper treatment, as well as for epidemiological studies. Since each genus has its own antibiotic resistance, precise careful diagnosis is of prime importance. As compared to biochemical and phenotypic methods, the efficacy of molecular methods for fast and accurate identification of *Nocardia* species has been proven. The aim of this study was to detect for the first time *Nocardia asteroides* complex in clinical isolates using real time polymerase chain reaction (Real-Time PCR).

Materials and Methods: Out of the 25 clinical isolates suspected to be *Nocardia asteroides* genus 10 were identified as *Nocardia asteroids* complex by biochemical and phenotypic methods, followed by genomic DNA extraction of the suspicious isolates. *Nocardia asteroides* complex positive controls were prepared using standard strains. Real-time PCR was conducted on all the 10 suspicious isolates. The final real-time PCR samples were sent for sequencing to verify the identified species.

Results: Based on sequencing results 3 of 10 clinical isolates suspected to be identified as *Nocardia asteroides* complex were confirmed as belonging to the *Nocardia asteroids* complex genera ─ *Nocardia asteroids, Nocardia farcinica,* and *Nocardia nova*.

Conclusion: This study shows that, as compared to biochemical and phenotypic methods, real-time polymerase chain reaction is faster and more specific, and is considered as an efficient method, for *Nocardia* interspecies identification and differentiation.

Keywords*: Nocardia Asteroides* Complex, Real Time PCR, Clinical Isolates

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-02-16]