دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

# مقایسه روش های جداسازی نوکاردیا از خاک: میلهٔ پارافینی، کشت در محیط هیومیک اسید ویتامین B آگار و پارافین آگار

**معصومه رسولی نسب**
کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده بهداشت،دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

**شادی حبیب نیا**
کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

**پروین حیدریه**
استادیار میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

**محمدرضا پورمند**
دانشیار میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

**مهدی فتاحی**
دانشجوی دکترای باکتری شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

**سید سعید اشراقی**
استاد میکروب شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

**نویسنده مسئول: سید سعید اشراقی**

**پست الکترونیک:** eshragh s@ tums.ac.ir

**تماس: ۰۹۱۲۶۳۶۳۱۳٤**

**آدرس:** دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

**دریافت:۹۱/۱۱/۹**
**ویرایش پایانی:۹۱/۱۲/٤**
**پذیرش:۹۱/۱۲/۷**

## چکیده

***زمینه و هدف:*** *جداسازی نوکاردیا به دلیل رشد سریع تر باکتری های هم جوار در محیط طبیعی بسیار مشکل است. بنابراین انتخاب محیط کشت اختصاصی و ترکیب مناسب که بتواند میکروارگانیسم های سریع الرشد مزاحم را حذف یا کاهش دهد همواره مورد توجه محققین بوده است. در این راستا ما به بررسی و مقایسه سه روش متداول آزمایشگاهی پرداختیم تا بهترین و مطمئن ترین روش جداسازی گونه های نوکاردیا شناخته و معرفی شود.*

***روش بررسی:*** *نمونه های خاک از مناطق مختلف تهران جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها پس از آماده سازی، در سه محیط کشت مایع بدون کربن حاوی میلهٔ پارافینی، هیومیک اسید ویتامین ب آگار و پارافین آگار تلقیح و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳تا ۴ هفته گرمخانه گذاری شدند.*

***یافته ها:*** *از تعداد ۱۱۰ نمونه خاک جمع آوری شده، ۳۱جدایه نوکاردیا (۲۸/۱۸٪)بدست آمد که به ترتیب ۱۹جدایه(۱۷/۲۷٪) توسط روش میلهٔ پارافینی، ۴ جدایه(۳/۶۳٪) با روش کشت در محیط هیومیک اسید ویتامین ب آگار و ۸ جدایه(۷/۲۷٪) با روش کشت در محیط پارافین آگار به دست آمد.*

***نتیجه گیری:*** *کارایی روش میلهٔ پارافینی با توجه به جداسازی بیشتر، ارزانی محیط کشت و وضوح کلنی های مشکوک به جنس نوکاردیا بیشتر از روش های دیگر کشت می باشد.*

***واژه های کلیدی:*** *نوکاردیا، خاک ،میلهٔ پارافینی،پارافین آگار*

**آدرس مقاله:**
رسولی نسب م، حبیب نیا ش، حیدریه پ، پورمند م، فتاحی م، اشراقی س" مقایسه روش های جداسازی نوکاردیا از خاک: میلهٔ پارافینی، کشت در محیط هیومیک اسید ویتامین B آگار و پارافین آگار" مجله علوم آزمایشگاهی، ۱۳۹۲ویژه نامه دوره هفتم(شماره۵) :۲۹-۳۶

Archive of SID
www.SID.ir

**مقدمه**

نوکاردیاها[1] گروهی از باکتری های گرم مثبت، غیر متحرک و گندروی هوازی می باشند. این میکروارگانیسم ها میله ای شکل، رشته ای شاخه شاخه، با ویژگی مقاوم به اسید که عامل بیماری عفونی خطرناکی تحت عنوان نوکاردیوزیس هستند(۱). از آنجایی که جایگاه نوکاردیا به طور معمول در محیط خاک و آب است، در صورت مناسب بودن میزبان، بیماری در هر نقطه جغرافیایی ممکن است رخ دهد(۲و۳). نوکاردیوزیس ریوی معمولا" در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی بصورت ضایعات منتشره ریوی یا عفونت های مزمن ریوی تظاهر می کند(۴).این بیماری در هر رده سنی و هر دو جنس مذکر و مونث بوجود می آید.گونه های نوکاردیا به علت داشتن آنزیم های خاص و توانایی اثر گذاری در فعالیت های بیولوژیکی، نقش تعیین کننده ای در زنجیره غذائی و تولید متابولیت های ثانویه دارند. این باکتری ها قادرند مواد زاید جامد و مایع حاصل از فعالیت های بیولوژیکی جانوران در محیط زیست و نیز پسماند صنایع و کارخانه ها را تجزیه نمایند. همچنین آنتی بیوتیک های با ارزشی مانند نوکاردیسین، برازیلونید و توبلاکتومایسین A از گونه های نوکاردیا به دست آمده است(۵ ،۶). شایع ترین اشکال بالینی نوکاردیا فرم ریوی منتشره، جلدی، زیرجلدی، جلدی- لنفاوی و فرم پیشرفته مایستومائی است(۷). نوکاردیاها در همه جا وجود دارند و می توانند در سراسر جهان به عنوان باکتری‌های گندروی در منابع مختلف آب شیرین و شور، خاک، گردو غبار، گیاهان در حال پوسیدن و فضولات حیوانی یافت شوند(۸). با اینکه نوکاردیا روی بیشتر محیط های مختلف کشت آزمایشگاهی رشد می کند ولی گرمخانه گذاری به مدت ۳ تا ۷ روز و ۵ تا ۱۰ درصد دی اکسید کربن شرایط رشد را مساعدتر می نماید(۹). جداسازی این باکتری مشکل بوده و محیط کشت نیز می تواند با سایر میکروارگانیسم های آلاینده محیط با رشد سریع آلوده گردد بنابراین جدا کردن باکتری خالص نوکاردیا مشکل و وقت گیر است(۱۰). جداسازی و شناسایی خصوصیات کشت خالص این ارگانیسم ها از محیط های طبیعی در راستای درک نقش اکولوژیکی آن به منظور ارزیابی خطرات سلامت که امروزه مطرح هستند، اهمیت زیادی دارد(۱۲،۱۱). در حال حاضر چند روش تجربه شده برای جداسازی نوکاردیا وجود دارد که در این مطالعه مقایسه کارکرد سه روش رایج بررسی گردید. در روش معمول میلهٔ پارافینی در محیط مایع[2]، جداسازی نوکاردیا از خاک بر پایهٔ قابلیت استفاده نوکاردیا از پارافین به عنوان تنها منبع کربن[5] و انرژی برای رشد خود استوار است(۱۳). روش میلهٔ پارافینی، اولین بار در سال ۱۹۳۶ جهت جداسازی نوکاردیا آستروئیدس (عامل اتیولوژی اصلی نوکاردیوزیس) از خاک مورد استفاده گرفت(۱۱، ۱۴،۱۳). محیط هیومیک اسید ویتامین ب آگار[3] (HV agar) نیز یک محیط انتخابی جدید برای جداسازی اکتینومایست ها از خاک به شمار می رود که منبع منحصر به فرد کربن و نیتروژن است. این محیط امکان رشد بسیاری از جنس های متعلق به خانواده اکتینومایست ها از جمله استرپتومایسس، میکرومونوسپورا، نوکاردیا و غیره را فراهم می کند (۱۵). با توجه به تنوع محیط های کشت نسبتا" متفاوت در جداسازی نوکاردیاهای محیطی، به نظر می رسد مطالعه روش های متنوع بتواند راهنمای مناسبی جهت جداسازی نوکاردیا باشد. در مطالعه حاضر از سه محیط اختصاصی نوکاردیا شامل پارافین آگار[4] ، هیومیک اسید ویتامین ب آگار و روش میلهٔ پارافینی مورد استفاده قرار گرفته و به بررسی و مقایسه آنها در رابطه با مزایا و معایب جدا سازی نوکاردیا پرداخته شد.

## روش بررسی

با استفاده از قاشق چوبی سترون، تعداد ۱۱۰ نمونه خاک از مناطق مختلف تهران از عمق ۳ تا ۵ سانتی متری در ظروف نمونه گیری سترون جمع آوری و در طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت به آزمایشگاه میکروب شناسی در دانشکده بهداشت منتقل شد(۱۶). اطلاعات مربوط به هر نمونه خاک (محل جمع آوری، عمق خاک، نوع خاک و تاریخ جمع آوری) ثبت گردید. روش میلهٔ پارافینی اساس این روش به کار به

1. Nocardiae
2. Paraffin Baiting
3. Humic Acid-Vitamin B Agar
4. Paraffin agar



Archive of SID
SID.ir

کار گرفتن میله شیشه ای آغشته به پارافین در محیط مایع بدون کربن[5] است(جدول۱). به هر لوله آزمایش حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت اضافه و سترون گردید. برای آماده سازی میلهٔ پارافینی ابتدا میلهٔ شیشه ای را در فور سترون کرده، سپس به پارافین جامد ذوب شده آغشته گردید. برای سترون کردن، میله شیشه ای پارافینی را در اتانول ۹۶درجه فرو می بریم(۱۱). محیط هیومیک اسید ویتامین B آگار- برای تهیه این محیط تمامی مقادیر ذکر شده در جدول ۱ به جز ویتامین های گروهB و سیکلوهگزامید را با هم مخلوط کرده سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو می شود. بعد از اتوکلاو وقتی دمای محلول به ۵۰ درجه سانتی گراد رسید، سیکلوهگزامید و ویتامین B کمپلکس را کـه بـه صـورت تجاری تهیه شده است، اضافه کرده و سپـس در پلیت ۶ سانتی متر تـقسیم شـدند.تهیه محیط پارافین آگار (PA)- این محیط با افزودن پارافین مذاب به نسبت ۹ به ۱ به محیط پایه کربن فری آگار (CFA)[6] (جدول۱)، مخلوط نمودن و جـوشانـدن این مجموعه و تنظیم pH بدست می آید(۱۰). برای تهیه سوسپانسیون از نمونه خاک، ۱ گرم از هر نمونه خاک را در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به طور جداگانه در لـولـه شـیشـه ای مـخـلـوط و بـه مـدت ۵ دقـیـقـه مـخلـــوط کـرده، بعد از تـــه نشـیـــن شدن ســوسپـانـــسیون و بـا اسـتـفـاده از پـی پـــت ســترون، مـقـــدار مـــورد نـیاز از مـایع رویـــی لوله شـــیشـــه ای برداشته و توسط یک لوپ استریل به صورت یکنواخت در سرتاسر پلیت پخش گردید(۱۱).

**جدول ۱- مواد لازم مورد استفاده در سه روش بررسی شده**

| مواد لاز م | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **HV agar** | | **CFA**[b] | | (Paraffin Baiting) مایع بدون کربن [a] | |
| 1.0 g | Humic acid[c] | 3 g | $KH_2PO_4$ | 2 g | $NaNO_3$ |
| 1.71 g | KCl | 1 g | $K_2HPO_4$ | 2 mg | $ZnSO_4$ |
| 0.05 g | $MgSO_4.7H_2O$ | 5 g | $NH_4Cl$ | 0.5 g | $MgSO_4.7H_2O$ |
| 0.5 g | $Na_2HPO_4$ | 1 g | $NH_4NO_3$ | 0.8 g | $K_2HPO_4$ |
| 0.02 g | $CaCO_3$ | 0.05 g | $MgSO_4.7H_20$ | 10 mg | $FeCl_3$ |
| 0.01 g | $FeSO_4.7H_2O$ | 0.05 g | $ZnSO_4$ | 8 mg | $MnCl_2.4H_2O$ |
| ۱ ویال تجاری | B-vitamins | 0.05 g | $FeSO_4$ | 1 lit | Distilled water |
| 50 mg | Cycloheximide [d] | 0.05 g | $MnSO_4$ | | |
| 18 g | Agar | 17 g | Bacto- Agar | | |
| 1 lit | Distilled water | 1 lit | Distilled water | | |

a) **محیط مورد استفاده در روش Paraffin Baiting**

b) **محیط پایه PA**

c) **حلاّل هیومیک اسید : ۱ گرم هیومیک اسید ویتامین ب آگار در ۱۰ میلی لیتر از سود ۰/۲ نرمال.**

d) **حلاّل سیکلوهگزامید: ۵۰ میلی گرم سیکلوهگزامید در ۲۰۰ ماکرولیتر اتانول ۹۶ درجه.**

e) **pH هر سه محیط مذکور ۷/۲ می باشد. در صورت نیاز برای تنظیم pH محیط از سود ۰/۲ نرمال و یا اسیدکلریدریک ۱۰ درصد استفاده شد.**

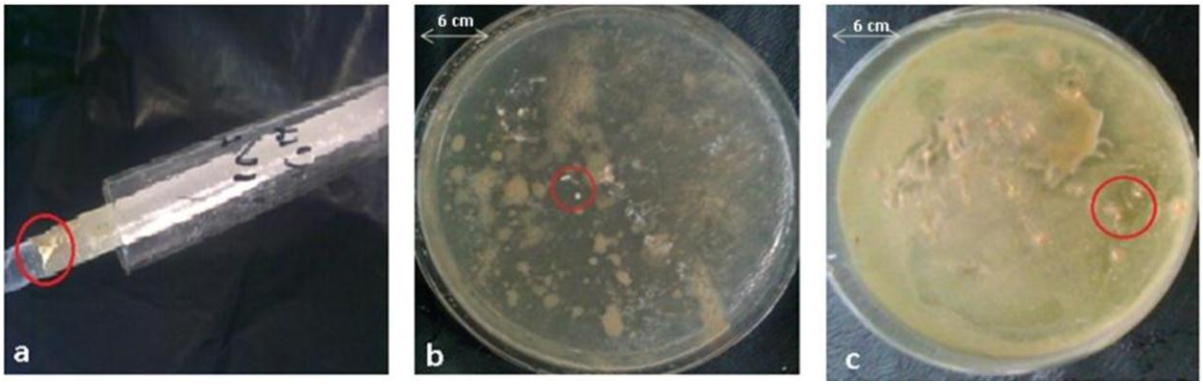
کشت سوسپانسیون خاک در محیط مایع بدون کربن- یک میلی لیتر از سوسپانسیون هر نمونه خاک را به طور جداگانه در لوله های آزمایش حاوی مایع بدون کربن اضافه و خوب مخلوط گردید(۱۱). همچنین مقدار یک میلی لیتر از هر سوسپانسیون خاک به صورت یکنواخت در سرتاسر پلیت حاوی محیط های HV agar وPA ، کشت داده شد. تمامی محیط ها را در شرایط یکسان در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. برای مشاهده کلنی نوکاردیا، آنها را در هفته اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم مورد بررسی قرار است برای و پس از مشاهده کلنی های مشکوک به نوکاردیا(سفید، کرمی رنگ، نارنجی، صورتی)، آنها را بر روی محیط های نوترینت آگار و سابورو دکستروزآگار کشت داده تا کلنی خالص مشکوک به نوکاردیا بدست آید. بعد از تهیه اسمیر از کلنی، آنها را از نظر رنگ آمیزی گرم، پارشیال اسیدفاست و اسید فاست مورد بررسی قرار داده و کلنی هایی که گرم مثبت، اسیدفاست منفی و پارشیال اسیدفاست مثبت بودند به عنوان جنس نوکاردیا تشخیص داده می شوند. کلنی های خالص و مشکوک

5. Carbon-free broth
6. Carbon-free agar

نوکاردیا را جهت تائید بر روی محیط مایع لیزوزیم براث کشت دادیم. از آنجایی که نوکاردیا مقاوم به لیزوزیم می باشد، در این محیط لیزوزیم براث و نیز در محیط کنترلی (فاقد لیزوزیم) رشد می کند(۱۷).

## یافته ها

نمونه ها از نواحی مختلف شهر تهران به صورت تصادفی مطابق جدول شماره ۳ جمع آوری گردید(جدول۲). از کشت مجموع ۱۱۰ نمونه خاک جمع آوری شده با سه روش کشت، در مجموع۴۸ کلنی مشکوک به نوکاردیا جدا گردید. از این تعداد، ۳۱ نمونه، (۲۸/۱۸٪) مثبت تشخیص داده شد. از مجموع ۲۳ کلنی مشکوک به نوکاردیا در روش پارافین بایت (میله های پارافینی)، ۱۹ کلنی، از ۱۰ کلنی مشکوک به نوکاردیا بر روی محیط HV آگار، ۴ کلنی و از ۱۵ کلنی مشکوک به نوکاردیا، تنها ۸ کلنی بر روی محیط پارافین آگار رشد نمودند. کلنی ها با رنگ آمیزی های گرم، پارشیال اسیدفاست و اسیدفاست مورد بررسی قرار گرفتند که در آنها ویژگی جنس نوکاردیا تشخیص داده شد.




**شکل ۱- جداسازی نوکاردیا در سه محیط کشت متفاوت a. روش** Paraffin Baiting **b. محیط پارافین آگار c. محیط هیومیک اسید ویتامین ب آگار**

**جدول۲- تعداد و درصد جدایه مثبت نوکاردیا بر حسب منابع مختلف**

| ناحیه | تعداد نمونه جمع آوری شده | نمونه های مثبت تعداد/درصد |
|---|---|---|
| پارک ها | ۵۷ | ۲۰ / (۳۵/۰۸٪) |
| جوی آب | ۸ | ۱ / (۱۲/۵٪) |
| گل و لای | ٤ | ۰ |
| گلدان | ۹ | ۱ / (۱۱/۱۱٪) |
| فضای سبز میدان ها و بلوارها | ۳۲ | ۹/ (۲۸/۱۲٪) |
| جمع | ۱۱۰ | |

جهت مشاهده کلنی های نوکاردیا بعد از تلقیح نمونه مورد نظر، هر کدام از سه محیط در هفته اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم مورد بررسی قرار گرفت. کلنی ها در روی محیط مایع بدون کربن بیشتر در هفته سوم ظهور کرده و ۸۰ درصد کلنی های مربوط به نوکاردیا مثبت بودند. در صورتی که در روی محیط هیومیک در هفته دوم و سوم کلنی های مشکوک به نوکاردیا از نظر رنگ و مورفولوژی متفاوت بوده و بعد از رنگ آمیزی پارشیال اسیدفاست تنها ۴۰ درصد کلنی ها در هفته سوم مثبت گزارش شده و در هفته چهارم ۵۰ درصد کلنی ها مثبت گزارش شدند. در محیط پارافین آگار بیشترین تعداد جدایه های مشکوک به نوکاردیا درهفته سوم مشاهده گردیدند.

## بحث

در مطالعات انجام شده توسط Mishra در سال ۱۹۶۹ از روش میلهٔ پارافینی جهت تشخیص آزمایشگاهی روتین برای جداسازی نوکاردیا آستروئیدس به عنوان عامل اتیولوژی



www.SID.ir

نوکاردیوزیس استفاده شد(۱۴). در مطالعه انجام شده توسط Singh و همکاران در سال ۱۹۸۷، ۱۵۱۰ نمونه خلط مربوط به ۱۰۱۶ از بیمار با ناهنجاری برنکوپولمونری، ۶۷ مورد نوکاردیا با روش میلهٔ پارافینی جداسازی شد، در صورتی که با روش کشت معمولی در سابورو دکسترز آگار،۳۰ مورد گزارش گردید که نشان دهنده این است که روش پارافین یکی از محیط های اختصاصی در جداسازی گونه های مختلف نوکاردیا به شمار می رود(۱۱). در سال ۱۹۹۷ Khan و همکاران برای تعیین توزیع نوکاردیاهای بیماریزا در کشورکویت، تعداد ۱۰۲ نمونه خاک را از دو جایگاه مختلف انتخاب و با روش میلهٔ پارافینی مورد بررسی قرار دادند که ۴۲ ایزوله نوکاردیا (۴۱٪) گزارش گردید (۱۶). در مطالعه ای که توسط Khan و همکاران در سال ۱۹۹۷ جهت تعیین توزیع نوکاردیاهای بیماری زا در خاک کویت انجام گرفت،تعداد ۱۰۲ نمونه را از دو جایگاه مختلف با روش میلهٔ پارافینی مورد بررسی قرار دادند که ۴۲ جدایه نوکاردیا (۴۱٪) گزارش گردید (۱۶). در مطالعه دیگر توسط آقامیریان و همکاران در سال ۲۰۰۷، تنوع اکتینومایست‌های هوازی مهم بالینی در ۳۰۰ نمونه خاک مناطق مختلف قزوین مورد بررسی قرار گرفت که اولین بررسی اپیدمیولوژیکی در خاک ایران بود. در مطالعه ذکر شده جهت جداسازی از BHIA[۷] آگار[۸] و سابورو دکستروز آگار استفاده شد. از این تعداد، ۱۹/۸ درصد اکتینومادورا مادوره و استرپتومایسس سومالینسیس، ۱۵/۷ درصد نوکاردیا آستروئیدس، ۹/۴ درصد نوکاردیا اوتیتیدیس کاویه و ۷/۳ درصد نوکاردیا برازیلینسیس گزارش گردید (۱۸). در مطالعه حاضر ابتدا توسط روش میلهٔ پارافینی، جداسازی صورت گرفته و سپس برای به دست آوردن کلنی های خالص مشکوک به نوکاردیا از محیط های نوترینت آگار و سابورو دکستروز استفاده گردید. در مطالعه انجام شده توسط Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۲، از ۱۲ نمونه خاک، ۱۰۹ اکتینومایست توسط کشت در محیط HV agar جداسازی شد. در این روش اکتینومایست های مانند استرپتومایسس، اکتینومادورا، ساکارو پلی اسپورا بیشتر و باکتری های نوکاردیا و ترمواکتینومایست کمتر جداسازی گردید (۱۹). در مطالعه حاضر نیز درصد جداسازی نوکاردیا توسط این محیط پایین بود. با توجه به روش های متفاوتی که در زمینه جداسازی نوکاردیا انجام شده، نتایج مختلفی بدست آمده است. مقایسه روش های به کار گرفته شده در مطالعه کنونی، بیانگر این است که مشاهده کلنی ها در محیط های HV agar و PA سخت تر بوده و از نظر مورفولوژی، رنگ کلنی ها متفاوت هستند. نکته قابل توجه دیگر اینکه کلنی های نوکاردیای جدا شده بر روی محیط HV agar بیشتر به رنگ نارنجی مشاهده می شد. آلودگی با سایر باکتریها در این دو محیط نیز نسبتا بالا بود، در حالیکه در روش میلهٔ پارافینی رنگ بیشتر کلنی ها سفید گچی بوده و از طرفی به دلیل آلودگی کمتر، تشخیص را ساده تر می کند. نوکاردیا ارگانیسم سخت رشدی می باشد و برای مشاهده و رشد آن به زمان گرمخانه گذاری طولانی تری (۵-۲هفته) نیاز دارد. اگر محیط های حاوی آگاری مانند HV agar و PA بیشتر از ۳ هفته در گرمخانه قرار داده شوند، خشک گردیده و شرایط مغذی برای رشد میکروارگانیسم را کاهش داده و در نتیجه کلنی نوکاردیا کمتر مشاهده می گردد. در صورتی که در روش میلهٔ پارافینی، هنگامی که سطح محیط براث در لوله های آزمایش پائین می آید، برای جلوگیری از خشک شدن، می توان به آن مقدار قابل توجهی از محیط مایع بدون کربن اضافه نمود.

نظر به اینکه محیط HV agar ، بسیار گران قیمت بوده و امکان تهیه آن در همه آزمایشگاه های تحقیقاتی به راحتی میسر نیست و نیز بیشتر اکتینومایست ها و قارچ های مقاوم به سیکلوهگزامید در آن رشد می کنند، بنابراین به نظر می رسد محیط هیومیک اسید برای سایر اکتینومایست ها و نیز رویش اسپور و فعال شدن اکتینومایست ها مناسب باشد و کمتر برای جداسازی نوکاردیا توصیه می شود. محیط PA نیز به دلیل سطح مقطع زیاد و ارتباط بیشتر با هوا هنگام قرار گرفتن در درجه حرارت گرمخانه، سریع تر خشک می گردد، بنابراین برای بر طرف کردن این مشکل، محیط در



Archive of SID
www.SID.ir

لوله آزمایشگاهی به صورت مایل پخش گردید که در این صورت نیز سطح مقطع برای بررسی و رشد باکتری به نسبت کم بوده و از طرفی میکروارگانیسم های با رشد سریع روی سطح را پوشانده و تشخیص باکتری با مشکل مواجه می شود. بنابراین با توجه به دلایل ذکر شده و نیز داشتن Bacto-Agar در این محیط کشت و هزینه بالاتر، برای جداسازی نوکاردیا پیشنهاد نمی شود. در مطالعه حاضر، بیشترین درصد نمونه های مثبت مربوط به پارک ها و نیز فضاهای سبز بود. حدس زده می شود که استفاده از کودهای متنوع، مواد آلی و مغذی خاک باشد که شرایط را برای رشد نوکاردیا مساعدتر می کند. روش میلهٔ پارافینی به دلیل داشتن هزینه پایین تر، آلودگی کمتر، جلوگیری از رشد سایر میکروارگانیسم ها، کیفیت بهتر رشد نوکاردیا و قابل تشخیص بهتر کلنی های مشکوک به نوکاردیا محیط انتخابی مناسب تری برای جدا کردن نوکاردیا می باشد. همچنین این روش سطح انتخابی بیشتری برای رشد باکتری داشته، بنابراین در شرایط برابر، درصد جداسازی نوکاردیا با این روش نسبت به سایر محیط ها از قابلیت بالاتری برخوردار است.

## نتیجه گیری

اگر چه روش های مختلف جدا سازی باکتری ها کارایی قابل قبولی را در بر دارند، ولی نتایج این مطالعه نشان می دهد که روش میلهٔ پارافینی با کارایی بالاتر به لحاظ جداسازی کمی و کیفی کلنی های نوکاردیا و وضوح بیشتر کلنی های خالص مشکوک به جنس نوکاردیا و نیز مزایای اقتصادی (ارزانی محیط کشت) به روش های دیگر کشت ارجحیت دارد.

## تشکر وقدردانی

این مقاله قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران بشماره ۲۷/۲۳۳۳۵-۹۲-۲ می باشد. محققان بدینو سیله از حمایت های مالی معاونت پژوهشی این دانشگاه کمال تشکر را دارند.

**References**

1.Brown-Elliott BA, Mann LB, Hail D, Whitney C, Wallace RJ Jr. Antimicrobial susceptibility of nontuberculous mycobacteria from eye infections. Cornea. 2012; 31(8): 900-6.

2.Albuquerque de Barros EV, Manfio GP, Ribiero Maitan V, Mendes Bataus LA, Kim SB, Maldonado LA, et al. Nocardia cerradoensis sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2003; 53(1): 29-33.

3. Wang L, Zhang Y, Lu Z, Shi Y, Liu Z, Maldonado L, et al. Nocardia beijingensis sp. nov., a novel isolate from soil. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2001; 51(5): 1783-8.

4.Hoogeveen M, Brouwer RE, Bernards AS, Soetekouw R. Nocardiosis, an important opportunistic infection. Ned Tijdschr Geneeskd. 2010; 154: A1177.

5. Exmelin L, Malbruny B, Vergnaud M, Prosvost F, Boiron P, Morel C. Molecular study of nosocomial nocardiosis outbreak involving heart transplant recipients. Journal of clinical microbiology. 1996; 34(4): 1014-6.

6. Igarashi M, Hayashi C, Homma Y, Hattori S, Kinoshita N, Hamada M, et al. Tubelactomicin A, a novel 16-membered lactone antibiotic, from Nocardia sp. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. J Antibiot (Tokyo). 2000; 53(10): 1096-101.

7. Couble A, Rodriguez-Nava V, de Montclos MP, Boiron P, Laurent F. Direct detection of Nocardia spp. in clinical samples by a rapid molecular method. Journal of clinical microbiology. 2005; 43(4): 1921-4.

8. Kurup PV, Sandhu RS. Isolation of Nocardia caviae from Soil and Its Pathogenicity for Laboratory Animals. Journal of bacteriology. 1965; 90(3): 822-3.

9.Boncyk LH, Millstein CH, Kalter SS. Use of CO2 for more rapid growth of the Nocardia species. Journal of clinical microbiology. 1976; 3(4): 463-4.

10. Shawar RM, Moore DG, LaRocco MT. Cultivation of Nocardia spp. on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1990; 28(3): 508-12.

11. Singh M, Sandhu RS, Randhawa HS. Comparison of ميلهٔ پارافينیing and conventional culture techniques for isolation of Nocardia asteroides from sputum. J Clin Microbiol. 1987; 25(1): 176-7.

12.Ayyar S, Tendolkar U, Deodhar L. A comparison of three media for isolation of Nocardia species from clinical specimens. Journal of postgraduate medicine. 1992; 38(2): 70-2.

13. Gordon RE, Hagan WA. A study of some acid-fast actinomycetes from soil with special reference to pathogenicity for animals. J Infect Dis. 1936; 59(2): 200-6.

14. Mishra SK, Randhawa HS. Application of ميلهٔ پارافينی technique to the isolation of Nocardia asteroides from clinical specimens. Appl Microbiol. 1969; 18(4): 686-7.

15. Hayakawa M, Nonomura H. Humic Acid-Vitamin Agar, a New Medium for the Selective Isolation of Soil Actinomycetes. J Ferment Technol. 1987; 65(5): 501-9

Archive of SID



www.SID.ir

16. Khan ZU, Neil L, Chandy R, Chugh TD, Al-Sayer H, Provost F, et al. Nocardia asteroides in the soil of Kuwait. Mycopathologia. 1997; 137(3): 159-63.

17. Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M, Delmee M. Distribution of nocardia species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. Journal of clinical microbiology. 2005; 43(6): 2624-8.

18. Aghamirian MR, Ghiasian SA. Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of iran (2006 - 2007). The open microbiology journal. 2009; 3: 53-7.

19. Kumar V, Bharti A, Gupta VK, Gusain O, Bisht GS. Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity. World J Microbiol Biotechnol. 2012; 28(3): 871-80.

Archive of SID



www.SID.ir