

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی گونه‌های نوکاردیا با استفاده از ژن‌های 16S rRNA، hsp65 و gyrB

مسعود کیخا*

• دریافت مقاله: ۹۶/۳/۶ • پذیرش مقاله: ۹۶/۱۲/۲۵

مقدمه: نوکاردیا یکی از مهم‌ترین گروه از اکتینومیست‌های هوازی است که در خاک زندگی می‌کند و قادر است به وسیله تنفس و تلقیح تروماتیک به بدن انسان وارد شود و عفونت نوکاردیوزیس را به وجود آورد. روش‌های مولکولی یکی از بهترین روش‌های سریع و دقیق برای شناسایی و افتراق این گروه از باکتری‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی سه ژن خانه‌دار در تشخیص و تفریق مهم‌ترین گونه‌های نوکاردیا بود.

روش: در این مطالعه مقطعی، ابتدا توالی ژن‌های 16S rRNA، gyrB و hsp65 برای ده گونه نوکاردیا از بانک ژنی دریافت شد. سپس توالی‌ها به کمک نرم‌افزارهای AL16S و jPhydit هم‌ردیف شدند، سپس اطلاعات به برنامه MEGA منتقل شد و در نهایت درخت فیلوژنتیک براساس هر یک از ژن‌های 16S rRNA، gyrB و hsp65 به طور جداگانه رسم شد.

نتایج: تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیک حاصل از ژن‌های 16S rRNA، gyrB و hsp65 نشان داد که همه این ژن‌ها گونه‌های نوکاردیا را تشخیص دادند. همچنین ژن gyrB بهترین گزینه برای ترسیم روابط فیلوژنتیک گونه نوکاردیا می‌باشد.

نتیجه‌گیری: براساس پژوهش حاضر، برای شناسایی و افتراق صحیح گونه‌های نوکاردیا می‌بایست چند ژن خانه‌دار به طور همزمان مطالعه شود.

کلید واژه‌ها: نوکاردیا، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، 16S rRNA

• **ارجاع:** کیخا مسعود. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی گونه‌های نوکاردیا با استفاده از ژن‌های 16S rRNA، hsp65 و gyrB. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۳۹۶؛ ۴(۴): ۳۰۵-۳۱۲.

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

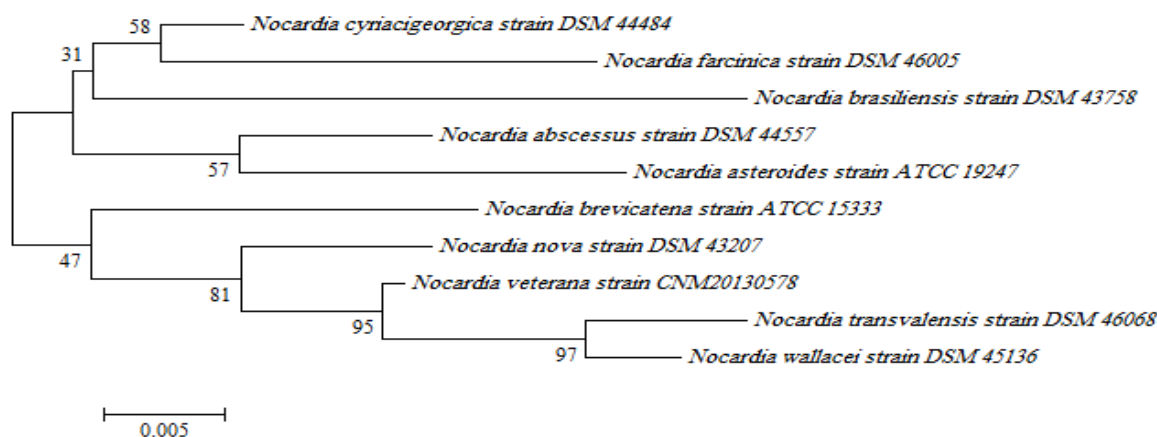
* **نویسنده مسئول:** اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی اصفهان

• **Email:** masoudkeikha@outlook.com

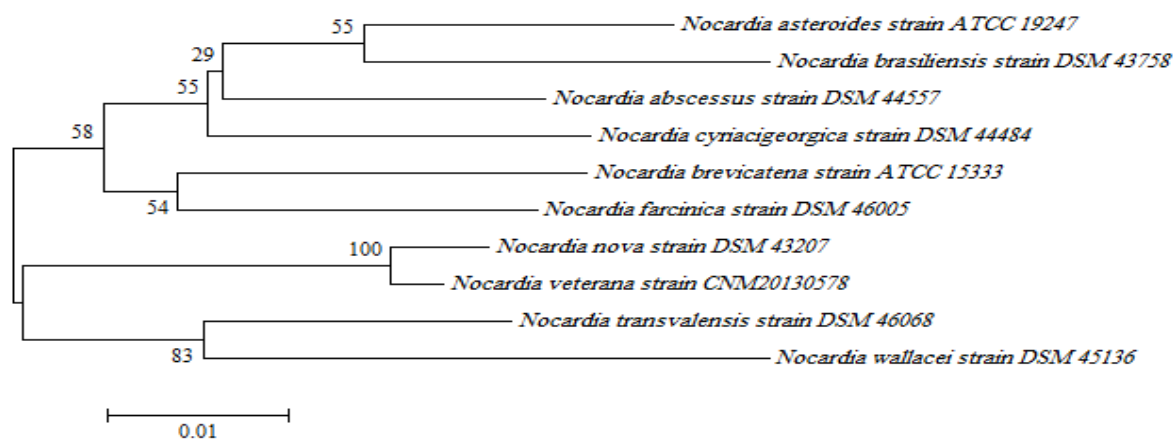
• **شماره تماس:** ۰۹۳۸۶۸۳۶۴۲۵

نسبت به سایر ژن‌های 16S rRNA و *hsp65* بهتر عمل کرده است.

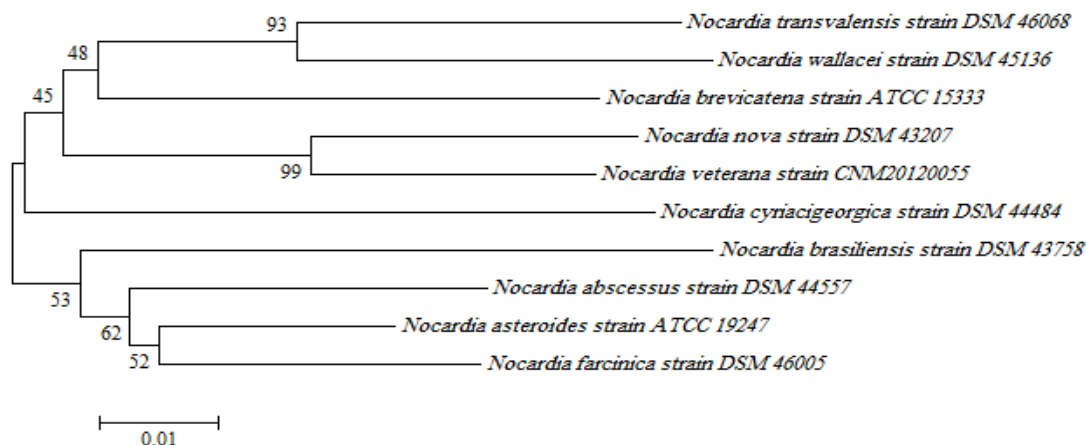
16S rRNA، *hsp65* و *gyrB* قادرند گونه‌های نوکاردیا را تشخیص و افتراق دهند؛ اما در صورتی که تکامل و بررسی روابط خویشاوندی مدنظر باشد واضح است که ژن *gyrB*



شکل ۱: درخت فیلوژنتیک گونه‌های نوکاردیا براساس ژن 16S rRNA



شکل ۲: درخت فیلوژنتیک گونه‌های نوکاردیا براساس ژن *hsp65*



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک گونه‌های نوکاردیا براساس ژن *gyrB*

سلولیت، اولسره‌های پوستی، عفونت‌های منتشره مغزی، کلیوی، مفاصل و استخوان‌ها، قلب و چشم بروز می‌نماید. بررسی مطالعات نشان می‌دهد که نوکاردیوزیس ریوی با میزان شیوع ۶۴٪ از شایع‌ترین اشکال عفونت‌های نوکاردیوزیس می‌باشد؛ پس از عفونت‌های ریوی، عفونت‌های جلدی (۲۸٪)، سیستم اعصاب مرکزی (۱۹٪)، عفونت‌های تجهیزات پزشکی مانند کاتتر، چشم، دریچه‌های مصنوعی قلب، کبد، طحال و غده‌های فوق کلیوی و تیروئید در رتبه‌های بعدی شیوع قرار دارند [۱۰]. نوکاردیا آستروئیدس با اختصاص دادن بیش از ۵۰٪ گزارش‌های عفونت‌های انسانی شناخته شده‌ترین گونه نوکاردیایی پاتوژن انسانی به حساب می‌آید، پس نوکاردیا آستروئیدس گونه‌های نوکاردیا برازیلینسیس، نوکاردیا آبسوس، نوکاردیا سیریاسیجئورجیکا، نوکاردیا فارسنیکا، نوکاردیا نوآ، کمپلکس نوکاردیا ترانسوالنسیس، کمپلکس نوکاردیا نوآ، نوکاردیا سودوبرازیلینسیس و نوکاردیا وترانا نیز از مهم‌ترین گونه‌های پاتوژن انسانی هستند [۱۱]. در ایالات متحده آمریکا مطالعه‌ای که بین سال‌های ۱۹۹۵-۲۰۰۴ بر روی ۷۶۵ بیمار مبتلا به عفونت نوکاردیوزیس صورت گرفت نشان داد که شایع‌ترین گونه‌های نوکاردیایی جدا شده از بیماران به ترتیب گونه‌های نوکاردیا نوآ (۲۸٪)، نوکاردیا برازیلینسیس (۱۴٪)، نوکاریا فارسنیکا (۱۴٪) و نوکاردیا سیریاسیجئورجیکا (۱۳٪) بودند [۱۲].

عفونت‌های نوکاردیایی اغلب با عفونت‌های ویروسی، مایکوپلازما، قارچ، سل و تومورهای بدخیم اشتباه گرفته می‌شوند [۱۳، ۴]؛ عدم اختصاصیت تصاویر رادیولوژیک، تظاهرات بالینی و خصوصیات میکروبی شناسی (رنگ‌آمیزی اسید فاست و کند رشد بودن) گونه‌های نوکاردیا و مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد از مهم‌ترین دلایل اشتباه در تشخیص می‌باشد جدای از این که شناسایی گونه‌های نوکاردیا با استفاده از روش بیوشیمیایی مرسوم خود در بیش از ۳۷٪ موارد منجر به اشتباه در تشخیص می‌گردد [۱۴، ۸]. با این وجود با توجه به متفاوت بودن الگوی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی گونه‌های نوکاردیا، مطالعات اپیدمیولوژیکی و شناسایی صحیح عامل عفونت و در نتیجه آن تجویز رژیم درمانی مؤثر، یکی از مهم‌ترین رسالت‌های آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شناسایی عفونت‌های نوکاردیایی تا سطح گونه است [۱۵، ۲]. روش‌های مولکولی یکی از مهم‌ترین ابزارها در تشخیص چنین عفونت‌هایی به حساب می‌آیند؛ در این میان تعیین توالی قسمت‌های محافظت شده ژن‌های خانه‌دار (مانند ژن‌های 16S rRNA و

طبق درخت فیلوژنتیک بر پایه ژن 16S rRNA گونه‌های نوکاردیا فارسنیکا و سیریاسیجئورجیکا با هم در یک شاخه قرار گرفته‌اند و گونه‌های نوکاردیا آبسوس و آستروئیدس نیز در یک شاخه مجزای دیگر هستند حال آن که گونه‌های نوکاردیا آستروئیدس و فارسنیکا به لحاظ ژنتیکی بیشترین شباهت را دارند؛ ژن *hsp65* نیز به اشتباه نوکاردیا آستروئیدس را در کنار نوکاردیا برویکاتا قرار داده است در حالی که ژن *gyrB* این دو گونه را به درستی در یک شاخه دسته‌بندی کرده است. همچنین ژن 16S rRNA دو عضو مهم بیماری‌زای کمپلکس نوکاردیا نوآ (نوکاردیا نوآ و نوکاردیا وترانا) را به اشتباه در کنار سایر گونه‌ها قرار داده است این در حالی است که ژن‌های *hsp65* و *gyrB* اعضای کمپلکس نوآ را به درستی و با عدد *bootstrap value* بالایی تشخیص داده‌اند. مورد بعد اینکه نوکاردیا آبسوس بر اساس ژن‌های 16S rRNA و *hsp65* به ترتیب با گونه‌های نوکاردیا آستروئیدس، نوکاردیا برازیلینسیس و فارسنیکا در ارتباط است؛ اما در بررسی درخت روابط فیلوژنتیک حاصل از ژن *gyrB* نوکاردیا آبسوس با گونه‌های آستروئیدس و فارسنیکا به طور مشترک یک نیای واحد داشته‌اند؛ با توجه به نزدیکی روابط بین گونه‌های نوکاردیا آستروئیدس و فارسنیکا به نظر می‌آید تحلیل ژن *gyrB* نسبت به خویشاوندی نوکاردیا آبسوس و گونه‌های نوکاردیا آستروئیدس و فارسنیکا محتمل‌تر و صحیح‌تر می‌باشد. همچنین در نگاه کلی به تصاویر می‌توان دریافت ژن *gyrB* نسبت به سایر ژن‌های 16S rRNA و *hsp65* گونه‌های نوکاردیا را با اعداد *bootstrap value* های مطمئن‌تری افتراق داده است.

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون بیش از ۳۰ گونه مختلف نوکاردیا از نمونه‌های بالینی جداسازی شده است [۷]. در این میان اعضای کمپلکس نوکاردیا آستروئیدس شایع‌ترین پاتوژن‌های انسان هستند که به طور شایع از نمونه‌های بالینی جداسازی و گزارش می‌شوند [۸]. شیوع عفونت‌های نوکاردیوزیس در کشور ایران به میزان ۱/۸۸ درصد گزارش شده است [۴]. طبق گزارش‌های منتشره شده از آمریکا شصت درصد از عفونت‌های نوکاردیوزیس انسانی در بیماران نقص سیستم ایمنی اتفاق می‌افتد؛ در این میان نسبت عفونت‌های نوکاردیا در مردان سه برابر زنان است. عفونت‌های نوکاردیا در انسان می‌تواند با اشکال مختلفی از قبیل عفونت‌های ریوی، آبسه‌های ریوی، لزیون‌های ریوی، عفونت جلدی،

[۱۷]. در یک مطالعه قدرت تشخیص و تفریق ژن‌های *gyrB* و *rpoB* در افتراق گونه‌های نوکاردیا مورد سنجش قرار گرفت؛ طی این مطالعه ۱۱۹ ایزوله بالینی نوکاردیا از نظر تشخیص و افتراق توسط ژن‌های *rpoB* و *gyrB* مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که ژن *gyrB* به تنهایی یک ژن قدرتمند در شناسایی و افتراق گونه‌های نوکاردیا می‌باشد [۱۸].

پایین بودن اعداد Bootstrap value چند clade، حجم کم تعداد توالی‌های مورد مطالعه از مهم‌ترین ابهامات و نواقص مطالعه حاضر بود؛ هر چند سعی شد شایع‌ترین گونه‌های نوکاردیا جدا شده از نمونه‌های بالینی و گونه‌هایی که بیشترین شباهت ژنومی را داشتند انتخاب شوند، با این حال با توجه به این که جداسازی و تشخیص عفونت‌های نوکاردیوزیس نیازمند به کارگیری روش‌ها و شرایطی خاص می‌باشد و این استاندارد ها در کمتر آزمایشگاه‌های بالینی میکروبی شناسی رعایت می‌شود این گونه عفونت‌های شناسایی نشده و به طور کلی اطلاعات در خصوص این خانواده از باکتری‌ها محدود می‌باشد. به طور کلی به منظور شناسایی مولکولی گونه‌های نوکاردیا بهترین گزینه‌های موجود، ژن‌های خانه‌داری همچون: *16S rRNA*، *secA1* و *gyrB* بهترین گزینه‌ها می‌باشند؛ با توجه به اینکه نتایج حاصل از بررسی هر یک از این ژن‌ها به طور مستقل با نواقصی همراه است؛ لذا مطالعه همزمان بیش از یک ژن خانه‌دار نتیجه کامل‌تری را ارائه می‌دهد.

hsp65 یکی از پرکاربردترین روش‌های تشخیص مولکولی میکروارگانیزم‌ها است که مطالعات مولکولی صورت گرفته در زمینه شناسایی و افتراق گونه‌های نوکاردیا ثابت کرده است که ژن *hsp65* در مقایسه با ژن *16S rRNA* کمی متغییر تر بوده؛ لذا علی‌رغم کاربرد وسیع ژن *16S rRNA* در شناسایی مولکولی میکروارگانیزم‌ها، این ژن توانایی شناسایی و افتراق کامل گونه‌های نوکاردیا را ندارد. Rudramurthy و همکاران در مطالعه‌ای به منظور مقایسه قدرت تشخیص و افتراق ژن‌های *hsp65* و *16S rRNA* در خصوص گونه‌های نوکاردیا دریافتند که عملکرد ژن *hsp65* در مقایسه با ژن *16S rRNA* بهتر است [۸]. طی مطالعه صالحی‌پور و همکاران بر روی ۴۶ ایزوله نوکاردیا جدا شده از نمونه‌های بالینی کشورمان مشخص شد که تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیک بر پایه ژن‌های *gyrB* و *secA1* نسبت به ژن *16S rRNA* مطلوب‌تر است. همچنین مطالعه همزمان ژن‌های *16S rRNA* و *gyrB* بهترین نتیجه ممکن را به همراه داشت [۶]. McTaggart و همکاران در مطالعه‌ای دیگر در زمینه شناسایی و افتراق ۱۹۰ ایزوله بالینی نوکاردیا دریافتند که به کارگیری تکنیک MLSA با استفاده از ترکیب ژن‌های *gyrB-16S rRNA-secA1* بهترین نتیجه ممکن را می‌دهد [۱۶]. طبق مطالعه‌ای که توسط Takeda منتشر شد، مشخص شد که ژن *gyrB* در مقایسه با *16S rRNA* گونه‌های نوکاردیا را با دقت بالاتری تفکیک و تشخیص می‌دهد

References

1. Aghamirian MR, Ghiasian SA. Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of Iran (2006 - 2007). *Open Microbiol J*. 2009;3:53-7.
2. Bafghi MF, Heidarieh P, Habibnia S, Rasouli-Nasab M, Kalantar Neyestanaki D, Afshar D, et al. Phenotypic and molecular properties of the *Nocardia* species. *Avecinna J Clin Microb Infect* 2014;1(1):e19215.
3. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2):259-82.
4. Rahdar HA, Azadi D, Shojaei H, Daei-Naser A. Molecular analysis and species diversity of *Nocardia* in the hospital environment in a developing country, a potential health hazard. *J Med Microbiol* 2017;66(3):334-341.
5. Wallace RJ, Steele LC, Sumter GW, Smith JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* asteroides. *Antimicrob agents chemother*. 1988;32(12):1776-9.
6. Salehipour M, Zaker Bostanabad S, Rezaee S, Hashemi-Shahraki A. Species spectrum of pathogenic *Nocardia* isolated from patients. *New Cellular & Molecular Biotechnology Journal* 2016; 6(21):75-84.
7. Kageyama A, Poonwan N, Yazawa K, Mikami Y, Nishimura K. *Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54(Pt 1):125-30.
8. Rudramurthy SM, Honnavar P, Kaur H, Samanta P, Ray P, Ghosh A, et al. Molecular identification of clinical *Nocardia* isolates from India. *J Med Microbiol* 2015;64(10):1216-25.
9. Shariff M, Gunasekaran J. Pulmonary nocardiosis: review of cases and an update. *Can Respir J* 2016;2016:7494202.
10. Cui Y, Yang Y, Peng WH, Liang Q, Li H, Li XY, et al. *Nocardia* infection of muscular and pulmonary in a membranous glomerulonephritis patient treated only

by steroids: a case report and article review. *Int J Clin Exp Med* 2016;9(11):22687-90.

11. Kandi V. Human nocardia infections: a review of pulmonary nocardiosis. *Cureus* 2015;7(8):e304.

12. Igbinsosa O, Igbinsosa O, Dass K, Wortmann G. Nocardia arthritidis infection in an immunocompetent human in the United States. *American Journal of Medical Case Reports* 2016;4(7):251-4.

13. Menku A, Kurtsoy A, Tucer B, Yildiz O, Akdemir H. Nocardia brain abscess mimicking brain tumour in immunocompetent patients: report of two cases and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)* 2004;146(4):411-4;

14. Muricy EC, Lemes RA, Bombarda S, Ferrazoli L, Chimara E. Differentiation between nocardia spp. and mycobacterium spp.: critical aspects for bacteriological diagnosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; 56(5): 397-401.

15. Wallace RJ, Tsukamura M, Brown BA, Brown J, Steingrube VA, Zhang YS, et al. Cefotaxime-resistant Nocardia asteroides strains are isolates of the controversial species Nocardia farcinica. *J Clin Microbiol* 1990;28(12):2726-32.

16. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. Phylogeny and identification of Nocardia species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4525-33.

17. Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y. Phylogenetic studies of Nocardia species based on gyrB gene analyses. *J Med Microbiol* 2010;59(Pt 2):165-71.

18. Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Villalon P, Medina-Pascual MJ, Saez-Nieto JA. Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical Nocardia species in Spain according to their gyrB and rpoB genes. *J Clin Microbiol* 2013;51(11):3602-8.

Phylogenetic Analysis of *Nocardia* spp. using 16S rRNA, hsp65 and gyrB Genes

Masoud Keikha *

• Received: 27 May, 2017

• Accepted: 16 Mar, 2018

Introduction: *Nocardia* is one of the most important aerobic actinomycetes that lives in soil and can enter the human body by inhalation and traumatic inoculation and causes Nocardiosis. Molecular methods are one of the best methods for rapid and accurate identification and differentiation of species of this group of bacteria. The purpose of this study was evaluation of three housekeeping genes in identification and differentiation of most important species of *Nocardia*.

Methods: In this study cross-sectional, first, gene sequences of 16S rRNA, gyrB and hsp65 for ten species of *Nocardia* were obtained from Genebank (NCBI). Then, those sequences were transferred to MEGA 5.0. Finally, phylogenetic trees based on each of 16S rRNA, gyrB and hsp65 genes were drawn.

Results: Phylogenetic trees analysis based on 16S rRNA, gyrB and hsp65 gene sequences indicated that all of these genes could identify and differentiate *Nocardia* species. Also, it was found that gyrB gene is the best option for drawing the phylogenetic relationships of *Nocardia* species.

Conclusion: According to this research, for accurate identification of *Nocardia* species, several housekeeping genes should be investigated simultaneously.

Keywords: *Nocardia*, Phylogenetic analysis, 16S rRNA

• **Citation:** Keikha M. Phylogenetic Analysis of *Nocardia* spp. using 16S rRNA, hsp65 and gyrB Genes. *Journal of Health and Biomedical Informatics* 2018; 4(4): 308-312.

1. M.Sc. student in Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

***Correspondence:** School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

• **Tel:** 09386836425

• **Email:** masoudkeikha@outlook.com