

16S rRNA Gen Dizi Analizi ile Tanımlanan Klinik *Nocardia* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları*

Antimicrobial Susceptibilities of Clinical *Nocardia* Isolates Identified by 16S rRNA Gene Sequence Analysis

Mahmut Celalettin UNER¹, Gülşen HAŞÇELİK², Hamit Kaan MÜŞTAK³

¹ Mardin Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Mardin.

¹ Mardin State Hospital, Microbiology Laboratory, Mardin, Turkey.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Hacettepe University Faculty of Medicine, Medical Microbiology Department, Ankara, Turkey.

³ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu (No: 012D11101003) tarafından desteklenmiş ve 16th International Congress on Infectious Diseases (2-5 Nisan 2014, Capetown, G. Afrika) kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 05.08.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 01.12.2015

ÖZ

Doğada yaygın olarak bulunan *Nocardia* türleri, insanlarda pulmoner, kütanöz, merkezi sinir sistemi ve sistemik nokardiyoz gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Çok farklı klinik tablolara yol açması ve yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde farklı profillerin izlenmesi nedeniyle, izole edilen her bir *Nocardia* türü için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması önerilmektedir. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *Nocardia* türlerinin antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi ve mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, klinik örneklerden izole edilen 45 suş (17 solunum yolu, 8 beyin apsesi, 7 püy, 3 deri, 3 konjonktiva, 2 kan, 2 doku, 2 plevral sıvı, 1 beyin omurilik sıvısı) konvansiyonel yöntemler ve 16S rRNA gen dizi analizi kullanılarak tanımlanmıştır. Duyarlılık testi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2011 M24-A2 klavuzu tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon ve ayrıca disk difüzyon yöntemi ile yapılmış ve testte amikasin, siprofloksasin, seftriakson, linezolid ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) antibiyotikleri kullanılmıştır. İzole edilen 45 *Nocardia* suşunun çoğunluğunu *N.cyriacigeorgica* (n: 26, %57.8) oluşturmuş, bunu *N.farcinica* (n: 12, %26.7), *N.otitiscaviarum* (n: 4, %8.9), *N.asteroides* (n: 1, %2.2), *N.neocaledoniensis* (n: 1, %2.2) ve *N.abscessus* (n: 1, %2.2) izlemiştir. Amikasin ve linezolid, sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yönteminde direnç gözlenmeyen iki antibiyotik olmuştur. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde TMP-SMX, seftriakson ve siprofloksasine direnç oranları sırasıyla %15.6, %37.8 ve %84.4 olarak bulunmuştur. Tüm izolatlar içinde

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Mahmut Celalettin Uner, Mardin Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Vali Ozan Caddesi, Mardin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 537 425 0666, **E-posta (E-mail):** drcuncer@gmail.com

siprofloksasine en yüksek direnç *N.cyriaciageorgica* (n: 25, %96.2) suşlarında tespit edilmiştir. Disk difüzyon yönteminde en fazla direnç siprofloksasine (n: 33, %73.3) karşı saptanmış ve *N.cyriaciageorgica* (n: 25, %96.2) tanımlanan türler içinde siprofloksasine en fazla direnç gözlenen tür olmuştur. İkinci sıklıkta ilaç direnci TMP-SMX (n: 22, %48.9) için belirlenmiş olup, bunu seftriakson (n: 15, %33.3) izlemiştir. Her iki yöntem arasındaki uyum karşılaştırıldığı; amikasin ($\kappa= 1$), linezolid ($\kappa= 1$) ve seftriakson ($\kappa= 0.903$) için yöntemler arasındaki uyumun çok iyi olduğu, siprofloksasin için ise iyi düzeyde ($\kappa= 0.672$) olduğu görülmüştür. Buna karşın TMP-SMX için iki yöntem arasında uyum olmadığı ($\kappa= 0.092$) belirlenmiştir. Sonuç olarak, son yıllarda *Nocardia* enfeksiyonlarının sıklığının artması ve moleküler yöntemler sayesinde farklı türlerin tanımlanması, tedavi açısından *Nocardia* türlerine karşı in vitro duyarlılık testlerinin yapılmasının önemini ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: *Nocardia*; 16S rRNA gen dizisi analizi; antibiyotik; duyarlılık.

ABSTRACT

Nocardia species are ubiquitous in the environment and responsible for various human infections such as pulmonary, cutaneous, central nervous system and disseminated nocardiosis. Since the clinical pictures and antimicrobial susceptibilities of *Nocardia* species exhibit variability, susceptibility testing is recommended for every *Nocardia* isolates. The aims of this study was to determine the antimicrobial susceptibilities of *Nocardia* clinical isolates and to compare the results of broth microdilution and disc diffusion susceptibility tests. A total of 45 clinical *Nocardia* isolates (isolated from 17 respiratory tract, 8 brain abscess, 7 pus, 3 skin, 3 conjunctiva, 2 blood, 2 tissue, 2 pleural fluid and 1 cerebrospinal fluid samples) were identified by using conventional methods and 16S rRNA gene sequence analysis. Susceptibility testing was performed for amikacin, ciprofloxacin, ceftriaxone, linezolid and trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) by broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria recommended in 2011 approved standard (M24-A2) and disk diffusion method used as an alternative comparative susceptibility testing method. Among the 45 *Nocardia* strains, *N.cyriaciageorgica* (n: 26, 57.8%) was the most common species, followed by *N.farcinica* (n: 12, 26.7%), *N.otitiscaviarum* (n: 4, 8.9%), *N.asteroides* (n: 1, 2.2%), *N.neocaledoniensis* (n: 1, 2.2%) and *N.abscessus* (n: 1, 2.2%). Amikacin and linezolid were the only two antimicrobials to which all isolates were susceptible for both broth microdilution and disk diffusion tests. In broth microdilution test, resistance rates to TMP-SMX, ceftriaxone and ciprofloxacin were found as 15.6%, 37.8% and 84.4% respectively, whereas in the disk diffusion test, the highest resistance rate was observed against ciprofloxacin (n: 33, 73.3%), followed by TMP-SMX (n: 22, 48.9%) and ceftriaxone (n: 15, 33.3%). In both of these tests, *N.cyriaciageorgica* was the species with the highest resistance to ciprofloxacin (n: 25, 96.2%). When the susceptibility test results were compared, amikacin ($\kappa= 1$), linezolid ($\kappa= 1$), and ceftriaxone ($\kappa= 0.903$) showed very good agreement, whereas ciprofloxacin showed good agreement ($\kappa= 0.672$). For TMP-SMX no agreement was found between the two test methods ($\kappa= 0.092$). In conclusion, due to the identification of different species with molecular methods and increased frequency of *Nocardia* infections in recent years, in vitro susceptibility testing for *Nocardia* species is important to guide the appropriate antimicrobial treatment.

Keywords: *Nocardia*; 16S rRNA gene sequence analysis; antibiotic; susceptibility.

GİRİŞ

Nocardia türleri, toprak, su, hava ve çürümüş bitki artıklarında saprofit olarak bulunmakta, insanlarda ve hayvanlarda lokal ve yaygın enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Nocardia* enfeksiyonları insanlarda nadir görülmekte, sağlıklı ve immün sistemi baskı-

lanmış kişilerde sıklıkla subakut veya kronik süpüratif veya granülomatöz hastalıklara yol açmaktadır^{1,2}. Sağlıklı kişilerde sıklıkla selülit ve apse gibi lokalize deri lezyonları veya endojen endoftalmit görülürken, immün sistemi baskılanmış kişilerde sistemik enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır³⁻⁵.

Wallace ve arkadaşları⁶, 1988 yılında *Nocardia asteroides*'e benzer mikroorganizmaları ilaç duyarlılık paternine (İPT) göre ayırmışlar ve bunları *N.abscessus* (Tip I, İPT I), *N.brevicatena* kompleks (Tip II, İPT II), *N.nova* kompleks (Tip III, İPT III), *N.travalensis* kompleks (Tip IV, İPT IV), *N.farcinica* (Tip V, İPT V) ve *N.cyriaciageorgica* (Tip VI, İPT VI) olarak sınıflandırmışlardır. Klinik izolatların tanımlanmasında çeşitli moleküler yöntemlerin kullanımıyla *Nocardia* türlerinin tanımlanmasında değişiklikler olmuş ve yeni birçok türün tanımlanması ile *Nocardia*'da tür sayısı 87'ye ulaşmıştır⁷. Klinik örneklerden en fazla izole edilen türler *N.farcinica*, *N.cyriaciageorgica*, *N.abscessus* ve *N.otitiscaviarum*'dur⁸.

Nocardia türleri arasında antibiyotik direnç paternlerinin farklılık göstermesi tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. *Nocardia* enfeksiyonlarının tedavisinde uzun yıllar trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) tek başına tercih edilmiş, ancak sistemik enfeksiyon ve immün sistemi baskılanmış kişilerde bu tedavi rejimi yetersiz kalmış ve bu tip hastalarda TMP-SMX ile birlikte amikasin, karbapenemler veya seftriakson gibi antibiyotiklerin kombine kullanılması önerilmiştir. Bunun yanında, *N.farcinica* gibi bazı türlerin birçok antimikrobiyal ilaca dirençli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle izole edilen her *Nocardia* türü için antibiyotik duyarlılık düzeyinin araştırılması klinik açıdan önem kazanmaktadır⁸.

Nocardia türlerinin yavaş üremeleri ve inokulum hazırlanmasındaki zorluklar nedeniyle, bu suşlarda rutin antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması sorun yaratmaktadır. Bu bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon, gradyan şerit testi, agar ve sıvı dilüsyon, BACTEC radyometrik üreme indeksi metodu gibi birçok yöntem kullanılmaktadır⁸⁻¹⁰. Ancak 2003 yılında yayınlanan Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kılavuzunda *Actinomyces* ve *Nocardia* türlerinin antimikrobiyal duyarlılık testleri için, altın standart yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi önerilmektedir¹¹. Bu çalışmada, 2002-2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen *Nocardia* suşlarının 16S rRNA gen dizilemesi ile tanımlanması, antibiyotik duyarlılıklarının sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemi ile araştırılması ve bu yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Çalışmaya 1 Ocak 2002 - 31 Aralık 2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen (17 solunum yolu, 8 beyin apsesi, 7 püy, 3 deri, 3 konjonktiva, 2 kan, 2 doku, 2 plevral sıvı, 1 beyin omurilik sıvısı) 45 *Nocardia* suşu alındı. Çalışmada, laboratuvara gelen klinik örnekler %5 koyun kanı içeren triptikaz soy agar (BBL, Becton Dickinson, ABD) besiyerine ekildi ve 37°C'de 3-5 gün inkübasyondan sonra değerlendirilmeye alındı. İzo-

latların tanımlanması; mikroskopik inceleme (Gram boyama ve modifiye Kinyoun boyama), biyokimyasal testler (lizozim direnci, arilsülfataz oluşumu, kazein, ksantin, tirozin ve nişasta hidrolizi ve ramnozdan asit oluşumu) ve 45°C'de üreme sonuçlarına göre yapıldı⁸. Bir hastada birden fazla aynı *Nocardia* türü izole edildiğinde tek suş çalışmaya alındı.

***Nocardia* Türlerinin 16S rRNA Dizi Analizi ile Tanımlanması**

Çalışmaya alınan suşların tür düzeyinde tanımlanması parsiyel 16S rRNA dizi analizi ile yapıldı. Bakteri DNA'sı kit protokolüne göre genomik izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen NV, Hollanda) ile ekstrakte edildi. Çalışmada, 16S rRNA'nın 1135 baz çift (bç)'lik bölgesi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile üniversal primerler (357F; CTC CTA CGG GAG GCA GCA G ve 1492R; GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) kullanılarak amplifiye edildi¹². PCR ürünleri, QIAquick PCR saflaştırma kiti (Qiagen, N.V. Hollanda) ile saflaştırıldı ve BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD) ile amplifiye edildi. Elde edilen ampikonlar Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich, ABD) ile saflaştırıldıktan sonra Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer, ABD) cihazına yüklenerek dizi analizi gerçekleştirildi. Elde edilen elektroferogramlar, Sequencing Analysis 5.2 programı ile analiz edilerek BLASTN (NCBI) programı ile GenBank'taki referans diziler ile karşılaştırıldı.

Tanımlamada kalite kontrol suşu olarak *N.cyriacigeorgica* DSM 44484 kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi: *Nocardia* türlerinin antibiyotik duyarlılık testi için CLSI M24 A2 (2011)¹³ protokolünde belirtilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulandı ve amikasin, siprofloksasin, TMP-SMX, seftriakson ve linezolid antibiyotikleri test edildi. Antibiyotiklerin stok solüsyonları uygun seyreltici ve çözücüler kullanılarak son konsantrasyondan dört kat fazla olacak şekilde hazırlandı ve -80°C'de stoklandı. Çalışma günü çalışılacak antibiyotik stok solüsyonu çözdürülerek, steril tüplerde Mueller Hinton sıvı besiyeri içinde iki kat seri dilüsyonları yapıldı ve her bir tüpten 50 µl alınarak U tabanlı mikropalak çukurlarına konuldu. Çalışılacak olan suşların kanlı agarda taze kültürü hazırlandı. *Nocardia* kolonileri steril su içinde bulunan cam boncuklar ile parçalandı. Daha sonra 0.5 McFarland (0.5 x 10⁸ cfu/ml) yoğunluğunda süspansiyon hazırlandı; son konsantrasyon 0.5 x 10⁶ cfu/ml yoğunluğa ayarlandı. Bu son konsantrasyonu içeren tüpten 50 µl alınıp antibiyotik içeren çukurlara ilave edildi. Son iki çukur üreme kontrol ve besiyeri kontrol olarak hazırlandı. Bu işlem sonrası, kapaklı olan mikropalaklar parafilm ile de kaplanarak 72 saat 37°C'lik inkübatörde bekletildi. Bu süre sonunda minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri okunarak kaydedildi.

Disk difüzyon yöntemi: Bu yöntemde 5 gün 37°C'de inkübe edilmiş olan *Nocardia* kolonilerinden 0.5 McFarland standardına uygun süspansiyonlar hazırlandıktan sonra 150 mm'lik Mueller Hinton katı besiyerlerine ekimler yapıldı. Besiyerleri kuruduktan sonra amikasin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), TMP-SMX (23.75 µg), seftriakson (30 µg) ve linezolid (30 µg) antibiyotik diskleri konularak 3-5 gün 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra zon çapları ölçülerek CLSI direnç sınır değerlerine göre değerlendirildi¹⁴.

Kalite kontrol suşu olarak sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon testi için *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

İstatistiksel Değerlendirme

Mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri arasındaki uyumun ölçülmesinde Kappa (κ) istatistik yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde sonuçlar şu sınırlar çerçevesinde yorumlandı: < 0 ise uyum yok; 0-0.20 ise uyumsuz veya çok kötü uyum; 0.21-0.40 ise kötü uyum; 0.41-0.60 ise orta dereceli uyum; 0.61-0.80 ise iyi dereceli uyum; 0.81-1.00 ise çok iyi dereceli uyum.

BULGULAR

Çalışmamızda en sık izole edilen tür *N.cyriacigeorgica* (n: 26, %57.8) olmuş, bunu *N.farcinica* (n: 12, %26.7), *N.otitiscaviarum* (n: 4, %8.9), *N.asteroides* (n: 1, %2.2), *N.neocaledoniensis* (n: 1, %2.2) ve *N.abscessus* (n: 1, %2.2) izlemiştir.

Çalışmaya alınan *Nocardia* suşlarının MİK aralıkları, antimikrobiyal ilaçlara direnç durumu, MİK50 ve MİK90 değerleri ve direnç yüzdesi Tablo I'de verilmiştir. Amikasin ve linezolid antibiyotiklerine karşı herhangi bir direnç gözlenmemiştir. En fazla direnç siprofloksasine karşı görülmüş (%84.4), bunu seftriakson (%37.8) ve TMP-SMX (%15.6) izlemiştir. *N.cyriacigeorgica* (n: 25, %96.2), tanımlanan türler içinde siprofloksasine en fazla direnç gözlenen tür olmuştur. İkinci en sık ilaç direnci seftriaksonda görülmüş olup, bu direnç en fazla *N.farcinica* (n: 11, %91.7) türünde gözlenmiştir. *N.cyriacigeorgica* ve *N.farcinica* suşlarında TMP-SMX'e karşı direnç oranlarının sırasıyla %7.7 ve %16.7 olduğu belirlenmiştir (Tablo II).

Nocardia suşlarının disk difüzyon yöntemi ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo III'de özetlenmiştir. Bu yöntemin sonuçlarına göre, sıvı mikrodilüsyonda olduğu gibi amikasin ve linezolid antibiyotiklerine karşı direnç gözlenmemiştir. En fazla direnç siprofloksasine (n: 33, %73.3) karşı saptanmış ve *N.cyriacigeorgica* (n: 25, %96.2) tanımlanan türler içinde siprofloksasine en fazla direnç gözlenen tür olmuştur. İkinci sıklıkta ilaç direnci TMP-SMX (n: 22, %48.9) için belirlenmiş olup, bu direnç en fazla *N.farcinica* (n: 12, %100) türünde belirlenmiştir. Seftriakson direnci ise %33.3 (n: 15) olarak izlenmiştir.

Disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki uyum karşılaştırıldığında; amikasin, linezolid ve seftriakson için yöntemler arasındaki uyumun çok iyi olduğu görülmüştür (amikasin ve linezolid için κ :1, seftriakson için κ : 0.903). Siprofloksasin için

Tablo I. Çalışmaya Alınan Nocardia Suşlarının MİK Sonuçları

	MİK # aralığı (µg/ml)	MİK50 (µg/ml)	MİK 90 (µg/ml)	Direnç n (%)
Amikasin	0.25-128	0.5	0.25	0
Siprofloksasin	0.125-64	4	16	38 (84.4)
TMP-SMX	0.125/2.375- 64/1216	1/19	0.5/9.5	7 (15.6)
Seftriakson	0.5-256	4	> 256	17 (37.8)
Linezolid	0.25-128	2	2	0

TMP-SMX: Trimetoprim-sülfametoksazol.

Tablo II. *Nocardia* Türlerinin Mik Sonuçları

Suşlar	Sayı	MİK # aralığı (µg/ml)												
		Amikasin		Siprofloksasin		TMP-SMX		Seftriakson		Linezolid				
		S (≤8)	I R (≥16)	S (≤1)	I R (2)	S (≤2/38)	I R (≥4/76)	S (≤8)	I R (16-32)	S (≤8)	I R (≥64)			
<i>N.cyriacigeorgica</i>	26	0	0	1	0	25	24	0	2	24	1	26	0	0
<i>N.farcinica</i>	12	0	0	6	4	2	10	0	2	1	0	12	0	0
<i>N.otitidiscaviarum</i>	4	0	0	0	2	2	1	0	3	0	0	4	0	0
<i>N.asteroides</i>	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
<i>N.abscessus</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
<i>N.neocaledoniensis</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
Toplam	45	0	0	7	7	31	38	0	7	28	1	45	0	0

S: Duyarlı; I: Orta duyarlı (Intermediate); R: Dirençli.

Tablo III. *Nocardia* Türlerinin Disk Difüzyon Testi Sonuçları

Suşlar	Sayı	Eşik Değerleri (mm)												
		Amikasin		Siprofloksasin		TMP-SMX		Seftriakson		Linezolid				
		S (>15)	I R (13-14)	S (>21)	I R (16-20)	S (>16)	I R (11-15)	S (>22)	I R (<21)	S (>21)	I R (<20)			
<i>N.cyriacigeorgica</i>	26	0	0	1	0	25	24	0	2	24	1	26	0	0
<i>N.farcinica</i>	12	0	0	6	4	2	10	0	2	1	0	12	0	0
<i>N.otitidiscaviarum</i>	4	0	0	0	2	2	1	0	3	0	0	4	0	0
<i>N.asteroides</i>	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
<i>N.abscessus</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
<i>N.neocaledoniensis</i>	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
Toplam	45	0	0	7	7	31	38	0	7	28	1	45	0	0

S: Duyarlı; I: Orta duyarlı (Intermediate); R: Dirençli.

uyumun iyi düzeyde ($\kappa = 0.672$) olduğu bulunurken, TMP-SMX için iki yöntem arasında uyum ($\kappa = 0.092$) olmadığı saptanmıştır. Hata oranları yönünden değerlendirildiğinde ise, seftriakson ve siprofloksasin için büyük hata oranları sırasıyla %4.4 ve %8.8 olarak bulunmuş; TMP-SMX için büyük hata oranı %44.4 olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Nocardia enfeksiyonlarının tedavisinde tek başına tercih edilen antibiyotik trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) olmakla birlikte, son yıllarda yapılan in vitro duyarlılık çalışmaları sülfonamid direncinin gözlemlendiğini ortaya koymuştur^{8,15}. Ayrıca, ağır, sistemik enfeksiyonu olan ve immün sistemi baskılanmış hastaların tedavisinde TMP-SMX'in yetersiz kaldığı ve kombine antibiyotik tedavisi kullanılması gerektiği bildirilmiştir^{15,16}. Bu nedenle araştırmacılar hastalardan izole edilen *Nocardia* suşlarında in vitro duyarlılık testlerinin yapılmasını önermektedirler¹⁵⁻¹⁷.

Nocardia türleri ve diğer aerop *Actinomycetes* türlerinin duyarlılık testlerine yönelik 2003 yılında CLSI tarafından hazırlanan rehberde, sıvı mikrodilüsyon yöntemi (SMY) önerilmektedir¹¹. Cercenado ve arkadaşları¹⁸, 2007 yılında çoğunluğunu *N.cyriacigeorgica* (n: 17) ve *N.farcinica* (n: 11) türlerinin oluşturduğu 51 *Nocardia* izolatında SMY ile antibiyotik duyarlılık testi çalışmışlar ve tüm *Nocardia* izolatlarının amikasin, TMP-SMX ve linezolidde duyarlı olduğunu saptamışlardır. Uhde ve arkadaşları¹⁶, 1995-2004 yılları arasında izole ettikleri 19 ayrı *Nocardia* türünü içeren 765 suşun tümünde amikasin, TMP-SMX, seftriakson ve siprofloksasin duyarlılığını ve 2002 yılından sonra ise bu suşların 269'unda linezolid duyarlılığını SMY ile araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, tüm *N.cyriacigeorgica* (n: 101) ve *N.farcinica* (n: 105) suşlarının linezolidde duyarlı olduğunu belirtmişler, bir *N.cyriacigeorgica* suşu hariç her iki türde de amikasine direnç gözlememişlerdir¹⁶. *N.farcinica* suşları için siprofloksasin, TMP-SMX ve seftriakson direnci sırasıyla %72, %80 ve %93 olarak bulunmuş olup, tanımlanan bu 16 ayrı *Nocardia* türü içerisinde en fazla direnç *N.farcinica*'da saptanmıştır¹⁶.

Conville ve arkadaşları¹⁹, 2011 yılında klinikte en sık izole edilen ve farklı duyarlılık patternleri gösteren beş farklı *Nocardia* türüne ait izolatların antibiyotik duyarlılıklarını SMY ile araştırmışlar; *N.cyriacigeorgica* türünde amikasin, TMP-SMX ve linezolidde karşı herhangi bir direnç saptanmazken, seftriakson ve siprofloksasine karşı sırasıyla %65.7 (%34.3'ü dirençli, %31.4'ü orta duyarlı) ve %100 direnç olduğunu tespit etmişlerdir. *N.farcinica* suşlarında amikasin ve linezolidde direnç gözlenmemiş; TMP-SMX, siprofloksasin ve seftriaksona sırasıyla %7.1, %94.4 ve %96.7 oranlarında direnç saptanmıştır¹⁹. Bu çalışmada ayrıca tüm suşlar altı farklı laboratuvara gönderilerek laboratuvarlar arası ve laboratuvar içi tekrarlanabilirlik karşılaştırılmış, amikasin, siprofloksasin, klaritromisin ve moksifloksasin duyarlılık sonuçları > %90 oranında tekrarlanabilir bulunmuştur¹⁹. *N.cyriacigeorgica* izolatlarında seftriakson, *N.farcinica* izolatlarında ise sülfonamid sonuçlarında uyumsuzluk izlenmiş; araştırmacılar bu durumun, *Nocardia* türlerinin koloni büyüklüklerine ve üreme özelliklerine bağlı olarak inokulum hazırlanması aşamasındaki farklılıklardan ve değerlendiren kişilerden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir¹⁹. McTaggart ve arkadaşları⁸ da, dokusu referans suş olmak üzere 112 klinik *Nocardia* suşunu SMY ile çalışmışlar, %97'sinin TMP-SMX'e, %99'unun amikasine ve tüm izolatların linezolidde duyarlı olduğunu saptamışlardır. 2015 yılında yayınlanan bu çalışma, *Nocardia* suşlarının in vitro an-

tibiyotik duyarlılık testlerinde kontrol suşların kullanılmasının, laboratuvarlar arası sonuç farklılığını ortadan kaldırabileceğini vurgulamaktadır⁸. Onbiri yeni tanımlanmış, 39 farklı tür ve 1299 suşun çalışıldığı Schlaberg ve arkadaşlarının²⁰ çalışmasında ise, TMP-SMX direncinin %2 olduğu; TMP-SMX'e intoleransı olan hastalar ve farklı in vitro duyarlılık paternine sahip suşlarla enfekte olan hastalarda in vitro duyarlılık testlerinin yapılmasının gerekli olduğu belirtilmektedir.

Çalışmamızda altı farklı *Nocardia* türünün amikasin, siprofloksasin, TMP-SMX, seftriakson ve linezolid duyarlılıkları SMY ile araştırılmış, amikasin ve linezolide karşı bir direnç gözlenmemiştir. Yapılan diğer çalışmalar da, *N.travalensis* kompleks hariç tüm türlerin amikasin ve linezolide duyarlı olduğunu göstermektedir^{8,10,16,18,21}. Bu antibiyotikler dışındaki diğer antibiyotikler için, tür düzeyinde farklı direnç oranları bulunmuştur^{10,16,18,19,21}. Araştırmacılar farklı direnç oranlarını, coğrafi farklılıklara, çalışılan yöntem ve değerlendirme farklılıklarına bağlamaktadırlar^{8,19}.

Nokardiya enfeksiyonlarının tedavisinde sülfonamidlerin tek başına veya diğer ilaçlarla kombine kullanılması ilk tercih edilen tedavi yöntemidir²². SMY ile yapılan çeşitli çalışmalarda TMP-SMX direncinin %0-42 arasında değiştiği ve bu direncin türler arasında da farklılıklar gösterdiği belirtilmektedir^{7,16,18,20,21}. Aynı yöntemle yaptığımız çalışmada, TMP-SMX direnci %15.6 (n: 7) olarak tespit edilmiştir. TMP-SMX'e karşı direncin en fazla *N.farcinica* (%16.7) ve *N.cyriacigeorgica* (%7.7) türlerinde bulunduğu belirlenmiştir.

Nocardia türleri için sıvı mikrodilüsyon ve diğer duyarlılık yöntemlerini karşılaştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu konudaki ilk çalışma 1997 yılında Ambaye ve arkadaşları¹⁰ tarafından yapılmış ve 26 *N.asteroides* suşunda agar dilüsyon, sıvı mikrodilüsyon, disk difüzyon ve BACTEC radyometrik metodları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada en iyi uyumun BACTEC radyometrik metotta olduğu, en az uyumun ise agar dilüsyon metodunda olduğu vurgulanmıştır¹⁰. Bu makalenin yayınlandığı yıllarda *Nocardia* türlerinin tanımlanması ve test edilen antibiyotiklerin farklı olması nedeniyle bu çalışmayı daha yeni çalışmalarla karşılaştırmak mümkün olamamıştır. Conville ve arkadaşları¹⁹ moleküler yöntemlerle tanımladıkları beş ayrı *Nocardia* türünü (*N.brasiliensis*, *N.cyriacigeorgica*, *N.farcinica*, *N.nova* ve *N.wallacei*) altı ayrı merkeze göndererek sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle in vitro duyarlılık testlerini çalışmalarını istemiş, bu testlerin sonucunda çalışılan antibiyotiklerden en fazla uyum (> %90) amikasin, siprofloksasin, klaritromisin ve moksifloksasin için bulunmuştur. SMY'de *N.cyriacigeorgica* ve *N.wallacei*'de seftriaksonda, *N.brasiliensis* ve *N.cyriacigeorgica*'da tigesiklinde, *N.farcinica* ve *N.wallacei*'de sülfonamidlerde tekrarlanabilirliğin yetersiz olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar sülfonamid MİK düzeyinin doğruluğunun test edilmesinde, disk difüzyon testi ile sülfisoksazol direncine bakılması, MİK ve disk difüzyonda uyumsuzluk saptandığında testlerin tekrarlanması veya referans merkezine gönderilmesini önermekte; ayrıca disk difüzyon testinde çalışılan sülfisoksazol direncinin hiçbir zaman rapor edilmemesi gerektiğini vurgulamaktadırlar¹⁹.

Türkiye'de Aydoslu ve arkadaşlarının²³ yaptıkları çalışmada, izole edilen iki *N.farcinica*, bir *N.asteroides* ve bir *N.otitidiscaviarum* suşunun in vitro duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon, E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle araştırılmış; bir *N.farcinica* suşunun siprofloksasine karşı, sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemiyle duyarlı olmasına rağmen, E-test yönteminde dirençli olduğu görülmüştür. Perçin ve arkadaşlarının²⁴ 2011 yılında 21 *No-*

cardia suşu ile yaptıkları çalışmada, disk difüzyon ve E-test yöntemleri karşılaştırılmış; en iyi uyumun ampisilin, seftazidim, imipenem, gentamisin ve linezolid için olduğu, tüm suşların TMP-SMX'e ve linezolide duyarlı olduğu belirtilmiştir. Rutin laboratuvarlarda referans yöntemin uygulanmasının zor olduğu durumlarda, uygulama ve değerlendirme kolaylığı nedeniyle E-test yöntemini, disk difüzyon yöntemine alternatif olarak önermişlerdir²⁴. Çalışmamızda ise, sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak her iki yöntemin amikasin ve linezolid için mükemmel uyum gösterdiği belirlenmiştir. TMP-SMX için büyük hata oranı %44.4 olarak bulunmuş olup, istatistiksel olarak yöntemler arasında uyum olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda, özellikle *N.farcinica* suşlarında TMP-SMX duyarlılık testinde uyumsuzluğun yüksek olduğu, SMY ile çalışılan 12 *N.farcinica* suşundan ikisi dirençli iken, disk difüzyonda tümünün TMP-SMX'e dirençli bulunduğu izlenmiştir.

Sonuç olarak, son yıllarda *Nocardia* enfeksiyonlarının sıklığının artması ve moleküler yöntemlerle farklı türlerin tanımlanması, tedavi açısından *Nocardia* türlerine karşı in vitro duyarlılık testlerinin yapılmasının önemini ortaya koymaktadır. Bu konuda CLSI tarafından sıvı mikrodilüsyon yöntemi önerilmekte, ancak bazı suşlarda inokulum hazırlığında ve MİK düzeyinin değerlendirilmesinde zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu konuda eğitilmiş kişilerin sonuçları değerlendirmesi gerektiği, yapılan testlerde beklenmedik sonuçlarla karşılaşıldığında sonuçların iki kere tekrarlanarak verilmesi gerektiği belirtilmektedir¹⁹. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda *Nocardia* suşlarının büyük oranda linezolid ve amikazine duyarlı olması, günümüzde tedavide ilk sırada yer alan TMP-SMX'in ardından ikinci sırada bu ilaçların kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Wilson JW. Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clin Proc* 2012; 87(4): 403-7.
2. Singh M, Sandhu RS, Randhawa HS, Kallan BM. Prevalence of pulmonary nocardiosis in a tuberculosis hospital in Amritsar, Punjab. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2000; 42(4): 325-39.
3. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(3): 357-417.
4. Milman T, Trubnik V, Shah M, McCormick SA, Finger PT. Isolated *Nocardia exalbida* endogenous endophthalmitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2011; 19(4): 237-9.
5. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection* 2010; 38(2): 89-97.
6. Wallace RJ Jr, Steele LC, Sumter G, Smith JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32(12): 1776-9.
7. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2): 259-82.
8. McTaggart LR, Doucet J, Witkowska M, Richardson SE. Antimicrobial susceptibility among clinical *Nocardia* species identified by multilocus sequence analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(1): 269-75.
9. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ. Comparative evaluation of the E test for susceptibility testing of *Nocardia* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 19(2): 101-10.
10. Ambaye A, Kohner PC, Wollan PC, Roberts KL, Cockerill FR. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4): 847-52.

11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard. CLSI Document M24-A, 2003. CLSI, Wayne, PA.
12. Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46(4): 327-38.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes. CLSI Document M24-A2, 2011. CLSI, Wayne, PA.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23rd Informational Supplement. CLSI M100-S23, 2013. CLSI, Wayne, PA.
15. Brown-Elliott BA, Biehle J, Conville PS, et al. Sulfonamide resistance in isolates of *Nocardia* spp. from a US multicenter survey. *J Clin Microbiol* 2012; 50(3): 670-2.
16. Uhde KB, Pathak S, McCullum I Jr, et al. Antimicrobial-resistant nocardia isolates, United States, 1995-2004. *Clin Infect Dis* 2010; 51(12): 1445-8.
17. Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pepin J. Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988-2008. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(5): 690-6.
18. Cercenado E, Marin M, Sanchez-Martinez M, et al. In vitro activities of tigecycline and eight other antimicrobials against different *Nocardia* species identified by molecular methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(3): 1102-4.
19. Conville PS, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, et al. Multisite reproducibility of the broth microdilution method for susceptibility testing of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 2012; 50(4): 1270-80.
20. Schlaberg R, Fisher MA, Hanson KE. Susceptibility profiles of *Nocardia* isolates based on current taxonomy. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(2): 795-800.
21. Larruskain J, Idigoras P, Marimon JM, Perez-Trallero E. Susceptibility study of 186 *Nocardia* sp. isolates to 20 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(6): 2995-8.
22. Sorrell TC, Mitchell DH, Iredell JR, Chen SCA. *Nocardia* species, pp: 3199-207. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2010, 7th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
23. Aydoslu B, Tuğrul HM. *Nocardia* spp. isolated from immunocompromised patients in Trakya University Medical Faculty Hospital and their antibiotic susceptibilities. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41(4): 529-35.
24. Perçin D, Sümerkan B, İnci R. Comparative evaluation of E-test and disk diffusion methods for susceptibility testing of *Nocardia* species. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 274-9.