شناسایی تنوع زیستی نوکاردیا های جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های تهران، با روش فنوتیپی و روش مولکولی

چکیده

«نوکاردیا» یک باکتری گرم مثبت، رشته‌ای با ویژگی اسید فست نسبی است. نوکاردیوزیس معمولاً به شکل بیماری حاد یا مزمن همراه با چرک یا ایجادگرانولوماتوز نمایان می‌شود که می‌تواند بیماری مهاجمی را هم در افراد سالم و هم در افراد ایمونوساپرس ایجاد کند. هدف از این پژوهه شناسایی تنوع زیستی نوکاردیا های جدا شده از بیمارستان‌های تهران با روش فنوتیپی و مولکولیPCR است.

بدین منظور ۲۰۰ نمونه بالینی از محوطه بیمارستان‌های تهران جمع‌آوری شد. پس از جداسازی توسط روش Paraffin baiting کلونی‌ها با بررسی ماکروسکوپی و سپس میکروسکوپی توسط رنگ آمیزی گرم و اسید فست نسبی، توانایی رشد در لیزوزیم مایع، رشد در ٤٥ درجه سانتیگراد و سایر تست‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت با طراحی پرایمر اختصاصی جنس و واکنش PCR دو نتیجه مقایسه شد که یافته‌ها نشان داد از ۲۰۰ نمونه ، ۳۰ ایزوله به دست می‌آید که از نظر کشت و تست‌های بیوشیمیایی مثبت تشخیص داده شد .

با توجه به تنوع گونه‌های مختلف جنس نوکاردیا به دلیل شرایط متفاوت در اجرای تست‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی ممکن است جنسی دیگر از خانواده اکتینومیست، به اشتباه نوکاردیا تشخیص داده شود. اجرای روش‌های مولکولی می‌تواند تأییدی بر روش فنوتیپی باشد.

واژگان کلیدی: نوکاردیا، بیمارستان‌های تهران، نمونه بالینی، شناسایی فنوتیپی، شناسایی مولکولی.

مقدمه

«نوکاردیا» یک باکتری گرم مثبت رشته‌ای متعلق به شاخه اکتینوباکتر و زیر راسته کورینوباکتریا است. این باکتری به عنوان یک ساپروفیت محیطی در خاک، آب، هوا، گیاهان و حیوانات در حال فساد ودر تمام نقاط دنیا یافت می‌شود(۲و۱). این باکتری اسیدفست نسبی، کاتالاز مثبت، غیرمتحرک و فاقد کپسول است (۳ و ٤). تاکنون بیش از ۷۵ گونه باکتریایی از نوکاردیا با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی شناسایی شده که از بین این گونه‌ها، ۲۵ گونه به عنوان پاتوژن بالقوه شناخته شده‌اند. شایع‌ترین آن‌ها نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس هستند(۵). نوکاردیوزیس معمولاً به شکل حاد یا مزمن همراه چرک یا ایجادگرانولوماتوز نمایان می‌شود و می‌تواند بیماری مهاجمی را هم در افراد سالم وهم در افراد ایمونوساپرس ایجاد کند. فرم‌های تنفسی، حدود ۷۰% موارد نوکاردیوز را تشکیل می‌دهند که بیش‌تر (حدود ۸۰%) با آستروئیدس کمپلکس مرتبط می‌باشد (٦). فرم‌های پوستی نیز معمولاً با نوکاردیا برازیلینسیس ارتباط دارند(۱). شیوع عفونت‌های نوکاردیایی در مبتلایان به نقص ایمنی اکتسابی و افراد با ایمنی سرکوب شده، از جمله افرادی که دارو های کورتیکواستروئید مصرف می‌کنند و کسانی که پیوند گرفته‌اند، در مقایسه با افراد سالم حدود ۱۰۰% است. همچنین دوره درمان طولانی بوده و مرگ و میر بیش از ۸۵% در این افراد دیده می‌شود (۷، ۸ و ۹). نوکاردیا یک باکتری ساپروفیت است که یکی از اجزای میکروفلور خاک شناخته می‌شود . این باکتری را می‌توان در خاک سرتاسر جهان یافت. همچنین در بسیاری از مواقع درآب ، اجزای درحال فساد گیاهان، گرد و غبار و هوا یافت می‌شود(۱۰). برخی عوامل پاتولوژیک، می‌توانند به عنوان عوامل مستعد کننده برای نوکاردیوزیس در نظر گرفته شود که از جمله آن می‌توان به سندروم لنفوپرولیفراتیو ، نئوپلازی، ایدز، سیروز کبدی، دریافت عضو پیوندی و درمان‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی اشاره کرد. به نظر می‌رسد سوء مصرف وریدی داروها نیز که می‌تواند یک risk factor در نظر گرفته شود (۱۱و۱۲). روش‌های فنوتیپی شامل بررسی ماکروسکوپی کلونی‌های ظاهر شده، بررسی میکروسکوپسی نمونه‌ها (با استفاده از رنگ آمیزی گرم و اسید فست نسبی و مشاهده فرم رشته‌ای باکتری) و کشت در محیط‌های انتخابی روشی مرجع در تشخیص نوکاردیوز محسوب می‌شود؛ اما این روش هم به دلیل وقت گیر بودن و نیاز به ایزوله‌های مناسب از باکتری دارای معایبی است. از طرفی روش‌های مولکولی مانند PCR با اختصاصیت و حساسیت هر چه بیش‌تر نسبت به روش‌های فنوتیپی و میکروسکوپی امکان بررسی تمام گونه‌های شناخته شده نوکاردیا را فراهم می‌کند و در سال‌های اخیر از آن‌ها در تشخیص به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود (۱ و ۸). هدف از این پژوهه شناسایی تنوع زیستی نوکاردیا های جدا شده از محیط بیمارستان‌های تهران با روش فنوتیپی و مولکولی است.

روش‌ها

روش جداسازی و نمونه‌گیری

دویست نمونه از مراکز درمانی و بیمارستان‌های تهران جمع‌آوری شد. روش جداسازی گونه‌های نوکاردیا از نمونه‌ها بر اساس روش Paraffin baiting انجام شد. در این روش نمونه از نمونه به ۱۵ میلی لیتر محیط (Carbon free broth 2g، $NaNO_3$ 2 mg، $ZnSO_4$ 0/5 g، $MgSO_4 7H_2O$ 0/8 g، K_2HPO_4 10، $FeCl_3$ 8، $MnCl_2.4H_2O$ mg ، در یک لیتر آب مقطر) منتقل کرده، سپس به مدت ٦ دقیقه در بنماری ۵۵ درجه قرار دادیم. محصول را به دو لوله استریل منتقل کرده و یک میله شیشه‌ای پوشیده با پارافین را درون هر کدام نهاده و حجم هر کدام را با محیط مذکور به ۱۰ میلی لیتر رساندیم. یکی از این لوله‌ها را در دمای ۳۵ درجه و دیگری را در ٤٢ درجه به مدت ۲۱ روز انکوباسیون کردیم تا کلونی‌ها ظاهر شود. سپس کلونی‌های ظاهر شده را بر محیط‌های عمومی مانند بلاد آگار کشت دادیم تا مراحل بعدی انجام شود(۱۳).

روش اجرای تست‌های فنوتیپی

پس از ظاهر شدن کلونی‌های مورد نظر، به بررسی ماکروسکوپی(شامل شکل، رنگ و نوع کلونی) و سپس میکروسکوپی ایزوله‌ها توسط رنگ آمیزی گرم و پارشیال اسید فست پرداختیم. توانایی رشد در لیزوزیم مایع (۹۵ میلی لیتر از مخلوط ۳ گرمBeef extract ، ۵ گرم پپتون و ۷۰ میلی لیتر گلیسرول در ۱ لیتر آب مقطر را به ۵ میلی لیتر مخلوط، ۱۰۰ میلی گرم لیزوزیم ، ۱۰۰ میلی لیتر اسیدکلریدریک ۰/۰۱ نرمال)؛ رشد در ٤٥ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز، تست اورئاز(۲۱گرم محیط اوره آگار در یک لیتر آب مقطر)؛ به علاوه ارزیابی هیدرولیز کازئین(۱۰گرم Skim milkدر ۹۰ میلی لیتر را به محلول۳ گرم آگار در ۹۷ میلی لیتر آب مقطر)؛ تیروزین(محلول ۳% نوترینت آگار اتوکلاو شده در محلول ۰/۵ % تیروزین فیلتر شده)؛ گزانتین (محلول ۳% نوترینت آگار اتوکلاو شده در محلول ۰/۵ % گزانتین فیلتر شده)؛ ژلاتین(۳ گرم Beef Extract، ۵ گرم پپتون، ۱۲۰ گرم ژلاتین ۱ لیتر آب مقطر)؛ اسکولین، هیپوگزانتین (محلول ۳% نوترینت آگار اتوکلاو شده در محلول ۰/۵ % هایپو گزانتین فیلتر شده)؛ تولید اسید در گلوکز (محلول ۱/۵% فنول رد اتوکلاو شده در محلول ۱ درصد گلوکز فیلتر شده)؛ گالاکتوز (محلول ۱/۵% فنول رد اتوکلاو شده در محلول ۱% گالاکتوز فیلتر شده)؛ اینوزیتول(محلول ۱/۵% فنول رد اتوکلاو شده در محلول ۱% اینوزیتول فیلتر شده)؛ مانیتول (محلول ۱/۵% فنول رد اتوکلاو شده در محلول ۱% مانیتول فیلتر شده)؛ آرابینوز (محلول ۱/۵% فنول رد اتوکلاو شده در محلول ۱% آرابینوز فیلتر شده)؛ سوربیتول (محلول ۱/۵% فنول رد اتوکلاو شده در محلول ۱% سوربیتول فیلتر شده)؛ تره‌هالوز(محلول ۱/۵% فنول رد اتوکلاو شده در محلول ۱% تره‌هالوز فیلتر شده)، ؛ استفاده از سیترات (۲۲ گرم محیط سیترات آگار در ۷۰۰ میلی لیتر آب) و احیای نیترات (۱٦/۵ گرم پودر

نیترات در ۱ لیتر آب مقطر) تست‌های بیوشیمیایی مشخص شده در پروژه در نظر گرفته شد. زمان انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۲۱ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد. محیط انکوباسیون به منظور جلوگیری از خشک شدن محیط‌ها باید مرطوب نگه داشته شود (۱٤، ۱۵و ۱٦) .

آزمایش‌های مولکولی

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از روش جوشاندن همراه لیز قلیایی استفاده شد. کلنی‌های خالص و دارای رشد مناسب و تازه را با کمک لوپ استریل جمع‌آوری و در میکروتیوپ حاوی ۳۰۰ میکرولیتر از آب تزریقی وارد کردیم. سپس نمونه‌های موجود میکروتیوپ‌ها، به مدت ۲ دقیقه در دورrpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی خارج و ۵۰۰ میکرولیتر سود ٤% به رسوب اضافه شد و ورتکس شدید انجام و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور دو دقیقه انجام و رسوب نگهداری و رسوب سه بار شست‌وشو و هر بار ۱۰۰۰۰ دور ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE را به آن اضافه کردیم و به میزان ۲۰ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار دادیم. بعد از سپری شدن این زمان میکروتیوپ‌ها به مدت ۲ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpmسانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی ژنوم باکتری می‌باشد که در دمای منهای ۲۰ ذخیره شد (۱۷).

طراحی پرایمر

در این مرحله از پرایمر جدول ۱ برای PCR و سپس سکانس استفاده شد. توالي‌این ژن‌ها از بانک ژن (NCBI) دریافت گردید. توالی ژن‌های هدف، همردیفي(Aligned)شده و توسط نرم افزار MEGA به منظور یافتن مناطق مناسب به منظور طراحی پرایمر مورد بررسی قرار گرفت. طراحی زوج پرایمر برای اجرای PCR با استفاده از نرم-افزارهاي Allele ID، Oligo ، Gene runner انجام شد.

جدول ۱. توالی پرایمر ۱٦S rRNA

Primers ۱۶S rRNA	Sequence	Tm	طول قطعه
۲۷F	۵AGAGTTTGATCCTGGCTCAG۳	۵۸	۱۵۰۰ bp
۱۴۹۲R	۵'- GGTTACCTTGTTACGACTT -۳'		

برنامه و مواد PCR

پس از تهیه مخلوط واکنش طبق جدول ۲ در میکروتیوب‌ها بسته شـد و در دسـتگاه ترموسـایکلر قـرار داده شـدند. برنامه کار دستگاه در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲. حجم واکنش PCR

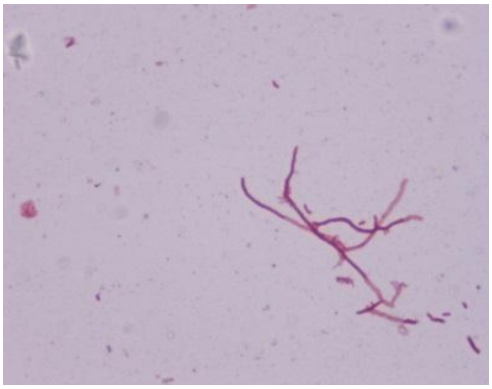
PCR reaction mix	
Master mix	۲۵µl
Each primer (۱۰pmol)	۱µl
DNA template	۲µl
Deionised Water (DW)	۲۱µl
Total volume	۵۰µl

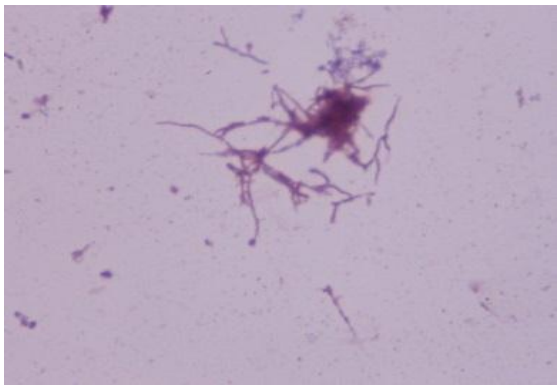
جدول ۳. برنامه کار دستگاه ترموسایکلر به منظور اجرای PCR

مراحل واکنش PCR		Temperature
Initial denaturation (۱cycle)		۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴ دقیقه
Amplification(cycle ۳۰)	Denaturation	۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ثانیه
	Annealing	ژن S۱۶(۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه)
	Extension	۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه
	Final Extension	۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه

یافته‌ها

از ۲۰۰ نمونه بیمارستان‌های شهر تهران پس از کشـت اولیـه ۳۰ کلـونی مشـکوک بـه دسـت آمـد. در مطالعـات ماکروسکوپی، رنگ و ظاهر کلونی و در مطالعات میکروسکوپی گرم باکتری‌های رشـته‌ای گـرم مثبـت و در رنـگ آمیزی اسید فست نسبی باکتری‌های رشته‌ای با خاصیت اسید فست نسبی مشاهده شدند. (مطابق شکل ۱) توانـایی رشد در لیزوزیم براث، رشد در ٤٥ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز، به علاوه ارزیابی تست‌های بیوشیمیایی مطـابق جدول ٤ مشخص و برای بررسی فنوتیپی، گونه‌ها بررسی شد. بیش‌ترین گونه مربوط بهN. Cyriacigeorgica به تعداد ١٤ عدد به دست آمد. از نمونه‌های بالینی بیش‌ترین تعداد نوکاردیا از نمونه‌های ریوی به دست آمد (نمودار۱).





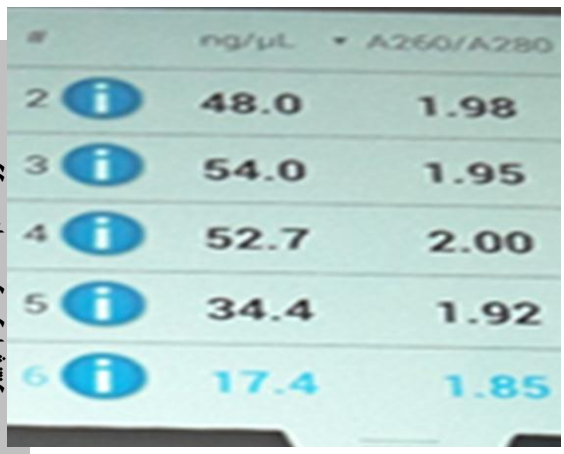
شکل ۱. بررسی میکروسکوپی جنس نوکاردیا. سمت راست: رنگ آمیزی گرم؛ سمت چپ: رنگ آمیزی پارشیال اسید فست

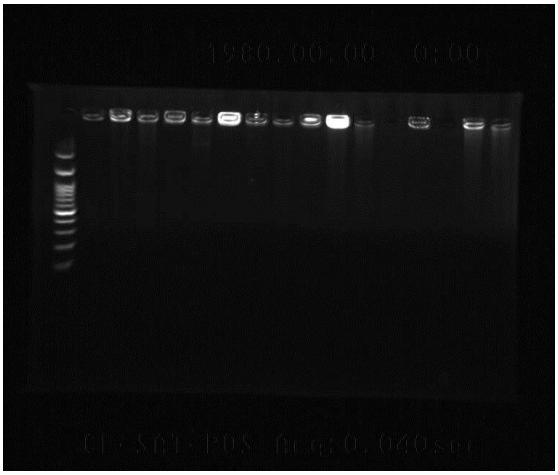
جدول٤- تست‌های بیوشیمیایی جهت تعیین هویت فنوتیپی ایزوله‌ها

نوکاردیا (تعداد=۳۰) تست	N. asteroides تعداد= ٤	N. .otitidis caviarum تعداد=۱	N. nova تعداد=۱	N. cyriaci georgica تعداد=۱٤	N. farcicica تعداد٤	N. brasiliensis تعداد=۱	N. coubleae تعداد=۱	N. cummidelens تعداد= ۱	N. ignorata تعداد= ۲
سیترات	–	–	–	–	–	+	–	–	–
نیترات	–	+	+	+	–	+	NA	+	+
اوره آز	+	+	+	–	+	+	NA	+	+
کازئین	–	–	–	–	–	+	–	–	–
مقاومت به لیزوزیم	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوربیتول	–	–	–	–	–	–	–	–	–
تیروزین	–	–	–	–	–	+	+	–	–
گزانتین	–	+	–	–	–	–	–	–	–
هایپوگزانتین	–	+	–	–	–	+	–	–	–
رشد در ٤٥ درجه	–	متغیر	–	+	+	–	–	–	–
اسکولین	–	+	–	–	+	+	NA	–	+

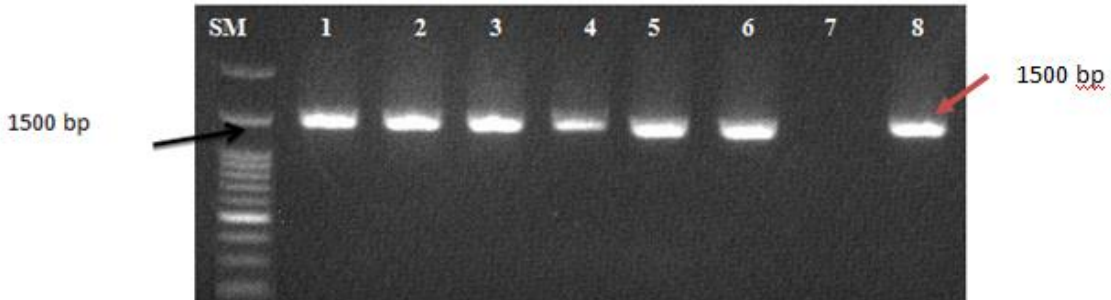
نتایج روش مولکولی

خلوص DNA مورد نظر، به دو روش کمی و کیفی با استفاده از اسپکترو فوتومتری و الکتروفورز در ژل اگارز ۱٪بررسی شد که دارای کیفیت مناسب بود. آنالیز های کمی و کیفی ژنوم استخراج شده درشکل ۲ مشخص شده است.





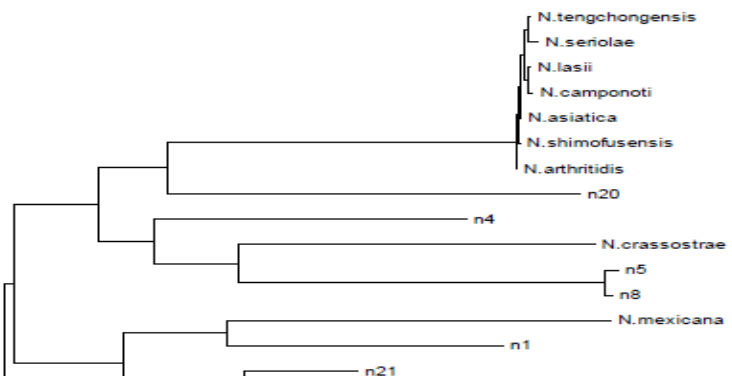
شکل ۵. آنالیز کمی و کیفی DNA استخراج شده. سمت راست: استفاده از الکتروفورز. سمت چپ: آنالیز کمی با استفاده از نانودراب واکنش PCR با استفاده از ژنوم‌های استخراج شده انجام شد که از ۳۰ نمونه مشکوک در روش‌های فنوتیپی، پس از اجرای سکوئنسینگ تمام ایزوله‌ها نوکاردیا تشخیص داده شد که نتایج الکتروفورز محصول PCR بر ژل ۱% در شکل ۳ مشاهده می‌شود.



شکل۳. محصول۱٦s RNA بعد از PCR (قطعه مورد نظر ۱۵۰۰ بیس پر می‌باشد شماره ۷ کنترل منفی و شماره ۸ کنترل مثبت می‌باشد)

آنالیز های فیلوژنتیکی

بعد از برچیدن سکانس (Sequence trimming) در ابتدا و انتهای آن (به دلیل کیفیت پایین)، قطعات مورد نظر از هر ژن در بین سکانس ها با برنامه MEGA ۷ همردیف سازی چندگانه(Multiple sequence alignment) و سپس مورد آنالیز مقایسه‌ای واقع شد. با این کار می‌توان بررسی دقیق‌تری انجام داد که در شکل ٤ مشاهده می‌شود. ژن ۱٦srRNA به عنوان یک ژن معتبر مطرح است که به تنهایی با بررسی مقایسه‌ای توالی آن در بین سویه‌ها می‌توان ارتباط ژنتیکی آنها را پیش بینی کرد. میزان اختلاف مشاهده شده در توالی‌های ژن در بین سویه‌ها، منعکس کننده اختلاف ژنومی آن‌ها می‌باشد.



شکل ٤. دندروگرام ژنی براساس ژن ١٦srRNA در میان سویه‌ها با متد Neighbor-joining

بحث

بررسی تنوع زیستی نوکاردیا های موجود در نمونه‌های بالینی، به دلیل شناسایی سخت باکتری و درمان به موقع آن در افراد مبتلا بسیار اهمیت دارد. روش‌های فنوتیپی که شامل بررسی ماکروسکوپی کلونی‌های ظاهر شده، بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها (با استفاده از رنگ آمیزی گرم و اسید فست نسبی و مشاهده فرم رشته‌ای باکتری) و کشت در محیط‌های انتخابی؛ روشی مرجع در تشخیص نوکاردیوز محسوب می‌شود؛ اما این تست‌ها بدون داشتن ایزوله‌های مناسب از نوکاردیا انجام پذیر نمی‌باشد. در صورت کشت نیز به دلیل نیاز به انکوباسیون طولانی و کند رشد بودن باکتری، امکان آلودگی محیط کشت با سایر ساپروفیت‌های محیطی در مدت انکوباسیون زیاد است (۱۸). روش‌های مولکولی برای تشخیص سریع و دقیق گونه‌های نوکاردیایی از نمونه مستقیم کاملاً کاربردی است. تشخیص باکتری نوکاردیا در سطح گونه به منظور مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین توزیع جغرافیایی این باکتری اهمیت فراوان دارد (۱۹). روش‌های مولکولی مانند PCR با اختصاصیت و حساسیت هرچه بیش‌تر نسبت به روش‌های فنوتیپی و میکروسکوپی امکان بررسی تمام گونه‌های شناخته شده نوکاردیا را فراهم می‌کند و در سال‌های اخیر از آن‌ها در تشخیص بطور گسترده‌ای استفاده می‌شود (۱و۸) . اولین بار در دهۀ ۱۹۹۰ از روش‌های مولکولی بر پایه PCR برای تشخیص جنس نوکاردیا از بین سایر اکتینومیست‌ها استفاده شد (۲۰). در مطالعه رسولی نسب و همکاران در سال ۹۲، نمونه ایزوله‌های جدا شده از تهران به روش فنوتیپی انجام شد که از مجموع ۱۹ نمونه مشکوک، ۱۲ ایزوله نوکاردیا آستروئیدس کمپلکس، ۵ ایزوله سیریا سیجرجیکا، ۱ ایزوله نوکاردیا اتیدیکاویاروم و یک ایزوله عدم شناسایی بود(۲۱). طی مطالعه‌ای که توسط عندلیبی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در شمال خراسان ایران انجام شد، از مجموع ۱۱ ایزوله جدا شده، همگی نوکاردیا استروئیدس کمپلکس شناسایی شدند(۲۲) . طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵

توسط بوربور و همکاران در اصفهان صورت گرفت، بر اساس گزارشی از نوکاردیا های ایزوله شده توسط سکانس از میان ۷۰ نمونه خاک که به روش‌های فنوتیپی و سکانس ۱٦S rRNA انجام شد، *N. cyriacigeorgica. N.cummidelens, N. asteroides, N. coubleae* شناسایی شد(۲۰).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تنوع گونه‌های مختلف جنس نوکاردیا بر اساس تست‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی مشاهده شد که با توجه به متنوع بودن پنل آنتی بیوتیکی و اهمیت آن در مبحث درمان، این شناسایی حایز اهمیت می‌باشد . از طرفی ارزیابی دو روش فنوتیپی و PCR در تشخیص ایزوله‌ها، نشان داد که روش‌های مولکولی می‌تواند کمک شایانی در امر تشخیص جنس نوکاردیا داشته باشد.

References

۱. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis review of clinical and laboratory experience. Journal of clinical microbiology. ۲۰۰۳;٤١(١٠):٤٤٩٧-٥٠١.

۲. Saubolle MA. Arobic actinomycetes, ۲۰۰۲. In: Lippincott Wiliams & Wilkins P, Pa, editor. K D McClatchey (ed), Clinical laboratory medicine, ۲nd ed. ۲nd ed. p. p:١٢٠١-٢٠.

۳. Das AK, Nandy S, Dudeja M, Tiwari R, Alam S. The incidence of nocardiosis at pulmonary and extra - pulmonary sites. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR. ۲۰۱۳;۷(۷):١٤٢٧-٩.

٤. McTaggart LR, Doucet J, Witkowska M, Richardson SE. Antimicrobial susceptibility among clinical Nocardia species identified by multilocus sequence analysis. Antimicrobial agents and chemotherapy. ۲۰۱٥;٥٩(١):٢٦٩-٧٥.

٥. Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pepin J. Nocardiosis in Quebec, Canada, ١٩٨٨-٢٠٠٨. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. ۲۰۱۱;۱۷(٥):٦٩٠-٦.

٦. Siamak H, Saeed ES, MohammadReza P, Maryam K, Mehrdad A, Ali A, editors. Molecular detection of Nocardia by Semi-Nested PCR, and compare with culture and biochemical test. The First International Congress of Medical Bacteriology; ۲۰۱۱: Tabtiz university of medical sciences.

۷. Perry HD, Nauheim JS, Donnenfeld ED. Nocardia asteroides keratitis presenting as a persistent epithelial defect. Cornea. ١٩٨٩;٨(١):٤١-٤.

۸. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. Infection. ۲۰۱۰;۳۸(۲):٨٩-٩٧.

۹. Agterof M, Van Der Bruggen T, Tersmette M, Ter Borg E, Van den Bosch J, Biesma D. Nocardiosis: a case series and a mini review of clinical and microbiological features. Neth J Med. ۲۰۰۷;٦٥(٦):١٩٩-٢٠٢.

۱۰. Saubolle MA SD. Nocardiosis review of clinical and laboratory experience. Journal of clinical microbiology. ۲۰۰۳.

۱۱. Yamamura H, Hayakawa M, Iimura Y. Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of Nocardia spp. from soil. Journal of applied microbiology. ۲۰۰۳;۹٥(٤):٦٧٧-٨٥.

۱۲. Imaneh Amini[۱] AT, Atousa Abdollahi[۲], Monir Doudi[۳]. Isolation, molecular identification & anthracene biodegradation of Nocardia cyriacigeorgica isolated from oil refinery soil in Isfahan. ۲۰۱۳.

۱۳. Jamshid Faghri PhD[۱] SB, Sharareh Moghim PhD[۳],, Hajieh Ghasemian Safaei PhD[۱] BNEP, Mohsen Meidani MD[٤],, Mojtaba Akbari[٥] NSH. Isolation and Identification of Nocardia Species from Soil Samples according to Comparison of Three Methods. ۲۰۱۳.

۱٤. Barbara A. Brown-Elliott JMB, ۲ Patricia S. Conville,[۳] and Richard J. Wallace, Jr.[۱]*. Clinical and Laboratory Features of the Nocardia spp. Based on Current Molecular Taxonomy. ۲۰۰٦.

۱٥. Paulo Victor Pereira Baio[۱], ۳, Juliana Nunes Ramos[۱،۲], Louisy Sanches dos Santos[۱], Morgana, Fonseca Soriano[۱] EML, Moˆ nica Cristina Souza,. Molecular Identification of

Nocardia Isolates from Clinical Samples and an Overview of Human Nocardiosis in Brazil. ۲۰۱۳.

۱۶. Patricia S. Conville SHF, Charles P. Cartwright,† and Frank G. Witebsky. Identification of Nocardia Species by Restriction Endonuclease Analysis of an Amplified Portion of the ۱۶S rRNA Gene. ۲۰۰۰

۱۷. Mehdi Fatahi Bafghi SSE, Parvin Heidarieh,۱ Shadi Habibnia, and Masoumeh Rasouli Nasab. DNA Extraction from Nocardia Species for Special Genes Analysis Using PCR. ۲۰۱۶.

۱۸. Eshraghi SS, Heidarzadeh S, Soodbakhsh A, Pourmand M, Ghasemi A, GramiShoar M, et al. Pulmonary nocardiosis associated with cerebral abscess successfully treated by co-trimoxazole: a case report. Folia microbiologica. ۲۰۱٤;٥۹(٤):۲۷۷-۸۱.

۱۹. Bafghi MF, Heidarieh P, Habibnia S, Nasab MR, Neyestanaki DK, Eshraghi SS, et al. Phenotypic and molecular properties of the Nocardia species. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection. ۲۰۱٤;۱(۱).

۲۰. *Bourbour S, Faghri J, Moghim S. Report of Nocardia species isolated from soil by ۱٦S rRNA gene sequencing method in Isfahan, Iran. Biological Journal of Microorganism. ۲۰۱٦; ٤(۱٦).*

۲۱. Masoumeh Rasouli-nasab MSc۱ SHM, Parvin Heidarieh PhD۲,, Mehdi Fatahi-Bafghi۳ MRPP, Seyyed Saeed Eshraghi PhD٥. Identification of Nocardia Species Isolated from Soil Samples of the City of Tehran, Iran, Using Phenotypic Tests. ۲۰۱٤.

۲۲. Fatemeh Andalibi ۱ MFB, Parvin Heidarieh ۳, Masoumeh Rasouli Nasab۲,, Shadi Habibnia ۲ MRP, Seyyed Saeed Eshraghi ۲*. Isolation and Identification of Nocardia spp. Using Phenotypic Methods from Soil Samples of North Khorasan Province. ۲۰۱٥

Identification of biodiversity of *Nocardia* spp. Isolated from clinical samples of the Tehran hospitals using phenotypic and molecular method

ABSTRACT:

Background and objective: *Nocardia* is a germ-positive filamentous bacterium with relative acid-fast properties that ubiquitously exists as an environmental saprophyte. Nocardiosis is usually characterized as an acute or chronic illness associated with pus or granulomatosis, which can cause an aggressive disease both in healthy people and immunosuppressive patients. The aim of this study was to identify the biodiversity of Nocardia species isolated from Tehran hospitals via phenotypic and PCR molecular approaches.

Materials and methods: ۲۰۰ samples were collected from Tehran hospitals. After being separated by paraffin baiting technique, the colonies were evaluated for their growth abilities in liquid lysozyme and at ٤٥°C and based on other biochemical tests via macroscopic examinations and then microscopic gram and relative acid-fast staining practices. Ultimately, we designed a genus-specific primer set and performed the PCR reaction to compare both results.

Results: From the ۲۰۰ samples, ۳۰ samples were identified as positive based on the culture and biochemical tests and molecular method.

Conclusion: Considering the species diversity of *Nocardia* genus and the existence of different conditions for performing phenotypic and biochemical tests, it is very probable that another genus relevant to the actinomycete family be mistakenly identified as *Nocardia*. Thus, molecular methods can provide confirmation of the phenotypic approach.

***Keywords**: Nocardia*, Tehran Hospitals , Phenotypical identification ، Molecular identification

* Corresponding author: Saeed Zakerbostanabad, Biology and Microbiology Department, Islamic Azad University-Parand Branch, Tehran, Iran