DOI: 10.48305/jims.v42.i800.1240

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و دوم/ شماره‌ی ۸۰۰/هفته‌ی چهارم اسفند ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۱ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۳ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۱۲/۳۰

جداسازی و شناسایی مولکولی و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیک رودوکوکوس‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان در شیراز

راضیه هلالی پرگالی[۱]، مجید باصری صالحی[۲]، نیما بهادر[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: شیوع عفونت‌های فرصت‌طلب، مانند عفونت‌های ناشی از گونه‌های رودوکوکوس، یک مسأله‌ی مهم در افراد دارای نقص ایمنی، به‌ویژه بیماران مبتلا سرطان است. از این‌رو با توجه به شیوع روزافزون انواع سرطان‌ها و عوارض ثانویه‌ی آنها در ایران، هدف از این مطالعه، جداسازی، شناسایی مولکولی و تعیین حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌های رودوکوکوس از بیماران مبتلا به سرطان به منظور بهبود مدیریت این عفونت‌ها و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بود.

روش‌ها: در سال ۱۴۰۲، تعداد ۷۹ نمونه بالینی (مایع پلور، خلط، شستشوی برونش، آبسه دندان، زخم و خون) از بیماران مبتلا به سرطان بر اساس روش استاندارد جمع‌آوری شد. با استفاده از آزمایش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی شناسایی اولیه و PCR و آنالیز توالی 16SrRNA جنس و گونه‌ی ایزوله‌های رودوکوکوس شناسایی گردید. تست حساسیت دارویی برای هر ایزوله، با استفاده از روش سریال رقت طبق دستورالعمل CLSI ۲۰۲۲ انجام شد.

یافته‌ها: از ۷۹ نمونه، ۱۳ نمونه (۱۶/۴۵ درصد) به عنوان رودوکوکوس شناسایی شدند که به هفت گونه: *R. erythropolis* ،*R. atherivorans* ،*R. ruber* ،*R. zopfi* ،*R. phenolicus* ،*R. equi* و *R. rhodochrous* تعلق داشتند. شایع‌ترین سرطان‌ها واجد عفونت، بدخیمی‌های خونی شامل ALL و CLL بودند. ایزوله‌ها رودوکوکوس واجد حساسیت بالا به دوکسی‌سایکلین، ایمیپنم و آزیترومایسین بودند، در حالی که نسبت به سیپروفلوکساسین و سفوکسیتین مقاومت نشان دادند؟؟؟؟؟.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که رودوکوکوس‌ها به عنوان عوامل مهم عفونت‌های فرصت‌طلب در بیماران مبتلا به سرطان شیوع، تنوع و دامنه‌ی حساسیت آنتی‌بیوتیکی گسترده‌ای دارند. بنابراین جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری برای مدیریت بهینه عفونت‌ها و کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در افراد مبتلا به سرطان اهمیت بالایی دارد.

واژگان کلیدی: رودوکوکوس؛ عفونت‌های مرتبط با سرطان؛ 16SrRNA؛ حساسیت آنتی‌بیوتیکی

ارجاع: هلالی پرگالی راضیه، باصری صالحی مجید، بهادر نیما. **جداسازی و شناسایی مولکولی و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیک رودوکوکوس‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان در شیراز** . مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۸۰۰): ۱۲۴۰-۱۲۴۸.

مقدمه

با پیشرفت فناوری، علوم پزشکی و بهبود شرایط اجتماعی و افزایش اقدامات بهداشتی عمومی در جوامع، پیشرفت قابل‌توجهی در کنترل بیماری‌های عفونی در سطح جهانی حاصل شده است. با این حال، متأسفانه عواملی مانند سندرم نقص ایمنی اکتسابی (Acquired immunodeficiency syndrome) AIDS، دیابت، سرطان‌ها و سایر بیماری‌های نقص ایمنی باعث ایجاد اختلالاتی شده‌اند (۱). حساسیت بیماران مبتلا به سرطان به عفونت‌ها به دلیل خود سرطان یا درمان‌هایی که دریافت می‌کنند، افزایش می‌یابد. خطر عفونت به‌طور عمده با نوتروپنی مرتبط است، به‌طوری‌که وقتی تعداد مطلق نوتروفیل‌ها به زیر ۵۰۰ سلول در میلی‌متر مکعب می‌رسد، خطرابتلا به انواع عفونت‌ها به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۲). عوامل دیگری که می‌توانند خطر عفونت را در بیماران سرطانی افزایش دهند شامل نقص ایمنی سلولی یا هومورال، اختلال در موانع طبیعی مانند پوست و غشاهای مخاطی و وجود کاتترهای وریدی یا سایر دستگاه‌های پزشکی خارجی است (۳).

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران.

۲- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران

۳- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مجید باصری صالحی: استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران

Email: dedalos_azadi@yahoo.com

عفونت‌ها در بیماران مبتلا به سرطان می‌توانند توسط انواع میکروارگانیسم‌ها، از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها ایجاد شوند. این عفونت‌ها علت عمده بیماری و مرگ و میر در بیماران دارای نقص ایمنی، از جمله مبتلایان به HIV/AIDS، سرطان، اختلالات خودایمنی و کسانی که تحت درمان‌های سرکوب‌کننده‌ی ایمنی هستند، می‌باشند (۳، ٤). از میان این موارد، بیماران مبتلا به سرطان به‌ویژه در برابر عفونت‌های ناشی از اکتینومایست‌ها مانند رودوکوکوس‌ها و مایکوباکتریوم‌های غیرسلی آسیب‌پذیر هستند. این میکروارگانیسم‌ها به خاطر توانایی‌شان در ایجاد عفونت‌های مختلف از جمله عفونت‌های تنفسی، سیستمیک، پوستی و ایجاد آبسه، به‌ویژه در افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف، شناخته شده‌اند (٤).

رودوکوکوس‌ها یک جنس از باکتری‌های گرم مثبت و هوازی است که به دلیل توانایی‌های زیستی متنوع و سازگاری با محیط‌های مختلف، در خاک و آب به‌وفور یافت می‌شود. این باکتری‌ها در ابتدا به عنوان پاتوژن‌های حیوانی شناخته شدند، اما در دهه‌های اخیر، به‌عنوان عوامل ایجادکننده عفونت‌های فرصت‌طلب در انسان‌ها، به‌ویژه در افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۵). یکی از چالش‌های مهم در درمان عفونت‌های ناشی از رودوکوکوس، مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است. این مقاومت باعث می‌شود که درمان عفونت‌های ناشی از رودوکوکوس پیچیده‌تر و زمان‌بر شود و خطر شکست درمان را افزایش دهد. از این‌رو، شناسایی سریع و دقیق رودوکوکوس در بیماران سرطانی ضروری است تا بتوان درمان مناسب را به موقع شروع کرد (٦). در ایران، با توجه به افزایش تعداد بیماران سرطانی و استفاده‌ی گسترده از درمان‌های تهاجمی که خود منجر به ایجاد عوارض مختلف از جمله ایجاد و گسترش انواع عفونت‌های فرصت طلب از جمله رودوکوکوس‌ها می‌شود، نیاز به تحقیقات جامع در زمینه‌ی شیوع عفونت‌های رودوکوکوس، روش‌های تشخیص مولکولی و بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری‌ها بیش از پیش احساس می‌شود. از این‌رو هدف از این مطالعه، جداسازی، شناسایی مولکولی و بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی رودوکوکوس‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان است تا از طریق نتایج این تحقیق، بتوان استراتژی‌های بهتری برای مدیریت و درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها ارائه داد.

روش‌ها

از دی‌ماه ۱٤۰۱ تا آذرماه ۱٤۰۲ در یک مطالعه‌ی مقطعی، تعداد ۷۹ نمونه‌ی بالینی شامل ۱۰ نمونه مایع پلور/چرک، ۱۰ نمونه خلط، ۸ نمونه شستشوی برونشیال، ۸ نمونه آبسه دندان، ۱۲ نمونه آبسه پوست و بافت نرم، ۲۲ نمونه زخم و ۹ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان که به بیمارستان‌های محمد رسول‌الله در شهر شیراز مراجعه کرده بودند و معیارهای ورود به مطالعه را داشتند، جمع‌آوری گردید. معیارهای ورود به مطالعه شامل سن بین ۲ تا ۷۰ سال، وجود بدخیمی، تحت شیمی‌درمانی بودن، شواهد مثبت آزمایشگاهی و رادیولوژیک و وجود هر گونه علائم عفونت مانند تب، علائم تنفسی، آبسه، چرک و ترشحات عفونی بود. معیارهای خروج شامل عدم وجود بدخیمی، عدم وجود تب و عدم شیمی‌درمانی بود. فرم رضایت‌نامه‌ی آگاهانه‌ی کتبی از همه‌ی بیماران یا سرپرستان آن‌ها دریافت شده و تمام روش‌های استفاده شده مطابق با دستورالعمل‌ها و مقررات مربوطه کار با بیماران مبتلا به سرطان انجام شد.

نمونه‌برداری و جداسازی رودوکوکوس‌ها

نمونه‌های خون با گرفتن ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی جمع‌آوری گردید، نمونه‌های آبسه با تخلیه‌ی محتوای آنها به دست آمد، نمونه‌های سیستم تنفسی توسط شستشوی برونش‌ها به دست آمد و بیوپسی را برای نمونه‌های تومور بافت جامد توسط بیوپسی جمع‌آوری گردید. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به آزمایشگاه دانشگاه منتقل شدند و حداکثر ظرف مدت ۲٤ ساعت مورد کشت و آزمایش‌های تشخیصی قرار گرفتند (۷). ابتدا از نمونه‌ها اسمیر تهیه شد و با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی گرم و کینیون رنگ‌آمیزی شدند. سپس، نمونه‌های غیر استریل مانند زخم، چرک و نمونه‌های تنفسی با استفاده از ٤٪ NaOH و ۱٪ HCL ضدعفونی شدند و سایر نمونه‌های استریل شامل خون، مایع تراشه و مایع پلور با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت g × ۳۰۰۰ تغلیظ شدند، سپس در محیط‌های کشت براث بدون کربن، آگار خون‌دار (مرک، آلمان) و محیط ساتن آگار (حاوی ۳۰ گرم در لیتر عصاره‌ی مخمر، ۱۵ گرم در لیتر پودر آگار و ۱۰ گرم در لیتر گلوکز) که با آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچ و ضدباکتری [کانامایسین، اسید نالیدیکسیک و نیستاتین (هر کدام با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)] غنی شده بودند، تلقیح و به مدت ۱٤ روز هفته در دماهای ۳۰، ۳۷ و ٤۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند.

شناسایی میکروبیولوژی ایزوله‌ها

ایزوله‌های بالینی که بر روی محیط‌های کشت رشد کرده بودند جهت تشخیص اولیه جنس رودوکوکوس با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی اسید فاست، رنگ‌آمیزی گرم، تست CAMP با Listeria ivanovii (ATCC 19119) به عنوان نشانگر، هیدرولیز اسکولین، اوره‌آز، کاتالاز، نیترات و ژلاتیناز مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی دقیق جنس و گونه‌ی ایزوله‌ها با استفاده از آزمون‌های مولکولی به شرح زیر انجام شد (۸).

شناسایی مولکولی ایزوله‌ها

DNA کروموزومی ایزوله‌های رودوکوکوس با استفاده از روش استاندارد جوشاندن درون بافر فسفات، به شرح زیر استخراج شد. تعداد کمی از کلنی‌های باکتری به ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر TE (Tris EDTA) اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و سپس در g × ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به میکروتیوب استریل منتقل و مجدداً در g × ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و DNA رسوب داده شده درون ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره گردید (۹).

جهت شناسایی جنس ایزوله‌هایی که به‌صورت فنوتیپی به عنوان رودوکوکوس شناسایی شدند، از روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی NG1-F 5′-GTCAACAACATCGACCAGGCG) و NG1-R 5′-CGAGCCGTCCACGACGTACAG) جهت تکثیر قطعه‌ی ۸۲۹ جفت بازی از ژن 16S rRNA، که توسط Hosseini و همکاران پیشنهاد شده است، استفاده شد (۱۰). در ادامه جهت شناسایی دقیق گونه‌های رودوکوکوس از PCR و آنالیز توالی ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. تعیین توالی محصول PCR ژن 16S rRNA توسط شرکت پیشگام بیوتکنولوژی (ایران) انجام شد. توالی‌های به‌دست آمده به‌صورت دستی تراز شدند و با تمام توالی‌های گونه‌های رودوکوکوس مرتبط و مشابه به دست آمده از پایگاه داده GenBank با استفاده از برنامه‌ی jPhydit نسخه‌ی ۳-۱-۱ مقایسه و تحلیل شدند و بدین ترتیب گونه‌ی دقیق آنها مشخص گردید (۱۱).

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با استفاده از روش رقت‌سازی سریالی

برای انجام آزمون حساسیت دارویی و تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای ایزوله‌های کلینیکی رودوکوکوس، از روش استاندارد رقت‌سازی سریالی برای رودوکوکوس توصیه شده توسط CLSI 2022 استفاده شد (۱۲). بر این اساس آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱ IU/mg)، سیپروفلوکساسین (۵۰۰ mg/mL)، سفوکستین (۱۰۰ mg/mL)، دوکسی‌سیکلین (۱۰۰ mg/mL)، ایمی‌پنم (۵۰۰ mg/mL)، لاینزولید (۶۰۰ mg/mL) و آزیترومایسین (۵۰۰ mg/mL) (Sigma-Aldrich- Germany) انتخاب گردید. محلول‌های ذخیره برای هر دارو توسط حل کردن پودر خالص داروهای در آب مقطر استریل یا ماده‌ی حل‌کننده اختصاصی آماده شدند. تمام ایزوله‌ها در محیط sauton agar کشت داده و سپس به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. برای هر ایزوله، سوسپانسون با غلظت معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند با حل کردن کلنی‌های ایزوله‌ها در محیط آبگوشت sauton تهیه گردید.

محلول‌های استوک با حل کردن پودر هر آنتی‌بیوتیک در یک حلال مناسب تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۲۵- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی در صفحات میکروتیتر ۹۶ چاهکی شکل انجام شد. در ابتدا درون هر چاهک ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت ساتن براث غنی شده با توئین ۸۰ ریخته شد، سوسپانسیون‌های اولیه داروها در محیط کشت ساتن براث درون چاهک‌ها میکس شده و رقیق گردیدند به طوری که برای هر دارو هفت رقت سری دو برابری از ۰/۶ تا ۲۵۶ میلی‌گرم بر میکرولیتر تهیه شد. سپس هر چاهک با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تلقیح شد. برای کنترل رشد، درون یک چاهک بدون هیچ عامل آنتی‌بیوتیکی از سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تلقیح شد. میکروپلیت‌ها درون در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند و به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان MIC به عنوان پایین‌ترین غلظت آنتی‌بیوتیک که مانع رشد باکتری می‌شود، تعیین شد. کنترل کیفیت MIC با استفاده از سویه‌های مرجع توصیه شده توسط CLSI شامل استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213، انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 انجام شد.

آزمایش‌ها به صورت دوتایی انجام شد و برای دستیابی به نتایج نهایی، میانگین مقادیر محاسبه گردید. برای تعیین شیوع ایزوله‌های رودوکوکوس در نمونه‌های مورد آزمایش، از فرمول زیر استفاده شد:

(تعداد نمونه‌های مثبت / تعداد کل نمونه‌ها) × ۱۰۰

نتایج به صورت درصد بیان شدند. داده‌های به دست آمده از این مطالعه در جداول و درصدها ارائه شده است.

یافته‌ها

مشخصات نمونه‌ها و بیماران

در مطالعه‌ی حاضر، ۷۹ نمونه به ترتیب زیر از بیماران مبتلا به سرطان جمع‌آوری شد. از مجموع ۷۹ نمونه‌ی بالینی، ۳۲ نمونه (۴۰/۵۱ درصد) از بیماران زن و ۴۷ نمونه (۵۹/۴۹ درصد) از بیماران مرد جمع‌آوری شد. سن بیماران در محدوده‌ی ۲ تا ۷۰ سال بود، اما بالاترین فراوانی نمونه‌ها در محدوده‌ی سنی ۴۵ تا ۶۵ سال قرار داشت. شایع‌ترین بیماری زمینه‌ای در میان بیماران، بدخیمی‌های خونی شامل لوسمی لنفوسیتیک حاد (ALL) و لوسمی لنفوسیتیک مزمن (CLL) با ۲۴ نمونه (۳۰/۳۸ درصد) بود، پس از آن تومور مغزی با ۱۶ نمونه (۲۰/۲۵ درصد)، سرطان‌های دستگاه گوارش شامل سرطان معده و روده با ۱۴ نمونه (۱۷/۷۲ درصد)، سرطان پستان با ۱۲ نمونه (۱۵/۱۶ درصد)، استئوسارکوم با ۷ نمونه (۸/۸۶ درصد) و سرطان ریه با ۶ نمونه (۷/۵۹ درصد) قرار داشتند. مشخصات بیماران

شامل سن، جنس، نوع بدخیمی و داروی شیمی‌درمانی مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. جدول ۲ منابع و جزئیات بالینی نمونه‌های بالینی را خلاصه می‌کند.

شناسایی میکروبیولوژیک و مولکولی ایزوله‌ها

بر اساس تست‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی شامل رنگ‌آمیزی گرم و اسید فست، تست CAM، پیرازینامیداز، اسکولین، اوره‌آز، نیترات، کاتالاز، ژلاتیناز و PCR و آنالیز توالی ژن 16S rRNA، از ۷۹ نمونه‌ی بالینی، ۱۳ (۱۶/۴۵ درصد) ایزوله به عنوان ردوکوکوس شناسایی شدند. آنالیز فیلوژنتیکی ایزوله‌ها بر اساس توالی‌های ژن 16SrRNA نشان داد که همه‌ی ایزوله‌ها دارای مشخصه‌های نوکلئوتیدی جنس رودوکوکوس در موقعیت‌های 70–98 (A-T)، 293–304 (G-T)، 307 (C)، 328 (T)، 614–626 (A-T)، 631(G)، 661–744 (G-C)، 824–876 (T-A)، 825–875 (A-T) و 843 (C)، ۱۱۲۲–۱۱۵۱ (A-T) بودند (۱۳).

نتایج تست‌های میکروبیولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی نشان داد که ایزوله‌های ردوکوکوس در مطالعه ما به هفت گونه‌ی معتبر تعلق داشتند که به ترتیب شامل *R. erythropolis* با چهار ایزوله (۳۰/۸ درصد)، *R. atherivorans* با سه ایزوله (۲۳ درصد) *R. ruber* با دو ایزوله (۱۵/۴ درصد) و چهار ایزوله‌ی منفرد که به چهار گونه تأیید شده *R. zopfi*، *R. phenolicus*، *R. equi* و *R. rhodococcus* تعلق داشتند. آنالیز توالی‌های ژن 16S rRNA نشان داد که همه‌ی ایزوله‌های رودوکوکوس دارای شباهت بالایی (۱۰۰ درصد) به نزدیک‌ترین گونه‌های تأیید شده بودند. مشخصات نمونه‌ها و نتایج آزمون‌های مولکولی و بیوشیمیایی ایزوله‌های رودوکوکوس در جدول ۲ آمده است.

شماره ثبت توالی نوکلئوتیدی ایزوله‌های بالینی رودوکوکوس در GenBank

شماره‌ی دسترسی GenBank توالی‌یابی 16S rRNA ایزوله‌های بالینی رودوکوکوس جداسازی شده در مطالعه‌ی حاضر در بانک اطلاعاتی GenBank در زیر فهرست شده‌اند، ایزوله‌ی R. erythropolis (MZ674180) HR1، ایزوله‌ی *R. zopfi* HR12 (MZ674181)، ایزوله‌ی *R. phenolicus* HR14 (MZ674183)، ایزوله‌ی *R. aetherivorans* HR15 (MZ674185) ایزوله‌ی *R. equi* HR17 (MZ674186)، ایزوله‌ی R. ruber HR23 (MZ674198)، ایزوله‌ی R. rhodochrous HR32 (MZ674199) (۱۰).

جدول ۱. مشخصات نوع بیماری زمینه‌ای و رژیم درمانی بیماران مورد بررسی در مطالعه

تعداد نمونه‌ها	جنسیت	محدوده‌ی سنی (سال)	نوع نمونه	نوع سرطان	رژیم درمانی
۱۰	۳ زن و ۷ مرد	۴۰–۷۰	خلط	سرطان سینه/ سرطان ریه CLL	Doxorubicin Paclitaxel Pembrolizumab Afatinib
۱۰	۵ مرد و ۵ زن	۵۰–۷۰	مایع جنب/چرک	سرطان دستگاه گوارش/ سرطان ریه	Chlorambucil Cisplatin Pembrolizumab Fluorouracil, Afatinib Cisplatin
۸	۶ زن و ۲ مرد	۲۰–۴۵	نمونه‌های شستشوی برونش	تومور مغزی/ سرطان ریه CLL	Cisplatin Chlorambucil Pembrolizumab Afatinib radiothrapy
۸	۳ زن و ۵ مرد	۲–۳۰	آبسه دندانی	تومور مغزی ALL	Daunorubicin Methotrexate Radiotherapy
۱۲	۲ زن و ۱۰ مرد	۵–۵۵	آبسه‌ها	سرطان پستان ALL	Daunorubicin Methotrexate Doxorubicin Paclitaxel
۲۲	۹ زن و ۱۳ مرد	۷–۶۵	زخم	استئوسارکوم/ ALL / تومور مغزی/ سرطان دستگاه گوارش	Ifosfamide, Doxorubicin Methotrexate Fluorouracil, Cisplatin radiotherapy
۹	۴ زن و ۵ مرد	۵–۶۵	خون	استئوسارکوم/ ALL / سرطان دستگاه گوارش	Ifosfamide, Doxorubicin Methotrexate Fluorouracil, Cisplatin

جدول ۲. مشخصات نمونه، ویژگی‌های فنوتیپی و مولکولی ایزوله‌های بالینی رودوکوکوس مورد مطالعه

مشخصات نمونه			ویژگی‌های فونتیپی و بیوشیمیایی ایزوله							آنالیز توالی 16S rRNA	
نام ایزوله‌ها	نوع نمونه	نوع سرطان	دمای بهینه رشد	رنگ‌آمیزی اسید فست نسبی	CAMP	ژلاتیناز	آوره آز	کاتالاز	نیترات	شباهت(%)	تفاوت در تعداد نوکلئوتیدها	تشخیص
HR1, HR6, HR7 and HR28	خلط / خون / بیوپسی	سرطان پستان/ سرطان ریهALL	۳۷-۳۰	+	+	+	+	+	-	۹۹/۷۶	۸۲۳/۲	*R. erythropolis*
HR15, HR20 and HR35	بیوپسی / خلط	سرطان گوارشی/ سرطان ریه	۳۷-۳۰	+	+	-	+	+	+	۱۰۰	۰/۷۸۲	*R. aetherivorans*
HR23 and HR30	بیوپسی / خون	تومور مغزی CLL	۳۷-۳۰	+	+	-	-	+	+	۹۸/۹۲	۲/۸۲۸	*R. ruber*
HR12	بیوپسی	سرطان ریه	۳۷-۳۰	+	+	+	+	+	+	۹۹/۸۸	۱/۹۲۳	*R. zopfi*
HR14	خون	ALL	۳۷-۳۰	+	+	+	-	+	-	۹۹/۵	۲/۸۰۷	*R. phenolicus*
HR17	بیوپسی / خون	استئوسارکومALL	۳۷-۳۰	+	+	+	+	+	-	۱۰۰	۰۰/۸۲۴	*R. equi*
HR32	آسپیراسیون آبسه	تومور مغزی	۳۷-۳۰	+	+	-	+	+	+	۱۰۰	۰/۸۱۲	*R. rhodochrous*

رابطه‌ی فیلوژنتیکی بین ایزوله‌های ما و گونه‌های استاندارد Rhodococcusبا استفاده از نرم‌افزار MEGAX و مقدار بالای bootstrap (Cut of value ≥ ۹۰٪) در درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی‌های ژن 16S rRNA ترسیم شده است (شکل ۱).

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

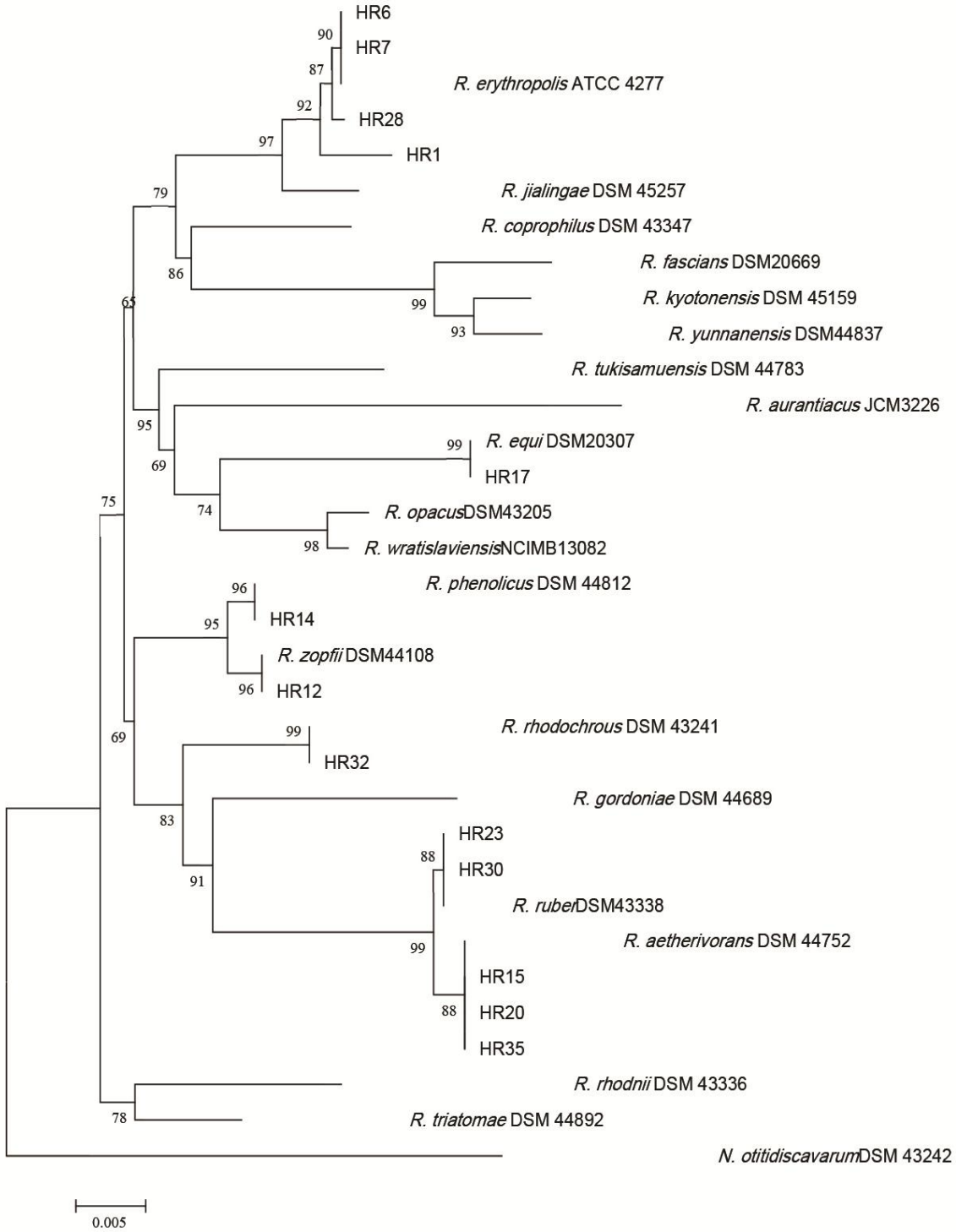
جدول ۳، مقادیر MIC ۷ آنتی‌بیوتیک انتخابی برای هر ایزوله رودوکوکوس جداسازی شده از بیماران مبتلا به سرطان را نشان می‌دهد. نتایج تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد کمترین مقدار MIC (بیشترین اثر ممانعت‌کننده) برای ایزوله‌های بالینی رودوکوکوس، شامل آنتی‌بیوتیک‌های انتخاب شده دوکسی‌سیکلین، ایمی پنم و آزیترومایسین بود که بازه‌ی آن بین ۰/۵ تا ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که بیشترین مقدار MIC (کمترین اثر ممانعت‌کننده) مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های به سیپروفلوکساسین و سفوکسیتین بود که بازه‌ی آن بین ۱۲۸ تا ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در جدول ۳، مقدار MIC هر آنتی‌بیوتیک بر علیه ایزوله‌های بالینی رودوکوکوس آورده شده است.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، جداسازی، شناسایی مولکولی و بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های رودوکوکوس‌های جداشده از بیماران مبتلا به سرطان مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از مجموع ۷۹ نمونه بالینی، تعداد ۱۳ (۱۶/۴۵ درصد) ایزوله متعلق به ۷ گونه‌ی مختلف شامل *R. erythropolis*، *R. atherivorans*، *R. zopfi*، *R. phenolicus*، *R. equi* و *R. rhodococcus* جداسازی شدند که نشان‌دهنده‌ی تنوع بالای منابع مختلف در انتقال این باکتری‌های به افراد مبتلا به سرطان می‌باشد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر در راستای نتایج دیگر مطالعات از جمله مطالعه‌ی Smith و همکاران، که از ۱۰۰ نمونه‌ی بالینی جمع‌آوری شده، ۱۵ ایزوله رودوکوکوس که شامل گونه‌های *R. equi*، *R. erythropolis*، *R. globerulus* و *R. phenolicus* جدا شد (۱۳) و مطالعه‌ی Ranganath و همکاران که از ۱۲۰ نمونه‌ی بالینی جمع‌آوری شده، ۱۸ ایزوله رودوکوکوس که شامل گونه‌های *R. equi*، *R. erythropolis*، *R. atherivorans* و *R. zopfi* جدا شد (۱۴). این مطالعات نشان‌دهنده‌ی تنوع گونه‌ای گسترده در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی و مبتلا به سرطان می‌باشند، با این وجود گونه‌های *R. erythropolis* و *R. equi* بیشترین فراوانی را در این بیماران داشته‌اند (۱۵).

نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که ایزوله‌های رودوکوکوس در بیماران مبتلا به سرطان با بیماری‌های زمینه‌ای مختلفی از جمله تومورهای مغزی، سرطان‌های دستگاه گوارش، سرطان پستان، استئوسارکوم و سرطان ریه مرتبط هستند که از میان، شایع‌ترین بیماری‌های زمینه‌ای



شکل ۱. درخت فیلوژنتیک مبتنی بر توالی **16S rRNA** ایزوله‌های بالینی رودوکوکوس و نزدیک‌ترین گونه استاندارد رودوکوکوس با استفاده از روش **neighbor-joining**. در هر گره مقادیر **bootstrap** مشخص گردیده است.

جدول ۳. میانگین مقادیر MIC (mg/mL) ایزوله‌های رودوکوکوس به آنتی‌بیوتیک‌های منتخب مطابق با استاندارد CLSI 2022

نام ایزوله‌ها	گونه	پنی‌سیلین	سیپروفلوکساسین	سفوکسیتین	دوکسی‌سیکلین	ایمیپنم	لاینزولید	آزیترومایسین
HR1, HR6, HR7 and HR28	R. erythropolis	≥32s	≥256®	≥256®	4(S)	4(S)	≥64®	≤0.25(S)
HR15, HR20 and HR35	R. aetherivorans	≥16s	≥256®	≥128®	8(I)	6(S)	≥128®	≤0.25(S)
HR23 and HR30	R. ruber	s≥16	≥256®	≥128®	4(S)	4(S)	≥64®	≤0.5(S)
HR12	R. zopfi	≥256®	≥128®	≥64®	4(S)	4(S)	≥32®	≤0.5(S)
HR14	R. phenolicus	≤0.5	≥256®	64(S)	2(S)	8(I)	64(S)	2(S)
HR17	R. equi	I≥64	≥256®	≥128®	8(I)	4(S)	≥128®	≤0.25(S)
HR32	R. rhodochrous	≥16s	≥256®	≥256®	8(I)	4(S)	≥128®	≤0.5(S)

در میان بیماران، بدخیمی‌های خونی شامل ALL و CLL بودند. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی ارتباط بالای عفونت‌های رودوکوکوسی با انواع مختلف سرطان‌ها و به ویژه بدخیمی‌های خونی است. این موضوع می‌تواند به دلیل ضعف شدید سیستم ایمنی از جمله کاهش میزان نوتروفیل‌های خون در این بیماران باشد که آن‌ها را مستعد عفونت‌های فرصت‌طلب می‌سازد. مطالعات مختلف از جمله مطالعه‌ی Li (۱۶) و Huber و همکاران (۱۷) که ۴۰ و ۶۰ درصد از ایزوله‌های جداسازی شده رودوکوکوس از بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی از جمله ALL و CLL و بدخیمی‌های گوارشی جدا شدند تأیید کننده‌ی نتایج مطالعه‌ی ما و اهمیت بالای بدخیمی‌های خونی به‌عنوان یک عامل خطر اصلی برای عفونت‌های رودوکوکوس می‌باشد.

نتایج بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نشان داد که رودوکوکوس‌های جدا شده مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و سفوکسیتین دارند، در حالی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دوکسی‌سیکلین، ایمی پنم و آزیترومایسین، حساسیت بیشتری نشان دادند. مطالعات مختلفی در زمینه‌ی بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزول‌های بالینی رودوکوکوس انجام گرفته است از جمله مطالعه‌ی Zúñiga و همکاران (۱۸) در سال ۲۰۱۹ و Ranganath و همکاران (۱۹) در سال ۲۰۲۴، که در آنها مشخص گردیده گونه‌های رودوکوکوس دارای حساسیت بالا به آنتی‌بیوتیک‌های دوکسی‌سایکلین، ایمی پنم، آزیترومایسین و ریفامپیسین بوده در حالی که مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های لاینزولاید و سیپروفلوکساسین و پنی‌سیلین بودند. این نتایج تأیید کننده‌ی نتایج مطالعه‌ی حاضر بوده و بر اهمیت شناسایی دقیق و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های بالینی رودوکوکوس تأکید دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که رودوکوکوس‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های فرصت‌طلب در بیماران مبتلا به سرطان شیوع و تنوع گونه‌ای بالا و دامنه‌ی حساسیت آنتی‌بیوتیکی گسترده‌ای دارند. بنابراین جداسازی، شناسایی دقیق و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی این گونه‌ها برای مدیریت بهینه‌ی عفونت‌ها و کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در افراد مبتلا به سرطان جهت کاهش عوارض گسترده ناشی از ضعف سیستم ایمنی از جمله ابتلا به عفونت‌ها بسیار مهم است. با توجه به مباحث فوق، این یافته‌ها می‌تواند به توسعه‌ی استراتژی‌های بهتر برای کنترل و پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی و افزایش اثربخشی درمان‌های ضدباکتریایی در افراد مبتلا به سرطان منجر شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دکترای تخصصی رشته‌ی میکروب‌شناسی به شماره‌ی ۱۴۰۰۰۳۹ می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، تصویب شد و با حمایت مالی دانشگاه به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Yuan T, Hu Y, Zhou X, Yang L, Wang H, Li L, et al. Incidence and mortality of non-AIDS-defining cancers among people living with HIV: a systematic review and meta-analysis. EClinicalMedicine 2022; 52: 101613.
2. Ghaffari K, Falahati V, Motallebirad T, Safarabadi M, Tashakor AH, Azadi D. Microbiological and molecular study of paranasal sinus infections of children with malignancy and unknown origin fever in Markazi Province, Iran. Curr Ther Res Clin Exp 2024; 100: 100745.
3. Azevedo M, Pina-Vaz C, Baltazar F. Microbes and cancer: friends or faux? nt J Mol Sci 2020; 21(9): 3115.
4. Motallebirad T, Tashakor A, Abniki R, Azadi D. Fifteen years of phenotypic and genotypic surveillance and antibiotic susceptibility pattern of Actinomycetes (Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus, etc.) in clinical and environmental samples of Iran. Diagn Microbiol Infect Dis 2023; 108(1): 116080.
5. Takai S, Sawada N, Nakayama Y, Ishizuka S, Nakagawa R, Kawashima G, et al. Reinvestigation of the virulence of Rhodococcus equi isolates from patients with and without AIDS. Lett Appl Microbiol 2020; 71(6): 679-83.
6. Majidzadeh M, Fatahi-Bafghi M. Current taxonomy of Rhodococcus species and their role in infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2018; 37(11): 2045-62.
7. Azadi D, Motallebirad T, Ghaffari K, Shokri D, Rezaei F. Species diversity, molecular characterization ,and antimicrobial susceptibility of opportunistic Actinomycetes isolated from Immunocompromised and healthy patients of Markazi Province of Iran. Infect Drug Resist 2020; 13: 1-0.
8. Ratnikova MS, Titok MA. Molecular genetic markers for identification of Rhodococcus erythropolis and Rhodococcus qingshengii. Microbiology 2020; 89: 435-42.
9. Álvarez-Narváez S, Huber L, Giguère S, Hart KA, Berghaus RD, Sanchez S, et al. Epidemiology and molecular basis of multidrug resistance in Rhodococcus equi .Microbiol Mol Biol Rev 2021; 85(2): e00011-21.
10. Hosseini S, Azadi D, Absalan A. Bioremediation of phenol, sulfate sodium, and polycyclic aromatic hydrocarbons by Rhodococcus sp. first time isolated and molecular characterized from aquatic and terrestrial ecosystems. Water and Environment Journal 2023; 37(3): 594-603.
11. Jeon YS, Chung H, Park S, Hur I, Lee JH, Chun J. jPHYDIT: a JAVA-based integrated environment for molecular phylogeny of ribosomal RNA sequences. Bioinformatics 2005; 21(14): 3171-3.
12. Salar-Vidal L, Martín-García M, Macías-Valcayo A, Ponz A, Esteban J. Epidemiology and in vitro antimicrobial susceptibility of aerobic Actinomycetales in a clinical setting. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed) 2022; 40(10): 562-7.
13. Smith J, Lord J, Carter C, Locke S, Phillips E. Antimicrobial resistance among Streptococcus equi subspecies zooepidemicus and Rhodococcus equi isolated from equine specimens submitted to a diagnostic laboratory in Kentucky, USA. PeerJ 2015; 10: e13682.
14. Ranganath N, Mendoza MA, Stevens R, Kind D, Wengenack N, Shah A. Rhodococcus infection: a 10-year retrospective analysis of clinical experience and antimicrobial susceptibility profile. J Clin Microbiol 2017; 62(3): e0153723.
15. Nahar A, Baker AL, Nichols DS, Bowman JP, Britz ML. Benchmarking DNA extraction methods for phylogenomic analysis of sub-antarctic Rhodococcus and Williamsia species. Microorganisms 2021; 9(6): 1253.
16. LI J. Antibiotic sensitivity of Rhodococcus equi in clinical specimens is correlated with efficacy of clinical treatment. Basic & Clinical Medicine 2022; 42(1): 136-8.
17. Huber L, Giguère S, Slovis NM, Carter CN, Barr BS, Cohen ND, et al. Emergence of resistance to macrolides and rifampin in clinical isolates of Rhodococcus equi from foals in central Kentucky, 1995 to 2017. Antimicrob Agents Chemother 2018; 63(1): e01714-18.
18. Zúñiga M, Badillo E, Abalos P, Valencia ED, Marín P, Escudero E, Galecio JS. Antimicrobial susceptibility of Rhodococcus equi strains isolated from foals in Chile. World J Microbiol Biotechnol 2023; 39(9): 231.
19. Ranganath N, Mendoza MA, Stevens R, Kind D, Wengenack N, Shah A. Rhodococcus infection: a 10-year retrospective analysis of clinical experience and antimicrobial susceptibility profile. J Clin Microbiol 2024; 62(3): e01537-23.

DOI: *10.48305/jims.v42.i800.????*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 42, No. 800, 4th Week, March 2025**

Received: 11.09.2024 Accepted: 23.12.2024 Published: 20.03.2025

Isolation, Molecular Identification, and Antibiotic Susceptibility Patterns of *Rhodococcus* Species Isolated from Patients with Cancer in Shiraz, Iran

Razieh Helali Pergali[1], Majid Basri Salehi[2], Nima Bahador[3]

Original Article

Abstract

Background: Opportunistic infections, including those caused by *Rhodococcus* species, pose a substantial threat to immunocompromised individuals, particularly cancer patients. With the rising incidence of cancer and its associated complications in Iran, this study sought to isolate and molecularly characterize *Rhodococcus* isolates from cancer patients. Additionally, the antimicrobial susceptibility of these isolates was assessed to enhance the management of *Rhodococcus*-related infections and address emerging antibiotic resistance.

Methods: In 2023, 79 clinical samples were collected from cancer patients using standard methods. Initial identification was performed using phenotypic and biochemical tests, while the genus and species identification of Rhodococcus isolates was carried out through PCR and 16S rRNA sequence analysis. Drug susceptibility testing for each isolate was conducted using the serial dilution method according to CLSI 2022 guidelines.

Findings: Out of the 79 samples, 13 (16.45%) were identified as Rhodococcus species, comprising seven different species: *R. erythropolis, R. atherivorans, R. ruber, R. zopfi, R. phenolicus, R. equi, and R. rhodochrous.* These infections were predominantly associated with hematologic malignancies, including acute lymphoblastic leukemia (ALL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Rhodococcus* isolates demonstrated high sensitivity to doxycycline, imipenem, and azithromycin but resisted to ciprofloxacin and cefoxitin.

Conclusion: The results indicated that *Rhodococcus* species are important opportunistic pathogens in cancer patients, displaying notable prevalence, diversity, and varying antibiotic susceptibility patterns. Consequently, the isolation, molecular identification, and antibiotic susceptibility testing of these bacteria are essential for effective infection management and the mitigation of antibiotic resistance in this vulnerable population.

Keywords: *Rhodococcus*; Cancer related infection; 16SrRNA Gene; Antibiotic susceptibility

Citation: Helali Pergali R, Basri Salehi M, Bahador N. **Isolation, Molecular Identification, and Antibiotic Susceptibility Patterns of *Rhodococcus* Species Isolated from Patients with Cancer in Shiraz, Iran.** J Isfahan Med Sch 2025; 42(800): 1240-48.

1- PhD Candidate, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon, Iran.
2- Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon, Iran.
3- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shiraz Branch, Shiraz, Iran.
Corresponding Author: Majid Basri Salehi, Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kazeroon Branch, Kazeroon, Iran; Email: dedalos_azadi@yahoo.com