



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،  
آزمایشگاه میکروبیولوژی



# آزمایشگاه باکتری شناسی ۱

انجام آزمون های میکروسکوپی و بیوشیمیایی جهت شناسایی نوکاردیا

# *Nocardia*

- **Genus** : aerobic actinomycetes  
G+ branching filamentous bacteria
- **Subgroup** : aerobic nocardiform actinomycetes
  - Mycobacterium*
  - Corynebacterium*
  - Nocardia*
  - Rhodococcus*
  - Gordona*
  - Tsukamurella*

# *Nocardia* :History

- Edmond Nocard,  
1888
- Aerobic actinomycete  
from cattle with  
bovine farcy



نوکار دیا یک جنس از باکتری‌های گرم مثبت، هوازی و اسید فست است که به دلیل توانایی‌های بالای بیماری‌زایی و مقاومت در برابر درمان، اهمیت بالایی در پزشکی دارند. این باکتری‌ها عمدتاً به عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب عمل کرده و می‌توانند عفونت‌های جدی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف ایجاد کنند. این مقاله به بررسی جامع ویژگی‌های میکروبیولوژیکی نوکار دیا و روش‌های آزمایشگاهی تشخیص آن می‌پردازد.

## مقدمه

- نمونه‌های ریوی: شامل خلط و مایعات برونشیال.
- نمونه‌های پوستی و زیرجلدی: شامل بافت‌های آلوده، ترشحات زخم.
- نمونه‌های خونی: برای عفونت‌های سیستمیک.
- نمونه‌های مغزی و نخاعی: در صورت مشکوک بودن به عفونت‌های عصبی مرکزی

### جمع‌آوری نمونه

استفاده از ظروف استریل برای جمع‌آوری نمونه.  
حمل و نقل سریع نمونه‌ها به آزمایشگاه در دمای مناسب (4-8 درجه سانتی‌گراد) برای جلوگیری از رشد باکتری‌های دیگر

## نمونه‌برداری

- گرم مثبت: نوکاردیا به عنوان باکتری‌های گرم مثبت شناخته می‌شوند.

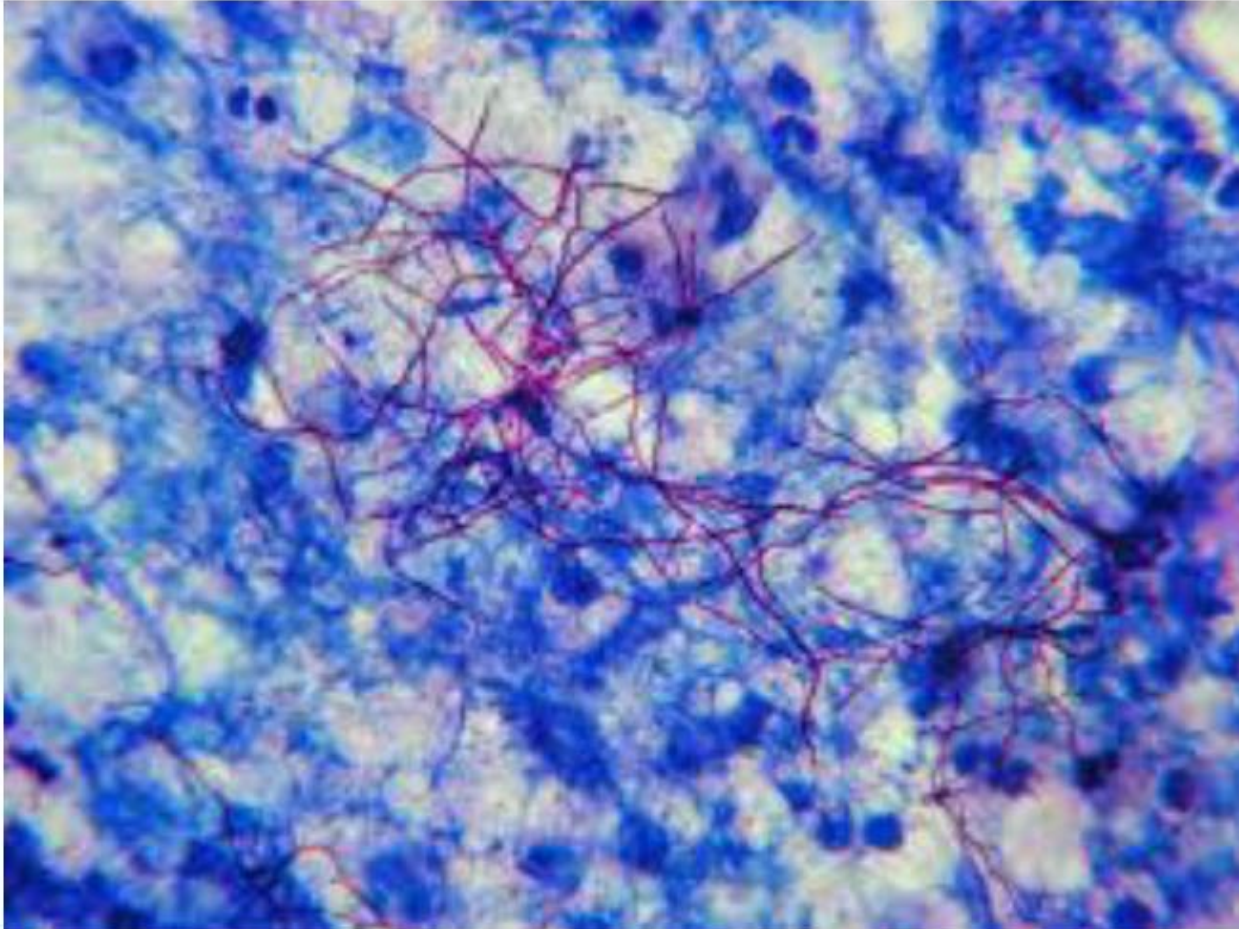
- هوازی اجباری: این باکتری‌ها برای رشد به اکسیژن نیاز دارند.

- اسید فست ضعیف: به دلیل دارا بودن مایکولیک اسید در دیواره سلولی، نوکاردیایاها به صورت ضعیف اسید فست هستند.

- رشته‌ای و شاخه‌دار: در زیر میکروسکوپ، نوکاردیایاها به صورت رشته‌های شاخه‌دار و منشعب دیده می‌شوند.

## ویژگی‌های میکروبیولوژیکی نوکاردیا

# شکل رشته ای و شاخه دار



تهیه کننده: سهیلا عباسی



تهیه کننده: سهیلا عباسی



### - نوکاردیا آستروئیدس

این گونه یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های نوکاردیوز در انسان است که می‌تواند عفونت‌های ریه، مغز و پوست ایجاد کند.

### - نوکاردیا برازیلینسیس

این گونه بیشتر با عفونت‌های پوستی و زیرجلدی مرتبط است و می‌تواند منجر به مایستوما‌ی نوکاردیایی شود.

### - نوکاردیا فارتیریا

این گونه به عنوان یک عامل مهم عفونت‌های ریه و عفونت‌های منتشره شناخته می‌شود و معمولاً مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد

# گونه‌های مهم نوکاردیا

## کشت باکتری

### الف) محیط‌های کشت اختصاصی

آگار شکلاتی و آگار خون‌دار: این محیط‌ها برای کشت و رشد نوکاردیا استفاده می‌شوند. نوکاردیایها معمولاً پس از چند روز به صورت کلنی‌های خشک و چسبناک رشد می‌کنند.

### ب) محیط‌های انتخابی

آگار سابورود دکستروز: این محیط به دلیل شرایط اسیدی که دارد، برای رشد نوکاردیا مناسب است.

## روش‌های آزمایشگاهی تشخیص

## شرایط انکوباسیون

دما: 35-37 درجه سانتی‌گراد.

زمان: رشد نوکاردیا ممکن است چند روز تا چند هفته طول بکشد.

فضای هوازی: نوکاردیایا هوازی هستند و نیاز به محیط غنی از اکسیژن دارند.

# انکوباسیون

## رنگ آمیزی

### رنگ آمیزی گرم

نوکار دیاها به عنوان باکتری های گرم مثبت به رنگ بنفش تیره دیده می شوند، اما این روش به دلیل شباهت با سایر باکتری ها نیاز به تأیید با روش های دیگر دارد.

### رنگ آمیزی اسید فست

این روش به دلیل وجود مایکولیک اسید در دیواره سلولی نوکار دیا استفاده می شود. در این رنگ آمیزی، نوکار دیاها به رنگ قرمز دیده می شوند.

# روش های آزمایشگاهی تشخیص

تست کاتالاز: نوکاردیها کاتالاز مثبت هستند، یعنی می‌توانند پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه کنند.

تست اوره‌آز: نوکاردیها معمولاً اوره‌آز مثبت هستند و می‌توانند اوره را به آمونیاک و دی‌اکسید کربن تجزیه کنند.

تست نیترات ردوکتاز: این تست بررسی می‌کند که آیا باکتری قادر به احیای نیترات به نیتريت است یا خیر.

## روش‌های آزمایشگاهی تشخیص

### PCR

باکتری DNA یکی از روش‌های بسیار دقیق و حساس برای تشخیص نوکاردیا است. در این روش، PCR مورد نظر تکثیر می‌شود تا به مقدار کافی برای شناسایی برسد. استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌های مختلف نوکاردیا ضروری است.

### توالی‌یابی ژنی

توالی‌یابی ژنی به شناسایی دقیق توالی‌های ژنی مربوط به نوکاردیا کمک می‌کند. این روش به‌ویژه برای تشخیص گونه‌های جدید و تعیین روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها مفید است.

## روش‌های آزمایشگاهی تشخیص

## تست‌های ایمنولوژیک

### **ELISA**

تست الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی‌ها یا آنتی‌ژن‌های خاص نوکاردیا استفاده می‌شود. این تست می‌تواند به تشخیص سریع و دقیق عفونت‌های نوکاردیایی کمک کند.

### تست‌های آگلوتیناسیون

در این تست‌ها، آنتی‌ژن‌های باکتری با آنتی‌بادی‌های خاص واکنش داده و تشکیل کمپلکس می‌دهند که به صورت دانه‌های قابل مشاهده درمی‌آید. این تست‌ها برای تشخیص سریع و شناسایی نوع باکتری مفید هستند.

# روش‌های آزمایشگاهی تشخیص

# روش های آزمایشگاهی تشخیص

تشخیص نوکاردیا نیازمند استفاده از تکنیک های مختلف میکروبیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی است.

هر کدام از این روش ها به نوبه خود می تواند به شناسایی دقیق و سریع این باکتری ها کمک کند.

استفاده از کشت باکتری، رنگ آمیزی اسید فست، آزمایشات بیوشیمیایی و تکنیک های مولکولی از جمله روش های اصلی برای تشخیص و شناسایی نوکاردیا هستند.

این روش ها به تشخیص سریع و دقیق عفونت های نوکاردیایی و در نتیجه انتخاب روش های درمانی مناسب کمک می کنند.



Table 5. Phenotypic properties separating the type strains of *Nocardia* species causing or associated with infections of humans and other animals.

Characters	Strains <sup>a</sup>																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<b>Biochemical tests</b>																	
Esculin hydrolysis	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	d	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	+	ND	+	+	ND	+	ND	+	+	+	+
Urea hydrolysis	+	+	-	+	+	-	-	ND	+	+	ND	+	ND	+	+	+	+
<b>Decomposition of (% w/v)</b>																	
Adenine (0.4)	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	-	ND	-	-	-	-
Casein (1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	-	-
Elastin (0.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	+	-	-	-
Hypoxanthine (0.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	+	-	+	-
Tyrosine (0.5)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	ND	-	ND	+	-	-	-
Uric Acid (0.5)		ND						ND	-	+	ND	-	ND	+	-	+	ND
Xanthine (0.4)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	ND	+	-	-	-
<b>Growth on sole carbon sources (% w/v)</b>																	
D(+) Mannitol (1.0)	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	ND	-	+	-	+	+	-
α-L-Rhamnose (1.0)	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
D(+) Sorbitol (1.0)	+	-	+	+	-	+	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-	+	-
D(+) Xylose (1.0)	+	+	-	-	+	ND	+	-	-	+	ND	+	-	-	+	ND	+
Sodium acetate (0.1)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	ND	+	+	-	-	ND	-
Sodium citrate (0.1)	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	d	+
Growth at 45°C	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	ND	-	-	-	-

Symbols and abbreviations: +, positive; -, negative; d, doubtful; and ND, not determined.

<sup>a</sup>Strains: 1, *N. beijingensis* IFP 16342<sup>T</sup>; 2, *N. caishijiensis* JCM 11508; 3, *N. carneae* DSM 43397<sup>T</sup>; 4, *N. cerradoensis* DSM 44546<sup>T</sup>; 5, *N. cummidelens* DSM 44490<sup>T</sup>; 6, *N. flavorosea* JCM 3332<sup>T</sup>; 7, *N. fluminea* DSM 44488<sup>T</sup>; 8, *N. ignorata* DSM 44496<sup>T</sup>; 9, *N. neocaledoniensis* DSM 44717<sup>T</sup>; 10, *N. pigrifrangens* JCM 11884<sup>T</sup>; 11, *N. pseudovaccinii* DSM 43406<sup>T</sup>; 12, *N. soli* DSM 44488<sup>T</sup>; 13, *N. tenerifensis* DSM 44704<sup>T</sup>; 14, *N. uniformis* JCM 3224<sup>T</sup>; 15, *N. vaccinii* DSM 43285<sup>T</sup>; 16, *N. vinacea* JCM 10988<sup>T</sup>; and 17, *N. xishanensis* JCM 12160<sup>T</sup>.

Data from Kämpfer et al. (2004), Saintpierre-Bonaccio et al. (2004), Wang et al. (2004), and Zhang et al. (2004).

Table 4. Phenotypic properties separating the type strains of *Nocardia* species causing or associated with infections of humans and other animals.

Characters	Strains*																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Esculin hydrolysis	-	-	ND	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+	+	-	+	+	+	+	+	ND	ND
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	+	+	+	ND	ND	+	+	-	-	ND	+	+	+	-	ND
Urea hydrolysis	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	ND	+	-	+	+	+
Deposition of (% w/v)																					
Adenine (0.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-	-	-	-	-
Casein (1.0)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Elastin (0.3)	-	-	ND	-	+	-	-	-	-	ND	ND	-	-	-	+	-	-	-	+	-	ND
Hypoxanthine (0.4)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
Tyrosine (0.5)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Uric acid (0.5)	-	-	ND	-	-	-	-	ND	-	ND	ND	-	+	-	+	ND	-	-	+	-	ND
Xanthine (0.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Growth on sole carbon sources (% w/v)																					
D(+) Mannitol (1.0)	-	-	ND	+	+	-	-	-	-	ND	ND	+	+	-	+	+	+	-	-	-	ND
α-L-Rhamnose (1.0)	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D(+) Sorbitol (1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
D(+) Xylose (1.0)	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-	ND	ND	-	-	-	+	-	-	ND	-	ND	ND
Sodium acetate (0.1)	+	-	ND	+	+	+	-	-	+	ND	ND	-	+	+	+	+	+	+	+	-	ND
Sodium citrate (0.1)	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Growth at 45°C	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Symbols: +, positive; -, negative; and ND, not determined.

\*Strain: 1, *N. abscessus* DSM 44432<sup>T</sup>; 2, *N. africana* DSM 44491<sup>T</sup>; 3, *N. asiatica* JCM 11892<sup>T</sup>; 4, *N. asteroides* ATCC 19247<sup>T</sup>; 5, *N. brasiliensis* ATCC 19246<sup>T</sup>; 6, *N. brevicatena* DSM 43024<sup>T</sup>; 7, *N. crasso streae* ATCC 70418<sup>T</sup>; 8, *N. cyriacigeorgica* DSM 44484<sup>T</sup>; 9, *N. farcinica* ATCC 3318<sup>T</sup>; 10, *N. inohanensis* JCM 11891<sup>T</sup>; 11, *N. niigatensis* JCM 11894<sup>T</sup>; 12, "*N. nova*" JCM 6044; 13, *N. otitidiscaviarum* NCTC 1934<sup>T</sup>; 14, *N. paucivorans* DSM 44386<sup>T</sup>; 15, *N. pseudobrasiliensis* ATCC 51512<sup>T</sup>; 16, *N. puris* DSM 44599<sup>T</sup>; 17, *N. salmonicida* JCM 4826<sup>T</sup>; 18, *N. seriolae* JCM 3360<sup>T</sup>; 19, *N. transvalensis* DSM 43405<sup>T</sup>; 20, *N. veterana* DSM 44445<sup>T</sup>; and 21, *N. yamanashiensis* JCM 11893<sup>T</sup>.

Data from Kageyama et al. (2003a, b) and Saintpierre-Bonaccio et al. (2004).

# *Nocardia*

At least 13 species : cause human infection

- 7 most important

- 1. *Nocardia asteroides* complex

  - :80% of noncutaneous dz.

  - :most systemic & CNS nocardiosis \*\*\*

- 2. *Nocardia farcinica* :less common,more virulent

  - :more antibiotic-resistant member

- 3. *Nocardia nova*

- 4. *Nocardia brasiliensis*:

  - skin, cutaneous, lymphocutaneous

- 5. *Nocardia pseudobrasiliensis*:systemic infections, CNS

- 6. *Nocardia otitidiscaviarum*

- 7. *Nocardia transvalensis*

# *Nocardia* : ECOLOGY & EPIDEMIOLOGY

- Ubiquitous environmental saprophyte
- Soil, organic matter, water
- Tropical and subtropical regions

:Mexico, Central and South America, Africa and India



# ***Nocardia : ECOLOGY & EPIDEMIOLOGY***

## ■ Transmission

- Inhalation
- Skin

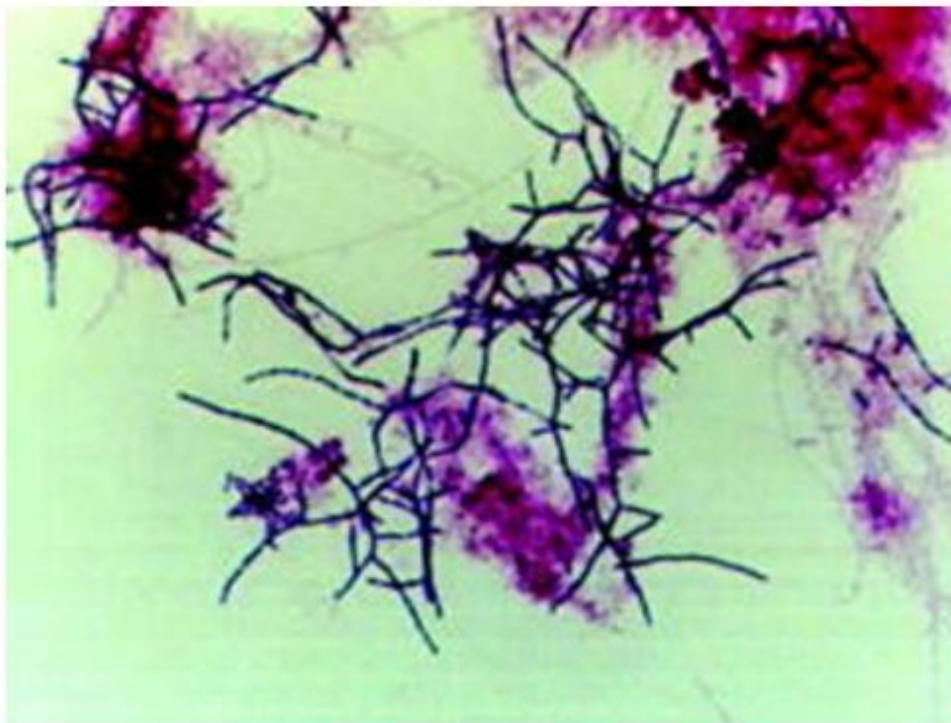
## ■ The risk of pulmonary\_ or disseminated disease

\*deficient cell-mediated \*

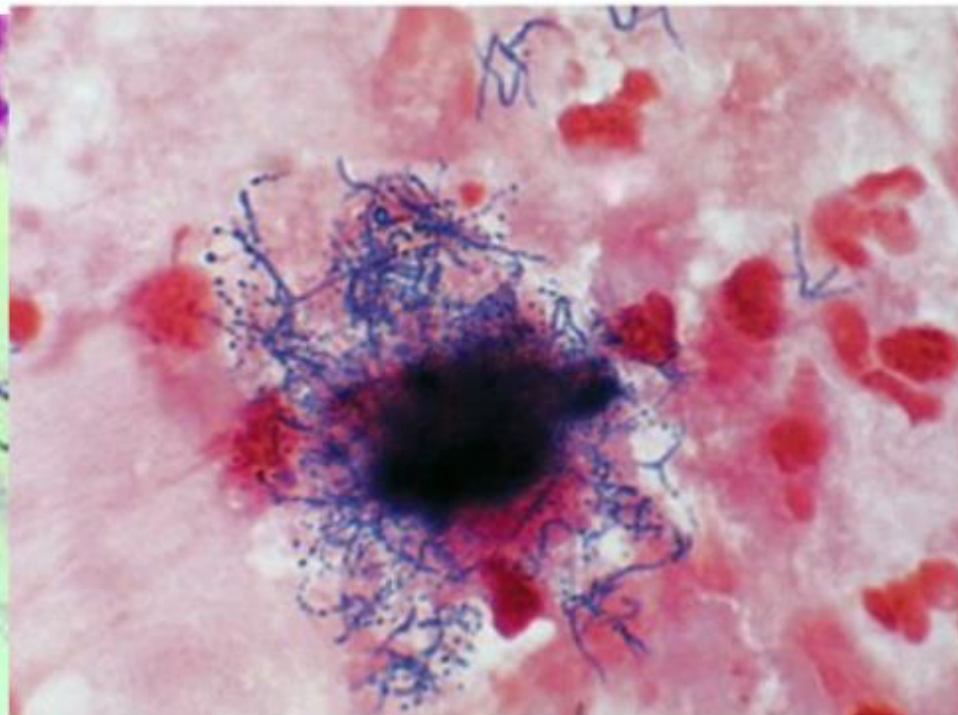
- Alcoholism
- Diabetes
- Lymphoma
- Transplantation
- Glucocorticoid therapy
- AIDS **CD4+ < 250**

# *Nocardia* : PATHOLOGY

- Acute pyogenic inflammatory reaction.  
Branching, beaded, filamentous bacteria



G/S from a nocardial lung abscess



G/S from nocardial pneumonia

# *Nocardia* :PATHOGENESIS

- Neutralization of oxidants
- Prevention of phagosome-lysosome fusion
- Prevention of phagosome acidification.

**Mycolic acid polymers** :ass.with virulence

# CLINICAL MANIFESTATIONS

: 4 main form

- Lymphocutaneous syndrome
- Pulmonary :Pneumonia
- CNS : Brain abscess
- Disseminated disease

CNS

Eyes (particularly the retina →Keratitis ),

Skin& subcutaneous

Kidneys,

Joints, bone

Heart



# Lymphocutaneous syndrome

-Cellulitis  
-Lymphocutaneous syndrome  
-Actinomycetoma

- Ubiquitous in soil → inoculation injuries,
- Insect and animal bites → contaminated abrasions
- *N. brasiliensis* : most common
- *N. asteroides* : self-limited
- Because initial response Rx as staphylococcus



**underdiagnosed → Mycetoma**

- Days to months ,typical:distal limb

# Pulmonary disease

- **Pneumonia**

  - Subacute (more acute in immunosuppressed)

  - Cough\*\*

  - Small amounts of thick, purulent sputum

  - Fever, anorexia, weight loss, malaise

- **Endobronchial inflammatory mass**

- **Lung abscess**

- **Cavitary disease**

- **Inadequate therapy → Progressive fibrotic disease**

**Cerebral imaging, should be performed in all cases of pulmonary and disseminated nocardiosis**



- **Nocardial pneumonia** . Discrete nodular in midlung on both sides



A

B

CT scan (A),CXR (B) from : multiple abscesses : *Nocardia farcinica*

# CNS : Brain abscess

- Insidious presentations : **mistaken for neoplasia !!!**
- Granulomatous , abscesses
- **Cerebral cortex, basal ganglia and midbrain \*\*\***
- Less commonly: spinal cord or meninges.
- Brain tissue diagnosis in pulmonary nocardiosis  
: not necessary
- However,  
cerebral biopsy:considered early in immunocompromised

# LABORATORY DIAGNOSIS

- Gram-positive, beaded, branching filaments usually weak acid fast+ve .
- **Standard blood culture** :48 hrs to several wks, but typical = 3 to 5 days
- **Colonization of sputum**  
:underlying pulmonary dz +  
not receiving steroid therapy → no specific therapy
- Susceptibility testing
  - Deep-seated /disseminated dz. fail initial therapy
  - Relapse after therapy
  - Alternatives to sulfonamides are being considered

# LABORATORY DIAGNOSIS

- Gram-positive, beaded, branching filaments usually weak acid fast+ve .
- **Standard blood culture** :48 hrs to several wks, but typical = 3 to 5 days
- **Colonization of sputum**  
:underlying pulmonary dz +  
not receiving steroid therapy → no specific therapy
- Susceptibility testing
  - Deep-seated /disseminated dz. fail initial therapy
  - Relapse after therapy
  - Alternatives to sulfonamides are being considered



با سپاس از توجه شما  
مهم است که این را بدانید