

# Nocardia Enfeksiyonlarının Tanısında Gram Boyanmış Yaymaların Önemi

## The Importance of Gram-stained Smears in the Diagnosis of Nocardia Infections

Serpil ÖLMEZ<sup>1</sup>(ID), Barış OTLU<sup>2</sup>(ID), Burçin ŞENER<sup>3</sup>(ID), Banu SANCAK<sup>3</sup>(ID)

<sup>1</sup> Batman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Batman.

<sup>1</sup> Batman Training and Research Hospital, Clinic of Medical Microbiology, Batman, Türkiye.

<sup>2</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

<sup>2</sup> İnönü University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Türkiye.

<sup>3</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>3</sup> Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Türkiye.

**Makale Atfı:** Ölmez S, Otlı B, Şener B, Sancak B. Nocardia enfeksiyonlarının tanısında gram boyanmış yaymaların önemi. Mikrobiyol Bul 2023;57(1):108-118.

### ÖZ

*Nocardia* türleri doğada bulunan düşük virülanlı bakterilerdir. Özellikle altta yatan immünyüpresyon, kronik akciğer hastalığı ve malignite gibi risk faktörleri olan hastalarda enfeksiyon etkeni olabilmektedir. Sık görülmediği ve patognomonik semptomları olmadığı için kolaylıkla gözden kaçırılmaktadır. Bu çalışmada, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Nocardia* enfeksiyonlarının tanısında Gram boyalı yaymaların mikroskopik incelemesinin önemine dikkat çekilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Kasım 2014-Aralık 2015 tarihleri arasında klinik örneklerinde *Nocardia* spp. izolasyonu saptanan olgular dahil edilmiştir. Laboratuvara gelen örneklerin Gram boyanmış yaymalarının direkt mikroskopik incelenmesinde *Nocardia* spp. ile uyumlu görüntüsü olan örneklerin kültürlerinin inkübasyon süreleri uzatılmıştır. Üreme saptanan plaklardaki koloniler, konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemlerle ve ayrıca matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile tanımlanmıştır. *Nocardia* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması, 16S rRNA gen dizi analizi ile yapılmıştır. *Nocardia* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi göstermek için izolatlara 'pulsed-field' jel elektroforezi (PFGE) yapılmıştır. İzolatların amoksisilin-klavulonat (AMC), linezolid, moksifloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT), amikasin, imipenem, klaritromisin, sefepim, sefotaksim, seftriakson ve siprofloksasin karşı in vitro duyarlılıkları gradiyent şerit yöntemi (E-test, bioMérieux, Fransa) kullanılarak saptanmıştır. Çalışma süresi içinde sekiz hastadan toplam 19 *Nocardia* spp. izolatı elde edilmiştir. Dokuz aylık süre zarfında dört olguda, *Nocardia* spp.'nin tekrarlayan üremesi saptanmıştır. En sık izole edilen tür, dört olguda tanımlanan *N.cyriaci-georgica* olarak belirlenmiştir. Hastalardan izole edilen diğer türler *N.asteroides*, *N.transvalensis*, *N.farcinicia* ve *N.asiatica/arthritis*'tir. DNA dizi analizi ve MALDI-TOF MS ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 19 izolatın 16 (%84.2)'sı MALDI-TOF MS ile cins düzeyinde ve 9 (%47.4)'u tür düzeyinde doğru olarak tanımlanırken, üç (%15.8) izolat tanımlanamamış, yedisi (%36.8) ise yanlış tanımlanmıştır. PFGE sonuçlarına göre aynı hastadan izole edilen suşların genetik olarak aynı olduğu belirlenmiştir. İzolatların tamamı amikasin, sefepim, sefo-

taksim, seftriakson, imipenem, linezolid ve bir izolat dışında TMP-SXT'ye duyarlı bulunmuştur. Çalışma izolatları arasında en sık direnç siprofloksasine (%62.5) karşı saptanmış, bunu klaritromisin (%37.5) takip etmiştir. *N.cyriacigeorgica*, çalışma popülasyonunda en sık saptanan ve antibiyotiklere karşı en dirençli tür olarak belirlenmiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında izolasyonu zor olan *Nocardia* türü bakterilerin tanımlanmasında en değerli yöntemlerden biri klinik örneklerin direkt mikroskopik incelemesidir. Bu çalışma ile çok çeşitli klinik tablolarla ortaya çıkabilen ve kolaylıkla gözden kaçabilen *Nocardia* türlerinin tanımlanmasında Gram boyalı klinik örneklerin incelemesinin önemi vurgulanmıştır. Ayrıca izole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenerek, türlere özgü duyarlılık profillerine katkıda bulunulmuştur. *Nocardia* türlerinin doğru tanımlanması klinik ve epidemiyolojik araştırmalara katkı sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Nocardia*; Gram boyama; modifiye asit-fast boyama; MALDI-TOF MS.

## ABSTRACT

*Nocardia* species are low virulence bacteria found in nature. They can be an infectious agent, especially in patients with risk factors such as underlying immunosuppression, chronic lung disease, and malignancy. They can be easily overlooked because they are not seen frequently and has no pathognomonic symptoms. With this study, it was aimed to draw attention to the importance of microscopic examination of Gram-stained smears in the diagnosis of *Nocardia* infections in routine microbiology laboratories. Cases in which *Nocardia* spp. were detected in their clinical samples between November 2014-December 2015 in Hacettepe University Medical Faculty Hospital were included in the study. In the direct microscopic examination of Gram-stained smears of the samples arriving to the laboratory, the incubation periods of the cultures of the samples compatible with *Nocardia* spp. were extended. Then relevant colonies were identified by conventional microbiological methods and also by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, bioMerieux, France) automated system. Species-level identification of *Nocardia* isolates was performed by 16S rRNA gene sequence analysis. To demonstrate the genetic relationship between *Nocardia* isolates, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed. In vitro susceptibility of the isolates against amoxicillin-clavulanate (AMC), linezolid, moxifloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SXT), amikacin, imipenem, clarithromycin, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, and ciprofloxacin was determined using the gradient strip method (E-test). A total of 19 *Nocardia* spp. strains were isolated from eight patients. Four cases exhibited repeated growth of *Nocardia* spp. up to a period of nine months. The most frequently isolated species was *N.cyriacigeorgica*, which was identified in four cases. Other species isolated from patients were *N.asteroides*, *N.transvalensis*, *N.farcinicia*, and *N.asiatica/arthritis*. When the results obtained with DNA sequence analysis and MALDI-TOF MS were compared, 16 (84.2%) of 19 isolates were correctly identified to the genus level and 9 (47.4%) to the species level with MALDI-TOF MS, while three (15.8%) isolates could not be identified, and seven (36.8%) isolates were misidentified. According to the PFGE results, it was determined that the strains isolated from the same patient were genetically identical. All isolates were susceptible to amikacin, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, imipenem, linezolid, and except one isolate to TMP-SXT. Among the study isolates, the most common resistance was against ciprofloxacin (62.5%), followed by clarithromycin (37.5%). *N.cyriacigeorgica* was determined as the most frequently detected and the most resistant species to antibiotics in the study population. Direct microscopic examination of clinical specimens is one of the most valuable methods for the identification of *Nocardia*-type bacteria, which is difficult to isolate in microbiology laboratories. With this study, the importance of examining Gram-stained clinical samples was emphasized in the identification of *Nocardia* species, which can emerge with a wide variety of clinical forms and can be easily overlooked. In addition, antibiotic susceptibility profiles of the isolated bacteria were determined to contribute to species-specific susceptibility profiles. Accurate identification of *Nocardia* species will contribute to clinical and epidemiological studies.

**Keywords:** *Nocardia*; Gram staining; modified acid-fast staining; MALDI-TOF MS.

## GİRİŞ

*Nocardia* türleri *Actinomycetales* ailesine ait, dallanan gram-pozitif basillerdir. Virülansı düşük olan bu bakteriler doğada yaygın olarak bulunurlar. Sıklıkla bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyon etkeni olarak saptansalar da bağışıklık sistemi sağlam kişilerde de enfeksiyonlara yol açabilmektedirler<sup>1,2</sup>. Deri enfeksiyonu gibi lokal enfeksiyonlardan bakteriyemi gibi sistemik enfeksiyonlara kadar çok çeşitli klinik tablolara neden oldukları için erken tanı ve tedavi çok önemlidir. *Nocardia* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar sık görülmediği ve bu enfeksiyonlara ait karakteristik bir klinik bulgu ve semptom olmadığı için, bu bakterilere ait enfeksiyonlar kolaylıkla gözden kaçırılmaktadır<sup>3</sup>. Bunun yanı sıra klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Nocardia* türlerinin izolasyonunda ve tanımlanmasında yaşanan zorluklar nedeniyle nokardiyozun tanısında gecikmeler yaşanabilmektedir<sup>4</sup>.

Nokardiyoz olgu sunumları değerlendirildiğinde, bu bakterinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında gözden kaçırıldığı veya yanlış tanımlanabildiği görülmüştür<sup>5,6</sup>. *Nocardia* türlerinin en kısa sürede doğru olarak tanımlanması ve buna bağlı uygun tedavinin başlanması hastaların prognozu açısından büyük önem taşımaktadır. Gram boyama yöntemi rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında değerli bir tanı aracıdır. Laboratuvara gelen klinik örneklerin değerlendirilmesinde çok önemli bir yere sahip olup, kültürlerin sonuçlanmasından saatler önce klinik örnekle ilgili klinisyene bilgi verilmesini sağlar. Bu çalışmanın amacı, *Nocardia* enfeksiyonlarının tanısında Gram boyamanın yeri ve önemini vurgulamaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Fenotipik Testler

Çalışmaya Kasım 2014-Aralık 2015 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden [balgam, bronkoalveolar lavaj (BAL), beyin omurilik sıvısı (BOS) ve püyen] izole edilen *Nocardia* türleri dahil edildi. Bu klinik örnekler %5 koyun kanlı agar, Mac Conkey agar ve çikolata agar besiyerlerine (bioMerieux, Fransa) ekildi. Tüm örnekler Gram boyası uygulanarak direkt mikroskopik değerlendirme yapıldı. Gram boyamasında dallanan gram-pozitif basil görülen klinik örneklerin ekildiği kültür plakları günlük olarak değerlendirilerek, kültür plaklarının inkübasyon süresi 14 güne kadar uzatıldı. Ayrıca bu klinik örneklerden 'buffered charcoal yeast extract' (BCYE) agara da (bioMerieux, Fransa) ekim yapıldı ve modifiye asit-fast boyama gerçekleştirildi. Tüm kültür plakları %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda, 37°C'de inkübe edildi. Mikroskopik ve makroskopik özelliklere göre (koyun kanlı agar, çikolata agar ve BCYE agardaki koloni morfolojisi, Gram boyamadaki görünüm ve modifiye asit-fast ile pozitif boyanma özelliği) ön tanımlama yapıldı.

### 16S rRNA Gen Dizi Analizi

İleri tür tanımlaması 16S rRNA geni 800 bp uzun fragman dizi analizi yoluyla yapıldı (ABI Prism 310 Genetik Analiz Cihazı, Applied Bio, Japonya). Nükleik asit pürifikasyonu

ise otomatize QIASymphony (Qiagen, Almanya) cihazıyla yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyon [polymerase chain reaction (PCR)] amplifikasyonu ile DNA dizi analizi için p8FPL 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve p806R 5'-GACTACCAGGGTATCTAAT-3' primerleri kullanıldı. 16S rRNA gen amplifikasyonu PCR kullanılarak GeneAmp PCR sistem 9700 (Applied Biosystems/Amerika) ile şu şartlarda yapıldı: 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye yeniden bağlanma ve 72°C'de bir dakika uzama (35 döngü). "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) kullanılarak GenBank veritabanında 16S rRNA gen dizi analizi yapıldı ve ilişkili *Nocardia* suşları veri tabanından bulundu.

### MALDI-TOF MS Tanımlama

İzolatlar MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) tabanlı bir sistem olan VITEK MS sistemi (bioMerieux, Fransa) (v3.0 veritabanı) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda tanımlandı.

### Pulsed Field Jel Elektforezi

İzolatlar arasındaki genetik ilişki, pulsed-field jel elektforezi (PFGE) kullanılarak araştırıldı. PFGE analizi için genomik DNA, Louie ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem modifiye edilerek hazırlandı<sup>7</sup>. İzolatların genotipik sınıflandırılmasında PFGE paternleri temel alındı. Bant profilleri GelCompar II yazılım sistemi (versiyon 6.6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) kullanılarak analiz edildi. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA ("Unweighted Pairwise Grouping Mathematical Averaging" matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması) yöntemi kullanıldı. Birbirleriyle %90'ın üzerinde benzerlik gösteren izolatlar aynı klonda kabul edildi.

### Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Çalışmada amoksisilin-klavulonat (AMC), linezolid, moksifloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT), amikasin, imipenem, klaritromisin, sefepim, sefotaksim, seftriakson ve siprofloksasin duyarlılıkları gradiyent şerit yöntemi (E-test, bioMerieux, Fransa) kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda uygulandı. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M24-A2 kılavuzuna göre yorumlandı<sup>8</sup>.

## BULGULAR

Çalışma süresi boyunca sekiz hastada toplam 19 *Nocardia* spp. izole edilmiştir. Klinik örneklerin Gram boyama ile değerlendirilmesi sonucunda *Nocardia* şüpheli görünüm saptanan 19 örneğin tamamında en geç 14 günlük inkübasyon süresinin sonunda koyun kanlı agar, çikolata agar ve BCYE agarda beyaz tebeşir tozu görünümünde ya da sarı renkli R (rough) koloniler şeklinde üreme saptanmıştır. Püye örneklerinde üreyen sarı renkli bakteri dışında tüm örneklerde beyaz tebeşir tozu görünümünde üreme olmuştur. Balgam örnekleri dışında tüm örneklerde saf üreme saptanmıştır. Şüpheli kolonilerden Gram

ve modifiye asit-fast boyamaları gerçekleştirilmiş; Gram boyama ile boncuklu (beaded) görümlü, dallanan gram-pozitif filamentöz basiller, modifiye asit-fast ile parlak kırmızı boyanma özelliği gösteren basiller saptanması durumunda *Nocardia* ön tanısıyla ileri inceleme alınmıştır.

Koloni morfolojisine ve Gram/modifiye asit-fast boyanma özelliklerine göre *Nocardia* olarak ön tanımlama yapılan tüm izolatların, 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda *Nocardia* spp. olduğu doğrulanmıştır. Tüm izolatların DNA dizi analizi GenBank veri tabanına göre, *Nocardia* türleriyle %99.8 ila %100 oranında benzerlik göstermiştir.

DNA dizi analizi ile VITEK MS sonuçları karşılaştırıldığında kültürde üreyen 19 izolattan 16 (%84.2)'sı VITEK MS ile cins düzeyinde ve 9 (%47.4)'u tür düzeyinde doğru tanımlanmıştır. Üç izolat (%15.8) tanımlanamamış, yedi izolat (%36.8) ise VITEK MS ile yanlış tanımlanmıştır. Dört olguda dokuz aylık süre içinde tekrarlayan epizotlar saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda beş farklı *Nocardia* türü izole edilmiş olup, en sık izole edilen tür *N.cyriacigeorgica* (n= 4 hasta) olarak tespit edilmiştir. Hastalardan izole edilen diğer türler ise *N.asteroides*, *N.transvalensis*, *N.farcinicia* ve *N.asiatica/arthritis* olarak belirlenmiştir. *Nocardia* üremelerinin saptandığı örnek türlerinin dağılımı, hastaların tanıları ve VITEK MS tanımlama sonuçları Tablo I'de verilmiştir.

Çalışma süresi boyunca dört hastada, farklı zamanlarda alınan klinik örneklerde tekrarlayan *Nocardia* üremelerinin saptanması nedeniyle *Nocardia* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi göstermek amacıyla 19 izolata PFGE analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo II'de verilmiştir. PFGE sonuçlarına göre aynı hastadan izole edilen izolatların genetik olarak aynı olduğu belirlenmiştir.

**Tablo I. Nocardia İzolatlarının Klinik Kökeni ve Hastaların Klinik Bilgileri**

Olgu	Yaş/ Cinsiyet	Primer Hastalık	Klinik Örnek Türü	VITEK MS Tanımlama Sonucu	<i>Nocardia</i> Türü (16S rRNA Sonucu)	<i>Nocardia</i> İzolasyon Epizotları
1	20/K	Kistik fibrozis	Balgam	Tanımlanamadı	<i>N.transvalensis</i>	1
2	27/E	Kistik fibrozis	Balgam	<i>N.cyriacigeorgica</i>	<i>N.asteroides</i>	6
3	26/K	Primer siliyer diskinezi	Balgam	<i>N.cyriacigeorgica</i>	<i>N.cyriacigeorgica</i>	4
4	56/K	SLE <sup>a</sup>	Balgam	<i>N.cyriacigeorgica</i>	<i>N.cyriacigeorgica</i>	1
5	38/K	SLE <sup>a</sup>	Püy (beyin apsesinden)	Tanımlanamadı	<i>N.farcinicia</i>	2
6	59/E	MM <sup>b</sup>	BAL <sup>c</sup>	<i>N.cyriacigeorgica</i>	<i>N.cyriacigeorgica</i>	1
7	74/E	KOAH <sup>d</sup>	Balgam	<i>N.cyriacigeorgica</i>	<i>N.cyriacigeorgica</i>	3
8	61/E	Diffüz büyük B-hücreli lenfoma	BOS <sup>e</sup>	<i>N.cyriacigeorgica</i>	<i>N.asiatica/arthritis</i>	1

<sup>a</sup>: Sistemik lupus eritematozus, <sup>b</sup>: Multipl miyelom, <sup>c</sup>: Bronkoalveolar lavaj, <sup>d</sup>: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, <sup>e</sup>: Beyin omurilik sıvısı.

**Tablo II.** *Nocardia* İzolatlarının PFGE Sonuçları

İzolat Numarası	Olgu	Tür	PFGE Genotipleri	Örnek Geliş Tarihleri
1	O1	<i>N.transvalensis</i>	A	13.04.2015
2	O2	<i>N.asteroides</i>	B	15.01.2015
3	O2	<i>N.asteroides</i>	B	17.02.2015
4	O2	<i>N.asteroides</i>	B	10.03.2015
5	O2	<i>N.asteroides</i>	B	07.07.2015
6	O2	<i>N.asteroides</i>	B	21.07.2015
7	O2	<i>N.asteroides</i>	B	26.08.2015
8	O3	<i>N.cyriacigeorgica</i>	C	17.02.2015
9	O3	<i>N.cyriacigeorgica</i>	C	12.03.2015
10	O3	<i>N.cyriacigeorgica</i>	C	08.07.2015
11	O3	<i>N.cyriacigeorgica</i>	C	24.11.2015
12	O4	<i>N.cyriacigeorgica</i>	D	31.03.2015
13	O5	<i>N.farcinica</i>	E	20.11.2014
14	O5	<i>N.farcinica</i>	E	25.11.2014
15	O6	<i>N.cyriacigeorgica</i>	F	26.08.2015
16	O7	<i>N.cyriacigeorgica</i>	G	13.12.2015
17	O7	<i>N.cyriacigeorgica</i>	G	16.12.2015
18	O7	<i>N.cyriacigeorgica</i>	G	23.12.2015
19	O8	<i>N.asiatica/arthritis</i>	I	04.09.2015

İzolatların tümü amikasin, sefepim, sefotaksim, seftriakson, imipenem, linezolid ve orta duyarlı bulunan bir izolat dışında TMP-SXT'ye duyarlı bulunmuştur. Tüm *N.cyriacigeorgica* izolatları siprofloksasine dirençli olarak tespit edilmiştir. Bir *N.cyriacigeorgica* izolatı ve bir *N.asiatica/arthritis* izolatı dışında, tüm izolatlar AMC'ye duyarlı olarak saptanmıştır. *N.asiatica/arthritis* izolatı AMC'nin yanı sıra moksifloksasin ve siprofloksasine karşı da dirençli tespit edilmiştir. İki *N.cyriacigeorgica* ve bir *N.farcinica* izolatı klaritromisine dirençli bulunmuştur. Çalışma izolatları arasında en yüksek direnç siprofloksasine (%62.5) karşı saptanmış, bunu klaritromisin (%37.5) takip etmiştir.

Hastalara ait tekrarlayan izolatların antimikrobiyal duyarlılık sonuçları ilk izolatla aynı olarak saptanmıştır. Bu nedenle her hastaya ait sadece ilk üretilen izolata ait antimikrobiyal duyarlılık sonucu Tablo III'te verilmiştir. Ayrıca en sık izole edilen tür olan *N.cyriacigeorgica* için antibiyotik duyarlılık profilleri daha detaylı olarak Tablo IV'te değerlendirilmiştir.

Tablo III. Nocardia spp. İzolatlarının Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri

Olgu	Nocardia spp.	Antimikrobiyal Ajan-MİK Değeri (µg/mL)-Kategori (S/I/R)										
		AMC*	Linezolid	Moksifloksasin	TMP-SXT*	Amikasin	İmipenem	Klaritromisin	Sefepim	Sefotaksim	Seftriakson	Siprofloksasin
1	<i>N.transvalensis</i>	0.38-S	0.25-S	0.023-S	3-I	3-S	0.5-S	3-I	0.5-S	0.25-S	0.38-S	0.094-S
2	<i>N.asteroides</i>	0.25-S	0.75-S	0.064-S	0.19-S	3-S	0.094-S	1.5-S	0.75-S	0.19-S	0.094-S	0.25-S
3	<i>N.cyrtaciğeorgica</i>	3-S	1.5-S	1-S	0.5-S	0.5-S	0.25-S	0.38-S	0.5-S	0.25-S	1.5-S	8-R
4	<i>N.cyrtaciğeorgica</i>	4-S	0.19-S	1-S	1-S	0.25-S	0.125-S	0.125-S	1-S	0.5-S	0.25-S	> 32-R
5	<i>N.farcinica</i>	0.5-S	0.5-S	1.5-I	0.012-S	0.38-S	0.094-S	12-R	0.75-S	0.75-S	1-S	0.064-S
6	<i>N.cyrtaciğeorgica</i>	16-I	0.75-S	1-S	0.032-S	0.25-S	1-S	> 256-R	2-S	0.25-S	1-S	> 32-R
7	<i>N.cyrtaciğeorgica</i>	6-S	1-S	3-I	0.064-S	0.5-S	0.25-S	8-R	1-S	1.5-S	0.38-S	> 32-R
8	<i>N.asiatica/arthritidis</i>	> 256-R	0.25-S	> 32-R	0.023-S	0.064-S	0.19-S	1-S	0.5-S	0.75-S	0.19-S	> 32-R

S: Susceptible (Duyarlı), I: Intermediate (Orta duyarlı), R: Resistant (Dirençli), AMC: Amoksisilin-klavulonik asit, TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol.

**Tablo IV.** *N.cyriacigeorgica* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Değerlendirilmesi

<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> (n= 9)					
	MİK <sub>50</sub> /MİK <sub>90</sub> (µg/mL)	MİK Aralığı (µg/mL)	Kategori		
			S (%)	I (%)	R (%)
AMC	4/6	3-16	89	11	-
Linezolid	1/1.5	0.19-1.5	100	-	-
Moksifloksasin	1/3	1-3	100	-	-
TMP-SXT	0.064/0.5	0.032-1	100	-	-
Amikasin	0.5/0.5	0.25-0.5	100	-	-
İmipenem	0.25/0.25	0.125-1	100	-	-
Klaritromisin	0.38/8	0.125-> 256	56	-	44
Sefepim	1/1	0.5-2	100	-	-
Sefotaksim	0.25/1.5	0.25-1.5	100	-	-
Seftriakson	1/1.5	0.25-1.5	100	-	-
Siprofloksasin	> 32/> 32	8-> 32	-	-	100

AMC: Amoksisilin-klavulonik asit, TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, S: Susceptible (Duyarlı), I: Intermediate (Orta duyarlı), R: Resistant (Dirençli).

## TARTIŞMA

*Nocardia* özellikle immünsuprese konaklarda, uzun süre steroid tedavisi alanlarda, kronik akciğer hastalıkları ve farklı maligniteleri olan hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara yol açmaktadır<sup>3</sup>. Benzer şekilde bu çalışmada *Nocardia* üremesi saptanan tüm hastalarda altta yatan en az bir hastalık olduğu görülmüştür. Primer siliyer diskinezili hastada dokuz aylık süre içinde üç kez daha *N.cyriacigeorgia* üremesi olmuştur. Bunun dışında, üç hastada daha tekrarlayan *Nocardia* üremesi saptanmıştır. Bu hastalardan sistemik lupus eritematosus tanısı ile izlenen hastanın beş gün arayla gelen iki farklı klinik örneğinde *Nocardia* üremesi tespit edilmiştir. Tekrarlayan üremelerin belirlendiği bir diğer olgu ise kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan bir hasta olup *Nocardia* üremeleri on gün içinde alınan iki balgam örneğinde saptanmıştır. Kısa süre içinde tekrarlayan bu üremelerin, enfeksiyonun henüz tedavi edilmemiş olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Tekrarlayan üremeleri olan üçüncü olgu bir kistik fibrozis hastasıdır. Bu hastanın sekiz aylık süre içinde alınan ardışık balgam örneklerinde altı kez *N.asteroides*'in ürettiği ve bu izolatların aynı PFGE genotipine sahip olduğu saptanmıştır. Bu nedenle bu hastada saptanan üremelerin kolonizasyon olabileceğini düşündürmüştür.

Mikrobiyoloji laboratuvarında klinik örnekleri değerlendirirken Gram boyama ile ön değerlendirmenin yapılması büyük önem taşımaktadır. *Nocardia* özelinde tartışmak gerekirse, geç üreme özelliğine sahip bu patojenin üretilebilmesi için kültür plaklarının inkübasyon süresinin uzatılması gerekmektedir. Örneğin normal koşullarda balgam ya da pü örneğinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında inkübasyon süresi 48 saattir ve bu süre *Nocardia* izolatlarının üremesi için yeterli olmayabilir. Çalışmaya dahil edilen

olguların klinik örneklerinin Gram boyamasında tipik boncuk tanesi şeklinde dallanan gram-pozitif mikroorganizmaların görülmesi nedeniyle kültür plaklarının inkübasyon süresi 14 güne kadar uzatılmış ve seçici bir besiyeri olan BCYE agara ek ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hastalara ait tüm klinik örneklerde *Nocardia* türlerinin 48 saatten daha uzun sürede üreyebildiği görülmüştür. Dolayısıyla Gram boyama yapılmadığı ya da doğru değerlendirilmediği durumlarda *Nocardia* mikrobiyolojik tanısının kolaylıkla atlanabileceği unutulmamalıdır.

*Nocardia* cinsinin taksonomisi oldukça karmaşık olduğundan, izolatların tür düzeyinde doğru tanımlanması için moleküler yöntemler tercih edilir. Ancak bu yöntemlerin rutin klinik laboratuvarlarda uygulanması zordur. *Nocardia* türlerini tanımlamaya yönelik fenotipik yöntemler zahmetlidir ve pratik değildir<sup>9,10</sup>. MALDI-TOF MS, son yıllarda mikroorganizmaların tanımlanmasında hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. *Nocardia* izolatlarının bu sistem ile tür düzeyinde tanımlanmasında halen zorluklar bulunmakla birlikte yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere MALDI-TOF MS sistemlerinin veri tabanlarının yenilenmesine paralel olarak daha fazla türün tanımlanması mümkündür<sup>11,12</sup>.

*Nocardia* spp. seçici olmayan besiyerlerinde üreyebilir. Ancak *Nocardia* şüphesi olan durumlarda özellikle normal mikrobiyota ile karışık örneklerde (balgam, püvy vb.) bakteri üremesi gözden kaçabileceğinden ve plakların inkübasyon süresinin uzatılması gerektiğinden klinik örnekler laboratuvara gönderilmeden önce mikrobiyoloji laboratuvarı bilgilendirilmelidir. Bu faktörler göz önüne alındığında, hızlı tanı için klinik örneklerin Gram boyama ile incelenmesi özellikle önemlidir. Bu çalışmada Gram boyalı yaymalarda gram-pozitif, dallanan basillerin saptanması üzerine örneklerin inkübasyon süresi uzatılmış, hem klinik örneğin kendisinden hem de kültürde üreyen *Nocardia* şüpheli kolonilerden modifiye asit-fast boyama ile değerlendirme gerçekleştirilmiştir.

TMP-SXT, nokardiyoz tedavisinde tercih edilen ilk ilaç olmaya devam etmektedir<sup>13,14</sup>. Bu çalışmada, orta duyarlı olarak bulunan bir *N.transvalensis* izolatı dışında bütün izolatlar TMP-SXT'ye (%87.5) duyarlı bulunmuştur. Diğer tedavi alternatifleri arasında bulunan linezolid, amikasin, seftriakson ve imipeneme ise çalışma izolatlarının tamamı duyarlı bulunmuştur (%100). *N.cyriacigeorgica*, çalışma popülasyonunda antibiyotiklere karşı en dirençli bulunan tür olmuştur. Yapılan çalışmalarda ayrı *Nocardia* türlerine ait antimikrobiyal duyarlılık sonuçları oldukça farklılık göstermektedir. Bunun yanı sıra aynı *Nocardia* türüne ait direnç oranları merkezden merkeze değişiklik gösterebilmektedir<sup>15,16</sup>. Dolayısıyla *Nocardia* türleriyle meydana gelen enfeksiyonların ampirik tedavi protokollerinin belirlenebilmesi için hem *Nocardia* türünün doğru belirlenmesi hem de antimikrobiyal duyarlılık testinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yönteminin ne yazık ki rutin laboratuvarlarda uygulanması mümkün değildir. Disk diffüzyon yöntemi için ise sadece TMP-SXT için tanımlanmış duyarlılık sınır değerleri mevcuttur. Bu çalışmada ilaçların minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin gradiyent test yöntemiyle belirlenmiş olması ve elde edilen sonuçların sıvı mikrodilüsyon

yöntemiyle karşılaştırılmamış olması çalışmanın bir eksikliğidir. Rutin laboratuvarlarda sıvı mikrodilüsyon yönteminin uygulanmasının zor olması nedeniyle *Nocardia* izolatlarının belirlenmiş olan merkezlerde toplanıp duyarlılık çalışmalarının yapılması büyük önem taşımaktadır.

Nokardiyozun patognomonik belirtileri veya semptomları yoktur. Bu nedenle, klinisyen açısından yüksek düzeyde şüphe ve mikrobiyoloji laboratuvarı açısından deneyim, nokardiyozun saptanması için esastır. *Nocardia* enfeksiyonundan şüphelenildiğinde, gönderilen numuneler üzerinde özgül besiyeri ve boyama prosedürlerinin yapılabilmesi ve kültürlerin inkübasyon süresinin uzatılması için laboratuvar bilgilendirilmelidir. Nokardiyoz, kaynakları kısıtlı laboratuvarlarda bile sıklıkla mevcut olan Gram boyama ile klinik örneklerin incelenmesiyle çok kısa sürede teşhis edilebilir. Bu nedenle, klinik uygulamada nokardiyozun erken ve doğru tanısı için Gram boyalı direkt mikroskopik değerlendirme ve buna bağlı olarak kültür plaklarının inkübasyon süresinin uzatılması büyük önem taşımaktadır.

### TEŞEKKÜR

Çalışmanın moleküler kısmına katkıda bulunan ve aramızdan ayrılmış olan Nafia Canan Gürsoy'a teşekkür ederiz.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

### KAYNAKLAR

1. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic Actinomycetes: Epidemiology and microbiology. Clin Microbiol Rev 1994; 7(3): 357-417. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.3.357>
2. Colaneri M, Lombardi A, Morea A, Monzillo V, Mariani B, Marone M, et al. An eight-year experience of *Nocardia* infection in Italy: Does immunosuppression matter? New Microbiol 2021; 44(2): 111-6.
3. Corti ME, Villafañi-Fiotti MF. Nocardiosis: A review. Int J Infect Dis. 2003; 7: 243-50. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(03\)90102-0](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90102-0)
4. Hashemzadeh M, Zadegan Dezfuli AA, Khosravi AD, Savari M, Jahangirimehr F. Genotypic and phenotypic prevalence of *Nocardia* species in Iran: First systematic review and meta-analysis of data accumulated over years. 1992-2021. PLoS One 2021; 16(7): e0254840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254840>
5. Li Y, Tang T, Xiao J, Wang J, Li B, Ma L, et al. Clinical analysis of 11 cases of nocardiosis. Open Med (Wars) 2021; 16(1): 610-7. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0196>
6. Mohanty A, Meena S, Kumar SP, Gupta PK, Kaistha N, Gupta P, et al. Incidental finding of *Nocardia*: A case series from a tertiary care centre in Uttarakhand. Case Rep Infect Dis 2020; 2020: 6874625. <https://doi.org/10.1155/2020/6874625>
7. Louie L, Louie M, Simor AE. Investigation of a pseudo-outbreak of *Nocardia asteroides* infection by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA PCR. J Clin Microbiol 1997; 35(6): 1582-4. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1582-1584.1997>
8. Wayne PA. Susceptibility testing of mycobacteria, *Nocardiae*, and other aerobic actinomycetes; approved standard-second edition. CLSI document M24-A2. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2011; p. 43.

9. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis: Review of clinical and laboratory experience. J Clin Microbiol 2003; 41(10): 4497-501. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4497-4501.2003>
10. Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification. J Clin Microbiol 2017; 56(1): e01419-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01419-17>
11. Marín M, Ruiz A, Iglesias C, Quiroga L, Cercenado E, Martín-Rabadán P, et al. Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2018; 24(12): 1342.e5-1342.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.014>
12. Toyokawa M, Ohana N, Ueda A, Imai M, Tanno D, Honda M, et al. Identification and antimicrobial susceptibility profiles of *Nocardia* species clinically isolated in Japan. Sci Rep 2021; 11(1): 16742. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95870-2>
13. Margalit I, Lebeaux D, Tishler O, Goldberg E, Bishara J, Yahav D, et al. How do I manage nocardiosis? Clin Microbiol Infect 2021; 27(4): 550-8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.019>
14. Lafont E, Conan PL, Rodriguez-Nava V, Lebeaux D. Invasive nocardiosis: Disease presentation, diagnosis and treatment - old questions, new answers? Infect Drug Resist 2020; 13: 4601-13. <https://doi.org/10.2147/IDR.S249761>
15. Yeoh K, Globan M, Naimo P, Williamson DA, Lea K, Bond K. Identification and antimicrobial susceptibility of referred *Nocardia* isolates in Victoria, Australia 2009-2019. J Med Microbiol 2022; 71(8). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001581>
16. Wang H, Zhu Y, Cui Q, Wu W, Li G, Chen D, et al. Epidemiology and antimicrobial resistance profiles of the *Nocardia* species in China, 2009 to 2021. Microbiol Spectr 2022; 10(2): 01560-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01560-21>