

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2002-2011 YILLARI ARASINDA HASTALARDAN İZOLE
EDİLMİŞ *NOCARDIA* TÜRLERİNİN BİYOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI**

Dr. M.Celalettin UNER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2014

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**2002-2011 YILLARI ARASINDA HASTALARDAN İZOLE
EDİLMİŞ *NOCARDIA* TÜRLERİNİN BİYOKİMYASAL VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI**

Dr. M. Celalettin UNER

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. Gülşen HASÇELİK

ANKARA
2014

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması, gerçekleştirilmesi ve yazımı sırasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen Prof. Dr. Gülşen Haşçelik'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca katkıları nedeniyle Prof. Dr. Özgen Köseoğlu Eser, Prof. Dr. Banu Sancak, Prof. Dr. Serdar Diker, Doç. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç, Dr. Aslı Çakar, Dr. Kaan Müştak, Dr. Özlem Şahan'a, öğrenim hayatım süresince katkıları ile her zaman yanımda olan anabilim dalımızın tüm değerli hocalarına, sevgili asistan arkadaşlarıma ve canım aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Nocardia türleri toprakta, suda, havada ve çürümüş bitki artıklarında saprofit olarak bulunmakta, insanlarda ve hayvanlarda lokal ve yaygın enfeksiyonlara neden olmaktadır. Nokardiya enfeksiyonları insanlarda nadir görülmekte, sıklıkla subakut veya kronik süpüratif veya granümatöz hastalıklara yol açmaktadır. *Nocardia* türlerine göre değişen farklı klinik tablolar ve farklı antibiyotik duyarlılık profilleri izlenmektedir.

Bu çalışmada 2002- 2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen 45 *Nocardia* suşu biyokimyasal ve moleküler testler ile tanımlanmış ve bu izolatların antimikrobiyal ajanlara direnç durumu incelenmiştir. *Nocardia* türleri izole edilen klinik örneklerin çoğunluğunu solunum yolu örneklerinin (% 37.7) oluşturduğu, bunu sırasıyla beyin apsesi (% 17.7) ve püy (% 15.55) örneklerinin izlediği gözlenmiştir.

Nocardia türlerinin tanımlanmasında uygulanan biyokimyasal testler sonucunda sadece *N. farcinica* (n:12) ve *N. otitidiscaviarum* (n:4) tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. DNA dizi analizi ile 45 *Nocardia* izolatının; *N. cyriacigeorgica* (n: 26), *N. farcinica* (n:12), *N. otitidiscaviarum* (n:4), *N. asteroides* (n:2) ve *N. abscessus* (n:1) türlerinden oluştuğu gösterilmiştir. Otomatize cihaz kullanılarak yapılan ribotiplendirme sonucu tüm *Nocardia* suşlarında 3.2 kb bant büyüklüğü görülmüştür. Türler arası farklı bant profilleri izlenmiştir.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerilerine göre bu izolatların antibiyotik duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Bu yöntemde beş antimikrobiyal ajan (amikasin, siprofloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol, seftriakson, linezolid) kullanılmıştır. Amikasin ve linezolid antibiyotiklerine karşı herhangi bir direnç gözlenmemiş olup, trimetoprim-sulfametoksazol, seftriakson ve siprofloksasine direnç sırasıyla % 15.5, % 37.7 ve % 82.2 oranında görülmüştür. Çoklu ilaç direnci görülen *N. farcinica* türü için trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiğine karşı direncin % 16.6 gibi düşük bir oranda saptanması, bu antibiyotiğin tedavideki yerini koruduğunu işaret etmektedir. Sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri karşılaştırıldığında TMP-SMX antibiyotiğine karşı duyarlılık sonuçları açısından iki yöntem arasında uyum bulunamamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada *Nocardia* türlerinin tanımlanması için DNA dizi analizi gibi moleküler testlerin önemli olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda ribotiplendirme yöntemi kullanılarak *Nocardia* türlerine yönelik bir kütüphane oluşturulmasında önemli olduğu belirtilmiştir. *Nocardia* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılmasının gerektiği anlaşılmıştır.

ABSTRACT

Nocardia species are found in soil, water, air and in decomposing plant materials as saprophytes. They also cause local and systemic infections in humans and animals. Human infections are rare and commonly presented as subacute or chronic suppurative or granulomatous diseases. Variable clinical manifestations and antibiotic susceptibility profiles can be seen according to the *Nocardia* species.

In this study, previously identified 45 *Nocardia* strains isolated from clinical samples in Clinical Microbiology Laboratory of Hacettepe University Hospitals between 2002 and 2011 were identified by using biochemical and molecular tests and the antimicrobial resistance were determined. Most of the strains were isolated from respiratory samples (37.7 %) which was followed by brain abscess (17.7 %) and pus (15.5 %).

By using biochemical tests, only *N. farcinica* (n:12) and *N. otitidiscaviarum* (n:4) could be identified to the species level. DNA sequencing test identified; *N. cyriacigeorgica* (n: 26), *N. farcinica* (n:12), *N. otitidiscaviarum* (n:4), *N. asteroides* (n:2) and *N. abscessus* (n:1) were to the species level. The ribotyping of the strains performed by automated device revealed that all of the *Nocardia* isolates had common 3.2 kb band patterns. Besides, distinctive band profiles were evaluated among the different *Nocardia* species.

According to the recommendations of CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), antibiotic susceptibility tests of these isolates were performed by broth microdilution method. In this method five antimicrobial agents (amikacin, ciprofloxacin, trimethoprim/ sulfamethoxazole, ceftriaxone, linezolid) were used. There was no resistance against amikacin and linezolid. The resistance rates against trimethoprim-sulfamethoxazole, ceftriaxone and ciprofloxacin were 15.5 %, 37.7 % and 82.2 %, respectively. In this study the resistance of *N. farcinica* to the trimethoprim-sulfamethoxazole was 16.6 % and because of this low resistance, this drug still keeps its place in treatment. Comparative evaluation of broth microdilution and disk diffusion methods indicated no consistency for TMP-SMX susceptibility profiles.

In this study, for identification of *Nocardia* species, the importance of molecular methods such as DNA sequencing was shown. The importance of establishment a library of *Nocardia* species by ribotyping was also emphasized. It was clearly understood that for the antibiotic susceptibility testing of *Nocardia* species, broth microdilution method should be the method of choice.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
TABLolar	ix
ŞEKİLLER	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Taksonomi	3
2.3. Mikrobiyolojik Özellikler	3
2.3.1. Hücre Yapısı	3
2.3.2. Morfolojik ve Üreme Özellikleri	4
2.4. Epidemiyoloji	5
2.5. Patogenez	6
2.6. Klinik	7
2.6.1. Akciğer nokardiyozu	7
2.6.2. Kutanoz, subkutanöz ve lenfokutanöz nokardiyoz	8
2.6.3. Yaygın (sistemik) nokardiyoz	8
2.6.4. Santral sinir sistemi nokardiyozu:	9
2.7. Laboratuvar Tanısı ve İn Vitro Antibiyotik Duyarlılık Testleri	10
2.7.1. Mikroskopik İnceleme	10
2.7.2. Kültür	10
2.7.3. Biyokimyasal Tanımlama	10
2.7.4. Moleküler Yöntemler	14
2.7.5. Antibiyotik Duyarlılığı	15
2.7.6. Serolojik Tanı	15
2.8. Tedavi	16

3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Suşlar	18
3.2. Biyokimyasal Testler	18
3.2.1. Lizozim Direnç Testi	18
3.2.2. Kazein, Ksantin, Hipoksantin, Tirozin ve Nişasta Hidrolizi:	19
3.2.3. Arilsülfataz Varlığı	19
3.2.4. Karbonhidrat Kullanımı (L-ramnoz)	20
3.2.5. 45°C’de Üreme	20
3.3. Moleküler testler	20
3.3.1. DNA İzolasyonu	20
3.3.2. PZR ve DNA Dizi Analizi	22
3.3.3. Ribotiplendirme	24
3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi	25
3.5. İstatistiksel Değerlendirme:	26
4. BULGULAR	27
4.1. Hastalar ve suşlar	27
4.2. Biyokimyasal Test Sonuçları	28
4.3. Moleküler Tanı	33
4.3.1. DNA dizi analizi	33
4.3.2. Ribotiplendirme	33
4.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	34
4.4.1. Mikrodilüsyon Sonuçları	34
4.4.2. Disk difüzyon sonuçları	35
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ	44
KAYNAKLAR	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

SSS	Santral sinir sistemi
ATCC	American Type Culture Collection
İDP	İlaç duyarlılık paterni
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CO ₂	Karbondiyoksit
HCL	Hidroklorik asit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
BCYE	Buffered charcoal yeast extract
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
TMP-SMX	Trimetoprim- sülfametoksazol
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbant assays
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
REA	Restriksiyon enzim analizi
DNA	Deoksiribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MİK	Minimum inhibitor konsantrasyon
BAL	Bronkoalveolar lavaj

TABLolar

Tablo No.		Sayfa
Tablo 2.1.	<i>Aerob Actinomycetes</i> ve ilişkili cinslerin biyokimyasal testlere göre tanımlanması	11
Tablo 2.2.	<i>Nocardia</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri	13
Tablo 4.3.	İzole Edilen <i>Nocardia</i> suşlarının örnek türlerine göre dağılımı	27
Tablo 4.4.	<i>Nocardia</i> suşlarının biyokimyasal test sonuçlarına göre tür dağılımı	28
Tablo 4.5.	<i>Nocardia</i> suşlarının DNA dizi analizine ne göre tür dağılımı	33
Tablo 4.6.	<i>Nocardia</i> türlerinin MİK sonuçları	35
Tablo 4.7.	<i>Nocardia</i> türlerinin disk difüzyon testi sonuçları	35
Tablo 4. 8.	Sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması	36

ŞEKİLLER

Şekil No		Sayfa
Şekil 4.1.	a) Arilsülfataz pozitif <i>M. fortuitum</i> b) Arilsülfataz negatif <i>Nocardia spp.</i>	29
Şekil 4.2.	Kazein, ksantin, tirozin hidrolizi pozitif <i>Nocardiosis spp.</i>	29
Şekil 4.3.	Kazein, ksantin, tirozin ve nişasta hidrolizi negatif <i>N. farcinica.</i>	30
Şekil 4.4.	a) Ramnoz testi negatif b) Ramnoz testi pozitif	30
Şekil 4.5.	Ksantin hidrolizi pozitif <i>N. otitiscaviarum</i>	31
Şekil 4.6.	Hipoksantin hidrolizi pozitif kontrol suş	31
Şekil 4.7.	Hipoksantin hidrolizi pozitif <i>N. otitiscaviarum</i>	32
Şekil 4.8.	Bazı <i>Nocardia</i> izolatlarına ait ribotip paternleri	34

1. GİRİŞ

Aerob *Actinomycetales* takımında yer alan *Nocardia* türlerinin günümüzde genotipik yöntemlerle tanımlanmış 80'den fazla türü bulunmaktadır (1, 2). *Nocardia* türleri doğada, toprakta, suda, havada ve çürümüş bitki artıklarında bulunmakta olup insanlarda ve hayvanlarda lokal ve yaygın enfeksiyonlara yol açabilmektedir. İnsanlarda enfeksiyon nadir görülmekle birlikte sıklıkla subakut veya kronik enfeksiyon şeklinde seyretmektedir (3, 4). Enfeksiyon başlıca akciğer nokardiyozu, kutanöz, subkutanöz ve lenfokutanöz nokardiyoz, santral sinir sistemi (SSS) nokardiyozu ve yaygın (sistemik) nokardiyoz şeklinde görülmekte olup, diğer organ tutulumunu gösteren olgu raporları da bulunmaktadır (5). İnsandan insana doğrudan bulaşın kanıtlanamadığı nokardiya enfeksiyonları, sıklıkla bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. Bu enfeksiyonlar erkeklerde kadınlara göre daha sık izlenmektedir (6,7). Klinik tabloların ve antibiyotik duyarlılık paternlerinin değişkenlik gösterdiği *Nocardia* türlerinin, tür düzeyinde tanımlanmasının önem ve gerekliliği vurgulanmaktadır (5).

Bu çalışmada 2002 - 2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen *Nocardia* suşlarının biyokimyasal yöntemler kullanarak tür düzeyinde tanımlanmasını yapmak, *Nocardia* suşlarını DNA dizi analizi ve ribotiplendirme ile tanımlamak, ribotiplendirme veritabanına katkı sağlamak, tanımlanan tür düzeyindeki her bir *Nocardia* suşunun antibiyotik duyarlılıklarını tespit etmek, sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerini karşılaştırmak ve dizi analizi ile biyokimyasal tanımlamayı karşılaştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Aerob *Actinomycetes* grubunda yer alan *Nocardia* türleri doğada, toprakta, suda, havada ve çürümüş bitki artıklarında saprofit olarak bulunmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda lokal ve yaygın enfeksiyonlara yol açabilen bu bakterilerin insanlarda oluşturdukları enfeksiyona nokardiyoz adı verilmektedir (3). Bu enfeksiyon nadir görülmekte, sıklıkla subakut veya kronik enfeksiyon şeklinde seyretmektedir. Ayrıca süpüratif veya granümatöz hastalık gibi ağır klinik tablolara da neden olduğu belirtilmektedir (4). *Nocardia* türleri arasında klinik tablo ve antibiyotik duyarlılık profillerinin farklı olması, bu bakterilerde tür düzeyinde ayırımın önemini göstermektedir (5).

2.1. Tarihçe

Nocardia türleri ilk olarak 1888'de Edmund Nocard (8) tarafından sığır çıbanı olgusundan tanımlanmıştır. Bundan bir yıl sonra Trevisan (9) organizmayı *Nocardia farcinica* olarak adlandırmıştır. İnsanda ilk hastalık etkeni olarak gösterilmesi 1890 yılında Eppinger tarafından yapılmıştır (10). *Nocardia* türleri içinde *N. farcinica* 1954 yılında standart tür olarak belirlenmiştir. Trevisan'ın tanımladığı orijinal *N. farcinica* kültür koleksiyonundan yapılan fenotipik çalışmalarda, bir örnek *Mycobacterium*, diğer örnek ise *Nocardia farcinica* (ATCC 3318) olarak tanımlanmıştır (10, 11). Gordon ve Mihm adlı araştırmacılar, 1962 yılında *Nocardia farcinica* ATCC 3318 ile "*N. asteroides*" arasında herhangi bir fenotipik fark bulamamışlardır (12, 13). *N. farcinica* standart suşunun belirsiz taksonomik konumu ve *N. asteroides*'in en sık adlandırılan tür olması nedeniyle, Gordon ve Mihm tarafından Ulusal Komisyona bu iki türün birlikte gruplandırılması ve *N. asteroides*'in *N. farcinica* yerine *Nocardia* cinsi içerisinde standart suş olarak kabul edilmesine yönelik öneri sunulmuştur. Aynı dönemde *N. asteroides* ATCC 19247 adlı yeni bir suş bulunmuştur (13, 14).

İki kültür koleksiyonundan hangi "*N. farcinica*" türünün *Nocardia* orijinal mikroorganizmasını temsil ettiği bilinmese de, *Nocardia farcinica* ATCC 3318'in tüm *Nocardia* suşlarının özelliklerini içerdiği bildirilmiştir (15, 16). Tsukumura ile 1969'larda başlayan ve daha sonra devam eden çalışmalarda, *N. asteroides* olarak

adlandırılmış grupların bazılarında biyokimyasal ve immünolojik özellikler *Nocardia farcinica* ATCC 3318 ile aynı, fakat *N. asteroides* ATCC 19247'den farklı altgruplar içerdikleri tesbit edilmiştir (17). Bu bulgular sonucunda Ulusal Komisyon tarafından, *N. farcinica* ile *N. asteroides* arasındaki uyumsuzluk devam etse de, *N. farcinica* ismi kullanılmaya devam etmiştir. Son yıllarda yapılan duyarlılık testleri ve çalışmalar sonucunda *N. farcinica* türünün, *N. asteroides* türünden tamamen farklı olduğu gösterilmiştir. Literatürde geçmişte *N. asteroides* olarak adlandırılan suşların aslında günümüzdeki gelişmiş yöntemlerle yanlış tanımlandığı belirtilmektedir (5).

Wallace ve arkadaşları (18) 1988 yılında *Nocardia asteroides*'e benzer mikroorganizmaları altı ilaç duyarlılık patern (İDP) tipinde tanımlamışlardır. Bunlar; *N. abscessus* (Tip I İDP), *N. brevicatena* kompleks (Tip II İDP), *N. nova* kompleks (Tip III İDP), *N. transvalensis* kompleks (Tip IV İDP), *Nocardia farcinica* (Tip V İDP) ve *N. asteroides* (Tip VI) olarak belirlenmiştir. Bu bakterilerin yarısından az bir kısmının insanlarda hastalık etkeni olduğu belirtilmektedir (18). Güney Amerika'da yapılan bir çalışmada eski tanımlamayla *N. asteroides* tanısı almış suşların, Wallace ve arkadaşlarının çalışmalarında tanımladıkları Tip VI (İDP) grubuna ait olduğu belirtilmektedir (5).

2.2. Taksonomi

Nocardia cinsi bakteriler *Actinomycetales* takımında, *Corynebacterineae* alt takımında ve *Nocardiaceae* familyasında yer almaktadır (1). Bugün için genotipik yöntemlerle belirlenmiş 86 türü bulunmaktadır (2). İnsanlarda bilinen en önemli patojen *Nocardia* türleri: *N. farcinica*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum*, *N. cyriacigeorgica*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. paucivorans*, *N. veterana* ve *N. transvelensis*'tir (19).

2.3. Mikrobiyolojik Özellikler

2.3.1. Hücre Yapısı

Nocardia türlerinin hücre duvar yapısı, diğer aerob *Actinomycetes* grubunda yer alan *Mycobacteria*, *Corynebacteria* *Rhodococcus*, *Gordona* gibi bakterilerin hücre duvar yapısına benzemektedir. Bu yapıda mezodiaminopimelik asid, arabinoz,

galaktoz ve mikolik asit bulunmaktadır. *Nocardia* türleri hücre duvarında yer alan mikolik asit nedeniyle değişen derecede “asidorezistan” boyanma özelliği göstermektedir (20).

2.3.2. Morfolojik ve Üreme Özellikleri

Nocardia türleri Gram yöntemi sonucunda yapılan mikroskopik incelemede gram pozitif dallanan basiller şeklinde görülmektedir. Modifiye Kinyoun boyamada ise kısmi asidorezistan boyanma özelliğindedir. Klinik örnekten doğrudan modifiye Kinyoun boyamanın güvenilir olmadığı belirtilmektedir. Bu nedenle bu boyamanın, sadece Gram boyama sonrası bakterinin asidorezistan olup olmadığını doğrulamak amacıyla yapılması önerilmektedir (6).

Nocardia türleri kanlı agar, çikolata agar, Sabouraud dekstroz agar ve Löwenstein Jensen besiyerlerinde üreyebilmektedir. *Nocardia* türlerinin üremesi için gerekli minimum inkübasyon süresi 48-72 saattir. Bu süre 48 saat-14 gün arasında değişebildiğinden, inkübasyonun 2 haftaya kadar sürdürülmesi önerilmektedir. *Nocardia* türleri 37-45 °C sıcaklıklarda üreyebilmekte ve üreme % 5-10 CO₂ varlığında hızlandırılabilir (21). Mikrobiyolojik besiyerlerinde kolaylıkla üreyen *Nocardia* türlerinin koloni morfolojileri değişkenlik göstermektedir. Bu bakteriler düzgün (S) koloniler yada düzensiz (R) koloniler şeklinde, saçaklı kenarlı havasal hiflere bağlı kadife görünümünde koloniler oluşturabilmektedir. *Nocardia* türleri tebeşir beyazından turuncuya kadar değişen pigment oluşturabilmektedir (21, 22). Üreme sonrası besiyerlerindeki toprak ya da küflü bodrum kokusu önemli özellikleri arasında sayılmaktadır (23).

Nocardia türlerinin besiyerinde oluşturdukları havasal hifler koloni yüzeyinden yukarıya doğru uzanmakta ve bu koloniler 2 hafta içerisinde görünür hale gelmektedir. Stereoskop kullanımı ile “pamuk şekeri” görünümünde havasal hifler görülebilmektedir. Lam kültürü ile 25°C inkübasyonda, 2-3 haftalık periyodik incelemeler sonunda substrat hif ve havasal hif varlığı yönünden değerlendirme yapılabilmektedir. Havasal hif varlığı ile *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Corynebacterium* ve *Mycobacterium* türlerinden ayrılabilir. Havasal hif oluşturan *Streptomyces* türlerinden ise kısmi asidorezistan boyama özelliği ile ayırım yapılabilmektedir (24).

2.4. Epidemiyoloji

Nocardia türleri insanlarda ve hayvanlarda lokal veya yaygın birçok enfeksiyona neden olmaktadır. Bu bakteriler toprak mikroflorasında, suda, çürümüş bitki artıklarında ve havada yaygın olarak bulunmaktadır. Bazı türler ılıman iklim gibi bazı coğrafik bölgelerde daha fazla görülmektedir. Bunun nedeni olarak kuruluşun, tozlu ve rüzgarlı havanın aerosol oluşumunu kolaylaştırması gösterilmektedir (25, 26, 27).

İnsanlara bulaşın en sık aerosol yoluyla olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda ortaya çıkan akciğer enfeksiyonunu takiben, diğer dokulara yayılımla, özellikle de merkezi sinir sistemine yayılımla beyin apsesi gelişmektedir. İnsanlarda bulaş aerosol yol dışında, cilt ya da yumuşak dokuya direk inokülasyon yoluyla da gerçekleşebilmektedir. Bunun sonucunda nodüler deri ve deri altı enfeksiyonları görülmektedir. Bunun yanısıra bakterinin lenfatik kanalla yayılımı sonucu eklem ve kemiklerde enfeksiyon saptanmaktadır. Literatürde nadirde olsa *Nocardia* türlerine bağlı göz enfeksiyonu olguları da bildirilmektedir (28).

İnsandan insana doğrudan bulaş ve nokardiyoz teşhisi konulmuş hayvanlardan insanlara bulaşa ait bir kanıt olmadığı belirtilmektedir. Aynı odayı paylaşan hastalarda benzer suşlarla enfeksiyonun geçtiğini gösteren nadir olgu raporları bildirilmektedir. (6, 29). Nokardiya enfeksiyonları en sık 20-50 yaş arasındaki olguları etkilemektedir (30). Erkeklerin kadınlara göre 3:1 oranında daha sık etkilendiği görülmektedir (7).

Nocardia türlerine bağlı enfeksiyonlarda saptanan en önemli risk faktörü insan bağışıklık sisteminin baskılanmasıdır. Bu enfeksiyon en sık solid organ transplantasyonu yapılan hastalarda görülmektedir. Bunu insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte hastalar ve kortikosteroid kullanan hastalar izlemektedir (24, 6, 31). Bronşektazi ve yapısal akciğer anomalileri *Nocardia* türleri için solunum sistemine kolonizasyon açısından risk faktörü oluşturmaktadır. Sistemik lupus eritematoz, sarkoidoz, lenfoma, diabetes mellitus, kronik granülomatoz hastalık, travma ve cerrahi nokardiyoz için diğer predispozan faktörler arasındadır (24, 32).

2.5. Patogenez

Virülan *N. asteroides* suşları fakültatif hücre içi patojenler olup, doğal ve kazanılmış immün yanıtın bakterisidal savunmasından başarıyla kaçabilmektedir. Retiküloendotelial sistemde *Nocardia* türlerinin üremesini durduran erken nötrofil göçü söz konusudur. Enfeksiyonun yayılımını geciktiren bu durum, makrofaj aktivasyonu ve lenfosit aracılı toksisiteden sorumlu T hücrelerinin indüksiyonuna kadar devam etmektedir. İnvitro ortamda yapılan çalışmalar, bu iki hücre grubunun *Nocardia* türlerini öldürebildiğini göstermiştir (25, 33,34).

Fagositik hücrelerle *Nocardia* türlerinin etkileşimi, mikroorganizmanın virülansına ve üreme fazına göre değişmektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, log fazındaki bakterilerin fagositoza dirençli oldukları ve durağan fazdaki kokoid bakteri formuna göre makrofajlara 1000 kat daha toksik oldukları gösterilmiştir (25).

Virülan *Nocardia* türleri fagozom-lizozom füzyonunu engellemekte, makrofaj içinde lizozomal enzim aktivitesini azaltmaktadır. Böylece fagozomal asidifikasyon nötralize edilerek oksidatif öldürme mekanizmalarına direnç gelişmektedir. Virülan suşlardaki bu direnç mekanizmasından yüzey ilişkili süperoksit dismutaz salınımı ve katalaz enzim seviyelerindeki artışın sorumlu olduğu gösterilmiştir (24, 25, 33). Hücre duvarındaki kompleks glikolipid yapısının da virülansa katkı sağlayan bir faktör olduğu vurgulanmaktadır (25). L-formuna dönüşümün geç rölapsların nedenini açıklayabileceği düşünülmektedir (35, 36).

Kronik granülomatöz hastalıkta nötrofil ve makrofajlar, fagositozda oksidatif patlamayı gerçekleştiremedikleri için, *Nocardia* türleri gibi katalaz pozitif hücre içi mikroorganizmaları öldürememektedir. Bunun yanında *Nocardia* türlerinin normal oksidatif patlamaya bile rölatif dirençli olabileceği belirtilmektedir. (25, 37)

Deneysel hayvan çalışmalarında baskılanmış interferon gama artışının iyileşmeyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnterferon gamanın kronik granülomatöz hastalığı olan kişilerde terapötik rolünün olabileceği belirtilmektedir (37).

2.6. Klinik

Nocardia türleri akciğer nokardiyozu, kutanöz, subkutanöz ve lenfokutanöz nokardiyoz, SSS nokardiyozu ve yaygın (sistemik) nokardiyoz gibi farklı klinik tablolara yol açmaktadır. Bunların dışında kemik, kalp kapakları, böbrek ve eklemlerde de enfeksiyona neden olmaktadır. Göz, karaciğer, dalak, adrenal bezler, pankreas ve prostat tutulumunu bildiren olgular da mevcuttur (5).

2.6.1. Akciğer nokardiyozu

Akciğer nokardiyozu, *Nocardia* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar içinde en sık görülen klinik formdur. Bu enfeksiyon bakterinin solunum yolu ile alınması ile ortaya çıkmaktadır (31, 38, 39). İmmünsüpresif ilaç alınımı, HIV enfeksiyonu, kortikosteroid kullanımı, kronik granümatöz hastalık, diyabet ve kronik alkolizmi olan kişilerde *Nocardia* türlerine bağlı akciğer enfeksiyonunun gelişme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Akciğer nokardiyozu olan bazı hastalarda kronik obstrüktif akciğer hastalığı, astım, kronik sarkoidoz veya bronşektazi gibi altta yatan kronik bir akciğer hastalığı olduğu belirtilmektedir (6). Nadir olarak kontamine yiyeceklerin alınması ile gelişen dental veya periodontal enfeksiyon sonrası pulmoner enfeksiyon gelişebildiği gösterilmiştir (40). Enfeksiyon her yaşta görülebilmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir (7, 29). Akut, subakut ve kronik formda seyredilmekte, en sık öksürük, yüksek ateş, gece terlemeleri, dispne, hemoptizi, iştahsızlık ve kilo kaybı gibi semptomlara neden olmaktadır (5).

Hastalarda pnömoni, bronkopnömoni, apse oluşumu yanında, %25 olguda plevral tutulum ya da ampiyem görülebilmektedir. Bronşit, trakeit, mediastinit ve sinüzit daha nadir olarak görülmektedir (40, 41).

Radyografide kavitasyon, konsolidasyon, apse oluşumu ve miliyer lezyonlar görülebilmektedir. Nadir olarak varolan akciğer kaviteleri invazyon sonrası fungus topu görünümüne yol açabilmektedir. Radyolojik olarak filamentöz mantarlardan ve mikobakterilerden ayırım mümkün değildir (33).

2.6.2. Kutanöz, subkutanöz ve lenfokutanöz nokardiyoz

Kutanöz nokardiyoz, pulmoner nokardiyozdan farklı olarak immün sistemi normal kişilerde gelişmektedir. Tüm nokardiyoz olgularının %25'ini kapsayan bu enfeksiyon, travma veya hayvan ısırığı sonrası gelişmektedir (5, 41). Kendini sınırlayan bir enfeksiyon olması ve rutin olarak yüzeysel cilt enfeksiyonlarında Gram boyama ve kültür yapılmaması nedeniyle gözden kaçabilmektedir. Primer kutanöz nokardiyoz enfeksiyonlarından %80 oranında *N. brasiliensis* izole edilmektedir, bunun yanında diğer türlerin de kutanöz nokardiyoz enfeksiyonuna neden olduğu gösterilmiştir (5).

Enfeksiyon genellikle yüzeysel apse, lokalize selülit, püstül ve ülserasyonlarla kendini göstermektedir. Bunun dışında enfeksiyon bölgesel lenf nodlarına yayılarak sporotrikozu andıran zincir şeklinde nodüler lezyonlara neden olabilmektedir. Bu lenfokutanöz nokardiyoz tablosuna sporotrikoid nokardiyoz adı verilmektedir (25, 41).

Nocardia türleri ciltten direk inokülasyon sonucu, cilt altı bir enfeksiyon olan miçetom oluşumuna yol açmaktadır. Miçetom (Madura ayağı) sıklıkla ayakta görülen kronik, yavaş ilerleyen, lokalize, ağrısız deriyi, derialtı dokusunu, fasya, kas ve kemikleri tutan ileri evre bir enfeksiyondur. Çoğunlukla çıplak ayakla uzun süre toprak teması enfeksiyonla ilişkilendirilmektedir (41, 42). Tümefaksiyon, fistülizasyon ve farklı boyut ve renklerde granüller enfeksiyona has özelliklerdir. (24, 43)

Miçetom gelişiminde *Nocardia* türlerinin yanında *Streptomyces* ve *Aktinomadura* türlerinin de etken olduğu belirtilmektedir (20).

2.6.3. Yaygın (sistemik) nokardiyoz

Pulmoner ya da kutanöz enfeksiyonun hematojen yayılımıyla iki veya daha fazla organda lezyonların görüldüğü enfeksiyonlara, sistemik enfeksiyon adı verilmektedir. Yayılım en sık olarak SSS, cilt ve cilt altı dokusu, böbrek, kemik, kalp ve göze olmaktadır (24, 33, 44).

Enfeksiyonun erken dönemlerinde konak cevabında nötrofiller hakim olup, ilerleyen dönemde makrofaj ve lenfosit hakimiyeti söz konusudur (25). Kutanöz

enfeksiyonların aksine, akciğer ve yaygın nokardiyoz tedavi edilmediği takdirde, ilerleme göstermektedir (45, 46).

Bunların dışında *Nocardia* türleri daha nadir olarak peritonit, perikardit, septik artrit, osteomyelite neden olmaktadır. Peritonit özellikle sürekli periton diyalizi uygulanan hastalarda gelişmektedir (47).

Travma sonrası nadir olarak göz tutulumu bildirilen olgular mevcuttur. Oküler nokardiyoz durumunda keratit, üveit ve retinal apse gelişimi görülebilmektedir (24, 48,49).

2.6.4. Santral sinir sistemi nokardiyozu:

Santral sinir sistemi enfeksiyonları yaygın nokardiyoz olgularının yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Sıklıkla akciğer nokardiyozuna eşlik eder (24).

Bu klinik form sessiz bir seyir gösterdiğinden tanısı zordur. Santral sinir sistemi nokardiyozu beyin apsesi, spinal kord apsesi ve menenjit şeklinde seyredebilmektedir. Tanı genellikle nörolojik bir hasar varlığı sonrası ve SSS'deki lezyonlardan alınan örneklerin incelenmesi ile konulmaktadır (29). Bu klinik formun beyin tümörünü taklit ettiği ve bu nedenle tümör rezeksiyonu amacıyla cerrahiye alınan nokardiyoz olgu raporlarının olduğu belirtilmektedir (40).

Santral sinir sistemi nokardiyozlu hastalarda genellikle bir ya da daha fazla beyin apsesi bulunmaktadır (50). Bu durumda başağrısı, kafa içi basınç artışı, bulantı, kusma ve konfüzyon görülebilmektedir (51). SSS nokardiyozunda menenjit tablosu ise beyin apsesine göre daha nadir görülmektedir (42). SSS tutulumunda depresyon, şizofreni, disleksi ve amnezi gibi psikolojik değişiklikler de gözlenmektedir (52). Hafif nörolojik bulgular varlığında antibiyotik tedavisi yeterli olmasına rağmen, apse oluşumunda cerrahi eksizyon gerekebilmektedir. Bu olguların çoğunda etken olan tür *N. asteroides*' dir (40).

2.7. Laboratuvar Tanısı ve İn Vitro Antibiyotik Duyarlılık Testleri

2.7.1. Mikroskopik İnceleme

Nocardia türleri sıklıkla bronkoalveoler lavaj, balgam, apse, doku ve beyin omurilik sıvısından izole edilmektedir (5). Klinik örneklerin Gram boyası ile mikroskopik incelemesinde, sıklıkla yoğun polimorfonükleer lökositlerin olduğu bir zeminde, gram pozitif dallanan basiller şeklinde görülürler. Mikroskopik incelemede Gram boyama dışında modifiye Kinyoun boyama yöntemi de kullanılmaktadır. Bu boyama yöntemi ile *Nocardia* türleri kısmi aside dirençli boyanmaktadır. Modifiye aside dirençli boyamada mikobakteriler için kullanılan %3 HCL yerine, %1 H₂SO₄ tercih edilmektedir (19, 24). Modifiye Kinyoun boyama yönteminin, klinik örneklerin incelenmesinde tek başına güvenilir olmadığı, Gram boyama sonrasında kısmi asidorezistan özelliğinin doğrulanması amacıyla kullanılması gerektiği belirtilmektedir (5, 40). Bu boyama yöntemi dışında gümüşleme boyasının da modifiye Kinyoun boyama yöntemi ile eşdeğer nitelikte olduğu gösterilmiştir (53).

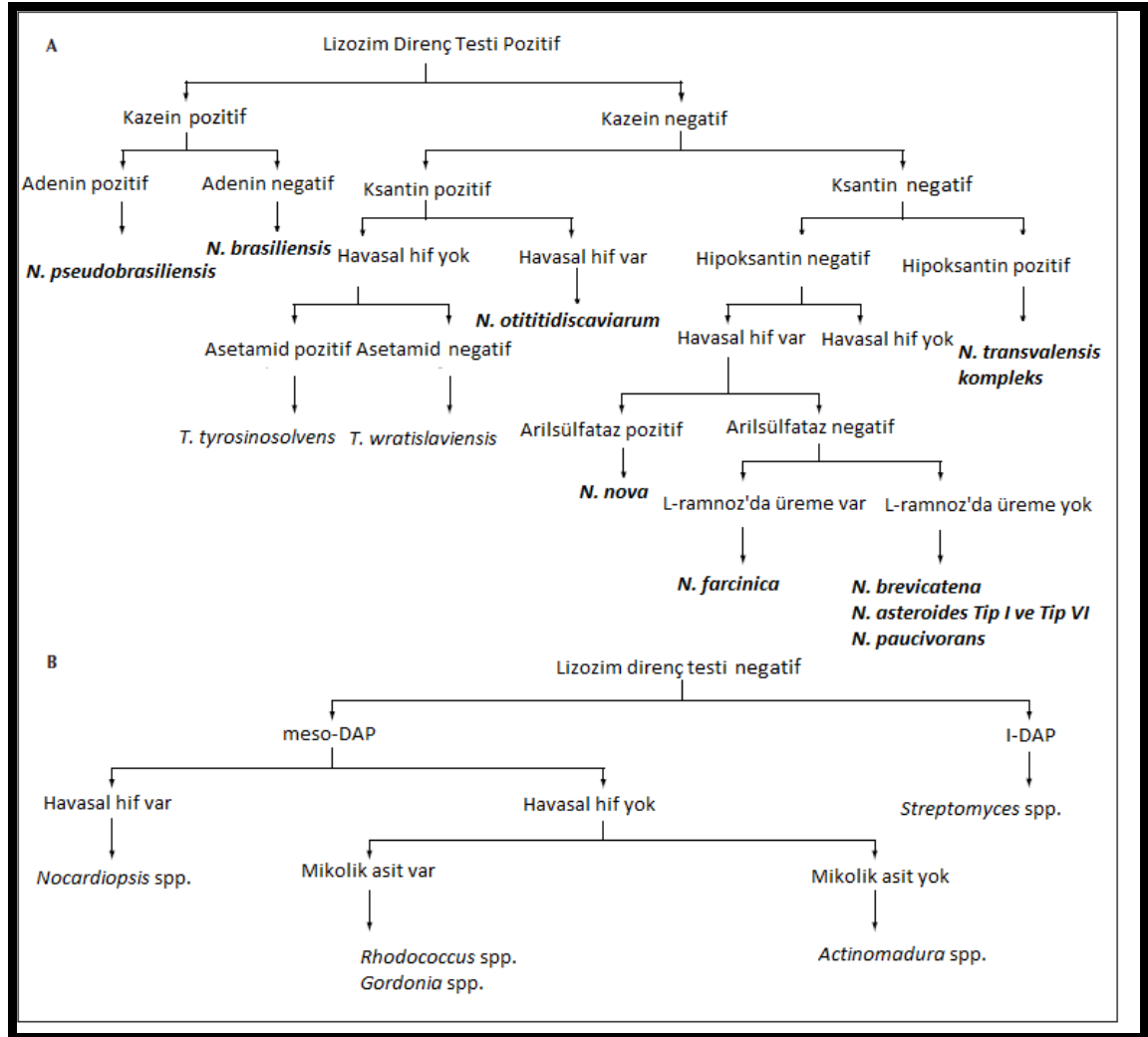
2.7.2. Kültür

Nocardia türleri rutin laboratuvarlarda kullanılan pek çok selektif olmayan besiyerlerinde üreyebilmektedir. Florası olan bölgelerden alınan örnekler için, Thayer-Martin agar, parafin agar veya polimiksin B, anisomisin ve vankomisin içeren selektif “buffered charcoal yeast extract” (BCYE) agar gibi seçici besiyerleri kullanılmaktadır (52, 54, 55). Klinik örneklerden *Nocardia* türlerinin izolasyonu için homojenizasyon, dekontaminasyon işlemi canlı bakteri sayısını ve izolasyon şansını azaltması nedeniyle önerilmemektedir (56, 57).

2.7.3. Biyokimyasal Tanımlama

Nocardia türlerinin diğer aerob *Actinomycetes* türlerinden ayırımında lizozim direnç testi kullanılmaktadır. Lizozim direncinin pozitif ve negatif olma durumuna göre ek biyokimyasal testler yapılmaktadır (5) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Aerob *Actinomycetes* ve ilişkili cinslerin biyokimyasal testlere göre tanımlanması



Nocardia türleri biyokimyasal olarak adenin, kazein, tirozin, ksantin ve hipoksantin, 45°C'de üreme, ramnozdan asit oluşturma gibi testlerle ayırt edilmektedir (5, 58) Tip II İDP içinde yer alan *N. brevicatena* ve *N. paucivorans* ksantin, tirozin, kazein ve hipoksantin negatif olmalarıyla diğer *Nocardia* türlerinden ayrılabilir. *N. brevicatena* *N. paucivorans*'tan izoamil alkol ve 1, 2 propanediol pozitif oluşuyla ayrılmaktadır (59). Tip VI İDP grubu ile biyokimyasal özellikler, antibiyotik duyarlılık sonuçları ve moleküler testler açısından büyük benzerlik gösteren *N. cyriacigeorgica* sitrat, ramnoz ve asetamid kullanımında değişkenlik göstermektedir. *N. farcinica* diğer türlerden 45°C'de üreme, asetamid hidrolizi, L-ramnoz'dan asit üretimi ile ayrılabilir, fakat *N. asteroides* Tip VI

İDP'ye ait bazı türler de bu testlerde pozitif sonuç verebilmektedir. *N. farcinica*'nın Middlebrook agarı opaklaştırma yeteneği, *N. asteroides* suşlarından ayırimda kolaylık sağlayabilmektedir (60). *N.nova* kompleksinde genel olarak aril sülfataz testinin (2 haftalık) pozitif ve L-ramnoz testinin negatif olması, bu türü *N.farcinica* ve *N.asteroides* Tip VI İDP'den ayırabilmektedir (61). *N.brasiliensis* ve *N.pseudobrasiliensis*'in jelatini eritme veya hidroliz etme özellikleri, diğer *Nocardia* türlerinden ayırım sağlayan en önemli özellikleridir (19). (Tablo 2.2)

Tablo 2.2. *Nocardia* türlerinin biyokimyasal özellikleri (kısaltmalar D=değişken , TE= Test edilmedi)

Özellikler	<i>N. asteroides</i>										<i>N. transvalensis</i> kompleksi													
	<i>N. sensu stricto</i>		<i>N. brasiliensis</i> kompleksi		<i>N. brevicatena</i> kompleksi		<i>N. farcinica</i>		<i>N. nova</i>		<i>N. otitidis</i>		<i>N. parvovirans</i>		<i>N. pseudobrasiensis</i>		<i>N. asteroides</i> tip IV		<i>Sensu stricto</i>		Yeni grup 1		Yeni grup 2	
	Tip I	Tip VI																						
Adenin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazein	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskülin	TE	TE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hipoksantin	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tirozin	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksantin	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tek karbon kaynağı kullanımı																								
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İ-eritritol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glukoz	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İ-nyo-İnozitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Ramnoz	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehaloz	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C'de üreme	D	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizozim direnç testi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asetamid hidrolizi	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arisülfataz üretimi	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

☘ “Sensu stricto“ “kesin anlamda“ demektir. “N. asteroides sensu stricto“ suşları, moleküler yöntemler kullanılarak N. asteroides standart suşuyla (ATCC 19247) benzer olduğu bulunan suşlardır.

Son yıllarda giderek artan yeni türlerin eklenmesi ve çoğu türlerin non-reaktif olmaları nedeniyle biyokimyasal testlerin tek başına güvenilir olmadığı anlaşılmıştır (5).

2.7.4. Moleküler Yöntemler

Günümüzde *Nocardia* türlerinin doğru ve kesin tanısında moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Tanımlamada kullanılan moleküler testler: polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), restriksiyon enzim analizi (REA), DNA dizi analizi ve ribotiplendirme yöntemleridir (18).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu: PZR tek başına veya diğer moleküler yöntemlerle kombine geliştirilmiş, kullanımda olan ilk yöntemlerden birisidir. Laurent ve arkadaşları *Nocardia* türlerine özgül primerler kullanmak suretiyle *Actinomycetes* grubundan ayırım için bir PZR yöntemi tanımlamışlardır (62).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Restriksiyon Enzim Analizi: REA yönteminde PZR ile amplifiye edilen hsp65 ve 16S rRNA gen bölgeleri restriksiyon enzimleriyle kesilerek agaroz jelde yürütülmektedir. Bu yöntemle *Nocardia* türlerinin tür ayırımına gidilebilmektedir (5).

DNA dizi analizi: *Nocardia* türlerinin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan en ileri yöntemlerden birisidir. 16S rRNA geni tür tanımlamasında en sık kullanılan gen bölgesidir. Bu gen bölgesinin 500 baz çifti içeren kısmının sekanslaması pek çok *Nocardia* türünün tanımlanmasında yeterli olmaktadır. Yeterli tanımlamanın yapılamadığı durumlarda 500 baz çifti yerine 900 baz çifti kullanılması önerilmektedir. En sık kullanılan 16S rRNA gen bölgesi dışında ayrıca *Nocardia* türlerinin tanımlanması için 65-kD ısı şok proteini (Hsp 65) ve sekretuar protein kodlayan secA1 genlerinin de kullanılabileceği bildirilmektedir (5).

Ribotiplendirme: Ribotiplendirme yöntemi kullanılarak *Nocardia* türlerinin tanımlanmasına yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu yöntem DNA saflaştırma, restriksiyon endonükleaz enzimleriyle bu DNA'nın kesimi, elektroforez ve Southern Blot aşamalarından oluşmaktadır (63). McNeil ve arkadaşlarının (64) yaptıkları çalışmada fenotipik yöntemlerle tanımlanmış *N. farcinica* suşunun,

ribotiplendirme sonucunun bilinen bir *N. farcinica* suşu ile benzer, *N. nova* ve *N. asteroides* olduğu bilinen suşlardan farklı olduğu gösterilmiştir (64).

2.7.5. Antibiyotik Duyarlılığı

Actinomycetes ve *Nocardia* türlerinin antimikrobiyal duyarlılık testleri için 2003 yılında yayınlanan Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kılavuzunda altın standart yöntem olarak, katyon eklenmiş Mueller-Hinton sıvı besiyeri içinde 2 kat seri dilüsyon yapılmış antimikrobiyallerin kullanıldığı sıvı mikrodilüsyon yöntemi kabul edilmiştir. Bu kılavuza göre duyarlılık testi için kullanılacak antimikrobiyal ajanlar: amikasin, amoksisilin-klavulanik asit, seftriakson, siprofloksasin, klaritromisin, imipenem, linezolid, minosiklin, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX) ve tobramisin olarak belirlenmiştir. İn vitro duyarlılık testlerinde ikincil olarak önerilen antimikrobiyal ajanlar ise sefepim, sefotaksim, doksisisiklin, gentamisin, gatifloksasin ve moksifloksasin olarak gösterilmiştir (65).

Nocardia türlerinin in vitro duyarlılığında sıvı mikrodilüsyon yönteminde bazı zorlukların olduğu vurgulanmaktadır. Örneğin *N.nova* kompleksi içindeki bazı suşlar zayıf üreme göstermekte, bazı suşlar 5 gün inkübasyon sonrasında bile üreyememektedir. Bu durumda daha yoğun bir inokulum hazırlanarak, tekrar inokülasyon yapılması gerektiği belirtilmektedir (5). Sıvı mikrodilüsyon yöntemi dışında, E-test ve disk difüzyon yöntemleri de kullanılmaktadır. Biehle ve arkadaşları (66) yaptıkları çalışmada, inokulum standardizasyonu ve 72 saat inkübasyon sonrası dikkatli bir değerlendirme ile E-test'in de iyi bir alternatif olabileceğini göstermişlerdir (66).

2.7.6. Serolojik Tanı

Nokardiya enfeksiyonlarında serolojik testlerin tanı değeri yoktur. Bu konuda daha çok *N. asteroides* veya *N. brasiliensis* antijenlerine yönelik testler denenmiş, ancak özgül olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçların özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde kullanımının tanıda yetersiz olabileceği sonucuna varılmıştır (67, 68).

İmmün sistemi baskılanmış hasta serumlarında kompleman fiksasyon testleriyle antikor saptanabilmiş ancak bunun yanında nonspesifik sonuçlar da alınmıştır. Immunoblot ve Enzim Temelli Katı Faz Yöntemi (Enzyme-Linked Immunoabsorbant assay-ELISA) ile yapılan çalışmalarda, yüksek molekül ağırlıklı proteinlere özgül antikorların *Nocardia* ve *Actinomadura* türlerinde ortak olduğu gösterilmiştir (69, 70, 71). Fare modellerinin kullanıldığı serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün optimizasyonu için çoklu antijenlerin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (72).

2.8. Tedavi

1940 yılında sülfonamidlerin tedavide kullanıma başlamasıyla nokardiya enfeksiyonları başarı ile tedavi edilmiş, ancak serebral ya da yaygın nokardiyoz ve immünsüpresyon gibi ağır klinik durumlarda tedavi yetersiz kalmıştır (73). Bu gibi durumlarda amikasin-imipenem kombinasyonları önerilmektedir. Sülfonamid, amikasin ve karbapenem veya 3.kuşak sefalosporin içeren üçlü ilaç kombinasyonları yüksek riskli hastaların tedavisinde kullanılmaktadır (20).

Sülfonamidlerin tedavideki kullanımı, izole edilen *Nocardia* türlerine göre değişmektedir. Yapılan çalışmalar, sülfonamidlerin *N. brasiliensis* ve *N.transvalensis* türlerine etkili olurken in vitro ortamda *N. otitidiscaviarum*'a daha az etkili olduğu gösterilmiştir. *N. farcinica*'nın ise sülfonamidlere yanıtı yetersizdir (20).

Sülfonamidler dışında in vitro ve hayvan modellerinde en çok amikasin ve imipenem ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. İn vitro deneylerde amikasin, *N.transvalensis* dışında diğer tüm *Nocardia* türlerine etkili bulunurken, imipenemin *N.transvalensis* ve bir çalışmada saptanan *N.farcinica*'da saptanan imipenem direnci (% 10) dışında, diğer türlere etkili olduğu gösterilmiştir (74).

Meropenemin imipeneme benzer farmakokinetik profil göstermesi, serebral nokardiyoz varlığında imipeneme göre beyin omurilik sıvısına geçişinin daha iyi olması ve daha az yan etkiye neden olması, iyi bir seçenek oluşturmasını sağlamaktadır. Meropenemin in vitro çalışmalarda hemen hemen tüm *Nocardia* türlerine etkili olduğu gösterilmiştir (75).

Günümüzde *Nocardia* tedavisinde kullanılabilen en yeni antimikrobialardan birisi oksazolidinon grubunda yer alan linezolidin BOS'a geçişinin iyi olduğu ve TMP-SMX'in iyi tolere edilemediği hastalarda kullanılabileceği gösterilmiştir (76, 77). Bunun yanında linezolid ile uzun süreli tedavilerde hematolojik toksisite, laktik asidoz, periferik nöropati gelişebilmesi nedeniyle tedavinin sonlandırılması gerekebileceği belirtilmektedir (76).

Zayıf tedavi edici etkisine rağmen minosiklin ve amoksisilin-klavulonat, oral tedavide sulfonamidlere alternatif olarak diğer ajanlarla kombine olarak kullanılmaktadır (78, 79). Florokinolonların ve makrolidlerin in vitro aktivitesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (20).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Suşlar

Çalışmaya 1 Ocak 2002- 31 Aralık 2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen *Nocardia* suşları alındı. Klinik örnekler kanlı besiyerine (oxid, UK) ekildi, 37°C 'lik inkübatörde 3-5 gün inkübasyon sonucu değerlendirilmeye alındı. İzole edilen bakterilere Gram boyama ve modifiye Kinyoun boyama yapıldı. Gram boyamada gram pozitif dallanan basillerin ve modifiye Kinyoun boyamada aside dirençli bakterilerin görülmesi durumunda *Nocardia* cinsi olabileceği düşünülerek izolatlar çalışma için -80°C'de stoklandı. Çalışmaya 45 *Nocardia* suşu alındı. Bir hastaya ait birden fazla izolat olduğunda tek bir izolat olarak kabul edildi.

3.2. Biyokimyasal Testler

Çalışmaya alınan *Nocardia* suşlarının biyokimyasal özellikleri değerlendirilmeden önce tüm suşlar -80°C'lik soğuk dondurucudan çıkarıldı, oda ısısında erimeleri sağlandıktan sonra konvansiyonel olarak hazırlanmış kanlı agara ekildi. Beş gün 37 °C'lik etüvde inkübasyon sonucu saf olup olmadıkları kontrol edildi. Testlere alınacak *Nocardia* suşlarının en az iki kere pasajları yapıldı.

Nocardia türlerinin tanımlanması için "Clinical Microbiology Procedures Handbook" 'ta belirtilen tanımlama şemaları temel alındı ve *Nocardia* türlerini diğer aerob *Actinomycetes* türlerinden ayırmak için lizozim direncine bakıldı (Tablo 3.1) (80). Bu amaçla ticari lizozim sıvı besiyeri (Remel, Lenexa, Kansas) kullanıldı; lizozim kontrol sıvı besiyeri ise konvansiyonel olarak hazırlandı.

3.2.1. Lizozim Direnç Testi

Lizozim/lizozim kontrol sıvı besiyerlerine, önceden kanlı agarda üretilmiş *Nocardia* kolonilerinden birkaç koloni alınarak ekim yapıldıktan sonra 25-30 °C'de 7 güne kadar veya lizozim kontrol besiyerinde iyi üreme görülünceye kadar inkübasyona bırakıldı. Kontrol sıvı besiyerinde iyi üreme gözlenirken, lizozim sıvı besiyerinde zayıf üreme görülmesi veya hiç üremenin olmaması durumunda lizozime

duyarlı veya negatif sonuç olarak kabul edildi. Her iki besiyerinde iyi üreme varlığında lizozime dirençli veya pozitif sonuç olarak kabul edildi.

3.2.2. Kazein, Ksantin, Hipoksantin, Tirozin ve Nişasta Hidrolizi:

Lizozim testi sonrası kazein, ksantin, tirozin ve nişasta hidroliz özelliğini değerlendirmek için kazein, ksantin, tirozin ve nişasta besiyerlerini içeren *Nocardia* Quad (Remel, Lenexa, Kansas) ticari ve hipoksantin konvansiyonel besiyeri kullanıldı. Pozitif kontrol olarak *Nocardia* DSM 44484 kullanıldı.

Test edilecek *Nocardia* türleri, taze besiyerinden yoğun bir inokulum alınarak en az 10 mm'lik bir alana ekim yapıldı. Ekim sonrası kurumunun engellenmesi amacıyla besiyerlerinin kenarları parafilm ile sarıldı. Besiyerleri 37°C'de 2-3 hafta inkübe edildi. Her 3-4 günde bir kazein, ksantin, tirozin ve hipoksantin besiyerlerinde üreyen koloni etrafında veya koloni altında hidroliz varlığı araştırıldı. Hidroliz yapan koloniler pozitif olarak kabul edildi. Nişasta hidrolizi testi için, üreme sonrası besiyeri yüzeyini hafif derece kaplayacak şekilde lugol solüsyonu eklendi. Üreyen koloniler etrafında renk olmaması pozitif, mor renk varlığı ise negatif olarak değerlendirildi (Tablo-2).

3.2.3. Arilsülfataz Varlığı

Hızlı üreyen mikobakterilerin, *Nocardia asteroides* kompleks ve *N. nova* türlerinin ayırımı için ticari arilsülfataz sıvı besiyeri (Remel, Lenexa, Kansas) kullanıldı.

Nocardia suşları Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde 37°C'de 7 güne kadar inkübe edildi, bu süspansiyondan 1'er damla alınarak arilsülfataz sıvı besiyeri içeren tüplere konuldu. 37°C'de en az 72 saat inkübasyon sonrası, 6 damla sodyum karbonat solüsyonu tüplere dağıtıldı. Bu aşama sonrası; 30 dakika sonunda besiyerinde pembe renk oluşumu pozitif sonuç, renk oluşumunun gerçekleşmemesi ise negatif sonuç olarak kaydedildi. Pozitif kontrol olarak *Mycobacterium fortuitum* olduğu doğrulanmış klinik izolat kullanıldı.

3.2.4. Karbonhidrat Kullanımı (L-ramnoz)

Kanlı agarda üretilen *Nocardia* suşlarından konvansiyonel olarak hazırlanmış olan L-ramnoz içeren besiyerine ekim yapıldı (80). 21 güne kadar 37°C'de inkübasyona bırakıldı her 3-4 günde bir üreme ve renk değişimi kontrolü yapıldı. Bu süre içinde besiyerinin mor renkten sarı renge dönüşümü pozitif, herhangi bir renk değişimi olmaması ise negatif olarak kaydedildi.

3.2.5. 45°C'de Üreme

Bakteri kanlı agara ekildikten sonra 45°C'de 10 gün inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kanlı agarda üreme olması pozitif sonuç, üremenin olmaması negatif sonuç olarak değerlendirildi.

3.3. Moleküler testler

3.3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, spin-kolon yöntemi ile manuel olarak yapıldı. Bu amaçla ticari QIAamp DNA Mini Kit'leri (250) (QIAGEN, Almanya) kullanıldı. Bu şekilde nükleik asitler santrifüj ile bir membran filtreye tutturularak saflaştırılmış oldu. Mikobakteriyel DNA'ların izolasyonu için kite ilave olarak aşağıdaki solüsyonlar ve maddeler kullanıldı.

AL	tamponu	200 µl
ATL	tamponu	180 µl
AW1	tamponu	500 µl
AW2	tamponu	500 µl
AE	tamponu	200 µl
Proteinaz K		40 µl

İzolasyon Basamakları:

1. DNA izolasyonu yapılacak bakteri kültüründen PBS içerisinde 10^8 - 10^9 /ml bakteri olacak şekilde bakteri süspansiyonu 1.5 ml'lik nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı.
2. Bakteri süspansiyonu, 10 dk 5,000 g'de (7500 rpm) santrifüj edildi.
3. Pelet kısmı üzerine 180 µl lizozim solüsyonu (20 mg/ml lizozim;20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; %1.2 triton) eklenerek 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Lizozim tam hücre lizisine neden olarak DNA'nın serbest kalmasına neden oldu.
4. 180 µl "AL Buffer" ve 20 µl proteinaz K eklenerek vortekslendi. Böylelikle izolasyon havuzu oluşturulmuş oldu. Önce 56°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
5. 200 µl etanol (%96) örnek üzerine eklenerek 15 sn karıştırıldı.
6. Karışımın tamamı filtre tüpüne (QIAamp Mini spin kolon) aktarıldı ve 1 dk boyunca 6,000 g (8000 rpm)'de santrifüj edildi. Bu aşamada DNA, membran filtreye bağlanmış oldu.
7. İnhibitör maddeleri uzaklaştırmak için "AW1"den 500 µl eklendi. 1 dk boyunca 6,000 g (8000 rpm)'de santrifüj edildi.
8. Bağlanmamış diğer hücresel yapıları uzaklaştırmak için "AW2"den 500 µl eklendi. 3 dk boyunca 20,000 g (14000 rpm)'de santrifüj edildi. Bu yıkama basamağı iki kez tekrar edildi.
9. Filtrede kalan alkolü uzaklaştırmak için, filtre üzerine hiçbir madde eklenmeden boş filtre 10 sn. son hızda santrifüj edildi.
10. Saflaşmış DNA'ları bağlı buldukları filtreden sökebilmek için filtre üzerine 200 µl "AE" eklendi. Oda ısısında 1 dk tutulduktan sonra 1 dk 6,000 g (8000 rpm)'de santrifüj edildi ve DNA saf olarak elde edildi. Bu şekilde izole edilen 200 µl bakteri DNA'ları hemen kullanılmayacaksa -20°C'ye kaldırıldı.

3.3.2. PZR ve DNA Dizi Analizi

Ekstraksiyonu gerçekleştirilen 45 izolatın DNA'ları moleküler tiplendirmede altın standart olan DNA dizi analizi ile değerlendirildi. DNA dizi analizi için “zincir sonlandırma yöntemi” ile çalışılan “Bigdye Terminator Cycle Sequencing 3.1” kiti (Applied Biosystems, ABD) kullanıldı. Kullanılan suşların 16S rDNA operonu PZR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra, kalıp olarak kullanıldı; PZR’da kullanılan primerler ile sekans PZR işlemi firmanın önerilerine göre gerçekleştirildi.

3.3.2.1. PZR

16S rRNA dizi analizi için PZR karışımı (1X):

DW	12,2 µL
x10 PZR Tamponu	2,5 µL
MgCl ₂ (25 Mm)	2,5 µL
dNTP (10 mM EACH)	0,5 µL
Primer F (10 pmol)	1 µL
Primer R (10 pmol)	1 µL
Taq Polimeraz	0,3 µL
DNA (25 ng/uL)	5 µL
Toplam	25 µL

Elde edilen bu PZR karışımından 0,2 ml’lik tüplere 20 µl, bakteri DNA’sından da 5 µl dağıtılarak termal döngü cihazına (Thermo Scientific, İngiltere) yerleştirildi. Termal döngü cihazında sıcaklıklar şu şekilde ayarlandı:

Ön denatürasyon:	94 ⁰ C’de 4 dk
Amplifikasyon: (35 döngü)	94 ⁰ C’de 30 sn denatürasyon 58 ⁰ C’de 30 sn bağlanma 72 ⁰ C’de 60 sn polimerizasyon
Son Uzama:	72 ⁰ C’de 6 dk

İzolatların 16S rDNA dizi analizi öncesi kalıp oluşturması için 16S rRNA’ya özgü universal primerler (357F; CTC CTA CGG GAG GCA GCA G ve 1492R;

GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) kullanılarak 16S rDNA'nın 1135 bp'lik bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı.

Agaroz Jel Elektroforez: Amplifiye edilen 16S rDNA dizileri %1.5'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle yürütüldükten sonra UV altında görüntüledi. Elektroforezde görüntülenen yaklaşık 1100 bp'lik temiz bantlar sekans analizi öncesi saflaştırmak için belirlendi.

PZR ürünlerinin ön saflaştırılması: Sekanslamadan önce elde edilen PZR ürününe, bağlanmamış dNTP'lerin ortamdan uzaklaştırılması için "exosap" enzimiyle saflaştırma yapıldı. Bunun için 5 µl PZR ürününe 2 µl "exosap" enzimi ilave edilerek termal döngü cihazında 37°C'de 30 dk (enzim aktivasyonu ısısı), 80°C'de 15 dk (enzim inaktivasyonu ısısı) tutuldu.

3.3.2.2. 16S rRNA Dizi Analizi

İlk saflaştırmadan sonra kalıp elde etmek için yukarıda anlatılan PZR'da kullanılan primer dizilerinden hem "forward" (ileri) hem de "reverse" (geri) primerler için ayrı ayrı karışımlar hazırlanarak her bir örnek için her bir primer ile iki PZR yapıldı. Bunun için aşağıda belirtilen karışım hazırlanarak aynı termal döngü cihazına yerleştirildi.

BigDye Mix (Applied Biosystems, ABD)	: 2 µl
5x tamponu	: 2 µl
PZR ürünü	: 2 µl
dH ₂ O	: 2 µl
Primer (F veya R) (3.2 pmol)	: 2 µl

Ön denatürasyon	: 96 ⁰ C'de 1 dk
Amplifikasyon (25 döngü)	: 96 ⁰ C'de 10 sn denatürasyon 50 ⁰ C'de 5 sn bağlanma 60 ⁰ C'de 4 dk polimerizasyon

Sekans PZR'in sonunda ortamdaki bağlanmayan ddNTP'leri ortamdan uzaklaştırılmak amacı ile tekrar saflaştırma yapıldı. Bunun için:

1. 1 gr sefadeks (toz halde) 13 ml nükleaz içermeyen distile su içerisinde süspansiyon edildi. İyice çalkanan ve çözdürülen sefadeks jelöz kıvam aldı.
2. Süspansiyon sefadeks'ten 750 µl kolonların içerisine konuldu. Kolonlar 4600 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Jelin içerisindeki sıvı koleksiyon tüpüne birikti. İçerisinde katılaşmış jel kalan kolon koleksiyon tüpünün içerisine yerleştirildi.
3. Elde edilen sekans PZR ürününün tamamı (10 µl) kolonun içerisindeki katı jelin ortasına, pipet ucu değdirilmeden dikkatlice bırakıldı.
4. 4800 g'de 2 dk santrifüj yapıldı.
5. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı (10 µl) sekanslamada kullanılacak olan örnek olarak elde edildi. Bu sıvının tamamı ABI 3130 (Applied Biosystems, ABD) sekans cihazında dizi analizi ile değerlendirildi. Sonuçlar sekans analiz yazılımına (Sequence Analysis 5.3) göre değerlendirildi. Böylelikle sekanslanan her bir örnek ile, 16S rDNA dizileri saptandı ve elde edilen diziler "GenBank" veritabanında bulunan referans diziler ile BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı.

3.3.3. Ribotiplendirme

Nocardia suşlarının ribotiplendirilmesinde RiboPrinter® Microbial Characterization System(Dupont, USA) kullanıldı. Bu sistem otomatik olarak başlamakta, ilk olarak seçilen EcoRI restriksiyon enzimiyle total genomik DNA daha küçük fragmanlara parçalanmaktadır. Bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrılmaktadır. Fragmanlar jelden membrana transfer edilmekte ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine özgül işaretlenmiş evrensel bir proba hibridizasyona tabi tutulmaktadır. Hibridizasyondan sonra fragmanları göstermek için problemlerin hibridize olduğu yerde kimyasal bir ışıldama olmakta, bu ışıldamayı dijital kamera yakalamakta ve bilgisayar ortamına aktarmaktadır. Görüntüde oluşan bantlara RiboPrint® pattern adı verilmektedir. Bu

patternler Riboprinter® kütüphanesindeki patternlerle karşılaştırılarak değerlendirilmektedir.

Ribotiplendirmede örnek hazırlama :

1. *Nocardia* türlerinin üremesi için uygun besiyeri seçildi.
2. Selüloz nitrat (CN) membrandan (0,45 µm) plak büyüklüğünü geçmeyecek şekilde parça alındı ve seçilen kanlı agar üzerine konuldu.
3. Membran üzerine ekim yapıldı; 35°C’de 24 saat (koloni membran üzerinde üreyene kadar) mikroaerofilik ortamda inkubasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası saf olan koloniler membran üzerinden toplanarak bir ependorf tüpüne alındı.
5. Kültür üzerine 200µl örnek tamponu eklendi.
6. Örnek vorteks ile iyice karıştırıldı.
7. Bu karışımdan 30µl örnek taşıyıcısına aktarıldı.
8. Örnek taşıyıcısı ısı muamelesi için ısı bloğu cihazına alındı.

Örnekler ısı bloğu cihazından alındıktan sonra otomatize sistemin başlatılması için cihaz üzerindeki kuyucuklara sırasıyla, örnek taşıyıcısı, EcoRI enzimini taşıyan kartuş, jel kaseti, membran ve “membrane processing base” (prob, substrat, konjugat, bloklama tamponu, deney tamponu, denatüran, post-hibridizasyon yıkama solüsyonu, post - konjugat yıkama solüsyonu ve pürifiye su) yerleştirildi.

3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Nocardia türlerinin antibiyotik duyarlılık testi için CLSI M24 A2 (2011) protokolünde belirtilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulandı (81). Bu amaçla öncelikle antibiyotik stok solüsyonları uygun seyreltici ve çözücüler kullanılarak son konsantrasyondan 4 kat fazla olacak şekilde hazırlandı ve -80°C’de stoklandı.

Çalışma günü çalışılacak antibiyotik stok solüsyonu çözülerek, steril tüplerde Mueller Hinton sıvı besiyeri içinde 2 kat seri dilüsyonları yapıldı ve her bir tüpten 50 µl alınarak U tabanlı mikropalak çukurlarına konuldu.

Antibiyotik duyarlılığı çalışılacak suşların, kanlı agarda taze kültürü hazırlandı. *Nocardia* kolonileri steril su içinde bulunan cam boncuklar ile parçalandı. Daha sonra 0.5 Mc Farland (0.5×10^8 cfu/ml) yoğunluğunda süspansiyon hazırlandı. Son konsantrasyon 0.5×10^6 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 değerleri (MİK) okunarak kaydedildi.

Mikrodilüsyon yöntemine ek olarak, disk difüzyon yöntemi ile *Nocardia* türlerinin direnç sınır değerlerine bakıldı. Bu yöntemde 5 gün 37°C 'de inkübe edilmiş olan *Nocardia* kolonilerinden 0.5 Mc Farland standardına uygun süspansiyonlar hazırlandıktan sonra 150 mm'lik Mueller Hinton katı besiyerlerine ekimler yapıldı. Besiyerleri kuruduktan sonra amikasin (30µg), siprofloksasin (5 µg), trimetoprim sulfametoksazol (23.75 µg), seftriakson (30µg) ve linezolid (30µg) antibiyotik diskleri konularak 3-5 gün 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Bu süre sonunda zon çapları ölçülerek CLSI direnç sınır değerlerine göre değerlendirildi (82).

3.5. İstatistiksel Değerlendirme:

Mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri arasındaki uyumun ölçülmesinde Kappa istatistik yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde sonuçlar aşağıda belirtildiği sınırlar çerçevesinde yorumlandı.

<0 ise uyum yok

0-0.20 ise uyum yok 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 veya mükemmel uyum

4. BULGULAR

4.1. Hastalar ve suşlar

Çalışmaya 2002 – 2011 yıllar arasında H.Ü.T.F Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen örneklerden izole edilen 45 hastaya ait 45 *Nocardia* suşu alınmıştır. Hastaların 29'u erkek, 16'sı kadın olup her iki cinsiyette yaş dağılımı 20-60 yaş arasında değişmektedir. *Nocardia* türleri üreyen hasta örneklerinin dağılımı incelendiğinde solunum yolu örnekleri (% 37.7) en sık izolasyonun yapıldığı klinik örnek olarak saptanmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. İzole Edilen *Nocardia* suşlarının örnek türlerine göre dağılımı

Örnek Türü	Suş sayısı, n(%)
Solunum yolu örnekleri	17 (37.77)
• Balgam	11 (24.44)
• BAL	6 (13.33)
Beyin apsisi	8 (17.77)
Püy	7 (15.55)
Deri	3 (6.66)
Konjonktiva	3 (6.66)
Toransentez	2 (4.44)
Kan	2 (4.44)
Doku	2 (4.44)
BOS	1 (2.22)

4.2. Biyokimyasal Test Sonuçları

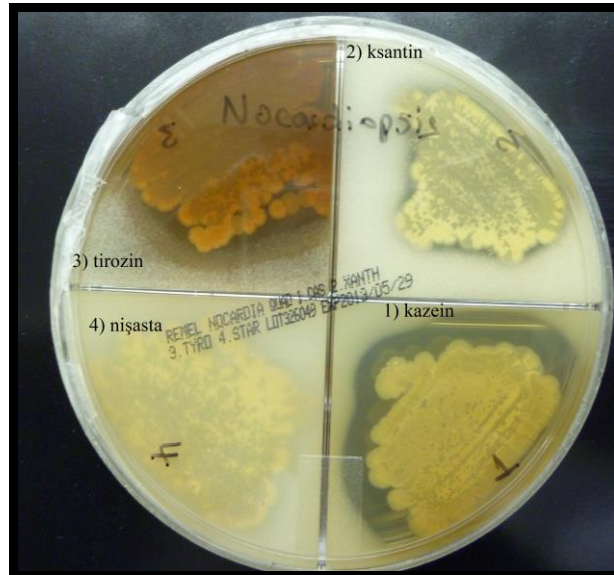
Çalışmaya alınan 45 *Nocardia* suşunun biyokimyasal test sonuçları *Nocardia* türlerinin biyokimyasal testlere göre tanımlanmasında kullanılan şema göz önüne alınarak değerlendirildiğinde; 45 suşun hepsinde lizozim direnç testi pozitif olarak bulunmuştur. Bunu izleyen kazein, ksantin, hipoksantin ve arilsüfataz testleri negatif bulunan suşlardan, L-ramnoz kullanım sonucu pozitif olan 12 suş *N. farcinica* olarak, negatif olanlar ise *N. brevicatena*, *N. paucivorans*, *N.asteroides* Tip I veya Tip 6 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1-4.4). Kazein testi negatif, ksantin ve hipoksantin testi pozitif olan 4 suş havasal hif içermesi (kadifemsi koloniler) nedeniyle *N. otitidiscaviarum* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.4) (Şekil 4.5-4.7).

Tablo 4.4. *Nocardia* suşlarının biyokimyasal test sonuçlarına göre tür dağılımı

<i>Nocardia</i> türleri	Sayı
<i>N. brevicatena</i> <i>N. asteroides</i> Tip I ve Tip VI <i>N. paucivorans</i>	29 (64.4)
<i>N. farcinica</i>	12 (26.6)
<i>N. otitidiscaviarum</i>	4 (8.88)
Toplam	45



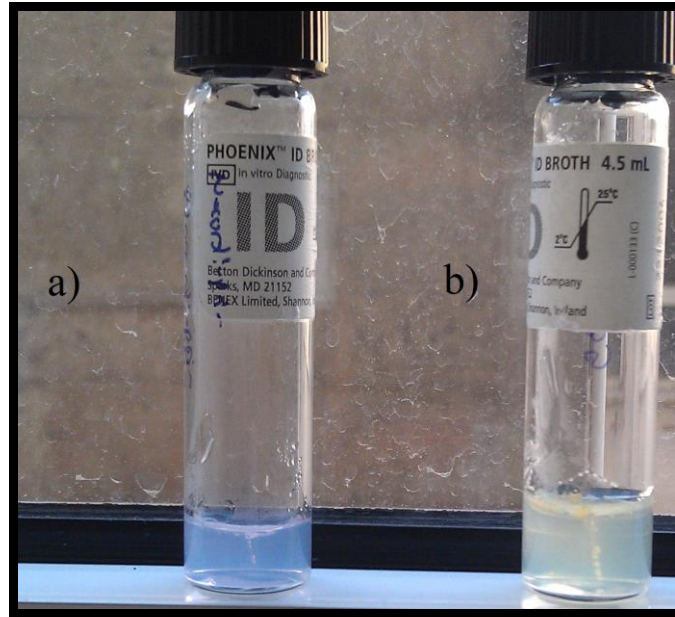
Şekil 4.1. a) Arilsülfataz pozitif *M. fortuitum*
b) Arilsülfataz negatif *Nocardia spp.*



Şekil 4.2. Kazein, ksantin, tirozin hidrolizi pozitif *Nocardiosis spp.*



Şekil 4.3. Kazein, ksantin, tirozin ve nişasta hidrolizi negatif *N. farcinica*.



Şekil 4.4. a) Ramnoz testi negatif b) Ramnoz testi pozitif



Şekil 4.5. Ksantin hidrolizi pozitif *N. otitidiscaviarum*



Şekil 4.6. Hipoksantin hidrolizi pozitif kontrol suş



Şekil 4.7. Hipoksantin hidrolizi pozitif *N. otitidiscalearum*

4.3. Moleküler Tanı

4.3.1. DNA dizi analizi

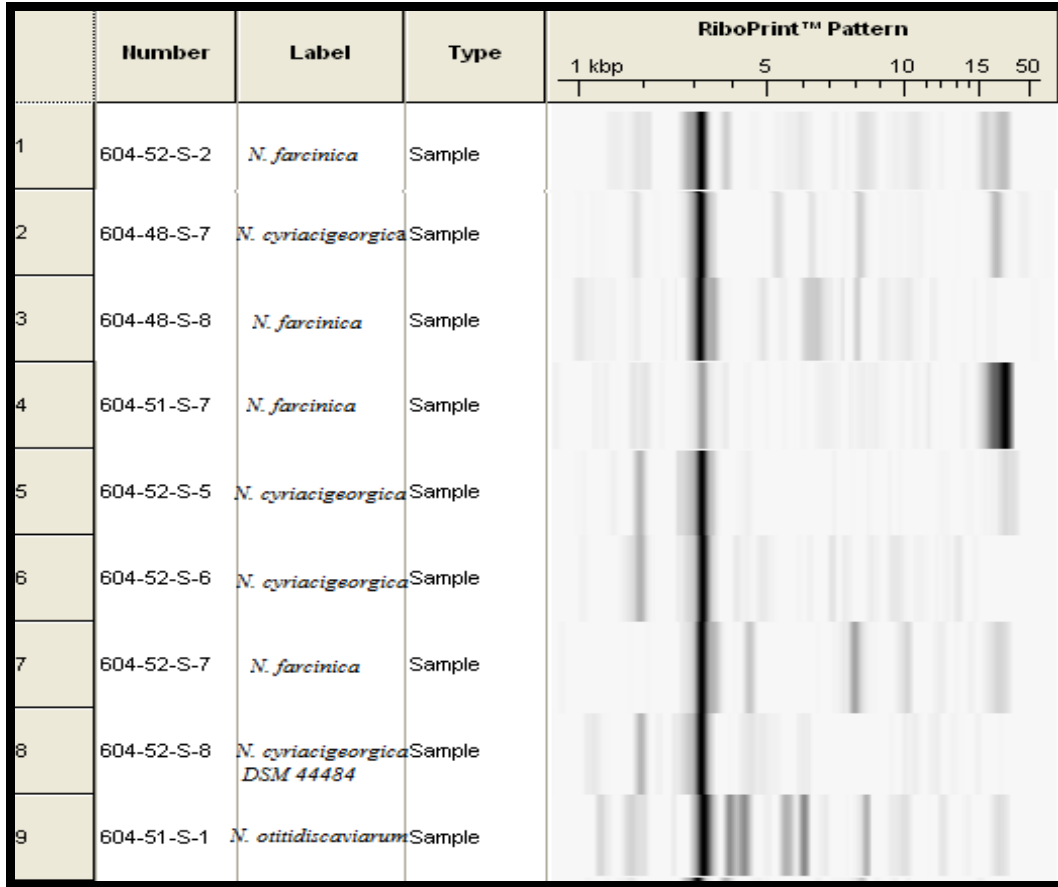
Çalışmaya alınan *Nocardia* türlerinin DNA dizi analizi sonucu en sık *N. cyriacigeorgica* (n:26, % 57.7) izole edilmiş, bunu *N. farcinica* (n:12, % 26.6) ve *N. otitidiscaviarum* (n:4, % 8.8) izlemiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *Nocardia* suşlarının DNA dizi analizine ne göre tür dağılımı

<i>Nocardia</i> türleri	Sayı (%)
<i>N. cyriacigeorgica</i>	26 (57.7)
<i>N. farcinica</i>	12 (26.6)
<i>N. otitidiscaviarum</i>	4 (8.8)
<i>N. asteroides</i>	2 (4.4)
<i>N. abscessus</i>	1 (2.2)
Toplam	45

4.3.2. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme yöntemi sonucu tüm *Nocardia* suşlarında 3.2 kb bant büyüklüğü görülmüştür. *N. cyriacigeorgica* suşları ise çok fazla polimorfizm göstermesine rağmen bu suşlarda ortak olarak 2 kb 'lık bant bulunmuştur. Bunun yanında *N. farcinica* suşlarının yüksek derecede farklı bant profillerine sahip olduğu görülmüştür. *N. otitidiscaviarum*'da sadece 2, 3.6 ve 8.3 kb'lık, *N. abscessus* suşlarında ise ayırıcı olarak 3.3, 4.3, 7.7 ve 10 kb'lık bantlar görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Bazı *Nocardia* izolatlarına ait ribotip paternleri

4.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

4.4.1. Mikrodilüsyon Sonuçları

Çalışmaya alınan *Nocardia* suşlarının MİK aralıkları, antimikrobiyal ajanlara direnç durumu, MİK50 ve MİK90 değerleri, direnç yüzdesi Tablo 4.6'da sırasıyla verilmiştir. Amikasin ve linezolid antibiyotiklerine karşı herhangi bir direnç gözlenmemiştir. Trimetoprim-sulfametoksazol, seftriakson ve siprofloksasine direnç sırasıyla %15.5, %37.7 ve %82.2 oranında saptanmıştır. En fazla direnç siprofloksasine karşı görülmüştür. *N. cyriacigeorgica* (n:25,%96.1), 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, % 91.6) türünde gözlemlenmiştir. *N. cyriacigeorgica* ve *N. farcinica* türlerinde trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiğine karşı direnç oranlarının sırasıyla % 7.6 ve % 16.6 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6. *Nocardia* türlerinin MİK sonuçları

	MİK aralığı (µg/ml)	MİK50 (µg/ml)	MİK 90 (µg/ml)	Dirençli suş sayısı n(%)
Amikasin	0.25-128	0.5	0.25	0 (0)
Siprofloksasin	0.125-64	4	16	37 (82.2)
Trimetoprim Sulfametoksazol	0.125/2.375 64/1216	1/19	0.5/9.5	7 (15.5)
Seftriakson	0.5-256	4	>256	17 (37.7)
Linezolid	0.25-128	2	2	0 (0)

4.4.2. Disk difüzyon sonuçları

Nocardia suşlarının disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç sonuçları Tablo 4.7’de verilmiştir. Bu yöntem sonuçlarına göre amikasin ve linezolid antibiyotiklerine karşı direnç gözlenmemiştir. En fazla direnç siprofloksasine karşı görülmüştür. *N. cyriacigeorgica* (n:25,%96.1), tanımlanan türler içinde siprofloksasine en fazla direnç gözlenen tür olmuştur. İkinci sıklıkta ilaç direnci trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiği için belirlenmiş, burada en fazla direnç *N.farcinica* (n:12, % 100) türünde gözlemlenmiştir. *N. farcinica* suşlarında seftriakson direnci % 91.6 (n:11) olup, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile de aynı sonuca ulaşılmıştır.

Tablo 4.7. *Nocardia* türlerinin disk difüzyon testi sonuçları

	Suş sayısı	Amikasin Eşik değerleri(mm) S(>15) I(13-14)R(<12)			Siprofloksasin Eşik değerleri(mm) S(>21) I(16-20) R(<12)			TMP-SMX Eşik değerleri(mm) S(>16) I(11-15)R(<10)			Seftriakson Eşik değerleri(mm) S(>22) I(-)R(<21)			Linezolid Eşik Değerleri(mm) S(>21) I(-)R(<20)		
<i>N. cyriacigeorgica</i>	26	26	0	0	1	0	25	16	3	7	25	0	1	26	0	0
<i>N.farcinica</i>	12	12	0	0	8	0	4	0	0	12	1	0	11	12	0	0
<i>N.otitidiscaviarum</i>	4	4	0	0	2	0	2	2	0	2	1	0	3	4	0	0
<i>N. asteroides</i>	2	2	0	0	1	0	1	2	0	0	2	0	0	2	0	0
<i>N. abscessus</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
TOPLAM	45	45	0	0	12	0	33	20	3	22	30	0	15	45	0	0

Disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile alınan antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 4.8’de birlikte verilmiştir. Bu sonuçlar kullanılarak her iki yöntem arasındaki uyum karşılaştırılmıştır.

Amikasin ve linezolid antibiyotikleri için yöntemler arasındaki uyumu gösteren kappa değeri, $k=1$ olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre, linezolid için yöntemler arasındaki uyumun mükemmel olduğu görülmektedir. Seftriakson için yöntemler arasındaki uyumu gösteren kappa değeri, $k=0.903$ olarak bulunmuş olup, seftriakson için yöntemler arasındaki uyumun çok iyi düzeyde olduğu görülmektedir. Siprofloksasin için yöntemler arasındaki uyumu gösteren $k=0.672$ olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre, siprofloksasin için yöntemler arasındaki uyumun iyi düzeyde olduğu görülmektedir. TMP-SMX için yöntemler arasındaki uyumu gösteren kappa istatistiği, $k=0.092$ olduğu buna göre, TMP-SMX için yöntemler arasında uyum olmadığı görülmektedir (Tablo-8).

Tablo 4. 8. Sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Antibiyotikler	Sıvı mikrodilüsyon yöntemi		Disk difüzyon yöntemi		Kappa değeri
	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	
Amikasin	45 (100)	0 (0)	45 (100)	0 (0)	1
Siprofloksasin	7 (15.5)	38 (84.4)	12 (26.6)	33 (73.3)	0.672
TMP-SMX	38 (84.4)	7 (15.5)	20 (44.4)	25 (55.5)	0.092
Seftriakson	28 (62.2)	17 (37.7)	30 (66.6)	15 (33.3)	0.903
Linezolid	45 (100)	0 (0)	45 (100)	0 (0)	1

5. TARTIŞMA

Doğada yaygın olan *Nocardia* türleri insanlarda ve hayvanlarda lokal ve yaygın enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlar klinik olarak başta akciğer enfeksiyonu olmak üzere kutanöz, sistemik ve organa özgül enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir. *Nocardia* enfeksiyonları akut, subakut veya remisyon ve alevlenmelerle seyreden kronik bir seyir gösterebilir. Klinik olarak şüphelenilen hastalardan alınan örneklerin çoğunluğunu solunum yolu örnekleri (BAL, balgam, bronş yıkama sıvısı) oluşturmaktadır. Bunu cilt biyopsisi, abse, doku ve BOS örnekleri izlemektedir (5, 6). Çalışmamızda *Nocardia* izole ettiğimiz klinik örneklerin çoğunluğunu BAL ve balgam gibi solunum yolu örnekleri (%37.77) temsil etmektedir. Bunu sırasıyla beyin apsesi (%17.77) ve püy örnekleri (% 15.55) izlemiştir.

Laboratuvara gelen şüpheli klinik örneklerin makroskobik ve mikroskobik incelenmesi doğru tanımlama için ilk basamaklardan birini oluşturmaktadır. Klinik örneklerden hazırlanan yaymalarda her zaman çift yayma hazırlanması, yaymalardan birinin Gram boyama, diğerinin ise modifiye Kinyoun boyama yöntemi ile boyanması önerilmektedir (83). Klinik örneklerde Gram boyama sonrası, sıklıkla zeminde bol polimorfonükleer lökositler ile birlikte *Nocardia* türleri ince, dallanan, düzensiz boyanan (boncuklu görünüm) filamentöz mikroorganizmalar şeklinde görülmektedir. Klinik örneklerin *Nocardia* türlerine yönelik mikroskobik incelenmesinde Gram boyama yönteminin en duyarlı boyama yöntemi olduğu belirtilmektedir (6). Modifiye Kinyoun boyama yöntemiyle kısmi aside dirençli boyanabilmektedir. Fakat bu kısmi boyanma, kültürden hazırlanan yaymalarda değişkenlik göstermektedir. Ayrıca kullanılan besiyeri ve kolonilerin yaşı hem modifiye Kinyoun boyama sonucunu etkilemekte, hem de filamentöz görünümdeki bu mikroorganizmaların basil veya kokoid formda fragmanlar şeklinde görülmesine yol açmaktadır (24). Klinik örneklerden hazırlanan yaymalarda tek başına modifiye Kinyoun boyaması önerilmemekte, sadece Gram boyama sonrası, kısmi aside dirençli olup olmadığını doğrulamak amaçlı kullanılması gerektiği belirtilmektedir. Çalışmamızda laboratuvarımıza gelen klinik örneklerden hazırlanan yaymalar da, her iki boyama yöntemiyle boyanıp incelenmiş, kültürleri yapılmış ve çalışma amaçlı

olarak stoklanmıştır. Çalışma için stokları açılan bu suşlar kanlı agara ekilmiş ve inkübasyon sonrası üremelerden hazırlanan yaymalar, Gram boyama ve modifiye Kinyoun boyama yöntemleri ile boyanıp mikroskop altında incelenmiştir. Gram boyama sonucunda bazı suşların gram pozitif dallanan basiller, bazılarının ise gram pozitif kokoid formda olduğu görülmüştür. Modifiye Kinyoun boyama yöntemi sonucunda ise *Nocardia* türlerine özgü kısmi aside dirençli boyanma profili izlenmemiştir. Bu durumun kullanılan besiyerinden (kanlı agar) veya yaymaların klinik örnek yerine kültürden hazırlanmış olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Nocardia türlerinin tanımlanmasında 90'lı yılların ortalarında ve 2000'lerin başında konvansiyonel olarak hazırlanmış testler ve bazı ticari kitler ile biyokimyasal özelliklerine bakılarak tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Biehle ve arkadaşları (84) *Nocardia* türlerinin tanımlanmasına yönelik yaptıkları çalışmada, konvansiyonel testlerin (lizozim, kazein, ksantin, hipoksantin, tirozin vb.) yanında inkübasyon süresinin daha az olması ve hızlı sonuç elde edilmesi nedeniyle 15'in üzerinde kromojenik substrat içeren "Microscan Rapid Anaerobe" ve *Haemophilus-Neisseria* tanımlama sistemleri (Microscan, West Sacramento, California) gibi iki ayrı ticari sistem ile çalışmışlardır. Bu çalışmaya göre konvansiyonel ve enzimatik tanımlama sistemleri arasında iyi bir uyum olduğu ve *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. nova*, *N. brasiliensis* ve *N. otitidiscaviarum* türlerinin tanımlandığı belirtilmiştir (84). Bu çalışmadan bir yıl sonra Muir ve arkadaşları (85) konvansiyonel testler yanında bioMerieux ID32 C maya tanımlama sistemi (bioMerieux, Hazelwood, Missouri) kullanarak 92 *Nocardia* izolatu üzerinde çalışmışlardır. *N. farcinica*, *N. transvalensis* ve *N. asteroides* izolatları arasında asimilasyon sonuçlarının belirgin olduğu, izolatların yarısından fazlasında özgün paternlerin elde edildiği bildirilmiştir (85). Kiska ve arkadaşları (58) 2002 yılında yaptıkları çalışmada, konvansiyonel ve API 20C AUX maya tanımlama sistemi (BioMerieux, Hazelwood, Missouri) ile gentamisin, tobramisin, amikasin ve eritromisin antibiyotik duyarlılık paternlerini yorumlayarak tanısız algoritma oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda 10 ayrı *Nocardia* türünden oluşan 75 *Nocardia* izolatu içerisinde 3-4 gün içerisinde çoğu izolat tanımlanmış, fakat *N. asteroides* tip I (*N. abscessus*) ve *N. asteroides* tip VI (*N. cyriacigeorgica*) ayrımı yapılamamıştır (58). 2005 yılında Wauters ve arkadaşlarının (86) yaptıkları çalışmada, konvansiyonel testler ve bazı suşlar için

yardımcı olması amacıyla API 32C (bioMerieux, Marcy, France) ticari maya tanımlama sistemi kullanılmıştır. Biyokimyasal testler ile oluşturdukları tanısal algoritmaya göre 6 farklı *Nocardia* türü tanımlanmıştır. Fakat sınırlı sayıda türle çalıştıkları için bu algoritmanın taksonomik olarak kullanılamayacağını ve tür düzeyinde tanımlama için moleküler yöntemlerin de gerekli olduğunu vurgulamışlardır (86). Çalışmamızda 45 *Nocardia* izolatına yönelik biyokimyasal testler sonucunda sadece *N. farcinica* (12) ve *N. otitidiscaviarum* (4) türleri tanımlanabilmiştir. Bunun dışında izolatların çoğunluğunun (n:29) *N. brevicatena*, *N. paucivorans* *N. asteroides* Tip I ve Tip VI olabileceği düşünülmüş, fakat kendi aralarında ayırım yapılamamıştır. Bu sonuçlara göre *Nocardia* türlerinin biyokimyasal yöntemlerle tek başına ayırımının mümkün olmadığı görülmüştür. Literatürde *Nocardia* suşlarının tür düzeyinde tanımlamasına yönelik ticari sistemlerin günümüzde artık kullanılmadığı, moleküler yöntemlerle saptanan tür sayısının da artması nedeniyle, biyokimyasal yöntemlerle tanımlamanın yeterli olmadığı belirtilmektedir (5).

Nocardia türlerinin doğru ve kesin tanısında çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde DNA dizi analizi yöntemi tür düzeyinde tanımlamada en uygun yöntem olarak belirtilmektedir (20). 16S rRNA geni tür tanımlamasında en sık kullanılan gen bölgesidir. Bu gen bölgesinin 500 bp içeren kısmının sekanslaması pek çok *Nocardia* türünün tanımlanmasında yeterli olmaktadır (5). Cloud ve arkadaşlarının (87) yaptıkları bir çalışmada, 16S rRNA gen bölgesinin 500 bp ve 999 bp bölgeleri kullanılarak kıyaslama yapılmıştır. Toplamda 10 türden oluşan 94 klinik izolatın 500 bp bölgesinin sekans sonuçları, fenotipik yöntem sonuçlarıyla %72 ve 999 bp sekans sonucuyla % 90 uyumlu olduğu gösterilmiştir. Patel ve arkadaşları (88) 28 referans suş ve 71 klinik izolatın 16S rRNA sekanslaması sonucu *N. nova*, *N. otitidiscaviarum* ve *N. translavalensis* olarak tanımladıkları suşlar içerisinde önemli heterojenite tespit etmişlerdir. Önceleri bilinen tür sayısı az olan *Nocardia* türlerinin tanısında 500 bp bölgenin sekanslaması yeterli olsa da, tanımlanan tür sayısının giderek artması nedeniyle gelecekte bunun yeterli olamayacağı belirtilmektedir (89). Wauters ve arkadaşları (86) çok sayıda klinik örnekten izole ettikleri *Nocardia* suşlarını 16S rRNA dizi analizi yöntemiyle tanımlamışlardır. Buna göre 86 suşun 83'ünün sadece 6 farklı türden oluştuğunu

tespit etmişlerdir. Bu tanımlanan 6 farklı türün *N.farcinica* (%44), *N.nova* (%22), *N.cyriacigeorgica* (%15), *N. brasiliensis* (%6.9), *N. abscessus* (%5.8) ve *N. paucivorans* (% 2.3) türlerinden oluştuğunu belirtmişlerdir (86). Çalışmamızda 16S rRNA dizi analizi yöntemi ile 45 *Nocardia* suşu tür düzeyinde tanımlanmıştır. Bu tanımlanan türler, *N. cyriacigeorgica* (n: 26, % 57.7), *N. farcinica* (n:12, %26.6), *N. otitidiscaviarum* (n:4, %8.88), *N.asteroides* (n:2, % 4.44), *N. abscessus* (n:1, % 2.22) türlerinden oluşmaktadır.

Nocardia türlerinin ribotiplendirme yöntemi kullanılarak tanımlanmasına yönelik çok az sayıda çalışma mevcuttur. Laurent ve arkadaşları (63) EcoRI, Hind III, HinfI ve PstI gibi restriksiyon enzimleri kullanarak 27 referans suşu ribotiplendirme ile tanımlamışlardır. Tüm suşlarda 2.9 kb'lık bant görülmüştür. *N. farcinica* ATCC 3318 ve diğer *N. farcinica* suşlarında ortak olarak 2.9, 2.7 ve 2.6 kb'lık bantlar bulunmuştur. *N. asteroides* ATCC19217 sensu stricto referans suşu için 6.4, 3.8, 3.5 ve 2.9 kb bantlar görülmüş olup, bunu izleyen diğer 3 *N. asteroides* suşunda da bu bantlar görülmüştür. *N. nova*, *N. brasiliensis* ve *N. otitidiscaviarum* türlerinden ayırım sağlayan farklı büyüklükte bantlar saptanmıştır (63). Brown ve arkadaşları (90) 19 klinik izolat, 2 referans suş ve bir ATCC 3318 *N. farcinica* suşunun ribotiplendirmesini yapmışlardır. Hastalardan izole edilmiş *N. farcinica* klinik izolatlarının ribotip paternleri referans suşlardan farklı bulunmuş, fakat ATCC 3318 ile 4.3 ve 5.0 kb arasında değişen mikroheterojenite dışında, ribotip paternleri benzer bulunmuştur. Bu heterojenitenin de ATCC 3318'den ayırımı sağladığı belirtilmiştir (90). Çalışmamızda ribotiplendirme yöntemi sonucu tüm *Nocardia* suşlarında 3.2 kb bant büyüklüğü görülmüştür. *N. cyriacigeorgica* suşlarında çok fazla polimorfizm görülmesine rağmen bu suşlarda ortak olarak 2 kb 'lık bant bulunmuştur. *N. farcinica* suşlarının yüksek derecede farklı bant profillerine sahip olduğu saptanmıştır. *N. otitidiscaviarum*'da 2, 3.6, 8.3 kb'lık, *N. abscessus* suşlarında ise ayırıcı olarak 3.3, 4.3, 7.7 ve 10 kb'lık bantlar gözlenmiştir. *N. asteroides*, suşlarında bant profili görülmesine rağmen, suş sayısının yetersiz olmasından dolayı değerlendirme yapılamamıştır.

Nocardia türleri ve diğer aerob *Actinomycetes* türlerinin duyarlılık testlerine yönelik 2003 yılında CLSI tarafından bir rehber hazırlanmıştır. Bu rehberde *Nocardia* türlerinin antibiyotik duyarlılık düzeylerinin araştırılmasında sıvı

mikrodilüsyon yöntemi önerilmektedir (65). Cercenado ve arkadaşları (91), 2007 yılında çoğunluğunu *N. cyriacigeorgica* (n:17) ve *N. farcinica* (n:11) türlerinin içerdiği 51 *Nocardia* izolatında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık çalışmışlardır. Çalışmada tüm *Nocardia* izolatlarının amikasin, TMP-SMX ve linezolid antibiyotiklerine duyarlı olduğu saptanmıştır (91). Uhde ve arkadaşları (92) 1995-2004 yılları arasında izole ettikleri 19 ayrı *Nocardia* türünü içeren 765 suşun hepsinde amikasin, TMP-SMX, seftriakson ve siprofloksasin duyarlılığına sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile bakmışlar, 2002 yılından sonra ise bu suşların 269'unda linezolid duyarlılığını da araştırmışlardır. Tüm *N. cyriacigeorgica* (n:101) ve *N. farcinica* (n:105) suşları linezolide duyarlı olup, bir *N. cyriacigeorgica* suşu hariç her iki türde amikasine direnç gözlenmemiştir. *N. farcinica* suşları için siprofloksasin, TMP-SMX ve seftriakson antibiyotiklerine karşı direnç sırasıyla % 72, %80 ve % 93 olarak bulunmuş olup, tanımlanan bu 16 ayrı *Nocardia* türü içerisinde en fazla direnç bu türde gözlenmiştir (92). Conville ve arkadaşları (93), 2011 yılında klinikte en sık izole edilen ve farklı duyarlılık paternleri gösteren 5 farklı *Nocardia* türüne ait izolatların antibiyotik duyarlılıklarını sıvı mikrodilüsyon testi ile araştırmışlardır. Bu çalışmada *N. cyriacigeorgica* türü için amikasin, TMP-SMX ve linezolid'e karşı herhangi bir direnç saptanmamış olup, seftriakson ve siprofloksasine karşı sırasıyla % 65 ve %100 direnç olduğu tespit edilmiştir. *N. farcinica* açısından değerlendirildiğinde, amikasin ve linezolide direnç gözlenmezken, TMP-SMX, siprofloksasin ve seftriaksona sırasıyla % 7.1, % 94.4 ve % 96.7 oranlarında direnç olduğu belirtilmiştir (93). Çalışmamızda *Nocardia* türlerinin amikasin, siprofloksasin, TMP-SMX, seftriakson ve linezolid duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Buna göre amikasin ve linezolid antibiyotiklerine karşı bir direnç gözlenmemiştir. Tanımladığımız *Nocardia* türleri içerisinde en fazla direnç siprofloksasine karşı görülmüştür. *N. cyriacigeorgica* (n:25,%96.1) tanımlanan türler içinde siprofloksasine en fazla direnç gözlenen tür olmuştur. İkinci sık ilaç direnci seftriaksonda görülmüş olup en fazla direnç *N.farcinica* (n:11, % 91.6) türünde gözlemlenmiştir. *N. farcinica* türlerinde TMP-SMX direnci % 16.6 oranında olduğu saptanmıştır.

Nocardia türleri için sıvı mikrodilüsyon ve diğer duyarlılık yöntemlerini karşılaştıran fazla çalışma bulunmamaktadır. Lowman ve arkadaşları (94) 2010

yılında yaptıkları bir çalışmada *Nocardia* türleri ve diğer aerob *Actinomyces* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarını sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve E-test yöntemi ile çalışmışlar ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Çalışmada 39 *Nocardia* suşunun hepsi amikasin, linezolid ve TMP-SMX'e duyarlı bulunmuştur. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde dirençli olan suş, E-test yönteminde duyarlı bulunduğu çok büyük hata, duyarlı olan suş E-test yönteminde dirençli bulunduğu büyük hata olarak kabul edilmiştir. Buna göre her iki yöntem arasında amikasin, TMP-SMX ve linezolid duyarlılık sonuçları yönünden çok büyük hata tespit edilmediği için % 100 uyum olduğu belirtilmiştir. Seftriakson için büyük hata % 11.8, küçük hata % 5.9 oranında saptanmış; siprofloksasin için ise büyük hatanın %3.3 olduğu, küçük hatanın ise olmadığı belirtilmiştir (94).

Yurdumuzda Aydoslu ve arkadaşlarının (95) yaptıkları çalışmada 234 hastadan izole ettikleri iki *N. farcinica*, bir *N. asteroides* ve bir *N. otitidiscaviarum* suşunun duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon, E-test ve disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda bir *N. farcinica* suşunun siprofloksasine karşı, sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemi ile duyarlı olmasına rağmen E-test yönteminde dirençli olduğu görülmüştür (95). Perçin ve arkadaşlarının (96) yaptıkları çalışmada, klinik örneklerden izole edilmiş 21 *Nocardia* suşunun antibiyotik duyarlılıklarına E-test ve disk difüzyon yöntemleri ile bakılmıştır. Her iki yöntem ile linezolid duyarlılığı % 100 olup, bu antibiyotik için yöntemler arası uyum oranı %100 olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmadığı için çalışmamızla karşılaştırma yapılmamıştır (96). Çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve disk difüzyon yöntemleri karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak amikasin ve linezolid antibiyotikleri arasında mükemmel bir uyum olduğu görülmüştür. Seftriakson ve siprofloksasin antibiyotikleri için büyük hata oranları sırasıyla % 4.4 ve % 8.8 olarak saptanmıştır. Trimetoprim-sulfametoksazol için büyük hata oranı % 44.4 olarak bulunmuş olup, istatistiksel olarak yöntemler arasında uyum olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, *Nocardia* türlerinin tanımlanması için konvansiyonel biyokimyasal testlerin yeterli olmadığı, moleküler testlerle ayırım yapılması gerektiği anlaşılmıştır. Bu bakterilerin kesin tanısında DNA dizi analizinin yapılması gerektiği ve ribotiplendirme yönteminin, *Nocardia* türlerinin kütüphanesi oluşturulduğunda

epidemiyolojik tiplendirme amacıyla kullanılabileceği anlaşılmıştır. *Nocardia* turlerinin antibiyotik duyarlılığında sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılması gerektiği tespit edilmiştir.

6. SONUÇ

Nocardia türleri insanlarda nadir fakat ağır enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Nocardia* türlerine bağlı enfeksiyonlarda görülen en önemli risk faktörü insan bağışıklık sisteminin baskılanmasıdır. *Nocardia* şüpheli örneklerin çoğunluğunu solunum yolu örnekleri oluşturmaktadır (6). Çalışmamızda örneklerin çoğunluğu %37.7 oranla solunum yolu örneklerinden oluşmaktadır.

Hastalardan izole ettiğimiz 45 *Nocardia* suşunun biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanmasına yönelik çalışmamızda, moleküler yöntemlerle tanımlayabildiğimiz 5 ayrı tür içinden sadece 2 tür tanımlanabilmiştir. Buna göre *Nocardia* türlerinin biyokimyasal yöntemlerle tek başına ayırımının mümkün olmadığı ve giderek artan tür sayısı ile beraber tanımlamada moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiği söylenebilir.

Çalışmamızda *Nocardia* türlerinin moleküler tanımlamasına yönelik DNA dizi analizi yöntemi ve ribotiplendirme yöntemi kullanılmıştır. Ribotiplendirme sonucu tüm izolatlarımızda ortak bant büyüklüğü yanında, türler arası ayırımı sağlayan farklı bant büyüklükleri de gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile, *Nocardia* türlerinin tanımlanmasına yönelik ilk defa otomatize sistem kullanılmıştır.

Çalışmamızda 45 *Nocardia* suşunun beş farklı antibiyotiğe karşı duyarlılık durumları mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle araştırılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi ile en fazla direnç siprofloksasine karşı görülmüş olup *N. cyriacigeorgica* en fazla direnç gözlenen tür olmuştur. *Nocardia* türleri içinde *N. farcinica*'nın çoklu ilaç direncinin en sık görüldüğü tür olduğu bilinmekte ve tedavide özellikle sulfonamidler tercih edilmektedir (5). Çalışmamızda TMP-SMX antibiyotiğine karşı direnç % 16.6 oranında saptanmış olup bu antibiyotiğin günümüzde hala tedavideki yerini koruduğu görülmüştür. Sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri karşılaştırıldığında TMP-SMX duyarlılık sonuçları açısından iki yöntem arasında uyum bulunamamıştır.

Sonuç olarak, *Nocardia* türlerinin tanımlanması için konvansiyonel biyokimyasal testlerin yeterli olmadığı, moleküler testlerle ayırım yapılması gerektiği anlaşılmıştır. Bu bakterilerin kesin tanısında DNA dizi analizinin yapılması gerektiği ve ribotiplendirme yönteminin, *Nocardia* türlerinin kütüphanesi oluşturulduğunda

epidemiyolojik tiplendirme amacıyla kullanılabileceği anlaşılmıştır. *Nocardia* turlerinin antibiyotik duyarlılığında sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılması gerektiği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Stackebrandt E, Rainey FA, and Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 479-491.
2. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4525-33.
3. Wilson JW. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *Mayo Clin Proc* 2012; 87: 403-407.
4. Singh M, Sandhu RS, Randhawa HS, Kallan BM. Prevalence of pulmonary nocardiosis in a tuberculosis hospital in Amritsar, Punjab. *Indian J Chest* 2000; 42: 325-339.
5. 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: 259-282.
6. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4497-4501.
7. Curry WA. Human nocardiosis. A clinical review with selected case reports. *Arch Intern Med* 1980; 140: 818-826.
8. Nocard E. Note sur la maladie des boeufs de la Gouadeloupe connue sous le nom de farcin. *Ann Inst Pasteur* 1888; 2: 293-302.
9. Trevisan V. Generi e le specie delle Batteriacee. Zanaboni and Gabuzzi, Milan, Italy. 1889.
10. Luca JD, Walsh B, Robbins W, Visconti EB. *Nocardia asteroides* osteomyelitis. *Postgrad Med J* 1986; 62: 673-674.
11. Chamoiseau G. Etiology of farcy in African bovines: nomenclature of the causal organisms *Mycobacterium farcinogenes* Chamoiseau and *Mycobacterium senegalense*. *Int J Syst Bacteriol* 1979; 29: 407-410.
12. Lechevalier HA. Nocardioforms. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1986; 1458-1471.
13. Gordon RE, Mihm JM. A comparative study of some strains received as nocardiae. *J Bacteriol* 1957; 73: 15-27.
14. Gordon RE, Mihm JM. The type species of the genus *Nocardia*. *J Gen Microbiol* 1962; 27: 1-10.

15. Boiron P, and Provost F. Enzymatic characterisation of *Nocardia* spp. and related bacteria by API ZYM profile. *Mycopathologia* 1990; 110: 51-56.
16. Franklin AA, and McClung NM. Heterogeneity among *Nocardia asteroides* strains. *J Gen Appl Microbiol* 1976; 22: 151-159.
17. Tsukamura M. Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*. *J Gen Microbiol* 1969; 56: 265-287.
18. Wallace RJ, Steele LC, Sumpter G, and Smith JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1776-1779.
19. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition Washington, DC: ASM Press 2007; p: 515-540.
20. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th edition. *Nocardia species*. 2009; p: 3199-3.207.
21. Beaman BL, Saubolle MA, Wallace RJ. *Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Oerskovia*, and other aerobic actinomycetes of medical importance. *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C: ASM Press 1995; p: 379-399.
22. Berd D. Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol* 1973; 25: 665-681.
23. Agterof MJ, Bruggen VD, Tersmette M, Borg EJ, van den Bosch JM, Biesma DH. Nocardiosis: a case series and a mini review of clinical and microbiological features. *Neth J Med* 2007; 65: 199-202.
24. McNeil MM, Brown J. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:357-417.
25. Beaman BL, and Beaman L. *Nocardia*: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 213-264.
26. Boiron P, Provost F, Chevrier G, Dupont B. Review of nocardial infections in France 1987 to 1990. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 709-714.
27. Georghiou PR, Blacklock ZM. Infection with *Nocardia* species in Queensland. A review of 102 clinical isolates. *Med J* 1992; 156: 692-697.
28. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection* 2010; 38: 89-97.
29. Lerner PI. Nocardiosis. *J Clin Infect Dis* 1996; 22: 891-905.
30. Reed RC. Nocardiosis and actinomycosis. *Medicine* 2005; 33: 114-115

31. McNeil MM, Brown JM, Jarvis WR, Ajello L. Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 778-783.
32. McNeil MM, Brown JM, Hutwagner LC, Schiff TA. Evaluation of therapy for *Nocardia asteroides* complex infection. CDC/NCID report. *Infect Dis Clin Pract* 1995; 4: 287-292.
33. Lerner PI. *Nocardia* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 4th ed. Vol 2. New York: Churchill Livingstone 1995; 2273-2280.
34. Deem RL, Doughty FA, Beaman BL. Immunologically specific direct T lymphocyte-mediated killing of *Nocardia asteroides*. *J Immunol* 1983;130: 2401-2406.
35. Beaman BL, Scates SM. Role of L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infect Immun* 1981; 33: 893-907.
36. JBourgeois L, Beaman B.. In vitro spheroplast and L-form induction within the pathogenic nocardiae. *Bacteriol* 1976;127: 584-94.
37. Dorman SE, Guide SV, Conville PS, DeCarlo ES, Malech HL, Gallin JI, Witebsky FG, Holland SM. *Nocardia* infection in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 390-394.
38. Long PF.. A retrospective study of *Nocardia* infections associated with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Infection* 1994; 22: 362-364.
39. McNeil MM, Brown JM, Magruder CH, Shearlock KT, Saul RA, Allred DP, Ajello L. Disseminated *Nocardia transvalensis* infection: an unusual opportunistic pathogen in severely immunocompromised patients. *J Infect Dis* 1992; 165: 175-178.
40. Patil SP, Nadkarni NJ, Sharma NR. Nocardiosis: Clinical and Pathological Aspects. In: *Histopathology: Reviews and Recent Advances* 2012: 81-96.
41. Corti ME, Villafañe Fioti MF. Nocardiosis: a review. *Int J Infect Dis* 2003; 7: 243-250.
42. Filice, GA. Nocardiosis, In M. S. Niederman, G. A. Sarosi, and J. Glassroth (ed.), *Respiratory infections*, 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001; p: 457-466.
43. Mahgoup ES. *Agents of mycetoma*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone. 1995; p: 2327-2330.

44. Matthay RA, Greene WH. Infecciones pulmonares en pacientes con deficiencia immune. *Clin Med Nor* 1980; 3: 531-554.
45. Beaman BL, Boiron P, Beaman L, Brownell GH, Schaal K, Gombert ME. *Nocardia* and nocardiosis. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 317-331.
46. Beaman BL, Beaman L, Kjelstrom JA, Ogata SA. Bacteria and neurodegeneration. In: Calne D editors. *Neurodegenerative diseases*. Orlando, Florida: WB Saunders; 1994; p: 319–338.
47. Dwyer KM, Daffy JR, Murphy BF. *Nocardia* peritonitis and abdominal abscess completing continous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrology* 2001; 6: 263-265.
48. Knouse MC, Lorber B. Early diagnosis of *Nocardia asteroides* endophthalmitis by retinal biopsy: case report and review. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 393-398.
49. Parsons MR, Holland EJ, Agapitos PJ. *Nocardia asteroides* keratitis associated with extended-wear soft contact lenses. *Can J Ophthalmol* 1989; 24: 120-122.
50. Kirmani N, Tuazon CU, and Ocuin JA. Extensive cerebral nocardiosis cured with antibiotic therapy alone. *J Neurosurg* 1978; 49: 924-928.
51. Murray RJ, Himmelreich U, Gomes L, Ingham NJ , and Sorrell TC. Cerebral nocardiosis characterized by magnetic resonance spectroscopy in vivo. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 849-852.
52. Ashdown LR. Improved screening technique for isolation of *Nocardia* species from sputum specimens. *Pathology* 1990; 22: 157–161.
53. Mathur S, Sood R, Aron M, Iyer VK, Verma K. Cytologic diagnosis of pulmonary nocardiosis: a report of 3 cases. *Acta Cytol* 2005; 49: 567-70.
54. Shawar RM, Moore DG, La Rocco MT. Cultivation of *Nocardia* spp. on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 508–512.
55. Vickers RM, Rihs JD, and Yu VL. Clinical demonstration of isolation of *Nocardia asteroides* on buffered charcoal-yeast extract media. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 227–228.
56. Murray PR, Heeren RL, Niles AC. Effect of decontamination procedures on recovery of *Nocardia* spp. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2010-2011.
57. Murray PR, Niles AC, Heeren RL. Modified Thayer-Martin medium for recovery of *Nocardia* species from contaminated specimens. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1219-1220.

58. Kiska DL, Hicks K, Pettit DJ. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1346-51.
59. Yassin AF, Rainey FA, Burghardt J, Brzezinka H, Mauch M, Schaal KP. *Nocardia paucivorans* sp. *Int J Syst Evol. Microbiol* 2000; 50: 803-809.
60. Wallace RJ, Tsukamura M, Brown BA, Brown JM, Steingrube VA, Zhang Y, Nash DR. Cefotaxime-resistant *Nocardia asteroides* strains are isolates of the controversial species *Nocardia farcinica*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2726-2732.
61. Wallace RJ, Brown BA, Tsukamura M, Brown JM, Onyi G. Clinical and laboratory features of *Nocardia nova*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2407-2411.
62. Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 99-102.
63. Laurent F, Carlotti A, Boiron P, Villard J, Freney J.. Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1079-1082.
64. McNeil M M, Ray S, Kozarsky PE, Brown JM. *Nocardia farcinica* pneumonia in a previously healthy woman: species characterization with use of a digoxigenin-labeled cDNA probe. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 933-934.
65. Clinical and laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved standard. 2003. CLSI document M24-A. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
66. 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: 101-110.
67. Blumer SO, Kaufman L. Microimmunodiffusion tests for nocardiosis. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 308-312.
68. Humphreys DW, Crowder JG, White A. Serological reactions to *Nocardia* antigens. *Am J Med Sci* 1975; 269: 323-326.
69. Angeles AM, Sugar AM. Rapid diagnosis of nocardiosis with an enzyme immunoassay. *J Infect Dis* 1987; 155: 292-296.
70. Angeles AM, Sugar AM. Identification of a common immunodominant protein in culture filtrates of three *Nocardia* species and use in etiologic diagnosis of mycetoma. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2278-2280.

71. Sugar AM, Schoolnik GK, Stevens DA. Antibody response in human nocardiosis: identification of two immunodominant culture-filtrate antigens derived from *Nocardia asteroides*. *J Infect Dis* 1985; 151: 895-901.
72. Kjelstrom JA, Beaman BL. Development of a serologic panel for the recognition of nocardial infections in a murine model. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 16: 291-301.
73. Wallace RJ Jr, Septimus EJ, Williams TW Jr, Conklin RH, Satterwhite TK, Bushby MB, Hollowell DC. Use of trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of infections due to *Nocardia*. *Rev Infect Dis* 1982; 4: 315-25.
74. Threlkeld SC, Hooper DC. Update on management of patients with *Nocardia* infection. *Curr Clin Top Infect Dis* 1997; 17: 1-23.
75. Yazawa K, Mikami Y, Ohashi S, Miyaji M, Ichihara Y, Nishimura C. In-vitro activity of new carbapenem antibiotics: comparative studies with meropenem, L-627 and imipenem against pathogenic *Nocardia* spp. *J Antimicrob Chemother* 1992 ; 29: 169-172.
76. Jodlowski TZ, Melnychuk I, Conry J. Linezolid for the treatment of *Nocardia* spp. infections. *Ann Pharmacother* 2007; 4: 1694-1699.
77. Rivero A, García-Lázaro M, Pérez-Camacho I, Natera C, del Carmen Almodovar M, Camacho A, Torre-Cisneros J. Successful long-term treatment with linezolid for disseminated infection with multiresistant *Nocardia farcinica*. *Infection* 2008; 36: 389-391.
78. Bach MC, Monaco AP, Finland M. Pulmonary Nocardiosis Therapy With Minocycline and With Erythromycin Plus Ampicillin. *JAMA*. 1973; 224: 1378-1381
79. Arduino RC, Johnson PC, Miranda AG. Nocardiosis in renal transplant recipients undergoing immunosuppression with cyclosporine. *Clin Infect Dis* 1993;16: 505-512.
80. Isenberg HD, Garcia LS. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd edition. P: 6.2.1- 6.2.11
81. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes. 2011. CLSI document M24-A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
82. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23rd Informational supplement. 2013. CLSI M100-S23. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
83. Berd D. Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol* 1973; 25: 665-681.

84. Biehle JR, Cavalieri SJ, Felland T, and Zimmer BL. Novel method for rapid identification of *Nocardia* species by detection of preformed enzymes. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 103-107.
85. Muir DB, and Pritchard RC. Use of the BioMerieux ID 32C yeast identification system for identification of aerobic actinomycetes of medical importance. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3240-3243.
86. Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M and Delmée M. Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2624-2628.
87. Cloud JL, Conville PS, Croft A, Harmsen D, Witebsky FG, and Carroll KC. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 578-584.
88. Patel JB, Wallace RJ, Brown-Elliott BA, Taylor T, Imperatrice C, Leonard DG, Wilson RW, Mann L, Jost KC, Nachamkin I. Sequence-based identification of aerobic actinomycetes. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2530-2540.
89. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Manuel of Clinical of Microbiology* 10th edition. ASM press. Washington DC. 2013; p: 443-471.
90. Brown JM, Cowley KD, Manninen KI, McNeil MM. Phenotypic and molecular epidemiologic evaluation of a *Nocardia farcinica* mastitis epizootic. *Vet Microbiol* 2007;125: 66-72.
91. Cercenado E, Marín M, Martínez SM, Cuevas O, Alarcón JM, Bouza E. In vitro activities of tigecycline and eight other antimicrobials against different *Nocardia* species identified by molecular methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1102-1104.
92. Uhde KB, Pathak S, McCullum I Jr, Jannat-Khah DP, Shadomy SV, Dykewicz CA, Clark TA, Smith TL, Brown JM. Antimicrobial-resistant nocardia isolates, United States, 1995-2004. *Clin Infect Dis*. 2010 Dec 15;51(12):1445-8.
93. Conville PS, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, Witebsky FG, Koziol D, Hall GS, Killian SB, Knapp CC, Warshauer D, Van T, Wengenack NL, Deml S, Woods GL. Multisite reproducibility of the broth microdilution method for susceptibility testing of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1270-80.
94. Lowman W, Aithma N. Antimicrobial susceptibility testing and profiling of *Nocardia* species and other aerobic actinomycetes from South Africa: comparative evaluation of broth microdilution versus the Etest. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4534-4540.

95. Aydoslu B, Tuğrul HM. *Nocardia* spp. isolated from immunocompromised patients in Trakya University Medical Faculty Hospital and their antibiotic susceptibilities. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 529-535.
96. 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: 274-279.