جدا سازی نوکاردیا از بیماران ریوی بااستفاده از محیط اختصاصی پارافین

دکترپریوش کردبچه [۱] ، دکترساسان صابر [۲] ، پرویزتوکل [۳]

واژه های کلیدی : *نوکاردیا، نوکاردیوزیس ریوی ، محیط پارافین*

چکیده

درطی ۱۷ ماه از تاریخ ۶۹/۶/۱ لغایت ۱۳۷۰/۱۱/۱ تعداد ۱۷۰ بیمار در بخش ریه بیمارستان دکترشریعتی تهران از نظرابتلاء به نوکاردیوزیس ریوی مورد مطالعه قرارگرفتند. ازاین تعداد در ۵ مورد نوکارديا‌آستروئیدس (۲ مورد از خلط، ۲ مورد ازترشحات پلور و یک مورد از شستشوی برنش) جداگردید. روش اصلی برای جداکردن نوکاردیا استفاده از محیط کشت انتخابی پارافین آگار بود.این محیط از رشد ارگانیسمهای دیگر و مخمرها جلوگیری می کند و روشی ساده ، ارزان ومطمئن جهت جداکردن نوکاردیا از نمونه های بالینی آلوده ، بخصوص در بیماران با اختلال ایمنی میباشد.

۱- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- بخش ریه بیمارستان شریعتی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

سرآغاز

نوکاردیوزیس یک عفونت باکتریال تحت حاد یا مزمن چرکی است که باپنومونی و انتشار خونی (بخصوص به سیستم اعصاب مرکزی) مشخص میگردد. این عفونت ممکن است درافراد سالم یاکسانیکه بیماری مزمن ریه دارند دیده شود. ولی در بیماران با اختلال ایمنی (CMI) حادتربوده و سیرسریعتری دارد (۶).

عامل اتیولوژیک بیماری اکثراً نوکاردیا آستروئیدس میباشد که یک آکتینومیست گرم مثبت و هوازی خاک بوده و بصورت ضعیف و پارسیل اسیدفست میباشد (۴).

این ارگانیسم گاهی بصورت ساپروفیت از خلط افرادیکه هیچ نوع علائم بالینی نوکاردیوزیس راندارند جداشده است. بنابراین درنظرگرفتن علائم بالینی و بیماریهای زمینه ای بیمار در تفسیر ارگانیسم جداشده اهمیت دارد (۷). این ارگانیسم بطورمکرر از کشورمان در بیماران با حالتهای بالینی مختلف جدا و گزارش شده است (۹,۷,۵,۴,۳,۲,۱).

نوکاردیاآستروئیدس در روی بیشترمحیط های استاندارد آزمایشگاهی رشدمیکند ولی رشد آن کند بوده و ۳-۷ روز طول میکشد. دراین صورت باکتریهای دیگر(بخصوص اگر نمونه خلط باشد) روی محیط رامپوشانند ومانع تشخیص این ارگانیسم میگردند. بهمین علت از محیط های مورداستفاده برای مایکوباکتریها وقارچ استفاده میکنند(۶).

اخیراً محیط تایرمارتین (Thayer Martin) مدیفیه بعنوان یک محیط برای جداکردن گونه نوکاردیا از خلط پیشنهادشده است . روش دیگر استفاده ازانکوباسیون محیط کشت در ۵۰-۴۰ درجه سانتیگراد است که ممکن است رشد فلور آلوده کننده راکاهش دهد. محیط پارافین برای جداکردن نوکاردیا آستروئیدس از خاک بکرات بکاررفته و درضمن با موفقیت برای جداکردن این ارگانیسم ازنمونه های بالینی مورداستفاده قرارگرفته است واخیراً نشان داده شده است که این محیط درمقایسه با تکنیک های متداول کشت نتایج بهتری را دارد (۱۲,۱۰).

موفقیت بیشتر دراستفاده از پارافین (برای جداکردن نوکاردیا از خلط مربوط به توانائی این ارگانیسم درتجزیه پارافین است . درحقیقت نوکاردیا با متابولیزه کردن منابع ساده کربن و نیتروژن مثل اوره ، ژلاتین و پارافین بهتر رشد میکند (۱۳).

باتوجه به افزایش اخیر موارد نوکاردیوزیس سیستمیک بخصوص دربیماران با اختلال ایمنی از جمله در« مبتلایان به ایدز» اهمیت استفاده ازاین روش مشخص تر میشود زیرا نوکاردیوزیس میتواند بصورت یک بیماری خطرناک و منتشر بخصوص باگرفتاری مغزی تظاهرنماید. باتوجه به آنکه تشخیص صحیح و درمان بموقع ممکن است بتواند از انتشار عفونت و عوارض بعدی آن جلوگیری نماید وبعلت آنکه هنوز تستهای سرولوژیک قابل اطمینان و قابل دسترس برای این عفونت وجود نداشته و تشخیص اکثراً ازطریق انجام آزمایش مستقیم و کشت صورت میگیرد مسلماً استفاده از روشی که بتواند نتایج بهتری را بدهد میتواند

درتشخیص صحیح بیماری و نجات جان بیماران کمک کننده باشد.

نمونه گیری و روش بررسی

در این بررسی بطور کلی بیمارانیکه اندیکاسیون برونکوسکوپی داشتند مورد مطالعه قرار گرفته اند و اکثراً افرادی بودند که بیماری مزمن ریوی ، هموپتیزی ، علائم ریوی با رادیوگرافی نامشخص و یامشکوک به کانسر ریه داشتند. نمونه های مورد آزمایش ، خلط ، مایع حاصل از شستشوی برنش و مایع پلور بود. در مواردیکه خلط مورد آزمایش قرارمیگرفت به یک سی سی از نمونه مذکور ۹ سی سی سرم فیزیولوژی و تعدادی گلوله شیشه ای استریل اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه جهت هموژنیزه کردن نمونه روی شیکر قرارمیگرفت . لازم به ذکراست که نمونه برنش و مایع پلور احتیاج به هموژنیزه کردن ندارد.

اقدام بعدی سانتریفوژ کردن نمونه بود (بمدت ۱۰دقیقه بادور۱۵۰۰ دردقیقه) که این عمل جهت تغلیظ ارگانیسم صورت گرفته ، محلول روئی دور ریخته شده و رسوب مورد آزمایش قرارمیگرفت . دراین بررسی از مواد موکولیتیک بعلت آنکه ممکن است اثر سمی روی نوکاردیا داشته باشد استفاده نشد جهت انجام آزمایش مستقیم ازنمونه مورد نظر گسترش نازک تهیه شده با روش گرم وکاینیون رنگ آمیزی میگردید.کشت روی محیط انتخابی پارافین آگار صورت میگرفت .

جهت تهیه محیط کشت ترکیبات بدون کربن بعنوان محیط پایه بشرح زیر تهیه شده و پارافین بعنوان سوبسترایا تنها منبع کرین اضافه گردید.

Mg So4, $7H_2O$	50 mg	K2HPO4	1gr
Fe So4	50 mg	KH2Po4	3gr
Zn So4	50 mg	NH4NO3	1gr
Mn So4	50 mg	NH4C1	5gr

و یک لیتر آب مقطر که تمام املاح فوق درآن حل شده و PH نهائی ۷/۲ بود که با HCL یا NaoH تنظیم میشد. PH میبایست قبل از ریختن آگار تنظیم شود، ۱۷ گرم آگار درمحلول فوق حل میگردید(۵). ۹ قسمت ازمحیط بدون کربن فوق با یک قسمت روغن پارافین مخلوط شده و سپس در اتوکلاواستریل میشد (قبل از ریختن محیط کشت در داخل پلیت یا لوله آزمایش باید با مخلوط کن مغناطیسی جهت خوب پخش شدن پارافین آن مخلوط گردد) بعدازکشت تا یک هفته محیط ها در ۳۷ درجه ازنظر رشد نوکاردیا مورد بررسی قرارمیگرفت . از

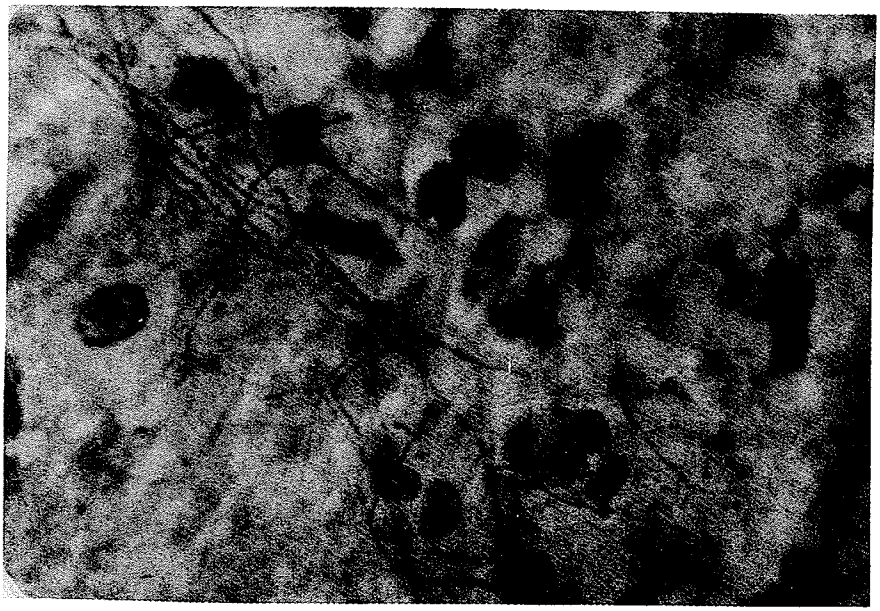
محیط های افتراقی کازئین ، تیروزین گزانتین و ژلاتین جهت تعیین نوع نوکاردیا استفاده میگردید.

یافته ها

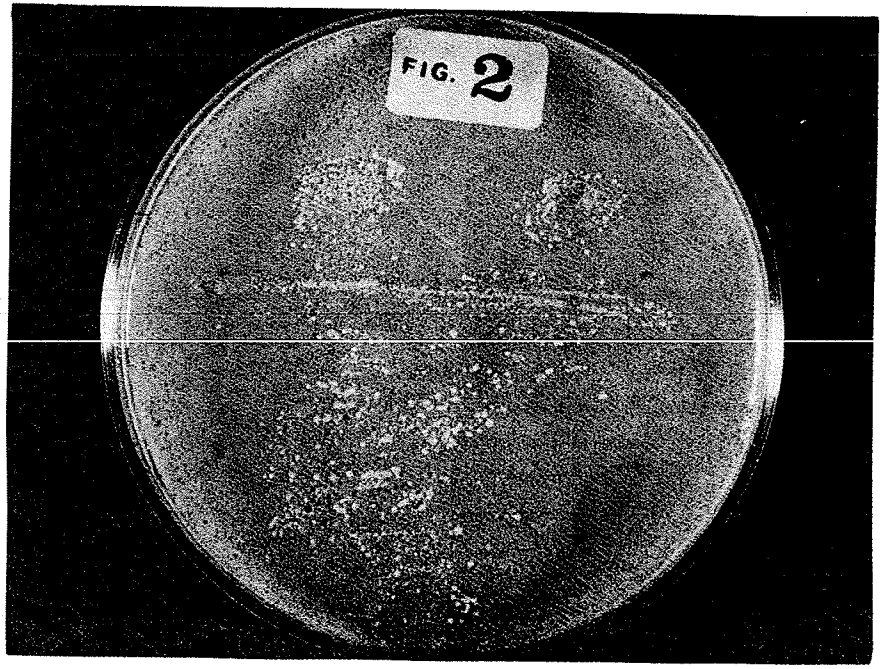
دراین بررسی ۱۷۰ بیمار با علائم ریوی مورد بررسی قرارگرفتند که ازاین تعداد در ۵ مورد (یک مورد از نمونه شستشوی برنش ، ۲ مورد از خلط، ۲ مورد از ترشحات پلور) نوکاردیا جداگردید. ارگانیسم در آزمایش مستقیم و رنگ آمیزی به روش کاینیون بصورت رشته های نازک و منشعب اسیدفست دیده شد (نگاره شماره ۱) .

درمحیط کشت انتخابی پارافین آگار کلنی های خالص کرمی ، صاف و قدری برجسته رشد نمود که دربعضی موارد رنگ کلنی متمایل به زرد بود (نگاره شماره ۲) بااستفاده از محیط های افتراقی کازئین ، تیروزین ،گزانتین و ژلاتین درهر ۵ مورد نوکاردیا آستروئیدس تشخیص داده شد (شترنگه شماره ۱).

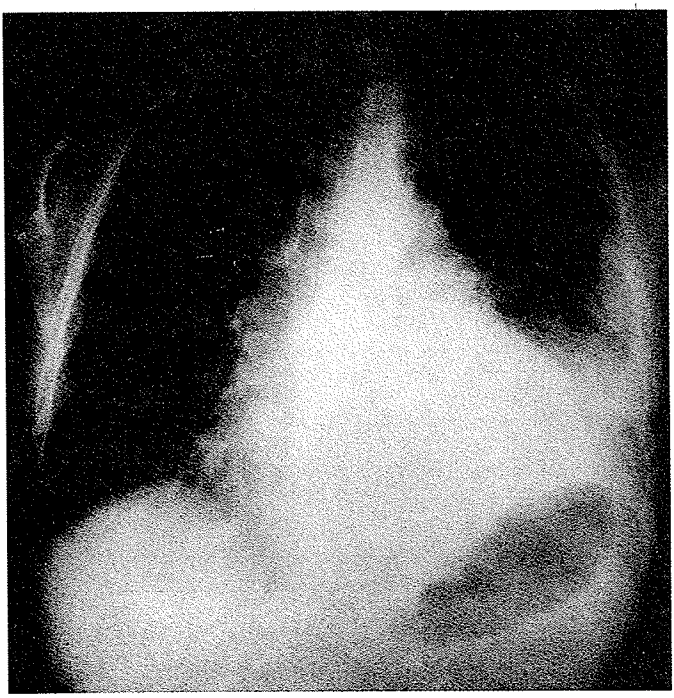
از ۵ بیمارمذکور ۴ نفر مرد و یک نفرزن بودند که درگروه سنی ۶۴-۲۸ سال قرارداشتند . تمامی این بیماران دارای بیماری زمینه ای (سندرم بهجت ، سندرم نفروتیک ، لنفوبلاستیک لمفوما و پیوند کلیه) بوده وتحت درمان با داروهای ایمونوساپرسیو و سیتوتوکسین قرارداشتند (شترنگه شماره ۲) مهمترین علائم بالینی بیماران تب ،سرفه ، خلط و تنگی نفس بوده و علائمی از گرفتاری مغزی یا گرفتاری سایرارگانها را ازنظربالینی نداشته و در رادیوگرافی ریه تصاویر مختلف و غیراختصاصی مانند انفیلتراسیون منتشر، تراکم لوبروپلورال افیوژن (نگاره شماره ۳) جلب توجه مینمود. در آزمایشات روتین بعمل آمده افزایش شمارش گلبول های سفیدخون (بیش از ۱۰ هزار) باتعداد بالای نوتروفیل مشاهده شده و درسه مورد سلولهای بانـد یعنی رده جوان نوتروفیل بین ۲۱ - ۵ درصد بوده و سدیمانتاسیون بیمـاران بالا (۱۱۵-۵۰ میلیمتر درساعت اول) بود. هر ۵ بیمار تحت درمان با کوتریموکسازول با دوز ۴ قرص روزانه بمدت یکماه قرارگرفته وبا حال عمومی خوب و بهبود علائم بالینی و رادیولوژیک با ادامه درمان مرخص گردیدند.



نگاره ۱ - فیلامانهای نازک اسیدفست نوکاردیا درگسترش خلط رنگ شده باروش کاینیو



نگارَه ۲ - کلنی های نوکاردیا درمحیط پارافین آگار



نگاره ۳ - پلورال افیوژن ریه چپ در بیمارمبتلا به نوکاردیوزیس ریوی

شترنگه ۱ - نتایج تست های فیزیولوژیک درسوشهای جداشده نوکاردیا ازبیماران

نوکاردیای جداشده از بیماران	کازئین	تیروزین	گزانتین	ژلاتین	اسیدفست
مورد شماره ۱	-	-	-	-	+
مورد شماره ۲	-	-	-	-	+
مورد شماره ۳	-	-	-	-	+
مورد شماره ۴	-	-	-	-	+
مورد شماره ۵	-	-	-	-	+

شترنگه ۲ - مشخصات بیماران مبتلا به نوکاردیوزیس ریوی دربخش ریه بیمارستان شریعتی تهران سال۷۰-۶۹

شماره	سن	جنس	بیماری زمینه ای	داروهای دریافتی	رادیوگرافی ریه	نمونه موردآزمایش
۱	۲۸	مرد	دیابت + سندرم بهجت	انسولین+ پردنیزولون	انفیلتراسیون شدیددوطرفه + کاویته های متعدد	مایع پلور
۲	۶۴	زن	سندرم نفروتیک	آندوکسان + پردنیزولون	پلورال افیوژن ریه چپ	مایع پلور
۳	۴۰	مرد	سندرم بهجت	آندوکسان + پردنیزولون	تراکم قاعده ریه راست کاویته درریه چپ و لوب فوقانی ریه راست	شستشوی برنش
۴	۶۳	مرد	لنفوبلاستیک لمفوما	وینکریستین + پردنیزولون + اشعه درمانی	تراکم غیرهموژن درهردوریه + سطح مایع و هوا درریه راست	خلط
۵	۳۹	مرد	پیوند کلیه	پردنیزولون + آزاتیوپیرین + سایکلوسپورین	کاویته درلوب میانی ریه راست	خلط

گفتگـو و بهره گیری پایانی

اسپس نوکاردیا آکتینومیستهای هوازی ، رشته ای ، گرم مثبت و بصورت پارسیل اسیدفست هستند که ایجاد عفونت تنفسی و منتشر دربیماران با اختلال ایمنی (ازجمله درمبتلایان به ایدز) مینمایند.بعلاوه چندین گزارش نشان دهنده بروزاین بیماری درافراد سالم (بدون بیماری قبلی یازمینه مساعد) بوده است (۱۲).

محیط پارافین درسال ۱۹۳۶ توسط Gordon و Hagan جهت جداکردن نوکاردیا آستروئیدس (عامل اتیولوژیک اصلی نوکاردیوزیس) از خاک ابداع شد و درسال ۱۹۶۰ توسط McClung کامل گردید (۱۳). این تکنیک باموفقیت برای جدا کردن نوکاردیا آستروئیدس از نمونه های بالینی استفاده میشود (۱۲).

باتوجه به افزایش اخیر موارد نوکاردیوزیس سیستمیک بخصوص درمیزبان با اختلال ایمنی ازجمله درمبتلایان به ایدزاهمیت استفاده ازاین روش مشخص ترمیگردد. دریک مطالعه ۱۵۱۰ نمونه خلط از ۱۰۱۶ بیمار با بیمار ریوی مورد آزمایش قرارگرفت . بااستفاده از محیط پارافین نوکاردیا از ۶۷ نمونه جداشد. درحالیکه بااستفاده ازتکنیک متداول کشت برروی محیط سابورو تنها در ۳۰ مورد نوکاردیا مشاهده گردید. زمان متوسط برای رشد نوکاردیا درروی محیط پارافین ۱۰ روز بود (۱۳)موفقیت بیشتر دراستفاده از محیط پارافین بطوراولیه مربوطه به توانائی اسپس نوکاردیا درتجزیه پارافین میباشد ، این ارگانیسم میتواند بخوبی بامتابولیزه کردن منابع نسبتاً ساده کربن و نیتروژن مثل اوره ، ژلاتین ، پارافین رشد کند (۱۱).

مطالعه دیگری بمنظور بررسی توانائی رشد اسپس نوکاردیا برروی محیط آگار حاوی پارافین و مشخص شدن انتخابی بودن این محیط برای جداکردن نوکاردیا آستروئیدس از خلط صورت گرفته است. دراین مطالعه ۵۵ نمونه خلط که بطور راندوم انتخاب شده بود برروی محیط آگار خوندار(BA) و پارافین آگار(PA) کشت شدند. دراین بررسی نشان داده شد که محیط حاوی پارافین (بعنوان تنها منبع کربن) برای رشد اسپس نوکاردیا بسیارمناسب است. زیرا پارافین رشد سایر ارگانیسمها را جلوگیری کرده وکیفیت رشد اسپس نوکاردیا در روی محیط حاوی پارافین برابر یا بهتر از رشد آن برروی محیط های غنی میباشد (۸,۱۲).درمطالعه ای که باانجام دادیم نیز ازمحیط پارافین جهت جداکردن نوکاردیا ازخلط و سایر نمونه های بالینی در بیماران مبتلا به ضایعات ریوی که تحت برونکوسکپی قرارمیگرفتند استفاده شده در ۵ مورد نوکاردیا جداگردید. نوکاردیای جداشده در روی محیط پارافین دارای کلنی های کرمی ، صاف و قدری برجسته برنگ متمایل به زرد بوده و زمان متوسط برای رشد کلنی ها ۳-۷ روز بود.

بعدازاستفاده از محیط های افتراقی کازئین ، تیروزین ، گزانتین و ژلاتین جهت تعیین نوع نوکاردیا درهر ۵ موردارگانیسم جدا شده نوکاردیا آستروئیدس بود. باتوجه به مطالعات

انجام شده بنظر میرسد که محیط پارافین بدلیل ارزان بودن جلوگیری از رشد ارگانیسمهای دیگر و کیفیت بهتر رشد نوکاردیا در روی آن یک محیط انتخابی برای جداکردن نوکاردیا از نمونه های مخلوط بوده و در دسترس بودن این محیط در آزمایشگاه احتمال رشد بهتر نوکاردیا را از کشتهای مخلوط میافزاید.

کتابنامه

۱- طاهری ، پرویز(۱۳۵۱-۱۳۵۰):مطالعه قارچهای ریوی درافرادمشکوک به سل درایران ، پایان نامه برای دریافت تخصص پاتوبیولوژی رشته قارچ شناسی ، دانشگاه تهران ، دانشکده بهداشت ، ش ۱۳۰۱.

۲- عسگری ، منوچهر ، عزیزی ،صادق پیروز(۱۳۵۰): نوکاردیوزیس ، گزارش اولین مورد شکل عمومی شونده آن درایران ، مجله دانشکده پزشکی ، سال ۲۹ ، ش ۶ ،ص ۲۳۷ .

۳- فروزش ، مختار، معتبر، کاظم ،سیدفرشی ، جلال ،حسنتاش ، مظفر، فریور، هوشنگ (۱۳۷۱):مایستوما بانوکاردیا معرفی چهارمورد آن ، مجله دارو و درمان ، ش ۱۱۳ ، ص ۲۳۷.

۴- مقدمی ، مهین ، کـــردبچه ، پریوش ،امامی، مسعود (۱۳۶۵) :بررسی دو مورد نوکاردیوز پوستی و ریوی، مجله دانشکده پزشکی شهیدبهشتی ، سال دهم ، ش سوم ، ص ۲۰۴ - ۲۰۱.

5- Asgari M,Alilou M.Mycetoma in Iran (1972):The first report of eight case with mycological studies, Ann soc Belge Med Trop 52 (4,5): 287- 306.

6- Cecil(1988): textbook of Medicine, W.B. Sounders Co. 1975-1976.

7- Mandel, Dauglas and Bennet (1985) : Principles and practice of Infectious Diseases , 2nd ed. New York John wiley and sons: 1423-27.

8- Mishru,S.K.Randhawa, H.S (1969): Application of parafin bait technique to isolation of nocardia asteroides from clinical specimens. Appl. Microbiol.18: 686-678.

9- Moghaddami, M.Kordbacheh P.(1989): Report of thirteen cases of mycetoma . Medical Journal of Islamic Republic of Iran, 3(3,4):183-186.

10-Murray P.R.Niles A.C., Heeren R.L.(1988): Modified Thayer -Martin Medium for Recovery of Nocardia specimens, J. of clinical Microbiol, 26(6):1219-1220.

11-Rippon JW. (1988): Medical Mycology, W.B.Saunders Co:53-67.

12-Shawar R.M.,Moore D.G., Larocco M.T.(1990):Cultivation of Nocardia spp.on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens .J. of clinical Microbiology ,28 (3): 508-512.

13-Singh M., Sandbu R.S.Randhowa H.S.(1987): Comparison of paraffin baiting and converntional culture techniques for isolation of Nocardia asteroides from sputum.J. of clinical Microbiol. 25(1): 176-177.