

CAT
Critically Appraised Topic

Titel: Identificatie en gevoeligheidsbepaling van Nocardia

Author: Dr. Steven Martens
Supervisor: Prof. Apr. Katrien Lagrou & Apr. Stefanie Desmet
Search/methodology verified by: Apr. Stefanie Desmet
Date: 19/07/2020

CLINICAL BOTTOM LINE

Belangrijkste weerhouden bevindingen/ conclusies. Iemand die niet veel tijd heeft, moet hier de correcte weergave van de besluiten vinden.

Nocardia werd voor het eerst in 1888 beschreven door Edmund Nocard en is in de meerderheid van de gevallen een opportunistische pathogeen. Er zijn momenteel meer dan 94 verschillende species gekend waarvan ongeveer de helft klinisch relevant is. In het verleden was *N. asteroides* de meest frequent geïsoleerde pathogeen op basis van biochemische testen. Na de opkomst van moleculaire technieken hebben er echter belangrijke taxonomische veranderingen plaats gevonden. Nocardiose presenteert zich vooral als een pulmonale infectie doch heeft ook een (secundaire) voorkeur voor het centraal zenuwstelsel en de huid. Patiënten met een deficiënte cellulaire immuniteit hebben een verhoogd risico op nocardiose. Nocardia is een traag groeiende bacterie die zichtbaar is als dunne, vertakte Grampositieve staafjes. Een bijkomende kleuring is soms nuttig om te differentiëren met Actinomycetes. Omwille van de langzame groei is het belangrijk de gebruikte voedingsbodems voldoende lang (tot 3 weken) te incuberen. Moleculaire technieken (o.a. 16S-rRNA) en sinds enige jaren ook MALDI-TOF MS spelen een vitale rol bij de snelle en correcte identificatie tot op species niveau. Relatief uniek is de associatie tussen zes verschillende *Nocardia* species (-complexen) en hun bijhorend gevoeligheidspatroon, ontdekt door Richard Wallace in 1988. Het uitvoeren van een antibiogram wordt altijd aangeraden bij isolatie van een *Nocardia* species uit een klinisch staal gezien de hoge inter-species variatie betreffende het resistentiepatroon. Gevoeligheidsbepaling door middel van de broth microdilution methode is de gouden standaard.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Inleiding

Nocardia werd voor het eerst geïsoleerd op het einde van de 19^e eeuw (1888) door de Franse dierenarts Edmond Nocard bij koeien die leden aan chronische lymfadenitis [1]. Het zijn niet-sporenvormde, grampositieve, zwak zuurvaste, strikt aerobe en filamentvormige bacillen. Ze behoren tot de groep van de aerobe Actinomycetes, waar o.a. ook de *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* en *Mycobacterium* deel van uitmaken [2]. Het genus van *Nocardia* bestaat uit ongeveer 86 species waarvan er meer dan 40 medisch relevant zijn [3].

Nocardia species maken geen deel uit van de normale humane flora en worden wereldwijd teruggevonden als saprofyten in de bodem, in rottende organische materie en in water [4].

Om tot op heden onduidelijke redenen, komt nocardiose twee- tot driemaal vaker voor bij mannen dan bij vrouwen [5].

Nocardiose is een zeldzame aandoening waarvan de incidentie niet exact bekend is. Volgens Minero et al. was er in Spanje een incidentie van 0,45/100.000 inwoners/jaar in de periode van 1995 tot 2006 [6]. Door een toename van het aantal immuun modulerende behandelingen in verschillende disciplines van de geneeskunde mag men aannemen dat deze incidentie nog zal toenemen [7].

Inhalatie is de meest voorkomende manier van besmetting. Een infectie via directe weg na beschadiging van de huid (primair cutane nocardiose) is eveneens mogelijk. De ziektebeelden veroorzaakt door *Nocardia* species zijn op te delen in twee grote groepen: lokale ontstekingsprocessen en veralgemeende of gedissemineerde infecties.

Taxonomie

Het genus *Nocardia* heeft een zeer verwarrende taxonomische geschiedenis gekend. De oorspronkelijke classificatie was gebaseerd op de (on-)mogelijkheid om verschillende substraten te verbruiken (o.a. caseïne, tyrosine en xanthine) en op een reeks enzymatische testen. *N. asteroides* werd hierdoor gedurende vele jaren het meest geïdentificeerde *Nocardia* species [8]. In 1988 ontdekte Wallace et al. echter zes verschillende types van antibioticum gevoeligheidspatronen bij 78 klinische stammen die voordien allen geïdentificeerd werden als *N. asteroides* op basis van de vroeger gebruikte biochemische identificaties [9]. Omwille van de onmogelijkheid om deze stammen op fenotypische wijze voldoende te onderscheiden en gezien de onderling verschillende gevoeligheidspatronen, werd de naam veranderd naar *N. asteroides complex* [9].

De laatste twintig jaar hebben er echter belangrijke taxonomische veranderingen plaatsgevonden door de opkomst van moleculaire technieken [4,8,10]. Hierdoor is het gebruik van de term *N. asteroides complex* dan ook obsoleet. Afhankelijk van de gebruikte methode voor de identificatie van *Nocardia* species, kan men sommige van deze stammen vervolgens groeperen in een 'complex' (tabel 1).

De volgende species worden vandaag beschouwd als de voornaamste humane pathogenen: *N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. nova*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. veterana* en *N. abscessus* [11].

Tabel 1. Taxonomie *Nocardia* species (niet exhaustieve lijst) [8]

Complex	Basis for complexing	Species Included in the complex
<i>N. abscessus</i> complex	MALDI-TOF MS profile Gene sequence (500 bp of 16S rRNA)	<i>N. abscessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. pneumoniae</i> <i>N. abscessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. beijingensis</i>
<i>N. nova</i> complex	Gene sequences (16S rRNA and/or <i>secA1</i>) Antibiotic susceptibility pattern MALDI-TOF MS profile	<i>N. africana</i> , <i>N. aobensis</i> , <i>N. cerradoensis</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. mikamii</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. vermiculata</i> , <i>N. veterana</i> <i>N. africana</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i> <i>N. africana</i> , <i>N. aobensis</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i>
<i>N. transvalensis</i> complex	Antibiotic susceptibility pattern Gene sequences (16S rRNA, <i>secA1</i>) MALDI-TOF MS profile	<i>N. blacklockiae</i> , <i>N. transvalensis</i> , <i>N. wallacei</i>
<i>N. brevicatena</i> / <i>N. paucivorans</i> complex	Antibiotic susceptibility pattern Gene sequences (16S rRNA, <i>secA1</i>) MALDI-TOF MS profile	<i>N. brevicatena</i> , <i>N. paucivorans</i>
<i>N. otitidiscaviarum</i> complex	Gene sequences (16S rRNA, <i>hsp65</i>)	Various strains of <i>N. otitidiscaviarum</i>
<i>N. cyriacigeorgica</i> complex	16S rRNA gene sequence	Various strains of <i>N. cyriacigeorgica</i>
<i>N. farcinica</i> complex	Gene sequences (16S rRNA, <i>secA1</i>)	<i>N. farcinica</i> , <i>N. kroppenstedtii</i>

Kliniek

Nocardiose wordt algemeen beschouwd als een opportunistische infectie, toch hebben tot een derde van de geïnfecteerde personen een normaal immuunsysteem [12]. De infectie treft vooral patiënten met een deficiënte cellulaire immuniteit en uit zich bij deze patiëntenpopulatie ook vaker als een gedissemineerde infectie. Patiënten die een beenmerg- of orgaantransplantatie hebben ondergaan zijn de voornaamste risicogroep. Patiënten met een maligniteit, hiv-infectie, langdurig corticosteroiden gebruik of diabetes mellitus hebben eveneens een verhoogde kans op een nocardiose [7,12-14].

Nocardiose heeft een polymorfe waaier aan klinische presentaties. Pulmonale nocardiose is het meest frequente klinisch beeld, gezien besmetting via inhalatie de primaire route van infectie is [5]. De symptomatologie vertoont meestal een subacuut of chronisch beloop en is aspecifiek. Medische beeldvorming kan diverse bevindingen tonen: nodulaire of interstitiële afwijkingen, lobaire consolidaties of pleuravochtuitstortingen. Differentiaal diagnostisch moet bij dit type patiënt en klinisch beeld gedacht worden aan een bacteriële origine (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, anaerobe kiemen), aspergillose of andere invasieve schimmelinfecties, actinomyose, tuberculose en maligniteiten [15].

Een veralgemeende nocardiose behoort ook tot de mogelijkheden en heeft meestal het pulmonaal stelsel als primaire bron. Mogelijke metastatische sites zijn o.a. het centraal zenuwstelsel, de huid en weke delen, het oog, het hart, de nieren en het osteo-articulair stelsel [7].

Centraal zenuwstelsel nocardiose wordt vaker teruggevonden bij patiënten met een verminderde immuniteit en is de meest frequente extra-pulmonale manifestatie [12]. Betrokkenheid van het CZS kan zich presenteren met een verscheidenheid aan symptomen en toont meestal één tot meerdere hersenabcessen op medische beeldvorming [4,7].

Een bacteriemie is minder frequent en wordt geassocieerd met de aanwezigheid van centraal veneuze katheters en/of een immuun gecompromitteerde status [16]. In een review van Williams et al. was in 91% van de 138 bacteriemie gevallen één van de twee hierboven beschreven factoren aanwezig.

Het kan ook de huid en subcutane weefsels infecteren (cutane nocardiose). Doorgaans vindt men dit type van infectie terug bij personen met een normale afweer [7]. De infectie vindt gewoonlijk plaats na beschadiging van de huid (primair) of na hematogene verspreiding (secundair). Ulcera, abscessen of een cellulitis beeld behoren tot de mogelijke vormen van huidletsels. Via de nabijgelegen lymfeklieren kan de infectie ook noduli vormen (lymfocutane nocardiose of ook wel sporotrichoïde nocardiose genoemd). De voornaamste verwekker van cutane nocardiose is *N. brasiliensis* [4]. Dit type van infectie wordt veelal gezien in een (sub-) tropisch klimaat [17].

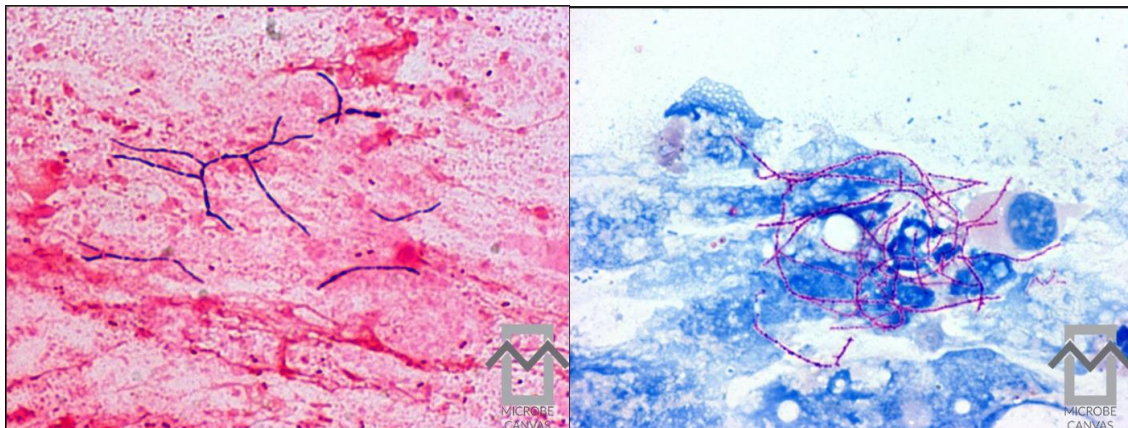
Kweek en identificatietechnieken

a) Microscopisch onderzoek

Microscopisch onderzoek is een erg belangrijke initiële stap in de voorlopige diagnose.

Er wordt aangeraden om zowel een gramkleuring als een zuurvaste kleuring uit te voeren bij verdenking op nocardiose (figuur 1) [3-4, 7, 17]. Uit een artikel van Saubolle et al. blijkt dat de gramkleuring gevoeliger is dan de zuurvaste kleuring en dus als eerste dient uitgevoerd te worden [7]. Op een gramkleuring presenteert de bacterie zich als dunne, vertakte Grampositieve staven met op de achtergrond meestal veel polymorfonucleaire leukocyten (figuur 1)

Wat betreft de zuurvaste kleuring wordt een variant van de Kinyounmethode aangeraden en niet de klassieke Ziehl-Neelsen-kleuring [4]. Bij deze variant wordt er gebruik gemaakt van 1% H₂SO₄ in de ontkleuringsfase. Gezien de moeilijkheid van het juist uitvoeren van deze kleuring is het aangewezen om een positieve en negatieve controle mee te nemen voor een correcte beoordeling van het preparaat [18]. De Nocardia bacterie is klassiek deels of zwak zuurvast bij dit type van kleuring en de genera Actinomyces en Streptomyces zijn daarentegen niet zuurvast.



Figuur 1. Grampositieve (blauwe) staven op Gramkleuring (sputum; links) en (deels) zuurvaste (rode) staven op gemodificeerde Kinyoun kleuring (BAL; rechts) [microbe-canvas.com]

Deze kleuring laat dus een snelle differentiatie tussen Nocardia en actinomyces toe (tabel 2) [2].

Tabel 2. Differentiatie van Nocardia met gerelateerde species op basis van Ziehl-Neelsen en Kinyoun kleuring

	Actinomyces	Mycobacterium	Nocardia	Streptomyces
Ziehl-Neelsen kleuring	-	+	-	-
Kinyoun kleuring	-	+	+	-

b) Isolatieprocedure

Nocardia is een aerobe bacterie die groeit op de klassieke niet-selectieve voedingsbodems. Het is ook een relatief traag groeiende bacterie waardoor de vorming van de typische kolonies vaak pas na twee tot vijf dagen incubatie wordt opgemerkt [7].

Indien het een normaal steriel staal betreft worden de volgende aanbevelingen gedaan: bij vermoeden van een bacteriemie met *Nocardia* species dient men de incubatieduur van de hemoculturen te verhogen naar 3 weken [2, 19]. Bij een steriel lichaamsvocht (of biopt) kan men meteen een bloedagar enten en de incubatieduur van de vloeibare bodems (THIO en TSB) eveneens verlengen tot 3 weken met een finale overenting indien geen troebelheid werd opgemerkt.

Indien het een niet-steriel monster betreft (respiratoir staal, mycetoma) dient er een bijkomende, selectievere voedingsbodem geënt te worden (bijvoorbeeld BCYE of Thayer-Martin bodem) om zo de opbrengst te vergroten [2, 19].

Gezien de langzame groei en dus de lange incubatieduur worden de platen best afgesloten om uitdroging te voorkomen. De aflezing dient de eerste week best dagelijks en nadien wekelijks te gebeuren [2]. Bij een grote meerderheid zal de kolonievorming echter wel al optreden gedurende de eerste dagen.

De kolonie morfologie van *Nocardia species* is variabel: gaande van glad en oranjekeurig (*N. farcinica*) tot een verheven, gerimpeld en krijtachtig uiterlijk bij de meeste overige species. *N. brasiliensis* heeft een geelachtige verkleuring en *N. cyriacigeorgica* produceert frequent een bruin pigment [4].

Huidige praktijk in UZ Leuven

In ons laboratorium wordt er een gramkleuring uitgevoerd en worden de gebruikte voedingsbodems voor langere tijd geïncubeerd. De identificatie gebeurt op basis van MALDI-TOF MS en 16S-rRNA-gen sequentieanalyse. Na overleg met de klinici kunnen volgende antibiotica uitgetest worden in ons laboratorium: co-trimoxazol, amikacine, ceftriaxone, linezolid, minocycline, levofloxacin en meropenem. Als methode voor de gevoeligheidsbepaling maken we gebruik van Etest. De aflezing van deze Etesten is niet altijd even gemakkelijk. Verder is er tot op heden nog geen aanvraagbare entiteit voor het opsporen van *Nocardia* in ons laboratorium informatiesysteem (LIS) maar dit zal in de nabije toekomst wel mogelijk zijn.

QUESTION(S)

- 1) Kan MALDI-TOF MS gebruikt worden voor de identificatie van *Nocardia species*?
- 2) Welke methode moeten we gebruiken voor de gevoeligheidsbepaling van *Nocardia species*?
- 3) Welke methode is het meest geschikt om gevoeligheidsbepaling in UZ Leuven uit te voeren?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: “*Nocardia*, diagnosis, antimicrobial agents, *Nocardia* infections, microbiology”
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>, Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/htahp.htm>))

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Nocard E. Note sur la maladie des boeufs de la Gouadeloupeconnue sous le nom de farcin. *Ann Inst Pasteur*. 1888;2:293–302.
2. Carroll K, Pfaller M, Patel R, McAdam A, Landry M, Richter S et al. *Manual of clinical microbiology volume 1-2*. Washington: ASM Press; 2019.
3. Restrepo A, Clark N. Nocardia infections in solid organ transplantation: Guidelines from the Infectious Diseases Community of Practice of the American Society of Transplantation. *Clinical Transplantation*. 2019;33(9).
4. Brown-Elliott B, Brown J, Conville P, Wallace R. Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(2):259-282.
5. Yildiz O, Doganay M. Actinomycoses and *Nocardia* pulmonary infections. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2006;12(3):228-234.
6. Minero M, Marín M, Cercenado E, Rabadán P, Bouza E, Muñoz P. Nocardiosis at the Turn of the Century. *Medicine*. 2009;88(4):250-261.
7. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: Updated Clinical Review and Experience at a Tertiary Center. *Infection*. 2010;38(2):89-97.
8. Conville P, Brown-Elliott B, Smith T, Zelazny A. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;56(1).
9. Wallace R, Steele L, Sumter G, Smith J. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988;32(12):1776-1779.
10. McTaggart L, Doucet J, Witkowska M, Richardson S. Antimicrobial Susceptibility among Clinical *Nocardia* Species Identified by Multilocus Sequence Analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;59(1):269-275.
11. Lebeaux D, Morelon E, Suarez F, Lanternier F, Scemla A, Frange P et al. Nocardiosis in transplant recipients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013;33(5):689-702.
12. Wilson J. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *Mayo Clinic Proceedings*. 2012;87(4):403-407.
13. Peleg AY, Husain S, Qureshi ZA, Silveira FP, Sarumi M, Shutt KA et al. Risk factors, clinical characteristics, and outcome of *Nocardia* infection in organ transplant recipients: a matched case-control study. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1307-14.
14. De La Cruz O, Mincez L, Silveira F. Experience with linezolid for the treatment of nocardiosis in organ transplant recipients. *Journal of Infection*. 2015;70(1):44-51.
15. Cattaneo C, Antoniazzi F, Caira M, Castagnola C, Delia M, Tumbarello M et al. *Nocardia* spp infections among hematological patients: results of a retrospective multicenter study. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(8):e610-e614.
16. Williams E, Jenney A, Spelman D. *Nocardia* bacteremia: A single-center retrospective review and a systematic review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;92:197-207.
17. Saubolle M, Sussland D. Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(10):4497-4501.
18. Brown-Elliott B, Conville P, Wallace R. Current Status of *Nocardia* Taxonomy and Recommended Identification Methods. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2015;37(4):25-32.
19. Leber A. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology; 2016.
20. CLSI. *Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by Targeted DNA Sequencing*, 2nd Edition. CLSI supplement MM18-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
21. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T, Wauters G et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Nocardia* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(11):4015-4021.
22. Hsueh P, Lee T, Du S, Teng S, Liao C, Sheng W et al. Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsakumurella*, and *Listeria* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(7):2371-2379.
23. Buckwalter S, Olson S, Connelly B, Lucas B, Rodning A, Walchak R et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and Other Aerobic Actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;54(2):376-384.

24. Khot P, Bird B, Durrant R, Fisher M. Identification of *Nocardia* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(10):3366-3369.
25. Blosser S, Drake S, Andrasko J, Henderson C, Kamboj K, Antonara S et al. Multicenter Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Study for Identification of Clinically Relevant *Nocardia* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(5):1251-1258.
26. Yarbrough M, Lainhart W, Burnham C. Identification of *Nocardia*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* using MALDI-TOF MS with the Bruker Biotyper. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2017;89(2):92-97.
27. Marín M, Ruiz A, Iglesias C, Quiroga L, Cercenado E, Martín-Rabadán P et al. Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24(12):1342.e5-1342.e8.
28. McTaggart L, Chen Y, Poopalarajah R, Kus J. Incubation time and culture media impact success of identification of *Nocardia* spp. by MALDI-ToF mass spectrometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018;92(4):270-274.
29. CLSI. Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems, 1st Edition. CLSI supplement M52. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
30. Wallace R, Wiss K, Curvey R, Vance P, Steadham J. Differences Among *Nocardia* spp. in Susceptibility to Aminoglycosides and β -Lactam Antibiotics and Their Potential Use in Taxonomy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1983;23(1):19-21.
31. NCCLS. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved standard. NCCLS document M24-A. NCCLS, Wayne, Pa
32. Biehle J, Cavalieri S, Saubolle M, Getsinger L. Comparative evaluation of the E test for susceptibility testing of *Nocardia* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1994;19(2):101-110.
33. Ambaye A, Kohner P, Wollan P, Roberts K, Roberts G, Cockerill F. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(4):847-852.
34. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(12):4534-4540.
35. Brown-Elliott B, Killingley J, Vasireddy S, Bridge L, Wallace R. In Vitro Comparison of Ertapenem, Meropenem, and Imipenem against Isolates of Rapidly Growing Mycobacteria and *Nocardia* by Use of Broth Microdilution and Etest. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(6):1586-1592.
36. CLSI. Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, *Nocardia* spp. and Other Aerobic Actinomycetes. 1st ed. CLSI supplement M62. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
37. Schlager R, Fisher M, Hanson K. Susceptibility Profiles of *Nocardia* Isolates Based on Current Taxonomy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;58(2):795-800.
38. UpToDate Online (2020)
39. Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Djadi-Prat J, Mounié D, Boiron P et al. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010–2015. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(4):489-495.
40. Coussement J, Lebeaux D, van Delden C, Guillot H, Freund R, Marbus S et al. *Nocardia* Infection in Solid Organ Transplant Recipients: A Multicenter European Case-control Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(3):338-345.
41. Arasaratnam R, Restrepo A. *Nocardia* Infections in Transplantation: Diagnosis, Management, and Impact on Outcomes. *Emerging Transplant Infections*. 2020;:1-18.
42. Paige E, Spelman D. Nocardiosis: 7-year experience at an Australian tertiary hospital. *Internal Medicine Journal*. 2019;49(3):373-379.
43. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1992;29(2):169-172.

APPRAISAL (3000)**CAT-vraag 1: Kan MALDI-TOF MS gebruikt worden voor de identificatie van Nocardia species?**

Snelle en accurate identificatie tot op species niveau is erg belangrijk bij Nocardia gezien de link met het resistentiepatroon (cfr. infra). Biochemische identificaties zijn tijdrovend en grotendeels onbetrouwbaar voor een correcte identificatie [18]. Het gebruik van moleculaire technieken blijft de gouden standaard tot op heden [3]. Het betreft meestal een sequentieanalyse van het 16S-ribosomaal-RNA gen, het secA1 gen en/of het hsp65 gen. Multilocus sequentieanalyse is soms noodzakelijk om te voldoen aan de criteria vooropgesteld door CLSI [20].

Een andere methode voor identificatie van micro-organismen is door middel van MALDI-TOF MS. Het voordeel hiervan is de lagere complexiteit, snellere turn-around time (TAT) en de kosten-efficiëntie. Een literatuurstudie werd dan ook uitgevoerd om de diagnostische accuraatheid van MALDI-TOF MS voor *Nocardia* species te achterhalen. Gezien men in UZ Leuven werkt met de MALDI Biotyper (Bruker), werden enkel studies geïnccludeerd die gebruik maken van dit platform.

Dit eerste deel van de literatuurstudie is gebaseerd op acht artikels [21-28]. Een overzicht van de resultaten is terug te vinden in tabel 3. Alle artikels gebruikten als referentiemethode gen sequentieanalyse (16S-rRNA, hsp65 en/of secA1). De diagnostische accuraatheid van het MALDI-TOF MS systeem wordt uitgedrukt in percentage overeenkomst ten opzichte van de referentiemethode (zowel op species als op groep niveau). CLSI stelt een $\geq 90\%$ correcte identificatie voorop als acceptatiecriterium [29].

Tabel 3. Overzicht van studies betreffende identificatie van *Nocardia* op species en groep niveau met MALDI Biotyper (Bruker)

studie en jaar publicatie databank (<i>Nocardia</i> spectra) ± in huis databank (<i>Nocardia</i> spectra)	aantal stammen	% correcte identificatie		incubatielijd extractieprocedure
		species (cutoff)	groep (cutoff)	
Verroken et al. 2010 BDAL 3486 (v.3.0) (X) + in-huis databank (110)	43	23 (≥ 2.0) 79 (≥ 2.0)	44 (≥ 1.7) 88 (≥ 1.7)	48-72u EtOH/FA
Hsueh et al. 2014 BDAL 5627 (72)	74	14,9 (≥ 2.0)	70,1 (≥ 1.7)	48u EtOH/FA
Buckwalter et al. 2015 BDAL 5627 v.3.3.1.0 (72) + in-huis databank (232)	148	41,9 (≥ 2.0) 89,9 (≥ 2.0)	57,4 (≥ 1.7) 94,6 (≥ 1.7)	onbekend EtOH/FA
Khot et al. 2015 BDAL 5627 v.3.1 (72) + in-huis databank (13)	87	53 (≥ 1.9) 83,1 (≥ 1.9)	62 (≥ 1.7) 94,8 (≥ 1.7)	18-48u EtOH/FA
Blosser et al. 2016 BDAL 5627 v.4.0.0.1 (72) + in-huis databank (90)	150	47,3 (≥ 2.0) 84,2 (≥ 2.0)	72 (≥ 1.8) 90,2 (≥ 1.8)	72-96u EtOH/FA

Yarbrough et al. 2017	60			48-144u
BDAL 5989 v.5 (73)		43 (≥ 2.0)	77 (≥ 1.7)	EtOH/FA
BDAL 6903 v.6 (105)		58 (≥ 2.0)	83 (≥ 1.7)	
Marín et al. 2018	73			36-48u
BDAL 6903 (v.6) (105)		57,5 (≥ 2.0)	95,9 (≥ 1.7)	mierenzuur op spot
		94,5 (≥ 1.7)	98,6 (≥ 1.5)	
McTaggart et al. 2018	251			18-72u
BDAL 6903 (v.6) (105)		80,9 (≥ 2.0)	86,9 (≥ 1.7)	EtOH/FA
+ in-huis databank (X)		87,3 (≥ 2.0)	93,3 (≥ 1.7)	

In de studie van Khot et al. is er gekeken naar de rol van de leeftijd van *Nocardia* culturen in het succes van MALDI-TOF MS identificatie. Hun resultaten gaven aan dat testen in een vroegere groeifase de identificatiescores significante verbeterde ($P = 0.0002$, t-test). Ze hebben 36 stammen, die aanvankelijk getest waren na 48 uur groei, opnieuw getest na 18 tot 48 uur vanaf het moment dat kolonies zichtbaar werden. In 80,5% (29/36) verbeterde de score bij aflezing na 18u ten opzichte van aflezing na 48 uur met een gemiddelde stijging van 0,39.

McTaggart et al. hebben een vergelijking gemaakt tussen enerzijds identificatie na 72 uur incubatie en anderzijds identificatie vanaf de aanwezigheid van de eerste kolonies (18-72 uur). Een percentage van 36.9% voor isolaten met een score ≥ 2.0 werd bekomen na 72u. Dit staat in groot contrast met het veel hogere percentage (83,3%) dat men bekam wanneer men MALDI-TOF MS uitvoerde vanaf vroege groei (1^e kwadrant). Een korte incubatieduur is dus een sleutelfactor is voor succesvolle identificatie.

Blosser et al. onderzocht dan weer of een lagere scoredrempel van 1,8 voor de identificatie op species (-complex) niveau een vermindering in accurateid zou teweegbrengen in vergelijking met de traditionele 2,0 grenswaarde. Voor deze analyse werden species (-complex) identificaties die $\geq 1,8$ scoorden als definitief geaccepteerd, op voorwaarde dat de score van de op één na hoogste overeenkomst met $\geq 10\%$ verschilde. Zij namen een gemiddelde toename van 5,6% van het aantal isolaten dat gerapporteerd kon worden waar zonder een afname in nauwkeurigheid.

Uit de studie van Yarbrough et al. valt af te leiden dat het gebruik van de ethanol/mierenzuur extractiemethode geen meerwaarde biedt ten opzichte van directe toevoeging van 1 μ L mierenzuur met nadien matrix toevoeging. Zij formuleerden ook een 'optimale workflow' voor de identificatie (tabel 4).

Tabel 4. Parameters voor optimale identificatie van vermoedelijke Actinomycetes [26]

Genus	Media	Extraction method	Target spotting	Genus threshold score	Species threshold score
<i>Nocardia</i>		Direct On-target or Ethanol-formic acid			≥ 1.8
<i>Tsukamurella</i>	BHI or SAB		Duplicate	≥ 1.7	N/A
<i>Streptomyces</i>					N/A

Besluit

Samenvattend kunnen we besluiten dat MALDI-TOF MS een snelle en betrouwbare doch een minder discriminerende identificatiemethode is voor *Nocardia* species dan gen sequentieanalyse. Het gebruik van aanvullende spectrale databases kan aangewezen zijn voor identificatie van *Nocardia* species die niet frequent geïsoleerd worden uit klinische monsters.

Onderzoek naar het effect van een lagere scoredrempel voor de identificatie op species (-complex) niveau suggereert dat een MALDI-TOF MS score $\geq 1,8$ kan gebruikt worden zonder dat er een verandering van accuraatheid plaatsvindt. Een isolaat dat een MALDI-TOF MS score van $< 1,8$ behaalt of één van $\geq 1,8$ dat niet met 10% gescheiden is van hun dichtstbijzijnde identificatie op species niveau, wordt best onderworpen aan gen-sequentieanalyse (16S-rRNA of secA1).

CAT-vraag 2: Welke methode moeten we gebruiken voor de gevoeligheidsbepaling van *Nocardia* species?

Indien een *Nocardia* species wordt geïsoleerd uit een klinisch staal betreft het meestal een reële infectie.

Kolonisatie van de respiratoire tractus door *Nocardia* species is zeldzaam beschreven en komt dan typisch voor bij patiënten met onderliggend longlijden die geen immunosuppressiva ontvangen [4, 6]. Het uitvoeren van een antibiogram wordt zeer sterk aangeraden gezien de variabele inter- en intra species gevoeligheidspatronen [8,18].

In de meeste laboratoria gebruikte men initieel vooral de disk-diffusie techniek [4]. Gezien de moeilijkheid om bèta-lactamantibiotica, tetracyclines en sulfonamides correct af te lezen bij de disk-diffusie techniek, omwille van vage of partiële zones van inhibitie, spitsen we ons toe op de vergelijking tussen Etest en broth microdilution (BMD) [30].

De Etest is een agar-diffusiemethode die het gemak van disk-diffusietesten combineert met de nauwkeurigheid van een kwantitatief MIC-resultaat van een verdunningstest. Het biedt microbiologische laboratoria mogelijks een alternatieve methode om de gevoeligheidsbepaling voor *Nocardia* species uit te voeren. Volgens de Etest® Application Guide van Biomerieux moet men een Mueller-Hinton agar (MHA) met 5% bloed gebruiken. Het benodigde inoculum bedraagt 1 McFarland en de agar moet gedurende 48-72u geïncubeerd worden bij 35 °C en omgevingslucht.

In 2003 publiceerde CLSI voor het eerst een aanbeveling voor de gevoeligheidsbepaling van aerobe actinomyces [31]. De voorkeursmethode volgens CLSI is broth microdilution (BMD) met een cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB), een inoculum van 0,5 McFarland en een incubatieduur van drie dagen. De primair aanbevolen antibiotica om te testen zijn de volgende: amikacine, amoxicilline-clavulaanzuur, ceftriaxone, ciprofloxacine, clarithromycine, doxyxycline, imipenem, linezolid, minocycline, moxifloxacine, TMP- SMX en tobramycine [4]. Er werden vier artikels gevonden die een vergelijking maakten tussen Etest en BMD. Een overzicht hiervan is terug te vinden in tabel 5.

Tabel 5. Overzicht artikels in verband met gevoeligheidsbepaling Nocardia species [32-35]

studie jaar publicatie	n (aantal stammen)	techniek	inoculum	incubatie		geteste antibiotica	breekpunten
				tijd	temperatuur atmosfeer		
Biehle et al. 1994	52 + 3 ATCC	BMD: NCCLS 1992 M7-A2 Etest: volgens fabrikant (MHA)	BMD: 0,5 McF Etest: 0,5 McF	BMD: 24, 48 & 72u Etest: 72u	35°C omgevingslucht	amikacine, amoxicilline- clavulaanzuur, cefotaxime, ceftriaxone, ciprofloxacine, minocycline, imipenem en TMP- SMX	NCCLS criteria voor aerobe bacteriën: M100-S4
Ambaye et al. 1997	23 + 3 ATCC	BMD: NCCLS 1993 M7-A3 Etest: volgens fabrikant (MHA)	BMD: 0,5-1 McF Etest: 0,5-1 McF	BMD: 72u Etest: 72u	35°C omgevingslucht	amikacine, ampicilline, amoxicilline-clavulaanzuur, ceftriaxone, ciprofloxacine erythromycin, imipenem, minocycline en TMP- SMX	NCCLS criteria voor aerobe bacteriën: M100-S5
Lowman et al. 2010	39 + 4 ATCC	BMD: CLSI 2006 M7-A7 Etest: volgens fabrikant (MHA)	BMD: 0,5 McF Etest: 0,5 McF	BMD: 24, 48 & 72u Etest: 24, 48 & 72u	35°C omgevingslucht	amikacine, amoxicilline- clavulaanzuur, ceftriaxone, ciprofloxacine, claritromycine, imipenem, TMP- SMX en linezolid	NCCLS criteria voor aerobe actinomycetes: M24-A
Brown-Elliot et al. 2016	87 + 4 ATCC	BMD: CLSI 2011 M100-S21 Etest: volgens fabrikant (MHA)	BMD: 0,5 McF Etest: 0,5 McF	onbekend	35°C omgevingslucht	ertapenem, imipenem, meropenem	CLSI criteria voor aerobe actinomycetes: M24-A2

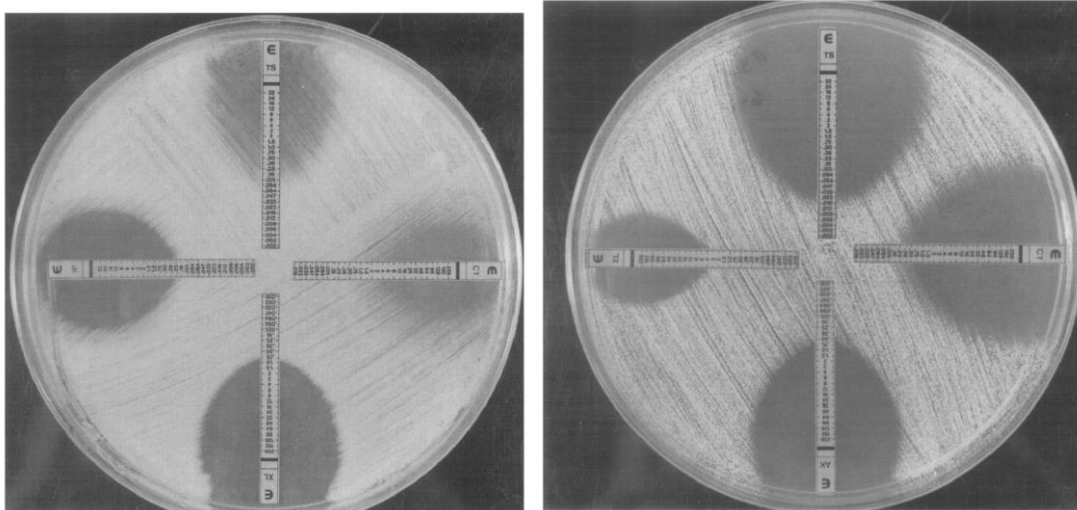
Bij de vergelijking van een nieuwe methode met de gouden standaard moet volgens CLSI voldaan worden aan de volgende criteria [29]:

- categorische en essentiële overeenkomst moeten $\geq 90\%$ zijn
- het aantal VME moet $\leq 3\%$ van het totaal aantal resistente stammen
- het aantal ME moet $\leq 3\%$ van het totaal aantal geteste stammen

Het eerste artikel is van Biehle et al. uit 1994 [32]. Zij gebruikten 52 klinische stammen en testten acht verschillende antibiotica. Parallel met het uitvoeren van de Etest en BMD heeft men in dit artikel een evaluatie gemaakt van de gebruikte inoculum dichtheid (0,5 McFarland). Na seriële verdunning en uitenting bleek dat slechts een gemiddelde kolonie hoeveelheid van $2,0 \times 10^7$ CFU/mL werd bereikt. Dit is belangrijk om te weten omdat de NCCLS procedures een initiële inoculum van $1,0 \times 10^8$ CFU/mL speciëren. Deze hoeveelheid werd alleen maar bereikt indien men de turbiditeit verhoogde tot 1 McFarland.

De inhibitie zones van de Etesten waren in het algemeen goed afgebakend en uniform voor de meeste antibiotica. De aflezing van amoxicilline-clavulaanzuur, ciprofloxacine, imipenem en TMP/SMX werd moeilijker wanneer de inoculum dichtheid meer als 10^8 CFU/mL bedroeg (figuur 2)

De interpretatie van de Etest TMP/SMX (80% inhibitie) was soms zelfs moeilijk bij een inoculum grootte van 10^7 CFU/mL. Deze waarneming is een inherent probleem bij het testen van de gevoeligheid voor TMP/SMX op een Muller-Hinton agar.



Figuur 2. E-test met een inoculum dichtheid van $> 10^8$ CFU/mL (links) en 10^7 CFU/mL (rechts)

De essentiële en categorische overeenkomst (essential and categorical agreement) tussen Etest en BMD bedroegen respectievelijk 89,4% en 96,2%. Er werden geen very major (VME) of major errors (ME) gedetecteerd. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat er maar weinig resistente stammen aanwezig waren in deze studie.

Een tweede artikel van Ambaye et al. (1977) gebruikte 23 klinische stammen en testten 9 antibiotica [33]. De categorische overeenkomst bedroeg in deze studie 96,6%. Er waren vier very major errors (1,8%) dewelke enkel optraden bij amoxicilline-clavulaanzuur (twee) en ceftriaxone (twee) en geen major errors.

Een derde artikel uit 2010 van Lowman et al. geeft een minder rooskleuring beeld over de vergelijking tussen Etest en BMD [34]. Zij hebben 39 klinische stammen gebruikt en 8 antibiotica getest.

De essentiële en categorische overeenkomst bedroegen hier respectievelijk 59,5% (variërend van 46,2-81,6%) en 86,7%. Amikacine, linezolid en TMP- SMX hadden een 100% categorische overeenkomst. De andere antibiotica hadden een categorische overeenkomst variërend van 67,5-90,2%. VME werden gezien bij amoxicilline-clavulaanzuur (11,8%), imipenem (5,6%), claritromycine (3,7%) en ciprofloxacine (3,3%).

ME waren aanwezig bij clarithromycine (33,3%), ceftriaxone (12%) en amoxicilline-clavulaanzuur (5,9%). De resultaten van dit artikel suggereren dan ook dat routinematig gebruik van Etest geen acceptabel alternatief is voor de referentiemethode (BMD) voor gevoeligheidsbepaling van *Nocardia*.

Een vergelijking van deze eerste drie artikels onderling is moeilijk omwille van de verschillende methodologie die gehanteerd werd (vb. inoculum voorbereiding, breekpunten voor aerobe actinomyces pas vanaf 2003 beschikbaar, verschillende *Nocardia* species en antibiotica getest...).

Het laatste en meest recente artikel is van Brown-Elliot et al. uit 2016 [35]. Zij vergeleken de activiteit van drie verschillende carbapenems voor 180 mycobacteriën en 170 *Nocardia* stammen op basis van BMD MIC-waarden. Op een subset van stammen (95/170) voerde men ook Etest uit. In tabel 6 is een vergelijking terug te vinden van de bekomen MIC-waarden voor BMD en E-test voor de species met ≥ 10 isolaten.

Bij de 12 geteste *N. transvalensis* stammen was er een VME in 8% (1/12) voor meropenem en imipenem en een ME in 8% (1/12) voor meropenem wanneer BMD als gouden standaard werd gebruikt. Er was eveneens in 8% van de *N. brasiliensis* isolaten een ME aanwezig. Vier van de 11 (36%) *N. cyriacigeorgica* stammen hadden een ME voor imipenem. Er waren geen VME of ME voor imipenem of meropenem voor het *N. nova complex*.

Tabel 6. Vergelijking van MIC-waarde Etest en BMD voor imipenem, meropenem en ertapenem voor *Mycobacteriën* en *Nocardia* [35]

Species or complex and drug	No. of isolates tested	% error		
		Very major	Major	Minor
<i>M. fortuitum</i>				
Ertapenem	22	5	0	0
Meropenem	22	0	0	86
Imipenem	22	0	5	36
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>				
Ertapenem	44	0	0	0
Meropenem	44	0	0	14
Imipenem	44	0	7	48
<i>M. chelonae</i>				
Ertapenem	13	0	0	0
Meropenem	12	0	0	0
Imipenem	12	0	0	75
<i>N. cyriaci</i> georgica				
Ertapenem	10	0	0	10
Meropenem	10	0	0	20
Imipenem	11	0	36	18
<i>N. nova</i> complex				
Ertapenem	32	0	3	43
Meropenem	31	0	0	9
Imipenem	32	0	0	0
<i>N. brasiliensis</i>				
Ertapenem	13	0	0	31
Meropenem	13	0	8	31
Imipenem	13	0	0	8
<i>N. transvalensis</i> complex				
Ertapenem	12	33	8	17
Meropenem	12	8	8	42
Imipenem	12	8	0	25

Besluit

BMD is de gouden standaard voor de gevoeligheidsbepaling van *Nocardia* species. De vergelijking tussen BMD en Etest op basis van de gegeven literatuur is moeilijk omwille van de beperktheid ervan en het verschil in gebruikte bodems en inoculum ten opzichte van de huidige richtlijnen.

Afgaand op de studie van Lowman et al., die methodologisch de eerste studie was die de CLSI richtlijn omtrent aerobe actinomyces volgde, is Etest geen goed alternatief voor de gevoeligheidsbepaling van *Nocardia* species. Hierbij dient wel de bedenking gemaakt te worden dat er reeds vele retrospectieve studies gepubliceerd zijn die o.b.v. Etest het gevoeligheidspatroon van *Nocardia* species bepaalden.

CAT-vraag 3: Welke methode is het meest geschikt om gevoeligheidsbepaling in UZ Leuven uit te voeren?

Een query werd uitgevoerd van januari 2010 tot januari 2020 om een idee te hebben over het aantal *Nocardia* species identificaties in ons ziekenhuis. Uit deze query blijkt dat het 42 unieke patiënten met nocardiose betreft. Gemiddeld gezien komen er jaarlijks één tot twee aanvragen voor identificatie en/of gevoeligheidsbepaling voor *Nocardia* species vanuit externe laboratoria. Dit brengt het totaal op ongeveer zes identificaties en gevoeligheidsbepalingen per jaar.

Een eerste (tijdelijke) methode is op basis van de identificatie op species niveau. Zoals reeds eerder aangehaald zijn er verschillende *Nocardia* species (-complexen) gekend die een typisch resistentiepatroon vertonen. Gezien de gevoeligheidsbepaling enkele dagen op zich kan laten wachten, is het zinvol te reflecteren op de reeds gestarte empirische behandeling wanneer de identificatie tot op species niveau gekend is. CLSI heeft een overzicht opgemaakt met de verwachte gevoeligheidspatronen van de meest voorkomend geïsoleerde *Nocardia* species (tabel 7) [36].

Deze heb ik vervolgens uitgebreid op basis van meerdere retrospectieve studies [3,18,37-38]. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat sommigen gebruik maakten van Etest en anderen van BMD voor de MIC-waarde bepaling.

Wat betreft de behandeling van nocardiose is er een gebrek aan prospectieve gerandomiseerde studies [3]. De behandeling is complex wegens de lange behandelingsduur, de hiermee gepaard gaande kans op toxiciteit en de mogelijkheid tot falen van therapie en relaps [7]. Omwille van de grote variabiliteit in het gevoeligheidspatroon van de meeste *Nocardia* species wordt er aangeraden om te starten met twee- of driedelige antibioticatherapie in geval van een ernstige infectie [11-12,40-41]. Een associatie van meropenem (of ceftriaxone) en/of amikacine bij co-trimoxazol is dan aangewezen [42]. Het toevoegen van amikacine en een bèta-lactamantibioticum bij co-trimoxazol waarborgt bij deze ernstige infecties dat alle species aan minstens één antibioticum gevoelig zijn. Er zijn, voor zover geweten, geen species resistent aan zowel amikacine als aan een bèta-lactamantibioticum [4].

Uit literatuuronderzoek blijkt dat de volgende antibiotica kunnen overwogen worden op basis van gekende in vitro activiteit tegen *Nocardia* species en retrospectieve studies: co-trimoxazol, carbapenems (imipenem en meropenem), 3^e generatie cefalosporines (ceftriaxone en cefotaxime), amikacine, fluoroquinolones (moxifloxacin en levofloxacin), tetracyclines (minocycline en tigecycline) en linezolid [3].

De BMD methode is, zoals reeds geweten, volgens CLSI de aangewezen manier voor de gevoeligheidsbepaling van *Nocardia* species. Hierop werd gezocht naar commerciële platen die de verschillende antibiotica die klinisch relevant zijn (cfr. supra) bevatten.

Een vergelijking tussen twee commerciële Sensititre™ platen van de firma ThermoFisher toont de volgende verschillen (zie attachment 1 voor de samenstelling van de platen):

- 1) De *Nocardia* en RAPMYCOI plaat bevatten respectievelijk 12 en 15 verschillende antibiotica. De drie extra aanwezige antibiotica op de RAPMYCOI plaat zijn cefoxitine, cefepime en tigecycline. Deze RAPMYCOI plaat kan dan ook gebruikt worden voor de gevoeligheidsbepaling van mycobacteriën.
- 2) De MIC-range is voor alle antibiotica (behalve doxycycline) uitgebreider op de *Nocardia* plaat dan op de RAPMYCOI plaat

Bij nadere inspectie van deze platen blijkt dat imipenem en niet meropenem aanwezig zijn op deze platen. Dit is een belangrijke bevinding aangezien uit de studie van Brown-Elliot et al. blijkt namelijk dat de MIC-waarde van imipenem bekomen door BMD geen consistente voorspeller is voor de gevoeligheid of resistentie voor meropenem en ertapenem (tabel 8). Enkel voor de stammen van het *N. nova*-complex kan dit mogelijks wel van voorspellende waarde zijn. Hieruit volgt dus ook dat meropenem enkel gebruikt mag worden na een in vitro gevoeligheidsbepaling daar het mogelijk is dat stammen gevoelig voor imipenem toch resistent zijn aan meropenem (vb. *Nocardia farcinica*) [11,18,43]

Tabel 8. Vergelijking van MIC50's, MIC90's en percentage isolaten die gevoelig / intermediair zijn voor imipenem, meropenem en ertapenem voor *Nocardia* species door BMD [35]

Complex or species and drug	Intermediate breakpoint (µg/ml)	No. of isolates tested	MIC (µg/ml)			% susceptible/intermediate
			Range	50%	90%	
<i>N. cyriacigeorgica</i>						
Imipenem	8	25	≤1-32	8	>16	60
Meropenem	8	25	4->16	8	>16	68
Ertapenem	4 ^a	26	2->16	8	>16	15
<i>N. nova</i> complex						
Imipenem	8	57	≤0.5-8	≤1	2	100
Meropenem	8	54	≤0.5-16	≤1	4	94
Ertapenem	4 ^a	57	0.5-16	2	4	96
<i>N. abscessus</i>						
Imipenem	8	13	2-32	>16	32	23
Meropenem	8	11	1-8	2	4	100
Ertapenem	4 ^a	13	0.5-4	2	4	100
<i>N. brasiliensis</i>						
Imipenem	8	23	16->32	>16	>32	0
Meropenem	8	23	4->16	>16	>16	48
Ertapenem	4 ^a	23	4->16	>16	>16	26
<i>N. farcinica</i>						
Imipenem	8	19	≤1->16	8	>16	63
Meropenem	8	18	4->16	8	>16	33
Ertapenem	4 ^a	19	4->16	8	16	21
<i>N. transvalensis</i> complex						
Imipenem	8	18	4->32	16	>32	22
Meropenem	8	18	2-16	8	16	83
Ertapenem	4 ^a	18	2->16	>16	>16	22

^a Based on the CLSI breakpoint for bacteria (8).

In kader van de mogelijke aankoop van een commerciële plaat, werd een kosten-baten analyse uitgevoerd. Wat betreft de inkomsten zijn er twee nomenclatuurnummers beschikbaar: 550734/5 en 550874/5. Deze zijn respectievelijk voor de bepaling van de gevoeligheid voor antibacteriële stoffen van aerobe kiemen, andere dan mycobacteriën en de bepaling van de minimale inhiberende concentratie van antibacteriële stoffen bij kiemen geïsoleerd uit bloed of cerebrospinaal vocht, per antibioticum met een maximum van drie. Deze beide nomenclatuurnummers hebben een B-waarde van 400. Dit komt overeen met 12,80 euro indien gefactureerd aan 100%. Een commerciële plaat zou grosso modo 136 euro (incl. btw) kosten. Indien we toch opteren voor het gebruik van Etest zou dit ongeveer 55-64 euro (incl. btw) kosten, uitgaande van de te testen antibiotica die op de commerciële platen beschikbaar zijn.

Besluit

Het is van groot belang om de empirische antibiotica therapie te herbekijken wanneer de identificatie tot op species niveau gekend is. Er is gezien het lage aantal stalen per jaar en de algemeen lage incidentie nood aan één centraal uitvoerend laboratorium in België. Op deze manier is er dan ook de mogelijkheid om expertise op te bouwen in deze complexe materie. Een custom-made plaat is wenselijk aangezien de commerciële platen imipenem bevatten en niet meropenem. Dit is een probleem aangezien de MIC van imipenem een heel beperkte voorspellende waarde heeft voor de gevoeligheidscategorisatie van meropenem. Echter voor het maken van een custom-made plaat bij ThermoFisher moeten grote volumes aangekocht worden.

Tabel 7. Gevoeligheidspatronen van de meest voorkomende pathogene *Nocardia* species op basis van CLSI (M62, eerste editie) en verschillende studies [3,18,36-38]

	N. abscessus	N. brasiliensis	N. cyriacigeorgica	N. farcinica	N. nova complex	N. otitidiscaviarum	N. transvalensis complex
Amikacine (CLSI)	S	S	S	S	S	S	R
Amoxicilline	S	R	R	R	S	R	V
Amoxicilline-clavulaanzuur (CLSI)	S	S	R	S	R	R	V (meestal R)
Ceftriaxone (CLSI)	S	V (meestal R)	S	R	S	R	S
Ciprofloxacine	R	R	R	S	R	S	S
Clarithromycine (CLSI)	R	R	R	R	S	V	R
Imipenem (CLSI)	V	R	S	V (meestal S)	S	R	V (meestal R)
Linezolid (CLSI)	S	S	S	S	S	S	S
Minocycline (CLSI)	V (meestal S)	S	V (meestal R)	V (meestal R)	V (meestal R)	V (meestal R)	V (meestal R)
Moxifloxacine	V (meestal R)	S	R	S	R	V (meestal R)	S
Tigecycline	S	S	V	R	V	X	X
Tobramycine (CLSI)	V (meestal S)	S	S	R	R	V	R
TMP-SMX (CLSI)	S	S	S	S	S	S	S



COMMENTS

TO DO/ACTIONS

- 1) VALIDATIEPLAN OPSTELLEN EN UITVOEREN VOOR COMMERCIËLE OF CUSTOM-MADE PLAAT VOOR DE GEVOELIGHEIDSBEPALING VAN NOCARDIA
- 2) TOEVOEGEN VAN TABEL 9 AAN SOP VAN DE ALGEMENE GEVOELIGHEIDSBEPALINGEN

ATTACHMENTS

Attachment 1: Samenstelling van de ThermoFisher Sensititre™ microdilutie platen voor gevoeligheidsbepaling van Nocardia.

Opmerking kleurencode

- groen: breekpunt voor S
- blauw: breekpunt(en) voor I
- rood: breekpunt voor R

Nocardia plaat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CLA 0.03	CLA 0.06	CLA 0.12	CLA 0.25	CLA 0.5	CLA 1	CLA 2	CLA 4	CLA 8	CLA 16	AUG2 2/1	AUG2 4/2
B	AUG2 8/4	AUG2 16/8	AUG2 32/16	AUG2 64/32	AUG2 128/64	AMI 0.25	AMI 0.5	AMI 1	AMI 2	AMI 4	AMI 8	AMI 16
C	AMI 32	IMI 0.12	IMI 0.25	IMI 0.5	IMI 1	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	IMI 32	AXO 1	AXO 2
D	AXO 4	AXO 8	AXO 16	AXO 32	AXO 64	AXO 128	LZD 0.5	LZD 1	LZD 2	LZD 4	LZD 8	LZD 16
E	MXF 0.015	MXF 0.03	MXF 0.06	MXF 0.12	MXF 0.25	MXF 0.5	MXF 1	MXF 2	MXF 4	MXF 8	MIN 0.06	MIN 0.12
F	MIN 0.25	MIN 0.5	MIN 1	MIN 2	MIN 4	MIN 8	MIN 16	DOX 0.12	DOX 0.25	DOX 0.5	DOX 1	DOX 2
G	DOX 4	DOX 8	DOX 16	TOB 2	TOB 4	TOB 8	TOB 16	TOB 32	SXT 0.06/1.19	SXT 0.12/2.38	SXT 0.25/4.75	SXT 0.5/9.5
H	SXT 1/19	SXT 2/38	SXT 4/76	SXT 8/152	CIP 0.12	CIP 0.25	CIP 0.5	CIP 1	CIP 2	CIP 4	CIP 8	POS

Afkortingen (alfabetische volgorde afkorting)

- AMI: amikacine
- AUG: amoxicilline-clavulaanzuur
- AXO: ceftriaxone
- CIP: ciprofloxacine
- CLA: claritromycine
- DOX: doxycycline
- IMI: imipenem
- LZD: linezolid
- MIN: minocycline
- MXF: moxifloxacine
- SXT: trimethoprim/sulfamethoxazol (co-trimoxazol)
- TOB: tobramycine

RAPMYCOI plaat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SXT 0.25/4.75	SXT 0.5/9.5	SXT 1/19	SXT 2/38	SXT 4/76	SXT 8/152	LZD 1	LZD 2	LZD 4	LZD 8	LZD 16	LZD 32
B	CIP 0.12	CIP 0.25	CIP 0.5	CIP 1	CIP 2	CIP 4	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	IMI 32	IMI 64
C	MXF 0.25	MXF 0.5	MXF 1	MXF 2	MXF 4	MXF 8	FEP 1	FEP 2	FEP 4	FEP 8	FEP 16	FEP 32
D	FOX 4	FOX 8	FOX 16	FOX 32	FOX 64	FOX 128	AUG2 2/1	AUG2 4/2	AUG2 8/4	AUG2 16/8	AUG2 32/16	AUG2 64/32
E	AMI 1	AMI 2	AMI 4	AMI 8	AMI 16	AMI 32	AMI 64	AXO 4	AXO 8	AXO 16	AXO 32	AXO 64
F	DOX 0.12	DOX 0.25	DOX 0.5	DOX 1	DOX 2	DOX 4	DOX 8	DOX 16	MIN 1	MIN 2	MIN 4	MIN 8
G	TGC 0.015	TGC 0.03	TGC 0.06	TGC 0.12	TGC 0.25	TGC 0.5	TGC 1	TGC 2	TGC 4	TOB 1	TOB 2	TOB 4
H	CLA 0.06	CLA 0.12	CLA 0.25	CLA 0.5	CLA 1	CLA 2	CLA 4	CLA 8	CLA 16	TOB 8	TOB 16	POS

Afkortingen (alfabetische volgorde afkorting)

- AMI: amikacine
- AUG: amoxicilline-clavulaanzuur
- AXO: ceftriaxone
- CIP: ciprofloxacine
- CLA: claritromycine
- DOX: doxycycline
- FEP: cefepime
- FOX: cefoxitine
- IMI: imipenem
- LZD: linezolid
- MIN: minocycline
- MXF: moxifloxacine
- SXT: trimethoprim/sulfamethoxazol (co-trimoxazol)
- TIG: tigecycline
- TOB: tobramycine