

***Nocardia* Klinik İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesinde E-Test ve Disk Difüzyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması**

Comparative Evaluation of E-Test and Disk Diffusion Methods for Susceptibility Testing of *Nocardia* Species

Duygu PERÇİN¹, Bülent SÜMERKAN¹, Ramazan İNCİ²

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 01.07.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 14.10.2010

ÖZET

Nocardia türleri arasında antibiyotik direnç paternlerinin farklılık göstermesi tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Yavaş üremeleri ve inokulum hazırlamadaki güçlükler nedeniyle bu suşlarda antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması sorun yaratmaktadır. Bu çalışmada *Nocardia* izolatlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde E-test ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Çalışmamızda E-test yöntemi, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından altın standart olarak kabul edilen sıvı mikrodifüzyon yöntemi ile uyum oranının %90 olarak verilmesi nedeniyle tercih edilmiş ve disk difüzyon yönteminin rutinde kullanılabilirliğinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, beyin (n= 7), akciğer (n= 12) ve deri/yumuşak doku (n= 2) örneklerinden izole edilen toplam 21 *Nocardia* suşu dahil edilmiştir. Konvansiyonel yöntemlerle izolatların altısı *N. asteroides*, altısı *N. farcinica*, beşi *N. cyriacigeorgica* ve dördü *Nocardia* spp. olarak tanımlanmıştır. Suşların ampicilin, ampicilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanik asit, seftazidim, sefepim, imipenem, gentamisin, eritromisin, moksifloksasin ve linezolid duyarlılıkları E-test ve/veya disk difüzyon yöntemleriyle araştırılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde CLSI'nın önerdiği *Staphylococcus* spp. için yorumlama kriterleri kullanılmıştır. Tüm suşlar E-test ile seftazidim, piperasilin-tazobaktam ve ampiciline dirençli; levofloksasin, moksifloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, tigesiklin ve linezolid duyarlı bulunmuştur. Antibiyotiklere karşı duyarlılığın belirlenmesinde yöntemler arasındaki uyum oranı; ampicilin, seftazidim, imipenem, gentamisin ve linezolid için %100, eritromisin için %85.7, sefepim için %76.2, moksifloksasin için %73.7, piperasilin-tazobaktam için %71.4, ampicilin-sulbaktam için %70 ve amoksisilin-klavulanik asit için %46.2 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, rutin laboratuvarlarda referans yöntemin uygulanmasının zor olduğu durumlarda, uygulama ve değerlendirme kolaylığı nedeniyle E-testin, disk difüzyon yöntemine alternatif olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Nocardia* türleri; antibiyotik duyarlılık; E-test; disk difüzyon yöntemi.

İletişim (Correspondence): Dr. Duygu Perçin, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 437 4901/23383, **E-posta (E-mail):** duygu.percin@hotmail.com

ABSTRACT

Variations in antimicrobial susceptibility among different *Nocardia* species limit the options for therapy. It is very difficult to perform antimicrobial susceptibility testing of these bacteria due to their slow growth rate and problems in inoculum preparation. The aim of this study was to compare E-test and disk diffusion methods for the determination of antimicrobial susceptibilities of *Nocardia* isolates. Since E-test is considered as 90% consistent with the gold standard microdilution method recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), it was chosen for comparison with disk diffusion and in order to determine the use of disk diffusion in routine practice. A total of 21 *Nocardia* strains isolated from clinical specimens (12 lung, 7 brain and 2 skin/soft tissue samples) were included in the study. Six of the isolates were identified as *N. asteroides*, six were *N. farcinica*, five were *N. cyriacigeorgica* and four were *Nocardia* spp. by conventional methods. Susceptibilities of strains to ampicillin, ampicillin-sulbactam, amoxicillin-clavulanic acid, ceftazidime, sefepime, imipenem, gentamicin, erythromycin, levofloxacin, moxifloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, piperacillin-tazobactam, tigecycline, and linezolid were investigated by using E-test and/or disk diffusion methods. The results were interpreted according to the CLSI breakpoints for *Staphylococcus* spp. All of the strains were found to be resistant to ceftazidime, piperacillin-tazobactam and ampicillin, however susceptible to levofloxacin, moxifloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, tigecycline, and linezolid. The concordance between the methods in terms of susceptibility testing were 100% for ampicillin, ceftazidime, imipenem, gentamicin and linezolid; 85.7% for erythromycin, 76.2% for sefepime, 73.7% for moxifloxacin, 71.4% for piperacillin-tazobactam, 70% for ampicillin-sulbactam and 46.2% for amoxicillin-clavulanic acid. In conclusion, the therapy must be planned according to the results of antimicrobial susceptibility testing. Disk diffusion is not a reliable method due to the high rates of very major errors. E-test would be an alternative method being practical and easily evaluated, especially in routine laboratories in which the reference method could not be performed.

Key words: *Nocardia* spp.; antimicrobial susceptibility; E-test; disk diffusion method.

GİRİŞ

Nocardia türleri, özellikle immün yetmezliği olan hastalardan giderek artan sıklıkta izole edilen patojenlerdir. Bu cins içinde en sık rastlanan tür *N. asteroides* olmakla birlikte, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve 16S rRNA sekanslama gibi moleküler yöntemler sayesinde tanımlanmış pek çok yeni türün benzer enfeksiyonlar oluşturduğu bildirilmektedir¹.

Nocardia türleri en çok pulmoner enfeksiyon şeklinde karşımıza çıkmakla birlikte, hematogen yolla yayılım sonucu deri, yumuşak doku ve santral sinir sistemi enfeksiyonlarına da yol açabilir. Özellikle *Nocardia* türleri ile gelişen santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tedavisi güçtür. Türler arasında farklı antibiyotik direnç paternlerinin görülmesi de tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Bu türlerle gelişen ciddi ve yaygın enfeksiyonlarda, tedaviye yanıt vermeyen olgularda ve sülfonamidlere allerjisi olan hastalarda duyarlılık testleri, tedaviye yön vermede önemlidir¹⁻³. Yavaş üremeleri ve inokulum hazırlamadaki güçlükler nedeniyle, bu suşlarda antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması sorun teşkil etmektedir. Ayrıca, in vitro sonuçlar ile klinik sonuçların uyumunu gösteren çalışmaların az olması da, elde edilen sonuçların dikkatle yorumlanmasını gerektirmektedir^{1,4,5}.

Nocardia türlerinin antimikrobiyal duyarlılıkların belirlenmesinde disk difüzyon, E-test, agar dilüsyon, BACTEC radyometrik üreme indeksi metodu gibi pek çok yöntem kulla-

nılmaktadır⁴⁻⁸. Bununla birlikte "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)", katyon ayarlanmış Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılarak yapılan sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir⁹. Ancak bu yöntemin uygulama zorlukları, laboratuvarları disk difüzyon ve E-test gibi daha kolay uygulanabilir test yöntemlerine yöneltmektedir. Bu çalışmada, altın standart yöntem olmamakla birlikte, uyum oranlarının %90 olarak bildirilmesi nedeniyle E-test yöntemi tercih edilmiş ve disk difüzyon yönteminin rutinde kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, klinik örneklerden izole edilen ve yurt dışında bir merkezde (Faculte de Pharmacie, Universite Claude-Bernard, Fransa) konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ile tanımlanan 21 *Nocardia* izolatı dahil edildi^{10,11}. Suşların ampisilin, ampisilinsulbaktam, amoksisilin-klavulanik asit, seftazidim, sefepim, imipenem, gentamisin, eritromisin, moksifloksasin ve linezolid duyarlılıkları %5 koyun kanlı Mueller-Hinton besiyeri kullanılarak E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle; tigesiklin ve levofloksasine duyarlılıkları E-test yöntemiyle; trimetoprim-sülfametoksazol duyarlılıkları ise disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Tüm test besiyerleri 35°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra, sonuçlar CLSI *Staphylococcus* spp. yorumlama kriterlerine göre değerlendirildi¹². Kalite kontrol suşları olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve ATCC 25923 kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda tanımlanan *Nocardia* türleri ve izole edildikleri örnekler Tablo I'de gösterilmiştir. E-test yöntemiyle test edilen antibiyotikler için duyarlılık durumları, MLK_{50} , MLK_{90} değerleri ve MLK aralıkları ise Tablo II'de verilmiştir. Tüm suşlar seftazidim, piperasilin-tazobaktam ve ampisiline dirençli, linezolid duyarlı bulunmuştur.

Yöntemlerin kategorik uyumu incelendiğinde, amoksisilin-klavulanik asit, piperasilin-tazobaktam ve sefepim duyarlılık sonuçlarında disk difüzyon testi ile büyük hata oranlarının yüksek olduğu görülmüştür (Tablo III).

Tablo I. *Nocardia* Suşlarının İzole Edildikleri Örneklerle Göre Dağılımı

Tür	Beyin	Akciğer	Deri/yumuşak doku
<i>N.asteroides</i>	2	4	-
<i>N.farcinica</i>	3	2	1
<i>N.cyraciageorgica</i>	1	4	-
<i>N.transvalensis</i>	-	-	1
<i>N.otitiscaviarum</i>	-	1	-
<i>Nocardia</i> spp.	1	1	-

Tablo II. *Nocardia* spp. İzolatlarının E-test Sonuçlarına Göre Duyarlılık Durumları, MIK_{50} , MIK_{90} Değerleri ve MIK Aralıkları

Antibiyotik	$\mu g/mL$			Sayı (%)		
	MIK_{50}	MIK_{90}	MIK aralığı	S	I	R
Ampisilin (n= 13)	8	32	1-32	0	0	13 (100)
Ampisilin-sulbaktam (n= 21)	4	16	0.5-256	17 (81)	3 (14.3)	1 (4.7)
Amoksisilin-klavulanik asit (n= 13)	4	4	0.25-8	12 (92.3)	0	1 (7.7)
Piperasilin-tazobaktam (n= 21)	> 256	> 256	> 256	0	0	21 (100)
Seftazidim (n= 21)	> 256	> 256	> 256	0	0	21 (100)
Sefepim (n= 21)	1	8	0.25-> 256	19 (90.5)	0	2 (9.5)
İmipenem (n= 21)	0.25	1	0.06-8	20 (95.2)	1 (4.8)	0
Gentamisin (n= 21)	1	32	0.25-64	13 (61.9)	3 (14.3)	5 (23.8)
Levofloksasin (n= 21)	2	16	0.06-16	9 (42.9)	2 (9.5)	10 (47.6)
Moksifloksasin (n= 19)	0.5	1	0.01-1	15 (78.9)	4 (21.1)	0
Eritromisin (n= 14)	4	32	0.06-64	1 (7.1)	7 (50)	6 (42.9)
Tigesiklin (n= 21)*	0.12	0.5	0.03-1	19 (90.5)	0	2 (9.5)
Linezolid (n= 21)*	0.25	0.5	0.12-1	21 (100)	0	0

* Tigesiklin ve linezolid için EUCAST sınır değerleri kullanılmıştır.

S: Duyarlı, I: Orta duyarlı (Intermediate), R: Dirençli, MIK : Minimum inhibitör konsantrasyonu.**Tablo III.** *Nocardia* Suşları İçin E-test ve Disk Difüzyon Yöntemleri Arasındaki Kategorik Uyum ve Hata Oranları

Antibiyotik	E-test/disk difüzyon			
	% Uyum (Uyumlu sonuç/ Toplam)	Çok büyük hata ^a (%)	Büyük hata ^b (%)	Küçük hata ^c (%)
Ampisilin	100 (13/13)	0	0	0
Ampisilin-sulbaktam	70 (14/21)	0	1 (4.8)	6 (28.6)
Amoksisilin-klavulanik asit	46.2 (6/13)	1 (7.7)	6 (46.2)	0
Piperasilin-tazobaktam	71.4 (15/21)	6 (28.6)	0	0
Seftazidim	100 (21/21)	0	0	0
Sefepim	76.2 (16/21)	1 (4.8)	3 (14.3)	1 (4.8)
İmipenem	100 (21/21)	0	0	0
Gentamisin	100 (21/21)	0	0	0
Levofloksasin	Çalışılmadı	Çalışılmadı	Çalışılmadı	Çalışılmadı
Moksifloksasin	73.7 (14/19)	0	1 (5.3)	4 (21)
Eritromisin	85.7 (12/14)	0	0	2 (14.3)
Tigesiklin	Çalışılmadı	Çalışılmadı	Çalışılmadı	Çalışılmadı
Linezolid	100 (21/21)	0	0	0

a: Yalancı duyarlı sonuç, b: Yalancı dirençli sonuç, c: Yalancı "intermediate" sonuç.

TARTIŞMA

Nocardia türlerine bağlı olarak gelişen ağır ve yaygın enfeksiyonlarda, tedaviye yanıt vermeyen ya da sülfonamid allerjisi olan hastalarda tedaviye yön vermek amacıyla anti-mikrobiyal duyarlılık testi yapılması önerilir¹³. Trimetoprim-sülfametoksazol, *Nocardia* enfeksiyonlarının standart tedavisinde önerilen bir ilaç olmakla birlikte, HIV ile enfekte hastalarda tedaviye yanıtın zayıf olabileceği ve/veya trimetoprim-sülfametoksazol dirençli suşların bulunabileceği unutulmamalıdır^{1,3,14}.

Nocardia türlerinin de içinde bulunduğu aerob aktinomiçesler için, CLSI tarafından, katyonu ayarlanmış Mueller-Hinton sıvı besiyerinde sıvı mikrodilüsyon yöntemi önerilmektedir⁹. Bu yöntemin performansı ve sonuçların yorumlanması, yöntem hakkındaki bilgi ve deneyim ile doğrudan ilişkilidir. Bunun yanı sıra *N.nova* kompleksi izolatlarının zayıf üremesi, önerilen 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sonuçların okunmasını güçleştirmektedir. Disk difüzyon yönteminde ise, aminoglikozidler ve siprofloksasin ile keskin sınırlı zon çapları elde edilmekle birlikte, tetrasiklin, beta-laktamlar ve sülfonamid diskleri etrafındaki inhibisyon zonları net olmadığından yorumlamada sorun oluşturabildiği iddia edilmektedir¹. Çalışmamızda test edilen beta-laktam antibiyotiklerden ampisilin, seftazidim ve imipenemle iki yöntem arasında %100 uyum saptanmıştır. Aynı şekilde gentamisin ve linezolid için de testler arasındaki uyum %100 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte sefepim ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlarda uyumun düşük olduğu gözlenmiştir. Bu yöntemler dışında, agar dilüsyon, E-test ve BACTEC radyometrik üreme indeksi metodu gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır⁴⁻⁸. Ambaye ve arkadaşları⁷, *N.asteroides* kompleks izolatlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde BACTEC radyometrik üreme indeksi metodunun en iyi yöntem olduğunu ve altın standart testle %97.9 uyum gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu yöntemler arasında uygulama kolaylığı yönünden E-test ve disk difüzyon sıklıkla tercih edilmektedir. Biehle ve arkadaşları⁶, *Nocardia* izolatları için E-test ile sıvı mikrodilüsyon arasındaki uyumu %96.2, E-test ile disk difüzyon arasındaki uyumu ise %93.3 olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada inokulumun 10⁷ cfu/ml'ye düşürülmesiyle optimal performans sağlandığı iddia edilmiştir⁶. Antimikrobiyal duyarlılık yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, *Nocardia* izolatları için uyum oranlarının %90'ın üzerinde olması, inhibisyon sınırlarının kolay okunabilir olması ve kolay uygulanması nedeniyle E-test yöntemi önerilmektedir^{6-8,15}.

Tedavide kullanılan trimetoprim-sülfametoksazol, minosiklin, üçüncü kuşak sefalosporinler ve kinolonlar gibi antibiyotiklere karşı türlere göre değişen ve giderek artan direnç oranları, araştırmacıları tigesiklin ve linezolid gibi yeni antibiyotikler üzerinde çalışmaya yöneltmiştir. Bu çalışmalarda, *Nocardia* izolatlarının bu antibiyotiklere duyarlı olduğu ve *Nocardia* enfeksiyonlarının tedavisinde tigesiklin ve linezolidin etkili olabileceği gösterilmiştir¹⁶⁻¹⁸. Çalışmamızda elde edilen MK₅₀ ve MK₉₀ değerleri ile MK aralıkları da bunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, *Nocardia* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık durumları türlere göre değişiklik göstermekte ve sülfonamidlerle yapılan geleneksel ampirik tedavi yerini yeni protokollere bırakmaktadır. Dolayısıyla enfeksiyonların tedavisi planlanırken antibiyotik du-

yarıllık sonuçlarına göre karar verilmelidir. Ancak, disk difüzyon yöntemiyle alınan duyarlılık sonuçlarında hata oranlarının yüksek olması ve zon çaplarının her zaman net olarak değerlendirilememesi, bu yöntemin kullanılabilirliğini azaltmaktadır. E-test ise, uygulama ve değerlendirmenin kolay olması nedeniyle alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. Yildiz O, Alp E, Tokgoz B, et al. Nocardiosis in a teaching hospital in the Central Anatolia region of Turkey: treatment and outcome. Clin Microbiol Infect 2005; 11(6): 493-512.
3. Sakai C, Tagagi T, Satoh Y. *Nocardia asteroides* pneumonia, subcutaneous abscess and meningitis in a patient with advanced malignant lymphoma: successful treatment based on in vitro antimicrobial susceptibility. Int Med 1999; 38(8): 683-6.
4. Lerner PI, Baum GI. Antimicrobial susceptibility of *Nocardia* species. Antimicrob Agents Chemother 1973; 4(2): 85-93.
5. Wallace RJ, Wiss K, Curvay R, Vance PH, Steadham J. Differences among *Nocardia* spp. in susceptibility to aminoglycosides and beta-lactam antibiotics and their potential use in taxonomy. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23(1): 19-21.
6. 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.
7. Ambaye A, Cohner PC, Wollan PC, Roberts KL, Roberts GD, 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.
8. Glupczynski Y, Berhin C, Jansens M, Wauters G. Determination of antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* spp. from clinical specimens by E-test. Clin Microbiol Infect 2006; 12(9): 905-12.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes. Approved Standard. NCCLS Document M-24A, 2003. NCCLS, Wayne, PA.
10. Land GA. Identification of aerobic actinomycetes, pp: 4.0.1-4.1.9. In: Isenberg HD (ed), Clinical Microbiology Procedures Handbook. 1992. ASM Press, Washington DC.
11. Kiska DL, Hicks K, Pettit DJ. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. J Clin Microbiol 2002; 40(4): 1346-51.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement M100-S19, 2009. CLSI, Wayne, PA.
13. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experiences. J Clin Microbiol 2003; 41(10): 4497-501.
14. Aydoslu B, Tuğrul HM. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde bağışıklık sistemi baskılanmış hastalardan izole edilen *Nocardia* türleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 2007; 41(4): 529-35.
15. Tomlin P, Sand C, Rennie RP. Evaluation of E-test, disk diffusion and broth microdilution to establish tentative quality control limits and review susceptibility breakpoints for two aerobic actinomycetes. Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 40(4): 847-52.
16. Cercenado E, Marin M, Sanchez-Martinez M, Cuevas O, Martinez-Alarcon J, Bouza E. 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.
17. Lai CC, Tan CK, Lin SH, et al. Comparative in vitro activities of nemonoxacin, doripenem, tigecycline and other 16 other antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides* and unusual *Nocardia* species. J Antimicrob Chemother 2009; 64(1): 73-8.
18. Maraki S, Scoulica E, Nioti E, Tselentis Y. Nocardial infection in Crete, Greece: review of fifteen cases from 2003 to 2007. Scand J Infect Dis 2009; 41(2): 122-7.