Isolation and Identification of *Nocardia* in Suspected Tuberculosis Samples Using Paraffin Baiting Technique

Mehdi Fatahi Bafghi[1], Seyyed Saeed Eshraghi[2*] , Alireza Abdollahi[3], Soroush Negahban[4], Abbas Ashrafi[5], Parvin Heidarieh[6], Masoumeh Rasouli nasab[7],Shadi Habibnia[8], Nadia Mardani[9]

[1]Ph.D candidate , Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[2]Ph.D, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3]MD, Imam Khomeini Hospital, Microbiology laboratory, Tehran, Iran.
[4]B.Sc, Imam Khomeini Hospital, Microbiology laboratory, Tehran, Iran.
[5]M.Sc, Imam Khomeini Hospital, Microbiology laboratory, Tehran, Iran.
[6]PhD , Alborz University of medical Sciences, school of medicine, Department of bacteriology and virology, Karaj, Iran.
[7]M.Sc, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[8]M.Sc, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[9]B.Sc, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Nocardia spp. is obligate aerobic filamentous bacilli, gram-positive, partially acid-fast, and non-motile bacteria. The genus *Nocardia* can cause infection in different parts of the body, especially the respiratory tract. The clinical signs of nocardiosis are similar to those of tuberculosis. The present study aimed to investigate the prevalence of *Nocardia* in sputum and bronchoalveolar lavage samples from the patients with suspected pulmonary tuberculosis using paraffin baiting Technique. In the current study, 250 samples of sputum and bronchoalveolar lavage from the patients with suspected tuberculosis were assessed using paraffin baiting technique. After collecting the samples, some microscopic slides were prepared for different types of staining and the rest of the samples were cultured in carbon-free broth containing paraffin rods and were then incubated at 35°C. The paraffin rods were checked regularly and the suspected colonies were tested for different specific phenotypic test, particularly growth in lysozyme broth.

No organisms were detected in the prepared smears. However, according to the results of the culture, two samples were isolated from the sputum. Moreover, staining the colonies by common and specific stains revealed gram positive, partially acid fast, and negative acid fast bacteria. In addition, *Nocardia* was confirmed by growth of the isolates in the lysozyme medium. Identification of *Nocardia* should be taken in to account while examination of the patients suspected to pulmonary tuberculosis.

Keywords: BAL, Mycobacterium tuberculosis, *Nocardia*, Paraffin Bating Technique, Sputum

Sadra Med Sci J 2014; 2(2): 207-212
Received: Des. 6th, 2013
Accepted: Mar. 7th, 2014

* 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

مجـــــله علمی علـــــوم پزشکی صدرا
دوره ۲، شماره ۲، بهار ۱۳۹۳، صفحات ۲۰۷ تا ۲۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۶ تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۱۵

مقاله کوتاه
(Short Communication)

جداسازی و شناسایی نوکاردیا در نمونه های مشکوک به سل ریوی با استفاده از تکنیک پارافین بایتینگ

مهدی فتاحی بافقی[۱]، سید سعید اشراقی[۲*]، علی رضا عبدالهی[۳]، سروش نگهبان[۴]، عباس اشرفی[۵]، پروین حیدریه [۶]، معصومه رسولی نسب[۷] ، شادی حبیب نیا [۸]، نادیا مردانی[۹]

[۱]دانشگاه علوم پزشکی تهران،دانشکده بهداشت،گروه پاتوبیولوژی، بخش باکتری شناسی، دانشجوی دکتری باکتری شناسی
[۲]دانشگاه علوم پزشکی تهران،دانشکده بهداشت،گروه پاتوبیولوژی، بخش باکتری شناسی، دانشیار میکروب شناسی
[۳]مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره)، آزمایشگاه حضرت ولی عصر(عج)، متخصص پاتولوژی
[۴]مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره)، آزمایشگاه حضرت ولی عصر(عج)، کارشناسی علوم ازمایشگاهی
[۵]مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره)، آزمایشگاه حضرت ولی عصر(عج)، کارشناسی ارشد میکروب شناسی
[۶]دانشگاه علوم پزشکی البرز، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی شناسی – استاد یار میکروب شناسی
[۷]دانشگاه علوم پزشکی تهران،دانشکده بهداشت،گروه پاتوبیولوژی، بخش باکتری شناسی، کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی
[۸]دانشگاه علوم پزشکی تهران،دانشکده بهداشت،گروه پاتوبیولوژی، بخش باکتری شناسی، کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی
[۹]دانشگاه علوم پزشکی تهران،دانشکده بهداشت،گروه پاتوبیولوژی

چکیده

نوکاردیا باسیل گرم مثبت هوازی بوده که یکی از مکان‌های اصلی عفونت توسط آن، بافت ریه می‌باشد. این باکتری علائم بالینی مشابه به عفونت ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را بوجود می‌آورد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی شیوع نوکاردیا در نمونه‌های خلط و مایع حاصل از شستشوی ریه در افراد مشکوک به سل ریوی با استفاده از تکنیک پارافین بایتینگ بود. در این بررسی ۲۵۰ نمونه خلط و مایع حاصل از شستشوی ریه از افراد مشکوک به سل ریوی با استفاده از تکنیک پارافین بایتینگ مورد بررسی قرار گرفت. بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها، ابتدا چندین لام میکروسکوپی جهت چند نوع رنگ آمیزی تهیه و بقیه نمونه‌ها در لوله حاوی کربن فری براث حاوی میله پارافینی کشت و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. میله‌های پارافینی بطور منظم مورد بررسی قرار گرفته و ایزوله‌های مشکوک با تست‌های مختلف فنوتیپیک بخصوص رشد در محیط لیزوزیم براث مورد بررسی قرار گرفتند. در اسمیرهای تهیه شده، هیچ ارگانیسمی مشاهده نشد درصورتیکه در نتایج حاصل از کشت، ۲ ایزوله از خلط بیماران جداسازی گردید. در رنگ‌آمیزی کلنی با رنگ‌های رایج و اختصاصی، باکتری گرم مثبت، پارشیال اسید فاست مثبت و اسید فاست منفی مشاهده گردید و با رشد ایزوله‌ها در محیط لیزوزیم براث باکتری نوکاردیا تایید گردید. در بررسی بیماران مشکوک به سل ریوی، باید شناسایی نوکاردیا نیز مد نظر قرار داده شود.

واژگان کلیدی: نوکاردیا، BAL ، تکنیک پارافین بایتینگ، خلط ، سل

[*]نویسنده مسئول: **سید سعید اشراقی**، تهران، خیابان قدس، خیابان پورسینا، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، eshraghs@tums.ac.ir

مقدمه

جنس نوکاردیا (Nocardia) به خانواده نوکاردیاسه تعلق داشته و اولین بار توسط ادموند نوکارد در سال ۱۸۸۸ گزارش گردید(۱). این باکتری در افراد سالم و به خصوص در افراد دارای نقص سیستم ایمنی، بیماری نوکاردیوزیس ایجاد می‌نماید. سالانه تقریباً ۱۰۰۰ مورد عفونت با منشأ نوکاردیا در امریکا گزارش می‌گردد(۲). نوکاردیا باسیل هوازی اجباری، رشته‌ای، کاتالاز مثبت، پارشیال اسید فاست بوده(۳-۵) و در خاک، شن، گرد و غبار و استخرهای شنا و مواد گیاهی در حال فساد یافت می‌شود(۱, ۶). نوکاردیا فلور نرمال انسان و حیوانات نمی‌باشد و انتقال این باکتری از انسان به انسان گزارش نگردیده است(۴). نوکاردیا بیماری های مختلفی در انسان، حیوانات وگیاهان ایجاد می‌کند(۵). این باکتری عامل عفونت در قسمت‌های مختلف بدن می‌باشد اما بیشتر از ریه و پوست و کمتر از سایر قسمت‌های بدن مانند سیستم عصبی-مرکزی (central nervous system) و عفونت‌های وابسته به کاتتر جداسازی شده است(۷ , ۸). از آنجائیکه گاهی در بیماری‌های مزمن ریوی نشا نه‌های بالینی و عکس‌های رادیولوژی بسیار به هم شبیه بوده، بنابراین تشخیص قطعی و درمان را با مشکل مواجه می‌سازد(۹). میزبان در اثر استنشاق آئروسل‌های حاوی نوکاردیا، مستعد نوکاردیوزیس ریوی می‌شود. جنس نوکاردیا معمولا با ایجاد آبسه‌های متاستاتیک در دستگاه تنفسی باعث سیستمیک شدن بیماری می‌شود.(۱۰). عفونت ناشی از جنس نوکاردیا در ۸۰-۹۰ درصد موارد به صورت عفونت ریوی خود را نشان می‌دهد ولی در بقیه موارد، گسترش عفونت به اندام‌های دیگر به خصوص سیستم عصبی مرکزی و پوست دیده می‌شود(۱۱). بیماری ریوی شایع‌ترین حالت در افراد ایمنو ساپرسیو بوده و تقریبا یک سوم بیماری‌های منتشره را تشکیل می دهد. نوکاردیوزیس پوستی به طور مکرر در بیماران بدون نقص ایمنی که از طریق تلقیح ارگانیسم صورت می‌گیرد، گزارش شده است. تشخیص عفونت‌های نوکاردیایی بسیار پیچیده و نشانه ها و علائم کلینیکی برای این باکتری اختصاصی نمی‌باشد، لذا یکی از ابزارهای استاندارد در تشخیص عفونت‌های نوکاردیایی کشت و جداسازی ارگانیسم و استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و پارشیال اسید فاست می‌باشد(۶ , ۱۲-۱۴). رشد آهسته نوکاردیا و آلودگی نمونه های حاوی آن با سایر میکروارگانیسم های سریع رشد، جداسازی آن را با مشکلات جدی روبرو کرده است و لذا بهینه‌سازی روش های جداسازی از نمونه‌های مختلف بالینی در دنیا در حال افزایش است(۱۵).گزارش‌های متعددی از کاربرد قابل قبول روش پارافین بایتینگ در جداسازی نوکاردیا آستروئیدس از نمونه‌های کلینیکی که با میکروفلور مختلف میکروبی آلوده بودند، وجود دارد(۱۶). به دلیل افزایش موارد نوکاردیوزیس در نمونه‌های مختلف بالینی خصوصا نمونه‌های ریوی، ما را بر آن داشت تا با استفاده از این روش، به جداسازی و شناسایی این باکتری در نمونه‌های خلط و مایع حاصل از شستشوی ریه (BAL, Bronchoalveolar Lavage) در بیماران مشکوک به سل ریوی بپردازیم.

مواد و روش

در این مطالعه ۲۵۰ نمونه خلط و BAL از افراد مشکوک به سل ریوی بستری شده در مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره)-آزمایشگاه مرکزی- تهران طی ماه های مهر تا اسفند ماه سال ۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا نمونه‌ها هموژن شده و بعد از سانتریفیوژ در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، از رسوب آنها جهت بررسی میکروسکوپی لام تهیه و در ادامه کشت انجام گردید. مواد لازم برای تهیه محیط کشت پارافین بایتینگ (carbon-free broth) که توسط Mishra and Randhawa معرفی شد، در جدول شماره ۱ ذکر گردیده است(۱۷). مقدار دو میلی لیتر از نمونه

خلط و رسوب حاصل از BAL را به لوله حاوی کربن فری براث اضافه (۱۷) سپس میله آغشته به پارافین را داخل لوله قرار داده آنگاه لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ هفته انکوبه گردیدند. هر چند روز در میان میله‌های پارافینی از نظر وجود نوکاردیا مورد بررسی قرار گرفتند . ظهور کلنی‌هایی مشکوک به نوکاردیا بر روی میله پارافینی نشانه مثبت بودن نمونه‌ها در نظر گرفته شد. در ادامه کلنی‌ها از روی میله پارافینی بر روی محیط‌های نوترینت آگار و سابرودکستروز آگار تلقیح شدند. چنانچه کلنی‌های رشد یافته سفید گچی بودند مشکوک به نوکاردیا تلقی شده، جداسازی و مورد بررسی قرارگرفتند. ایزوله‌های جدا سازی شده با رنگ آمیزی گرم، پارشیال اسید فاست واسید فاست رنگ آمیزی شده و در محیط لیزوزیم براث کشت داده شدند.

جدول ۱: مواد لازم برای تهیه محیط Carbon-free broth

$NaNO_3$	2 g
$ZnSO_4$	2 mg
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0.5 g
K_2HPO_4	0.8 g
$FeCl_3$	10 mg
$MnCl_2.\ 4H_2O$	8 mg
Distilled water	1 lit

یافته‌ها

در بررسی نمونه خلط و BAL از افراد مشکوک به سل ریوی، ۲ نمونه از کشت خلط، مثبت تشخیص داده شد. در بررسی مستقیم میکروسکوپی در رنگ آمیزی های گرم، پارشیال اسید فاست و اسید فاست، باکتری مشکوک به نوکاردیا مشاهده نگردید درحالیکه از این تعداد، ۲ نمونه بر روی میله پارافینی رشد نمود. بعد از مرحله کشت، کلنی‌های مثبت با روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی مورد بررسی قرار گرفتند که نمونه‌ها در رنگ‌آمیزی های گرم، پارشیال اسید فاست و اسید فاست به ترتیب مثبت، مثبت و منفی تشخیص داده شدند. در ضمن نمونه‌ها در محیط لیزوزیم براث رشد نمودند که یکی از ویژگی های جنس نوکاردیا می‌باشد.

بحث

در بررسی‌های انجام شده، تکنیک پارافین بایتینگ برای جداسازی نوکاردیا از نمونه‌های مختلف بالینی بسیار موثر بوده است. در یک مطالعه توسط شوار(Shawar) و همکاران برای جداسازی نوکاردیا از نمونه‌های مختلف بالینی، تکنیک پارافین بایتینگ، با محیط‌های کشت مختلف مقایسه گردید که این تکنیک نسبت به محیط‌های دیگر مانند نوترینت آگار، سابورو دکستروز آگار، سابورو دکستروز آگار با سیکلوهگزامید، ژلاتین آگار و اوره آگار برای جداسازی نوکاردیا مناسب تر و موثر تر بوده است(۱۷, ۱۸). در بررسی دیگری که توسط میشرا (Mishra) و همکاران انجام شد ۵۵۵ نمونه بالینی شامل خلط، BAL و شستشوی معده مورد بررسی قرار گرفت که ۱۰ نمونه خلط، ۱ نمونه BAL و یک نمونه شستشوی معده نوکاردیای خالص جداسازی گردید. این بررسی همچنین نشان داد که جداسازی نوکاردیا در آزمایشگاه‌های بالینی بر اساس محیط‌های معمول به دلیل داشتن آلودگی با میکروفلور خصوصاً در مورد نمونه های کلینیکی خلط یک مشکل اساسی می‌باشد. این میکرو فلورها رشد سریعی نسبت به نوکاردیا داشته و جداسازی این باکتری را با مشکل اساسی مواجه می‌نمایند. مکانیسم موفقیت روش پارافین بایتینگ به این دلیل است که جنس نوکاردیا پارافین را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی مورد استفاده قرار می‌دهد. این تکنیک خاص بر تعداد زیادی از آلودگی‌های معمول میکروبی چیره شده در نتیجه آنها نمی‌توانند از پارافین به عنوان منبع کربن استفاده کنند(۱۶). در بررسی توسط راندهوا (Randhawa) و همکاران ۱۵۱۰ نمونه خلط از ۱۰۱۶ بیمار مبتلا به اختلالات ریوی مورد بررسی قرار گرفت که ۶۷ نمونه با تکنیک پارافین بایتینگ

ایزوله گردید که در مقایسه با محیط‌های کشت معمول ۳۰ نمونه مثبت تشخیص داده شد(۱۷). در بررسی دیگری ۳۵۰ نمونه خلط، BAL، مایع پلور، چرک و بیوپسی مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد، ۱۵ نمونه مثبت جداسازی گردید(۱۹). در مطالعه دیگر توسط گوگنانی(Gugnani) و همکاران، ۶۰۰ نمونه BAL با استفاده از پارافین بایتینگ و گلوکز نوترینت آگار مورد بررسی قرار گرفت که تکنیک پارافین بایتینگ در جداسازی این باکتری موثرتر گزارش گردید (۲۰). در مطالعه حاضر ۲۵۰ نمونه خلط و BAL از افراد مشکوک به سل ریوی با استفاده از تکنیک پارافین بایتینگ مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد، با توجه به رنگ آمیزی ها و محیط کشت لیزوزیم براث، ۲ نمونه مثبت گزارش شد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه علائم بالینی ایجاد شده در بیماران مبتلا به نوکاردیوزیس ریوی مشابه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد باید بیماران مشکوک به سل ریوی از نظر وجود این ارگانیسم مورد بررسی قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

در پایان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران در حمایت مالی این پروژه کمال تشکر و قدردانی را داریم. در ضمن از پرسنل بخش میکروب شناسی آزمایشگاه ولی عصر(عج) مجتمع بیمارستان امام خمینی(ره) در همکاری با این پروژه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1- Manikandan P, Bhaskar M, Revathi R, Anita R, Abarna Lakshmi LR, Narendran V. Isolation and antimicrobial susceptibility pattern of Nocardia among people with culture-proven ocular infections attending a tertiary care eye hospital in Tamilnadu, South India. Eye 2007;21(8):1102-1108.

2- Toukap AN, Hainaut P, Moreau M, Pieters T, Noirhomme P, Gigi J. Nocardiosis: a rare cause of pleuropulmonary disease in the immunocompromised host. Acta clinica Belgica 1996; 51(3): 161.

3- Bafghi MF, Eshraghi SS, Heidarieh P, Habibnia S, Rasouli-Nasab M. Nocardiosis in immune disorder disease. Malays J Med Sci.Jan-Feb 2014; 21(1): 75-76.

4- Srifuengfung S, Poonwan N, Srifuengfung S, Poonwan N, Tribuddharat C, Chokephaibulkit K. Prevalence of Nocardia species isolated from patients with respiratory tract infections at siriraj hospital, Thailand. J Infect Dis Antimicrob Agents 24, 1-6.

5- Bose B, Balzarini M. Diagnosis and Treatment of Nocardial Brain Abscess. Neurosurg Q 2002; 12(2): 182-193.

6- Alfaresi M, Elkosh A. Rapid identification of clinically relevant Nocardia species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. J Med Microbiol 2006;55(12):1711-1715.

7- Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr. Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev 2006; 19(2): 259-282.

8- Akasaka E, Ikoma N, Mabuchi T, Tamiya S, Matuyama T, Ozawa A, et al. A novel case of nocardiosis with skin lesion due to Nocardia araoensis. J Dermatol 2011; 38(7): 702-706.

9- Black CM, Palieschekey M, Beaman BL, Donovan RM, Goldstein E.

Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockage by Nocardia asteroides. J Infect Dis 1986; 154(6): 952-958.

10- Eshraghi SS, Amin GR, Otari A. Evalution of antibacterial properties and review of 10 medical herbs on preventing the growth of pathogenic Nocardia species. Journal of Medicinal Plants 2009;8(32):61-78. [Persian]

11- Abtahi H, Saffari M, Jourabchi A, Rafiei M. Pulmonary Nocardiosis and its related factors in patients with pulmonary infection in Arak. Feyz Journals of Kashan University of Medical Sciences 2003; 7(3). [Persian]

12- Gupta N, Srinivasan R, Kumar R, Chakrabarti A. Two cases of nocardiosis diagnosed by fine-needle aspiration cytology: Role of special stains. Diagnostic Cytopathology 2011; 39(5): 363-364.

13- Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. Infection 2010; 38(2): 89-97.

14- Wada R, Itabashi C, Nakayama Y, Ono Y, Murakami C, Yagihashi S. Chronic granulomatous pleuritis caused by nocardia: PCR based diagnosis by nocardial 16S rDNA in pathological specimens. J Clin Pathol 2003; 56(12): 966-969.

15- Mishra S, Randhawa H, Sandhu R. Observations on paraffin baiting as a laboratory diagnostic procedure in nocardiosis. Mycopathologia 1973; 51(2): p. 147-157.

16- Mishra S, Randhawa H. Application of paraffin bait technique to the isolation of Nocardia asteroides from clinical specimens. Applied microbiology 1969; 18(4): 686-687.

17- Singh, M, Sandhu RS, H.S. Randhawa. Comparison of paraffin baiting and conventional culture techniques for isolation of Nocardia asteroides from sputum. J Clin Microbiol 1987;25(1):176-177.

18- Shawar, R.M., D.G. Moore, and M.T. LaRocco. Cultivation of Nocardia spp. on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens. J Clin Microbiol 1990;28(3):508-512.

19- Pankajalakshmi VV, Taralakshmi VV, Subramanian S, Arumugam S. Nocardia species from bronchopulmonary infections and mycetomas. Med Mycol 1980;18(1):11-18.

20- Gugnani, H., I. Unaogu, and C. Emeruwa. Incidence of pulmonary infection due to Nocardia. species in Nigeria. Mycoses 1991;34(7-8):359-361.