

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



**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN DİFTERİ DİŞİ  
KORİNEFORM BAKTERİLERİN İDENTİFİKASYONU,  
ANTİBİYOTİK DİRENÇ PATERİNİNİN VE BİYOFİLM  
OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. HATİCE ER**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. İLKNUR KALELİ**

**DENİZLİ- 2023**

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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN DİFTERİ DİŞİ  
KORİNEFORM BAKTERİLERİN İDENTİFİKASYONU,  
ANTİBİYOTİK DİRENÇ PATERİNİN VE BİYOFİLM  
OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİDR.**

**HATİCE ER**

**DANIŞMAN PROF.DR. İLKNUR  
KALELİ**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 23.06.22 tarih ve 2022TIPF019 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ- 2023**

## TEŞEKKÜR

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, koşulsuz şartsız arkamda duran canım annem merhume Elmas ER'e, canım babam Durmuş Ali ER'e ve canım ablalarım;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlere aktaran başta tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlknur KALELİ hocam başta olmak üzere, hocalarımız Prof. Dr. Melek DEMİR, Prof. Dr. Çağrı ERGİN, Doç. Dr. Ahmet ÇALIŞKAN, Doç. Dr. Sedef Zeliha ÖNER, Doç. Dr. Ergun METE ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ŞENGÜL'e;

Tezimin moleküler çalışmalarında yardımcı olan Doç. Dr. Ahmet ÇALIŞKAN hocamıza, kontrol suş temin etmemi sağlayan Dr. Elisabet GUİRAL-VİLALTA'ya;

Yolumuzun patolojide kesiştiği ve iyi ki dediğim, her zaman ve her şartta yanımda olan sevgili dostlarım Dr. Hayriye CANİK YAŞAR ve Dr. Duygu AKÇA'ya;

Asistanlık hayatım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Büşra DÖNMEZ, Dr.

Saniye KÜÇÜKAKIN YAKA, Dr. Gözde Gülcan ÜNAL, Dr. Hatice GELDİ ÖZDEMİR, Dr. Betül AYDIN, Dr. Sena UZAN, Dr. Esra KARADAY, Dr. Nilay GENÇ, Dr. Merve GÜNAY, Dr. Burhan ÖZKAN, Dr. Mehmet ATÇA ve Dr. Deniz DERELİ'ye;

Berber çalıştığımız laboratuvar ekibi arkadaşlarımıza;

Teşekkürlerimi sunarım.

**Dr. Hatice ER**

**Denizli, 2023**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
KISALTMALAR .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ .....	X
ÖZET.....	XI
İNGİLİZCE ÖZET.....	XIII
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
Tarihçe.....	3
Taksonomi .....	3
Mikrobiyolojik özellikler.....	4
Kültürel özellikler.....	5
Tanımlama .....	5
Manuel tanımlama sistemleri .....	8
Otomatize sistemler .....	9
Moleküler yöntemler .....	12
Pulsed field jel elektroforez (PFGE) .....	14
Antibiyotik duyarlılık testleri .....	18
Bazı <i>Corynebacterium</i> türlerinin klinik özellikleri .....	18
<i>Corynebacterium striatum</i> .....	19
<i>Corynebacterium afermentans</i> .....	20
Antimikrobiyal direnç mekanizmaları.....	21
Beta-laktam direnci.....	21
Makrolid, Linkozamid, Streptogramin B (MLS <sub>B</sub> ) direnci.....	22
Kinolon direnci .....	23
Aminoglikozid direnci.....	25

Tetrasiklin direnci .....	26
Biyofilm oluşumu .....	27
GEREÇ VE YÖNTEM .....	29
BULGULAR .....	39
TARTIŞMA .....	60
SONUÇLAR .....	91
KAYNAKLAR .....	94



## **KISALTMALAR**

**AAC:** Asetiltransferaz

**AFLP:** Amplified fragment length polymorphism

**ANF:** Absolute non-fermenting

**ANT:** Adeniltransferaz

**APH:** Fosfotransferaz

**AP-PCR:** Arbitrarily primed PCR

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BHI:** Brain-heart infüzyon

**Bp:** Baz çifti

**BSAC:** British Society for Antimicrobial Chemotherapy

**CAMP:** Christie, Atkins, Munch-Petersen

**CDC:** Centers for Disease Control and Prevention

**CHEF:** Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**DNA:** Deoksiribonükleik Asit

**dNTP:** Deoksinükleotid Trifosfat

**EDTA:** Etilendiamin tetraasetik asit

**EUCAST:** The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**GLU:** Glukoz

**LMA:** Low melting agarose

**MAL:** Maltoz

**MALDI-TOF MS:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of flight Mass Spectrometry

**MAN:** Mannitol

**MH-F:** Mueller-Hinton Fastidious agar

**MİK:** Minimum İnhibitör Konsantrasyon

**MLS<sub>B</sub>:** Makrolid-linkozamid-streptogramin B

**MLST:** Multilocus sequence typing

**β-NAD:** Nikotinamid adenin dinükleotid

**NDC:** Non-diphtheritic *Corynebacterium*

**OD:** Optik dansite

**PAL:** Alkalen fosfotaz  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**PFGE:** Pulsed Field Gel Electrophoresis  
**PYZ:** Pirazinamidaz  
**QRDR:** Quinolone resistance-determining region  
**RAPD:** Random Amplified Polimorphic DNA  
**RE:** Restriksiyon enzimi  
**rep-PCR:** Repetitive Extragenic Palindromic-PCR  
**RFLP:** Restriction fragment length polymorphism  
**rpm:** Revolutions per Minute  
**rpoB:** B-subunit of the DNA-dependent RNA polymerase  
**SDS:** Sodyum dodezil sülfat  
**SUC:** Sükroz  
**TA:** Trakeal aspirat  
**TBE:** Tris-Borik asit-EDTA  
**TE:** Tris-EDTA  
**XYL:** Ksiloz  
**YBÜ:** Yoğun bakım ünitesi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1</b> <i>Corynebacterium</i> izolatlarının tür dağılımı .....	40
<b>Şekil 2</b> <i>bla</i> geni jel görüntüsü .....	48
<b>Şekil 3</b> <i>ampC</i> geni jel görüntüsü.....	49
<b>Şekil 4</b> <i>aac(3)-XI</i> geni jel görüntüsü.....	50
<b>Şekil 5</b> <i>aphA1</i> geni jel görüntüsü.....	51
<b>Şekil 6</b> <i>ermX</i> geni jel görüntüsü.....	52
<b>Şekil 7</b> <i>gyrA</i> geni jel görüntüsü.....	53
<b>Şekil 8</b> <i>tetA</i> geni jel görüntüsü.....	54
<b>Şekil 9</b> Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plağındaki görüntüsü.....	55
<b>Şekil 10</b> <i>XbaI</i> ile kesilen izolatların genomik DNA bant görüntüleri.....	58
<b>Şekil 11</b> Tüm izolatların PFGE bant profilleri ve patern dağılımı.....	59

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b> Tanımlamada kullanılan fenotipik testler.....	7
<b>Tablo 2</b> Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki çalışma basamakları .....	14
<b>Tablo 3</b> Moleküler tiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması.....	17
<b>Tablo 4</b> <i>Corynebacterium</i> türleri.....	19
<b>Tablo 5</b> PCR Karışımı .....	33
<b>Tablo 6</b> Amplifikasyon koşulları .....	33
<b>Tablo 7</b> Direnç genlerine ait primer dizileri, beklenen bant büyüklükleri ve bağlanma ısıları .....	34
<b>Tablo 8</b> PFGE koşulları .....	37
<b>Tablo 9</b> <i>Corynebacterium</i> 'ların izole edildiği klinik örneklerin dağılımı .....	40
<b>Tablo 10</b> Klinik birimlerden gönderilen örneklerin sayı ve oranları.....	41
<b>Tablo 11</b> Örneklerin klinik birimlere göre dağılımı .....	42
<b>Tablo 12</b> Klinik örneklerin türlere göre dağılımı .....	42
<b>Tablo 13</b> Tüm izolatların antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları .....	43
<b>Tablo 14</b> <i>C. striatum</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları .....	44
<b>Tablo 15</b> <i>C. afermentans</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları.....	45
<b>Tablo 16</b> Tüm izolatların direnç geni oranları.....	46
<b>Tablo 17</b> <i>C. striatum</i> izolatlarının direnç geni oranları .....	46
<b>Tablo 18</b> <i>C. afermentans</i> izolatlarının direnç geni oranları.....	47
<b>Tablo 19</b> İzolatların biyofilm oluşturma oranları .....	54
<b>Tablo 20</b> İzolatların biyofilm oluşturma durumları.....	55
<b>Tablo 21</b> Biyofilm üreten suşlarda antimikrobiyal direnç oranları .....	56

## ÖZET

### **Klinik örneklerden izole edilen difteri dışı korineform bakterilerin identifikasyonu, antibiyotik direnç paterninin ve biyofilm oluşumunun araştırılması**

Dr. Hatice ER

*Corynebacterium* cinsine ait bakteriler; *Corynebacterium diphtheriae* ve non-difterik korineform bakteriler (NDC) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Önceki yıllarda laboratuvar kontaminantları olarak değerlendirilen non-difterik korineform bakterilerin (NDC) yapılan son çalışmalarda önemli hastane enfeksiyon etkeni olabilecekleri ve bu bakterilerin birçok antimikrobiyal ajana dirençli oldukları gösterilmiştir. Ciddi enfeksiyonlarda artan oranda NDC'lerin görülmesi bunların potansiyel patojenler olarak tanınmasını gerekli kılmaktadır.

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Aralık 2020-Ocak 2023 tarihleri arasında, klinik birimlerden gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen NDC'lerin tür düzeyinde identifikasyonları ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması, antibiyotik direnç paternlerinin incelenmesi, suşların moleküler epidemiyolojisinin ve biyofilm oluşumlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Tüm izolatlar MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. İzolatların %94,3'ü *C. striatum* ve %5,7'si *C. afermentans* olarak tanımlanmıştır. İzolatların %15'i kan, %5'i kateter içi kan, %34,3'ü yara, %32,9'u trakeal aspirat (TA), %7,9'u balgam, %2,9'u abse materyali ve %2,1'i pleural sıvı örneklerinden izole edilmiştir. En sık izole edilen klinik örnek yara (%34,3), ikinci en sık klinik örnek trakeal aspirat (%32,9) iken; en az izole edilen klinik örnek ise %2,1 ile pleural sıvı örneği olmuştur. EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) rehberi doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarına göre izolatların tamamı linezolid ve vankomisine duyarlı iken tamamı siprofloksasine dirençli bulunmuştur. İzolatların %98,6'sı penisiline, %96,4'ü klindamisine, %99,3'ü rifampisin ve tetrasikline, %88,6'sı gentamisine ve %75,7'si

eritromisine dirençli bulunmuştur. İzolatlarda direnç genlerinin varlığı PCR (Polymerase Chain Reaction) ile araştırılmıştır. İzolatların %94,3'ünde *bla* geni, %95'inde *ampC* geni, %95,7'sinde *ermX* geni, %90'nında *aac(3)-XI* geni, %92,1'inde *aphA1* geni, %97,9'unda *gyrA* geni ve %32,9'unda *tetA* geni tespit edilmiştir. *ermB* ve *tetB* genleri izolatların hiçbirinde tespit edilmemiştir. *aac(3)-XI* ve *aphA1* geni pozitif olan izolatlarda anlamlı bir şekilde gentamisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). *ermX* geni pozitif olan izolatlarda anlamlı bir şekilde eritromisin ve klindamisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İzolatlarda *tetA* geni pozitifliği ile tetrasiklin direnç oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). *bla/ampC* geni pozitifliği ile penisilin direnç oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). İzolatların biyofilm oluşturmaları mikrotitrasyon plak yöntemi ile semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. İzolatların %26,4'ünde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. *Corynebacterium* türleri ile biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Çalışmadaki 140 suşun klonal ilişkisi PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) yöntemi ile araştırılmıştır. 140 suş 46 farklı PFGE paterni göstermiştir. Bu paternlerden 13 tanesi yalnızca birer suş içermektedir. Kalan 33 patern ise küme oluşturan suşları içermekte olup küme genişliği 2-12 arasında değişmektedir. Kümeleşme oranı %90,7 olarak saptanmıştır. En büyük küme; 12 izolatın yer aldığı A ile kodlanan kümedir.

Çalışmamızdaki izolatların çoklu ilaç direncine sahip olmaları ve antimikrobiyal direnç oranlarının yüksek olması nedeniyle bu mikroorganizmalara bağlı gelişen hastane enfeksiyonlarının tedavi stratejisinin zor olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle bu mikroorganizmaların hastane enfeksiyon etkeni olabileceği göz önünde bulundurularak aktif sürveyans çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Difteri dışı korineform bakteriler, antimikrobiyal direnç, biyofilm, klonal ilişki

## SUMMARY

### **Identification, research of antibiotic resistance pattern and biofilm formation of non-diphtheria coryneform bacteria isolated from clinical specimens**

Dr. Hatice ER

Bacteria belonging to the genus *Corynebacterium* are divided into two as *Corynebacterium diphtheriae* and non-diphtheric coryneform bacteria (NDC). Non-diphtheric coryneform bacteria (NDC), which were considered laboratory contaminants in previous years, have been shown in recent studies to be important causative agents of nosocomial infections and that these bacteria are resistant to many antimicrobial agents. The increasing incidence of NDCs in serious infections makes it necessary to recognize them as potential pathogens.

In this study, it was aimed to determine the species level identification and antibiotic susceptibility tests, antibiotic resistance patterns, molecular epidemiology and biofilm formation of NDCs isolated from various clinical samples sent from clinical units to Pamukkale University Medical Faculty Research and Application Hospital Medical Microbiology Laboratory between December 2020 and January 2023.

All isolates were identified to species level by MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry). 94,3% of the isolates were identified as *C. striatum* and 5,7% as *C. afermentans*. 15% of the isolates were isolated from blood, 5% from intra-catheter blood, 34,3% from wound, 32,9% from tracheal aspirate (TA), 7,9% from sputum, 2,9% from abscess material and 2,1% from pleural fluid samples. The most frequently isolated clinical sample was wound (34,3%), the second most frequently isolated clinical sample was tracheal aspirate (32,9%), while the least frequently isolated clinical sample was pleural fluid sample with 2,1%. Antimicrobial susceptibilities were determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method and evaluated according to the criteria of EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) guidelines. All of the isolates were susceptible to vancomycin and linezolid, while all of them were resistant to ciprofloxacin. The isolates were resistant to penicillin (98,6%), clindamycin (96,4%), rifampicin and tetracycline (99,3%), gentamicin (88,6%) and erythromycin (75,7%), respectively. Drug-resistant genes were investigated by PCR (Polymerase Chain

Reaction). The presence of *bla* gene was detected in 94,3% of the isolates, *ampC* gene in 95%, *ermX* gene in 95,7%, *aac(3)-XI* gene in 90%, *aphA1* gene in 92,1%, *gyrA* gene in 97,9% and *tetA* gene in 32,9%. The *ermB* and *tetB* genes were not detected in any of the isolates. Gentamicin resistance rate was significantly higher in isolates with positive *aac(3)-XI* and *aphA1* genes ( $p < 0.05$ ). Erythromycin and clindamycin resistance rates were significantly higher in *ermX* gene positive isolates ( $p < 0.05$ ). No significant difference was found between *tetA* gene positivity and tetracycline resistance rate in isolates ( $p > 0.05$ ). No significant difference was found between *bla/ampC* gene positivity and penicillin resistance rate ( $p > 0.05$ ). Biofilm formation of the isolates were detected semi-quantitatively by microtiter plate method. Biofilm formation was detected in 26,4% of the isolates. No statistically significant difference was found between *Corynebacterium* species and biofilm formation ( $p > 0.05$ ). The clonal relationship of 140 strains in the study were investigated by PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) method. *XbaI* digestion of the 140 *Corynebacterium* isolates revealed 46 distinct PFGE patterns. 13 of these patterns include only one strain. The remaining 33 patterns include cluster-forming strains, with cluster width ranging from 2-12. The clustering rate was found to be 90,7. The largest cluster is the cluster coded A, which includes 12 isolates.

It is thought that the treatment strategy of nosocomial infections due to these microorganisms will be difficult because the isolates in our study have multidrug resistance and have high antimicrobial resistance rates. Therefore, it is important to carry out active surveillance studies considering that these microorganisms may be nosocomial infection agents.

**Keywords:** Non-diphtheria corineform bacteria, antimicrobial resistance, biofilm, clonal relationship

## GİRİŞ VE AMAÇ

*Corynebacterium* kelimesi; Yunanca lobut anlamında “coryne” ve küçük çomak anlamında “bacterion” kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur ve küçük, lobut şeklinde çomak anlamındadır (1, 2).

*Corynebacterium* cinsinin bakterileri, genel olarak “aerobik aktinomisetler” olarak da bilinen, CMN grubu adı verilen *Corynebacteriaceae*, *Mycobacteriaceae* ve *Nocardiaceae* familyalarının üyelerini içeren, *Actinobacteria* sınıfına aittir (3).

*Corynebacterium* cinsi, ilk olarak 1896 yılında Lehmann ve Neumann tarafından tanımlanmıştır (4, 5). *Corynebacterium* cinsi, *Corynebacterium diphtheriae* ve non-difterik korineform bakteriler (NDC) olmak üzere ikiye ayrılır (6, 7). İnsan cilt ve mukoz membranlarının kommensal florasında ve çevrede (toprak ve su) yaygın olarak bulunmaktadır (8, 9). *Corynebacterium* cinsi; patojenik, fırsatçı, patojenik olmayan çevresel ve saprofitik türleri içerir (5, 10). *Corynebacterium* cinsi içinde şu ana kadar 239 tür ve 16 alt tür tanımlanmıştır. Bu türlerin yarısına yakını insanlarda enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir (11).

Önceki yıllarda non-difterik korineform bakteriler (NDC) insan klinik örneklerinden sıklıkla izole edilmişler ve çoğu zaman laboratuvar kontaminantları olarak değerlendirilip göz ardı edilmişlerdir (12). Ancak son yıllarda, *Corynebacterium* cinsinin klasik patojeni olan *C. diphtheriae* dışındaki birçok türün yüzeysel ve invaziv enfeksiyonlarda rol oynadığı çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (13). NDC’lerin patojenitesi hala tartışma konusu olmasına rağmen, bakteriyemi, sepsis, endokardit, yara yeri enfeksiyonu, protez cihazlarla ilişkili enfeksiyonlar, osteomyelit, septik artrit, sinovit, keratit, konjunktivit, peritonit, beyin absesi, menenjit, solunum yolu ve üriner sistem enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlarda rol aldığını gösteren çok sayıda çalışma rapor edilmiştir (14, 15).

Enfeksiyonlara neden olan *Corynebacterium* türlerinin önemli bir özelliği, yapay yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yetenekleridir. İntravenöz biyomateryalin yüzey kolonizasyonu ile kan dolaşımı enfeksiyonuna, idrar yolu enfeksiyonlarına, implant yüzeyiyle ilişkili enfeksiyonlara veya entübasyon sonucu solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilir (16). *Corynebacterium striatum* başta olmak üzere *Corynebacterium jeikeum*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium afermentans*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium propinquum* ve *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* türleri artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (17, 18).

Son yıllarda tanı ve tedavi imkanlarının artması, hastanede yatış sürelerinin uzaması, immünespresif hasta sayısının artması, uygulanan invaziv işlemlerin ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının artması nedeniyle *Corynebacterium* türlerinin fırsatçı enfeksiyon etkeni olabileceği ve patojenik potansiyellerinin göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır (18, 19).

Hem ülkemizde hem de dünya çapında yapılan çalışmalarda NDC'lerin önemli hastane enfeksiyon etkeni olabilecekleri ve bu bakterilerin birçok antimikrobiyal ajana dirençli oldukları gösterilmiştir (20-24). Ciddi enfeksiyonlarda artan oranda NDC'lerin görülmesi bunların potansiyel patojenler olarak tanınmasını gerekli kılmaktadır (14). *Corynebacterium* türlerinde gelişmekte olan antibiyotik direnci, bu bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasını ve antimikrobiyal direnç paternlerinin gösterilmesini gerekli kılmaktadır.

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına klinik birimlerden gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen NDC'lerin tür düzeyinde identifikasyonları ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması, antibiyotik direnç paternlerinin incelenmesi ve suşların moleküler epidemiyolojisinin ve biyofilm oluşumlarının araştırılması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### Tarihçe

Klebs-Löffler basili olarak bilinen *C. diphtheriae* ilk keşfedilen *Corynebacterium* türü olup, keşfi 1880'lere dayanmaktadır. 1883-84 yıllarında Alman bakteriyologlar Edwin Klebs ve Friedrich Loeffler tarafından keşfedilmiş ve saf kültür ile izole edilmiştir (25). 1896 yılında ise Lehmann ve Neumann tarafından *Corynebacterium* cinsi tanımlanmıştır. Difteri basiline morfolojik olarak benzeyen non-difterik korineform (NDC) bakterileri bu cins içine dahil etmişlerdir (4).

İnsan klinik örneklerinden izole edilen NDC'ler, çoğu zaman laboratuvar kontaminantları olarak değerlendirilip göz ardı edilmiştir (12, 14). Dannie G. Hollis ve Robert E. Weaver klinik örneklerden izole edilen tüm korineform bakterileri sistematik olarak inceleyen ilk kişilerdir. Gram pozitif çomakların tanımlanmasına yönelik oluşturdukları rehber, klinik izolatları tanımlamak için önemli bir kaynak olmuştur ve korineform bakteriler üzerinde yapılan taksonomik çalışmaların da temelini oluşturmuştur (26).

### Taksonomi

Genel olarak "aerobik aktinomisetler" olarak bilinen Gram pozitif basiller grubu, Actinobacteria sınıfında Actinobacteria alt sınıfındaki Actinobacteria filumuna ait heterojen bir gruptur ve taksonomik olarak farklı cinslerden oluşur (3). *Corynebacterium* cinsine ait bakteriler, CMN grubu adı verilen *Corynebacteriaceae*, *Mycobacteriaceae* ve *Nocardiaceae* familyalarının üyelerini içeren Actinobacteria sınıfına aittir (27, 28). Lehmann ve Neumann (1896) tarafından tanımlanan *Corynebacterium* cinsi, Actinobacteria sınıfı, Actinomecetales takımı ve Corynebacteriaceae familyasına aittir (15).

Difteroidler olarak adlandırılan *Corynebacterium* cinsi; *C. diphtheriae* ve non-difterik korineform bakteriler (NDC) olmak üzere ikiye ayrılır (6). Bu cins içinde en önemlisi insanlarda difteri hastalığına neden olan *C. diphtheriae*'dir. Etkili aşılama programları sayesinde son 50 yılda *C. diphtheriae* ile ilişkili enfeksiyon vakaları yok

denecek kadar azalmıştır (26, 29). İnsan klinik örneklerinden izole edilen NDC'ler, çoğu zaman laboratuvar kontaminantları olarak değerlendirilmiştir ve patojenik potansiyelleri uzun yıllar göz ardı edilmiştir (12, 26).

1970-80'li yıllarda, *Corynebacterium* cinsini belirlemek ve sınırlarını yeniden çizmek için kemotaksonomik belirteçler (hücre duvarı, lipid ve DNA baz kompozisyonu) kullanılmıştır. Bazı *Corynebacterium* türleri diğer cinslere ve daha önce başka cinslerde bulunan diğer türler ise *Corynebacterium* cinsinin içine dahil edilmiştir (30, 31). Son yıllarda, çok sayıda yeni *Corynebacterium* türü izole edilmiş ve sınıflandırılmıştır. Artık klasik kemotaksonomik belirteçlere (peptidoglikan analizi, hücresel yağ asit analiz çalışmaları, menakinon karakterizasyonu) ek olarak filogenetik çalışmalar da (esas olarak 16S rRNA *rpoB* gen sekans analizleri) sınıflandırma için rutin olarak kullanılmaktadır (31).

*Corynebacterium* cinsi içinde şu ana kadar 239 tür ve 16 alt tür tanımlanmıştır. Bu türlerin yarısına yakını insanlarda enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir (11).

### **Mikrobiyolojik özellikleri**

*Corynebacterium* cinsine ait bakteriler; aerobik veya fakültatif anaerobik, katalaz pozitif, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, düzensiz boyanma ve metakromatik granül oluşturma özelliğine sahip, 2-6 µm uzunluğunda ve 0,5 µm çapında, gram pozitif pleomorfik, lobut şekilli çomaklardır. Hücre duvarlarında arabinoz, galaktoz, A1γ tipinde meso-diaminopimelik asit, 22-36 karbonlu kısa zincirli mikolik asitler (korinomikolik asit), doymuş ve doymamış yağ asitleri (palmitik, oleik, stearik asitler) ve bazı türlerde değişen miktarlarda tüberkülostearik asit bulunur. *Corynebacterium* cinsi aside dirençli değildir. *Corynebacterium* türlerinin kinon sistemlerinde, sekiz [MK-8(H2)] ve/veya dokuz [MK-9(H2)] izopren birimine sahip dihidrojene menakinonlar mevcuttur. İki tür dışında, *Corynebacterium* türlerinin genomik DNA'sının G+C (guanin+sitozin) içeriği %51-68 arasında değişir. G+C içeriği *Corynebacterium kutscheri*'de %46 ve *Corynebacterium auris*'te ise %74 olduğu bildirilmiştir (5, 32). 4 tür dışında (*Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium*

*aurimucosum*, *Corynebacterium doosanense* ve *Corynebacterium maris*) diğer türler oksidaz negatiftir (33, 34).

*Corynebacterium* türlerinin mikroskopik görüntüsü; tek tek ya da çiftler halinde dizilim gösteren, paralel hücre sıraları halinde veya tamamen ayrılmamış V şeklinde, bazen uçları biraz daha geniş, “bahçe çiti” veya “Çin harfi” şeklinde tokmak benzeri çomaklar şeklinde görülmektedir (30, 35, 36).

### **Kültürel Özellikleri**

*Corynebacterium* cinsine ait türler; 35-37°C’de CO<sub>2</sub>’li veya CO<sub>2</sub>’siz ortamda, %5 koyun kanlı agar ve çikolatamsı agarda, genellikle 18-24 saatlik inkübasyonun ardından belirgin S tipi düzgün, bazen pürüzlü, beyaz-krem rengi koloniler oluştururlar. Bazı türlerin üreme süresi 48-72 saate kadar uzayabilmektedir. Tür ayırımında koloni büyüklüğü, pigmentasyon ve hemoliz varlığı önemlidir (34). Klinik örneklerden izole edilen türlerin kültürü için rutin olarak %5 at veya koyun kanlı agar ve çikolata agar kullanılmakla birlikte *C. urealyticum* ve *C. jeikeium* gibi zor üreyen türlerin üremesini kolaylaştırmak için Columbia “colistin-nalidixic acid agar” (CNA), beyin-kalp infüzyon agar, triptik soy agar, sistin-tellurit, fosfomisin veya tween 80 (%0,1-1) içeren kanlı agar da kullanılır (37).

### **Tanımlama**

*Corynebacterium* türlerinin tanımlamasında kullanılan en temel testler arasında; Gram boyama ve hücre morfolojisi, koloni morfolojisi, boyutu ve kokusu, pigmentasyon varlığı, üreme süresi ve miktarı, hemoliz varlığı, CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) reaksiyonu, lipofili ve motilite varlığı yer alır (38). Bu testlere ek olarak; katalaz ve üreaz üretimi, pirazinamidaz ve alkalin fosfataz varlığı, nitrat redüksiyonu, eskülin ve jelatin hidrolizi, fermentatif veya oksidatif metabolizma, karbohidratlardan (glukoz, sukroz, maltoz, laktoz, mannitol ve ksiloz) asit üretimi gibi biyokimyasal testler de tanımlamada kullanılır (33, 38).

Dannie G. Hollis ve Robert E. Weaver klinik örneklerden izole edilen korineform bakterileri sistematik olarak ilk kez 1981 yılında, CDC (Centers for

Disease Control and Prevention) Özel Bakteriyoloji Laboratuvarlarında incelemiş ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanabilecek pratik ve güvenilir bir sistem olan “Gram Pozitif Basilleri Tanımlama Algoritması” geliştirmiştir. Bu algoritma, klinik izolatları tanımlamak için çok değerli bir kaynak olarak kullanılmış, aynı zamanda korineform bakteriler için sonraki taksonomik araştırmaların temelini oluşturmuştur. Geliştirilen bu algoritmaya göre katalaz; üreaz; glikoz, maltoz, sükroz, mannitol fermentasyonu; eskülin hidrolizi; jelatin hidrolizi; nitrat redüksiyonu; hareket; pigment oluşumu; CAMP reaksiyonu gibi özellikler tanımlamada kullanılmıştır (33) (Tablo 1).

Bu biyokimyasal testler modifiye edilerek *Corynebacterium* türlerinin tanımlaması için manuel biyokimyasal tanımlama sistemleri geliştirilmiştir. API Coryne (BioMérieux, Fransa), BBL Crystal Gram Positive ID System (Becton Dickinson, ABD), RapID CB Plus (Remel/ThermoFisher Scientific, ABD), MICRONAUT-RPO (Merlin Diagnostics, Almanya) gibi biyokimyasal testlere dayalı çeşitli manuel tanımlama sistemleri *Corynebacterium* türlerinin laboratuvar tanısını kolaylaştırmıştır. Bu sistemler çeşitli enzimatik ve karbonhidrat fermentasyon testlerinden oluşmaktadır (38).

*Corynebacterium* türlerinin tanımlamasında otomatize sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Piyasada bulunan sistemler biyokimyasal reaksiyonlar, yağ asidi analizi, DNA sekanslama gibi farklı yaklaşımlara dayanmaktadır. BD Phoenix System (Becton Dickinson, Hindistan), VITEK 2 (BioMérieux, ABD), Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu-kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS), MicroSeq Mikrobiyal Tanımlama Sistemi (Applied Biosystems, ABD) ve Biolog Mikrobiyal Tanımlama Sistemleri (Biolog Inc., ABD) piyasadaki otomatize tanımlama sistemleridir (38).

**Tablo 1.** *Corynebacterium* türlerinin tanımlanmasında kullanılan fenotipik testler (33)

Tür	F/O	Lipofilim	Nitrat	Üreaz	Eskülin hidrolizi	PYZ	PAL	ASİT ÜRETİMİ					CAMP
								GLU	MAL	MAN	SUC	XYL	
<i>C. striatum</i>	F	-	D	-	-	+	+	+	-	-	D	-	D
<i>C. urealyticum</i>	O	+	-	+	-	+	D	-	-	-	-	-	-
<i>C. xerosis</i>	F	-	D	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>C. ulcerans</i>	F	-	-	+	-	-	+	+	+	D	-	-	D
<i>C. jeikeium</i>	O	+	-	-	-	+	+	+	D	-	-	-	-
<i>C. amycolatum</i>	F	-	D	D	-	+	+	+	D	-	D	-	-
<i>C. macginleyi</i>	F	+	+	-	-	-	+	+	-	D	+	-	-
<i>C. matruchotii</i>	F	-	+	-	D	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>C. minutissimum</i>	F	-	-	-	-	+	+	+	+	-	D	-	-
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	O	-	+	+	-	+	D	-	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	F	-	D	+	-	-	D	+	+	-	D	-	D
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>	O	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	D
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>lipophilum</i>	O	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	D

F: Fermentasyon, O: Oksidasyon, PYZ: Pirazinamidaz, PAL: Alkalen fosfotaz, GLU: Glukoz, MAL: Maltoz, SUC: Sükroz, MAN: Mannitol, XYL: Ksiloz, CAMP: Christie, Atkins, Munch-Petersen, D: Değişken

### **Manuel tanımlama sistemleri (Konvansiyonel yöntemler)**

API Coryne tanımlama sistemi; 11 enzimatik test (pirazinamidaz, pirolidonil arilamidaz,  $\beta$ - galaktosidaz, alkalın fosfataz,  $\alpha$ -glukozidaz, N-asetilglukozaminidaz,  $\beta$ -glukuronidaz, nitrat redüksiyonu, üre, jelatin ve eskülin hidrolizi), 8 karbonhidrat fermentasyon testi (glikoz, riboz, D-ksiloz, mannitol, maltoz, laktoz, sükroz ve glikojen) ve bir fermentasyon kontrol testinden oluşan 20 mikrotüp içermektedir. 24 saatlik inkübasyondan sonra sonuç verir. 26 tane *Corynebacterium* türünün tanımlanmasını sağlar (38-43).

BBL Crystal Gram Positive ID System ve BBL Crystal Rapid Gram Positive ID System, 20 enzimatik ve 9 karbonhidrat fermentasyon testi içerir. BBL Crystal Gram Positive ID System 18–24 saatlik ve BBL Crystal Rapid Gram Positive ID System ise 4 saatlik inkübasyondan sonra sonuç verir. BBL Crystal Gram Positive ID System veri tabanı 13 tane ve BBL Crystal Rapid Gram Positive ID System veri tabanı 7 tane *Corynebacterium* türünün tanımlanmasına olanak sağlar (38).

RapID CB Plus sistemi 15 enzimatik ve 4 karbonhidrat fermentasyon testinden oluşur. Sistem 4 saatlik inkübasyondan sonra sonuç verir. 23 tane *Corynebacterium* türünü tanımlar. Bazen RapID CB Plus sisteminde enzimatik reaksiyonların okunması API Coryne sistemine kıyasla soluk gölgelerin oluşmasından dolayı daha zor olabilir. Karbonhidrat fermentasyon reaksiyonlarının okunması her iki sistemde de bazen zordur. Her iki sistemin dezavantajı yoğun inokulum (RapID CD Plus sistemi için McFarland no. 4 ve API Coryne sistemi için McFarland no. 6) gerektirmeleridir. Bu nedenle, korineform bakterileri doğrudan primer büyüme plaklarından tanımlamak genellikle imkansızdır (38, 44, 45).

API Coryne, RapID CB Plus ve BBL Crystal sistemleri karşılaştırıldığında, en duyarlı testin API Coryne sistemi olduğunu ortaya koyulmuştur. Ancak yine de tüm *Corynebacterium* izolatları sistem tarafından tanımlanamamıştır ve bazı izolatlar yanlış tanımlanmıştır. Tanımlamadaki başarısızlık, sistemin veri tabanının sınırlı sayıda olması ile ilişkilidir. Nadir görülen veya yakın zamanda tanımlanan türler, her zaman sistemin tanımlama matriksine dahil edilemez. Böyle bir izolat, veri tabanı

içindeki en yakın fenotipik modelle eşleştğinde hatalı tanımlama meydana gelebilir. Bazı durumlarda ise fenotip, belirli bir türün suşları arasında değişiklik gösterebilir. Bir izolat yavaş büyüdüğünde ve biyokimyasal olarak inert olduğunda ek zorluklar ortaya çıkmış olabilir. İzolattan yeterli inokulum elde etmek zor olabilir ve ayırt edilmesi zor olan zayıf biyokimyasal reaksiyonlara neden olabilir (38, 42).

MICRONAUT-RPO; *Corynebacterium*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *Streptococci*, *Listeria*, *Bacillus* ve diğer Gram-pozitif bakterilerin tanımlanmasında kullanılan yarı manuel bir sistemdir. Sistem, 30 enzimatik test ve 14 karbonhidrat fermentasyon testi olmak üzere 44 biyokimyasal testten oluşur. 22–24 saatlik inkübasyondan sonra, MICRONAUT Skan aracılığıyla bir fotometrik okuma ve MICRONAUT Yazılımı ile değerlendirme gerçekleştirilir. Sistem, *Corynebacterium* cinsine ait 29 türü tanımlar (38).

#### **Otomatize sistemler**

BD Phoenix, gram pozitif ve negatif bakterilerin hızlı tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılık testi için kolorimetrik ve florometrik reaksiyonlara dayalı tam otomatize bir sistemdir. Gram-pozitif izolatlar için, 46 biyokimyasal test ve MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değeri veren 22 antibiyotik içerir. Her teste ait reaksiyon inkübasyon sırasında tekrar tekrar okunur. Tanımlama 3 saat içinde gerçekleşir. MİK sonuçları 6-10 saat içinde elde edilir. BD Phoenix Sisteminin ID veri tabanında 15 tane *Corynebacterium* türü bulunur (38, 46).

VITEK 2, otomatik olarak inkübe edilen ve yorumlanan kolorimetrik reaktif kartları içeren, büyümeye dayalı teknoloji kullanan otomatize tanımlama sistemidir. Anaerob ve *Corynebacterium* türlerini tanımlamak için Anaerob/*Corynebacterium* Card (ANC card) vardır. ANC kartında, kromojenik substratlar içeren 64 kuyucuk bulunur. Mikroorganizma 3 McFarland yoğunluğunda inoküle edilir ve 6 saatlik inkübasyondan sonra otomatik okuma gerçekleştirilir. İnkübasyon sırasında, substrat metabolizmasının bulanıklığını veya renkli ürünleri ölçmek için her teste ait reaksiyon her 15 dakikada bir okunur. Sistemin veri tabanında 8 tane *Corynebacterium* türü bulunmaktadır (38, 47, 48).

Sherlock Mikrobiyal ID Sistemi, hücresel yağ asidi analizine dayalı otomatize mikrobiyal tanımlama sistemidir. Tür düzeyinde tanımlama yapmak için kullanılan yağ asidi profilleri DNA ile homoloji göstermektedir. Sherlock Sisteminde, analizden önce izolatların fizyolojik veya biyokimyasal gruplandırma için taranmasına gerek yoktur. Sistemin veri tabanı 19 tane *Corynebacterium* türü içerir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile mikolik asit analizine dayanan Sherlock Mikobakteriyel ID Sistem veri tabanında ayrıca 11 tane *Corynebacterium* türü bulunur (38, 49).

MicroSeq Mikrobiyal Tanımlama Sistemi, 16S bölgesinin karşılaştırmalı rDNA sekanslamasına dayanan genotipik tanımlama sistemidir. Bakterileri 24 saatten daha kısa sürede tanımlar. Sistem, rDNA'nın ilk 527 bp'lik kısmını kullanarak rutin bakteriyel tanımlama veya tam 1500 bp'lik bölgeye dayalı daha yüksek çözünürlüklü tanımlama sağlar. MicroSeq veri tabanı 50 *Corynebacterium* türü içerir (38, 49).

*Corynebacterium* türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması gerçek enfeksiyon kaynağını belirlemek ve enfeksiyon için uygun tedaviyi planlamak çok önemlidir. API Coryne ve BD Phoenix Otomatize Sistemi gibi mevcut bakteri tanımlama yöntemleri genellikle geleneksel fenotipik ve biyokimyasal yöntemlere dayanmaktadır. Bu testlerin çoğu zahmetli, zaman alıcı süreçlerdir ve tür düzeyinde her zaman güvenilir tanımlama sağlamazlar. Bu nedenle *Corynebacterium* türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması, klinisyenlerin izolatların etken veya kontaminant bakteri ayırımına karar vermesinde son derece yardımcı olur (50).

Matriks Aracılı Lazer Desorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS), mikrobiyal hücrelerin protein bileşimine dayalı tür tanımlaması için yeni bir teknolojidir (50, 51). Son zamanlarda MALDI-TOF MS, *Corynebacterium* türleri dahil çoğu mikroorganizmanın tanımlanması için hızlı, güvenilir bir tanı aracı olarak umut verici bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (52).

MALDI-TOF MS, üç temel birimden oluşur. İlki, iyonlaşmayı sağlayan ve örneğin molekül iyonlarını gaz fazına aktaran iyon kaynağıdır. İkincisi, kütle-yük oranına göre iyon ayrılmasına izin veren kütle analizörüdür. Son birim ise, ayrılmış iyonları izlemek için bir algılama aygıtıdır (53).

MALDI-TOF MS ile tanımlamada bakterileri hazırlamak için ya doğrudan koloni transferi ya da ekstraksiyon yöntemleri kullanılır (54). Mikroorganizmalara ait biyomeküllerin (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edildikten sonra elektrik veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılır. İşlem sırasında iyonize edilen proteinler arasında yapısal proteinler, DNA veya RNA bağlayıcı proteinler, ribozom modülasyon faktörleri, karbon depolama düzenleyicileri ve soğuk şok proteinleri bulunur. Her mikroorganizma için özgül olan proteinlerden spektral parmak izleri üretilir ve bu profil spektralarına ait grafiksel görüntüler sistem veri tabanında bulunan referans mikroorganizmalara ait spektrumlarla eşleştirilir. Buna göre elde edilen skor değerler tanımlanan eşik değer aralığında ise, mikroorganizmaların cins, tür ve alt tür düzeyinde doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanmasına izin veren sayısal bir değer elde edilir. Spektrometre ile analiz edilir edilmez tanımlama gerçekleşmiş olur (53).

MALDI-TOF MS günümüzde, kolay uygulanabilen, hızlı, güvenilir, doğru tanı koyması ve maliyet etkin bir tanımlama yöntemi olması nedeni ile klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında oldukça yaygın kullanılan bir sistem haline gelmiştir (52, 55). Özellikle de konvansiyonel yöntemlerin çok da yeterli olmadığı gram pozitif basillerin, anaerob ve non-fermentatif bakterilerin tanımlanmasında MALDI-TOF MS'in üstün olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur. Mikrobiyal tanımlama için farklı MALDI-TOF MS sistemleri geliştirilmiştir: MALDI Biotyper, Vitek MS ve Andromas sistemi. MALDI-TOF MS, *Corynebacterium* türlerinin tanımlaması için laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır (38).

Biolog Mikrobiyal Tanımlama Sistemleri şu an için piyasada manuel, yarı otomatize veya tam otomatize sistemler olarak bulunmaktadır. Sistem biyokimyasal

tanımlamaya dayalı bir sistemdir. Sistem veri tabanında 56 tane *Corynebacterium* türü bulunmaktadır (38).

### **Moleküler Yöntemler**

*Corynebacterium* türlerinin tanımlanması için 16S rRNA sekans analizi, *rpoB* gen sekans analizi, restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (restriction fragment-length polymorphism, RFLP), DNA-DNA hibridizasyonu ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) dahil olmak üzere çeşitli moleküler yöntemler uygulanmıştır. Bu yöntemler *Corynebacterium* türlerinin daha güvenilir bir şekilde tanımlanmasının yolunu açmıştır (56). 16S rRNA ve *rpoB* gen sekans analizi ile tanımlama konvansiyonel yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar verir, ancak uzun zaman alır ve yüksek maliyetlidir (57).

16S rRNA gen sekansı ile yapılan moleküler tiplendirme, *Corynebacterium* türlerini tanımlamak veya filogenetik ilişkilerini ortaya koymak için etkili bir yöntemdir (17). *Corynebacterium* cinsine ait bakterilerin 16S rRNA geni, cins içi düşük polimorfizm gösterdiğinden tür düzeyinde doğru moleküler tanımlama için neredeyse tam 16S rRNA sekansı gereklidir. *rpoB* gen sekansı da, *Corynebacterium* türlerinin doğru tanımlanması için kullanılır. 16S rRNA gen sekansı ile ayırt edilemeyen *Corynebacterium* türleri, diğer hedef genlerin örneğin *rpoB* gen sekansı ile ayrıca tanımlanabilir. İki *Corynebacterium* izolatının  $\geq 95\%$  *rpoB* sekans benzerliği olması durumunda bu iki izolatın aynı türe ait olduğunu gösterir (57).

İzolatların genomik benzerliğini ortaya koymak için yapılan 16S rRNA gen sekans analizinde benzerlik aralığının %98,7-99'un üzerinde olması gerekmektedir (58). 16S rRNA gen sekans analizi ile *Corynebacterium* türleri arasındaki filogenetik ilişki çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin *Corynebacterium aurimucosum* ile *C. minutissimum* arasında %98,9; *Corynebacterium coyleae* ile *Corynebacterium afermentans* subsp. *afermentans* arasında %98,2; *C. diphtheriae* ile *C. ulcerans* %98,5; *C. diphtheriae* ile *Corynebacterium pseudotuberculosis* arasında %98,5; *C. propinquum* ile *C. pseudodiphtheriticum* arasında %99; *C. ulcerans* ile *C. pseudotuberculosis* %99,8; *Corynebacterium mucifaciens* ve *C. afermentans*'ın her iki

alt türü %98,5; *Corynebacterium singulare* ile *C. minutissimum* %99.1-99.6 benzerlik görülmüştür (59-63).

Moleküler epidemiyolojik yöntemler, enfeksiyon hastalıklarının tanısına ve enfeksiyona yol açan faktörlerin incelenmesine; etkenin biyokimyasal ve moleküler düzeyde tanımlanması ve tiplendirilmesine; virülanstan sorumlu olan genlerin belirlenmesine ve bu genleri taşıyan suşların toplum içindeki yaygınlıklarının ortaya konulmasına; virülans ve bulaşıcılık yönünden farklı olan spesifik suşların araştırılmasına; salgınların kaynakları, yayılma yolları ve bölgesel veya küresel düzeyde yayılımları hakkında bilgiler elde edilmesine; salgındaki endemik ve sporadik olguların ayırt edilmesine; etken-kontaminant ayrımının yapılmasına; hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların ayırt edilmesine; salgın izolatlarının epidemiyolojik olarak birbirleriyle ilişkilerinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Salgın izolatları genel olarak klonal olarak ilişkili olup ortak bir kaynaktan köken alırlar. Klonal yönden ilişkili olan mikroorganizmalar aynı türün üyesi olup; ortak virülans, biyokimyasal ve genetik özellikleri paylaşırlar (64).

Hastane enfeksiyonlarına yol açan etkenlerin tiplendirilmesinde kromozomal DNA polimorfizmine dayalı yöntemler en iyi yöntemlerdir. Yaygın olarak kullanılan kromozomal DNA temelli tiplendirme yöntemleri; PFGE (Pulsed field gel electrophoresis), ribotipleme, RFLP (Restriction fragment length polymorphism, Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi), rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic-PCR), RAPD (Random amplified polymorphic DNA, Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA ), AFLP (Amplified fragment length polymorphism, Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi ), MLST (Multilocus sequence typing) ve AP-PCR (Arbitrarily primed PCR)'dir (64). Bu yöntemler; ya PCR amplifikasyonu ya genomik DNA'nın restriksiyon enzimiyle kesilmesi ya da kombine amplifikasyon ve restriksiyon işlemleri esasına göre çalışırlar (65).

Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki çalışma basamakları Tablo 2'de ve yöntemlerin karşılaştırılması Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki çalışma basamakları (64, 66)

PFGE	RFLP	PCR- RFLP	REP-PCR	AP-PCR	AFLP
Organizmaları agaroz kalıp içine gömme	Restriksiyon enzimi ile kesme	Amplifikasyon	Amplifikasyon	Amplifikasyon	Restriksiyon enzimi ile kesme
Proteazlarla kesme	Jel elektroforezi	Restriksiyon enzimi ile kesme	Jel elektroforezi	Jel elektroforezi	Adapterle ligasyon
Restriksiyon enzimi ile kesme	Blotlama	Jel elektroforezi	Değerlendirme	Değerlendirme	Amplifikasyon
Jel elektroforezi	Hibridizasyon	Değerlendirme			Elektroforez
Değerlendirme	Değerlendirme				Değerlendirme

PFGE (Pulsed field gel electrophoresis), RFLP (Restriction fragment length polymorphism), rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic-PCR), AP-PCR (Arbitrarily primed PCR), AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

PFGE yüksek ayırt etme gücüne sahip olması nedeni ile altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. PFGE yönteminde, yüksek çözünürlük, yüksek tekrarlanabilirlik ve iyi karşılaştırılabilirlik vardır (67-69).

### **Pulsed Field Jel Elektroforez (PFGE)**

PFGE yöntemi ilk kez 1984 yılında David Schwartz ve Charles Cantor tarafından tanımlanmıştır (65). Üçüncü jenerasyon moleküler tiplendirme yöntemi olarak kabul edilmektedir (69). Periyodik olarak elektrik akımının yönünün değiştirildiği 20 kb'dan 5 Mb'a kadar büyüklükteki DNA moleküllerinin fragmanlara ayrıştırıldığı, izolatların birbirleri ile olan ilişkisini ortaya koyan elektroforez yöntemidir (64).

PFGE yöntemi; düşük erime ısı (low melting) agaroz içinde gömülü halde bulunan bakteri hücrelerinden, yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen genomik DNA'nın uygun restriksiyon endonükleaz enzimi (RE) ile kesimi sonucu oluşan bant profillerinin belirlenmesi ve yorumlanması esasına dayanır (67). Genomik DNA'nın

fragmanlara ayrılma işlemi spesifik restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri ile yapılır. *XbaI*, *Corynebacterium* türlerinin PFGE analizi için yaygın olarak tercih edilen restriksiyon enzimidir (19, 70-74). Agaroz içindeki kromozomal DNA'nın kesimi için uygun RE'nin seçilmesi gerekir. Az sayıda fakat büyük molekül ağırlığına sahip fragmanlar oluşturabilen enzimler seçilmelidir. Bakteriyel DNA'nın G+C içeriği ve enzimin tanıma bölgesinin uzunluğu RE seçiminde önemli kriterlerdir (67).

PFGE'nin yedi tane tipi vardır. Bunlar; alan inversiyon jel elektroforezi (Field inversion gel electrophoresis, FIGE), contour-clamped homojen elektrik alanları (Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields, CHEF), transvers dalgalı alan jel elektroforezi (Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis, TAFE), pulsed-homojen ortogonal alan jel elektroforezi (Pulsed-Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis, PHOGE), ortogonal alan alternasyon jel elektroforezi (Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis, OFAGE), programlanabilir bağımsız kontrollü elektrotlar (Programmable Autonomously-Controlled Electrodes, PACE) veeşzamanlı teğetsel/dikdörtgen inversiyon çapraz elektroforez (Simultaneous Tangential/Rectangulare Inversion Decussate Electrophoresis (ST/RIDE)'dir. En yaygın kullanılan tipi ise "contour-clamped homogenous electric field" (CHEF)' dir. Bu sistemde altıgen biçiminde 120° açılarda yerleştirilmiş olan elektrotlardan, belirli aralıklarla yönü değişen sabit hızla elektrik akımı gelmektedir (75).

PFGE yönteminde; sıvı ya da katı besiyerinde üreyen bakteriler, düşük erime ısıyla agarozla karıştırılıp "plug mold" adı verilen küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içindeki bakteri hücre duvarı, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak hücrel proteinler sindirilir (in situ-lysis). Lizis işlemi takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak protein ve karbonhidrat gibi maddelerin uzaklaştırılması sağlanır. Böylece saf hale getirilen kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu halde kalır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA, oldukça az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi (RE) ile kesime uğrattılır (in situ digestion). Daha sonra içinde enzim ile kesime uğrattılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilir ve belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulur. Elektroforez sonucunda agaroz jel etidyum bromürle boyanarak

her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbiriyle olan ilişkileri ortaya konulur (64).

Bakteriler arasında epidemiyolojik ilişkinin değerlendirilebilmesi için DNA kabul görülen sayıda (10'dan az 25-30'dan fazla olmamalı) ve büyüklükte kesilmelidir (76).

Tenover ve ark., PFGE sonuçlarının yorumlanması için belirli bir sistem önermişlerdir. Bu sistemde bant profillerine bakılarak izolatların birbirleriyle ilişkilerinin derecelendirilmesi yapılabilmektedir. Buna göre, öncelikle salgın suşu belirlenir. Bu suş ile aynı sayı ve büyüklüğe sahip bantlar veren izolatlar için “aynı izolat” tabiri kullanılır. Bu izolatlar, genetik açıdan farksız olarak kabul edilirler. Bunlar salgının bir parçası olup epidemiyolojik olarak yakın ilişkili izolatlardır. Tek bir nokta mutasyon, insersiyon veya delesyon oluşması nedeniyle salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı olan izolatlar ise “yakın ilişkili” izolat olarak isimlendirilir. İzolat salgın suşuyla yakından ilişkili olarak değerlendirilir ve epidemiyolojik açıdan salgının bir parçası olma olasılığı yüksektir. Salgın suşu ile aralarında 4-6 bant farkı olan izolatlar için ise “muhtemel ilişkili izolat” tabiri kullanılır. Bu farklılık iki bağımsız genetik olay (insersiyon veya delesyon ile restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı) sonucu daha uzun sürede ortaya çıkmış olup, suşlar aynı soydan olsalar bile genetik olarak ilişkili değildirler, epidemiyolojik olarak ilişkili olma ihtimalleri azdır. Salgın suşu ile aralarında yedi ve daha fazla bant farkı olan izolatlar ise “ilişkisiz izolatlar” olarak kabul edilir. İzolatların DNA'sında üç ya da daha fazla genetik olay meydana gelmiştir. Epidemiyolojik olarak salgın suşuyla ilişkisiz oldukları kabul edilir (76).

**Tablo 3.** Moleküler tiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması (64, 66)

	<b>PFGE</b>	<b>RFLP</b>	<b>rep-PCR</b>	<b>RAPD</b>	<b>AFLP</b>	<b>MLST</b>	<b>AP-PCR</b>	<b>Ribotipleme</b>
<b>Tiplendirilebilirlik</b>	Mükemmel	Mükemmel	Değişken	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel
<b>Tekrarlanabilirlik</b>	İyi	İyi	Orta	Kötü	İyi	İyi	İyi	İyi
<b>Ayrım gücü</b>	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek
<b>Stabilite</b>	İyi	Mükemmel	Mükemmel	İyi	Mükemmel	İyi		İyi
<b>Uygulama kolaylığı</b>	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Orta	Orta	Kolay	Orta
<b>Yorumlama kolaylığı</b>	Kolay	Kolay	Kolay	Kolay	Kolay	Kolay	Kolay	Zor
<b>Sonuç alma süresi (gün)</b>	1-2	1-2	1	1	2	≥3	1	1-3
<b>Maliyet</b>	Orta	Düşük	Düşük	Düşük	Orta	Orta	Düşük	Yüksek

PFGE (Pulsed field gel electrophoresis), RFLP (Restriction fragment length polymorphism), rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic PCR), AP-PCR (Arbitrarily primed PCR), AFLP (Amplified fragment length polymorphism, RAPD (Random amplified polimorphic DNA, MLST (Multilocus sequence typing)

### **Antibiyotik duyarlılık testleri**

*Corynebacterium* türlerinin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon, broth mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve gradient test (E-test) gibi farklı yöntemler ile çalışılmıştır (14, 77, 78).

Önceki yıllarda *Corynebacterium* türlerinin duyarlılık testi için özel bir rehber bulunmadığı için Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) ve/veya İngiliz Antimikrobiyal Kemoterapi Derneği (British Society for Antimicrobial Chemotherapy, BSAC)'nin *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* türleri için belirlemiş olduğu kriterler kullanılmıştır (77). CLSI 2006 yılında nadir izole edilen veya zor üreyen bakterilerde antimikrobiyal dilüsyon ve disk duyarlılık testleri için rehber yayımlamıştır. Bu rehber *Corynebacterium* türlerinin sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi için bilgi ve yorumlayıcı kriterler sağlamıştır. Ancak disk difüzyon testi için herhangi bir yorumlayıcı kriter yoktur (56, 79). Bu organizma grubu için disk difüzyon yöntemi için belirlenmiş CLSI yönergesi bulunmaması nedeniyle, CLSI ve BSAC rehberlerinin bir kombinasyonu kullanılmış olup siprofloksasin, penisilin ve vankomisin duyarlılık testi yapılırken BSAC yönergeleri ve diğer antibiyotikler için *Staphylococcus aureus* için geçerli olan CLSI yönergeleri kullanılmıştır (77, 80).

2014 yılında ise Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), ilk defa *Corynebacterium* türleri için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin ve zon çaplarının olduğu klinik sınır değerler tablosu içeren bir rehber yayınlamıştır. Böylece EUCAST CLSI'dan farklı olarak, disk difüzyon yöntemi için de yorumlama kriterleri içeren bir rehber olarak kullanıma girmiştir (81).

### **Bazı *Corynebacterium* türlerinin klinik özellikleri**

*Corynebacterium* türleri temel olarak lipofilik, nonlipofilik-fermentatif ve nonlipofilik-nonfermentatif korinebakteriler olarak üç grupta toplanırlar (Tablo 4).

**Tablo 4.** *Corynebacterium* türleri (17, 33, 82)

<b>Lipofilik</b>	<b>Nonlipofilik- Fermentatif</b>	<b>Nonlipofilik- Nonfermentatif</b>
<i>C. jeikeium</i>	<i>C. diphtheriae</i> group	<i>C. afermentans</i> subsp.
<i>C. afermentans</i> subsp.	<i>C. striatum</i>	<i>afermentans</i>
<i>lipophilum</i>	<i>C. xerosis</i>	<i>C. auris</i>
<i>C. urealyticum</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. mucifaciens</i>
<i>C. macginleyi</i>	<i>C. matruchotii</i>	<i>C. propinquum</i>
<i>C. lipophilum</i>	<i>C. argentoratense</i>	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>
<i>C. accolens</i>	<i>C. minutissimum</i>	
<i>C. resistens</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	
<i>C. tuberculostearicum</i>	<i>C. ulcerans</i>	
	<i>C. coyleae,</i>	

#### ***Corynebacterium striatum***

Koyun kanlı agarda 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra non-hemolitik, pürüzsüz, 1-2 mm çapında, gri-beyaz, bazıları kremi, soluk sarı koloniler şeklinde görülür (33). *C. striatum* çevrede yaygın olarak bulunur ve cilt ve mukozal membranların normal mikrobiyotasının bir üyesidir (83). *C. striatum* non-lipofiliktir. Üreyi ve eskülünü hidrolize etmez. Glukoz ve sükrözü fermente eder; maltoz, mannitol ve ksilozu fermente etmez. CAMP pozitifliği değişkendir. Pirazinamidaz ve alkalın fosfataz üretir (30). DNA G + C içeriği %57'dir (33).

*Corynebacterium striatum*, ilk defa 1980 yılında Bowstead ve ark. tarafından hastalık etkeni olarak kabul edilmiş ve kronik lenfositik lösemili 79 yaşındaki bir erkek hastada, plöropulmoner enfeksiyon etkeni olarak rapor edilmiştir. *C. striatum* hastaya ait balgam, iki set kan kültürü ve plevral sıvı kültüründen izole edilmiştir (30, 84, 85).

2007'de Renom ve ark. kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan hastalarda bu bakterinin ilk nozokomiyal salgınını tanımlamıştır. Bu salgında tanımlanan tüm suşlarda çoklu antibiyotik direnci görülmüştür (86).

*Corynebacterium striatum* özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda çoklu ilaca dirençli, fırsatçı patojen olarak karşımıza çıkmaktadır ve çok çeşitli klinik tablolara yol açarak nozokomiyal salgınlara neden olmaktadır (15, 19, 22, 85, 87-99). Kan dolaşımı (6, 88, 100, 101) ve katater ilişkili enfeksiyonlara (7, 102), protez eklem enfeksiyonu (103-105), pnömoni (100, 106, 107), menenjit (108, 109), endokardit (110), tromboflebit (91), cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu (92), doğal kapak endokarditi (111), enfektif endokardit (112), septik artrit (113), tenosinovit (114), alt solunum yolu enfeksiyonu (115), sellülit (116, 117), periton diyalizi ilişkili peritonit (118), septik artrit (119, 120), osteomyelit (7, 121, 122), tubo-ovaryan abse (123), yara yeri enfeksiyonu (124), sepsis (125), sistit (126), meme absesi (127), intrauterin enfeksiyon (128), konjunktivit, keratit (129, 130) gibi çok çeşitli klinik tablolara yol açmaktadır.

### ***Corynebacterium afermentans***

*Corynebacterium afermentans*, 1981 yılında CDC grup ANF-1 (absolute nonfermenting group 1) olarak adlandırılmıştır. Kantitatif DNA-DNA hibridizasyonu ile *C. afermentans*'ın *C. afermentans* subsp. *afermentans* ve *C. afermentans* subsp. *lipophilum* olmak üzere iki alt tipe sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Her iki alt tür, koloni büyüklüklerine göre kolayca ayırt edilebilir. 24 saatlik inkübasyondan sonra %5 koyun kanlı agarda; non-hemolitik, grimsi-şeffaf koloniler şeklinde görülürler. *C. afermentans* subsp. *afermentans* 1-2 mm çapında koloniler oluştururken *C. afermentans* subsp. *lipophilum* 0,5 mm çapından daha küçük koloniler oluşturur. Koyun kanlı agar besiyerine %1'lik Tween 80 eklendiğinde *C. afermentans* subsp. *lipophilum* kolonileri 2-3 mm çapına ulaşır. Fenotipik özellikleri aynıdır. Tek fark; *C. afermentans* subsp. *lipophilum* lipofiliktir, *C. afermentans* subsp. *afermentans* non-lipofiliktir (26). DNA G + C içeriği *C. afermentans* subsp. *afermentans* 'ta % 66 iken, *C. afermentans* subsp. *lipophilum* 'da % 68'dir (33).

*Corynebacterium afermentans* ilk kez 1993 yılında Riegel ve ark. tarafından yapılan çalışmada kulak ve kan örneklerinden izole edilmiştir (131). Daha sonraki yıllarda farklı klinik tablolara yol açtığını gösteren birkaç çalışma rapor edilmiştir. Karaciğer ve beyin absesi (132), nöroşirürjik cerrahi sonrası gelişen sepsis (133), HIV (insan immünyetmezlik virüsü) enfeksiyonu olan hastada akciğer absesi ve ampiyem (134), prostetik kapak endokarditi (135), ventrikülo-peritoneal şant enfeksiyonu (136) gibi farklı klinik tablolara yol açtığı gösterilmiştir.

Patojenik önemleri nedeniyle *C. jeikeium*, *C. amycolatum*, *Corynebacterium macginleyi*, *C. urealyticum*, *C. minutissimum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* ve *Corynebacterium xerosis* de sıklıkla rapor edilen diğer *Corynebacterium* türleridir. Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu, bakteriyemi, sepsis, endokardit, protez kapak enfeksiyonu, menenjit, şant enfeksiyonu, beyin absesi, peritonit, osteomyelit, septik artrit, cilt ve yara enfeksiyonu, yumuşak doku enfeksiyonu, pyelonefrit, ampiyem, pnömoni, keratit, konjunktivit, endoftalmit, otit, kazeöz lenfadenit (14, 45, 77, 130, 137-139) gibi klinik tablolara yol açmaktadırlar.

## **Antimikrobiyal direnç mekanizmaları**

### **Beta-laktam direnci**

Son yıllarda *Corynebacterium* türlerinde özellikle de *C. striatum*'da  $\beta$ -laktam antibiyotik direncinde bir artış olmuştur (79). Ambler moleküler sınıflamasına göre serin hidrolazlar olarak bilinen sınıf A beta laktamazlar *bla* geni tarafından kodlanırlar ve *Corynebacterium* türlerinde penisilin direncinden sorumludurlar (23, 140). Sefalosporinazlar olarak bilinen sınıf C beta laktamazlar ise *ampC* geni tarafından kodlanırlar, sefalosporinler başta olmak üzere, sefamisin ve penisilin direncinden sorumludurlar. *ampC* direnci kromozomal veya plazmid kaynaklı olabilir (140, 141). Beta-laktam direnci birçok *Corynebacterium* türünde yüksek oranda saptanmıştır (23, 36, 71, 77, 87, 94, 142, 143).

### **Makrolid, Linkozamid, Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) direnci**

*Corynebacterium* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda  $\beta$ -laktamlara ve tetrasiklinlere alternatif olarak sıklıkla kullanılan makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) grubu antibiyotikler, farklı kimyasal yapıya sahip olmalarına rağmen bakteriyel protein sentezi üzerine benzer etkiler göstermektedirler. Bu sebeple MLS<sub>B</sub> grubu antibiyotiklerden herhangi birine karşı oluşan dirence neden olan genler aynı gruba ait diğer antibiyotiklere de çapraz direnç gelişimine neden olabilmektedir (70, 144).

MLS<sub>B</sub> grubu antibiyotiklere karşı direnç 23S rRNA'nın metilasyonu ile hedef bölge değişikliği, aktif efluks pompa sistemiyle ilacın hücre içine girişinde azalma veya dışarı atılmasında artma ve enzimatik inaktivasyon ile olabilmektedir (70).

*Corynebacterium* türlerinde direnç genellikle hedef bölge değişikliği ile olmaktadır. Bakterinin metilaz enzimi üretmesi sonucu, bakteriyel ribozomların 50S alt biriminde bulunan 23S rRNA'nın adenin rezidülerinin metilasyonu ile bu direnç gelişir. *Corynebacterium* türlerinde MLS<sub>B</sub> grubu antibiyotiklere karşı dirence yol açan metilaz enzimleri *ermX* ve *ermB* genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu genler yapısal-konstitütif (cMLS<sub>B</sub>) veya indüklenebilir (iMLS<sub>B</sub>) olabilir. Yapısal gen taşıyan bakteriler daima metilaz enzimi üretirken, indüklenebilir gen taşıyan bakteriler ortamda indükleyici bir ajan olduğu zaman metilaz enzimini üretir (140, 144). Yapısal MLS<sub>B</sub> (cMLS<sub>B</sub>) direncine sahip suşların tüm makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye dirençli olduğu kabul edilir.

İndüklenebilir MLS<sub>B</sub>'ye (iMLS<sub>B</sub>) sahip suşlar ise 14 ve 15 üyeli makrolidlere direnç gösterir ancak 16 üyeli makrolidlere, linkozamidlere ve tip B streptograminlere duyarlı görünür (145). *ermX* geni *Corynebacterium* kromozomunda transpozon Tn5432 üzerinde bulunur (140).

MLS<sub>B</sub> direnci bazen de aktif efluks pompa sistemiyle gerçekleşmektedir. *msrA* (makrolid streptogramin direnci) geni tarafından kodlanan enerji bağımlı ATP taşıyıcı ailesine ait efluks pompa sistemi ile, hücre içine giren makrolid ve tipB streptograminleri dışarı atarak bu antibiyotiklere karşı dirence yol açarken linkozamidlere karşı dirençte rol oynamaz. *msrA* geni ilk olarak *Staphylococcus epidermidis*'te tanımlanmıştır. Daha sonra *msrA* genine *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ve *Pseudomonas* türlerinde de rastlanmıştır (146, 147). Aynı şekilde *mef* geni tarafından kodlanan enerji bağımlı ATP taşıyıcı ailesine ait efluks pompa sistemi ile, makrolidleri dışarı atarak dirence neden olmaktadır (147).

MLS<sub>B</sub> direnci *C. diphtheriae*, *C. xerosis*, *C. jeikeium*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. urealyticum* ve *C. striatum* gibi klinik öneme sahip türlerde yaygın olarak görülmektedir ve yapılan birçok çalışmada *Corynebacterium* türleri arasında MLS<sub>B</sub> grubu antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç bildirmiştir (70, 140, 143, 148-150).

### **Kinolon direnci**

Kinolonların temel hedefleri, DNA'nın negatif süpersarmal oluşturmasını katalizleyen ve ATP bağımlı DNA giraz enzimi (topoizomeraz II) ve DNA replikasyonu sonrasında hücre bölünmesinden sorumlu Topoizomeraz IV enzimleridir. Kinolonlar bu enzimlerin enzimatik aktivitelerini inhibe ederek DNA-enzim komplekslerinde DNA'nın yıkımını sağlarlar (151).

DNA giraz enzimi *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan iki adet A ve iki adet B alt ünitesinden oluşan heterotetramer yapıda bir enzimdir. Topoizomeraz IV enzimi ise *parC* geni tarafından kodlanan iki *parC* alt birimi ile, *parE* geni tarafından kodlanan iki *parE* alt biriminden oluşur (151, 152).

Kinolon direnci sıklıkla DNA giraz enziminin *gyrA* bölgesindeki kinolon direncini belirleyen bölgedeki (quinolone resistance-determining region-QRDR) nokta mutasyonlar sonucu gelişir (147).

*Corynebacterium* türlerinde en sık *gyrA* geninde oluşan mutasyon görülmektedir. Ortaya çıkan direnç seviyesi büyük ölçüde, önceden var olan aminoasitin yerine mutasyon sonucu gelen amino asidin tipine bağlıdır (147). *Corynebacterium* türlerinde Topoizomeraz IV enzimi bulunmadığından dolayı bu mikroorganizmalarda *parC* gen mutasyonu şeklinde dirence rastlanmamıştır (153).

*Corynebacterium striatum*, *C. jeikeium* ve *C. urealyticum* suşları üzerinde yapılan çalışmada *gyrA* geninin QRDR bölgesindeki 87. ve 91. kodonlarda tekli ya da çifte mutasyonlar saptanmıştır. 87. kodonda bulunan serin aminoasiti yerine izolösin, valin veya tirozin aminoasiti (Ser-87-Ile, Ser-87-Val, Ser-87-Tyr); 91. kodonda bulunan aspartat aminoasiti yerine tirozin veya alanin (Asp-91-Tyr, Asp-91-Ala) aminoasitinin geçmesiyle nokta mutasyonlar meydana gelmiştir. Tüm bu mutasyonlar siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin için yüksek düzey dirence neden olmuştur (154).

Kinolona dirençli *C. striatum* suşlarında *gyrA* genindeki mutasyon çeşitliliğinin araştırıldığı bir başka çalışmada QRDR bölgesinde 87. ve 91. kodonlarda çifte mutasyonlar saptanmıştır. 87. kodondaki serin aminoasiti yerine fenilalanin, izolösin, valin veya tirozin aminoasiti (Ser-87-Phe, Ser-87-Ile, Ser-87-Val, Ser-87-Tyr); 91. kodondaki aspartat aminoasiti yerine alanin veya glisin (Asp-91-Ala, Asp-91-Gly) aminoasitinin geçmesiyle nokta mutasyon meydana gelmiştir. Oluşan bu mutasyonlar siprofloksasin için yüksek MİK değerleri görülmesine neden olmuştur (155).

*Corynebacterium amycolatum*, *C. macginleyi* ve *C. striatum* suşları ile yapılan çalışmalarda *gyrA* geninin QRDR bölgesinde meydana gelen tekli ya da çifte mutasyonların sayısına ve değişen amino asitlerin türüne bağlı olarak kinolonlara karşı farklı düzeylerde direnç geliştiği gösterilmiştir. Görülen mutasyonlar Ser-87-Ile, Ser-87-Phe, Asp-91-Gly, Ser-83-Arg, Pro-84-Ala, Ser-83-Phe, Asp-87-Ala, Ser-87-Arg, Ile-89-Val, Ala-88-Pro, Asp-91-Ala'dır (13, 87, 153, 156, 157).

### **Aminoglikozid direnci**

Aminoglikozidler ribozomların 30S alt birimine bağlanarak translasyonu bozarak protein sentezini inhibe etmektedirler. Aminoglikozidlere karşı direnç ribozomal hedef değişikliği, enzimatik inaktivasyon ve ilacın sitoplazmaya geçişinin engellenmesi şeklinde üç mekanizma ile oluşmaktadır (158).

*Corynebacterium* türlerinde en sık karşılaşılan direnç mekanizması enzimatik inaktivasyondur (140). Asetiltransferazlar (AAC), fosfotransferazlar (APH) ve adeniltransferazlar (ANT) olmak üzere üç aminoglikozid modifiye edici enzim grubu aminoglikozidin hidroksil veya amino gruplarına özgül olarak bağlanarak, aminoglikozid yapısını asetilasyon, adenilasyon veya fosforilasyon mekanizmaları ile inaktive ederler (159).

AAC, aminoglikozid molekülündeki amino gruplarını asetile etmektedirler. APH, aminoglikozid molekülündeki hidroksil grubunu fosforile etmektedirler. ANT, aminoglikozidlerin hidroksil gruplarını adenile etmektedirler. Enzimin aminoglikozid molekülündeki etki bölgesi parantez içinde rakam olarak yazılır. Benzer etki gösteren enzimleri ayırt etmek için buna Romen rakamları eklenir. Protein tanımlaması için de sonuna a, b, c gibi harfler eklenir. Dört adet aminoglikozid asetiltransferaz enzimi [AAC(2'), AAC(6), AAC(1), AAC(3)]; yedi adet aminoglikozid fosfotransferaz enzimi [APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(6), APH(9), APH(4), APH(7'')] ve dört adet aminoglikozid adeniltransferaz enzimi [ANT(6), ANT(3''), ANT(4'), ANT(2'')] bulunmaktadır (160).

2015 yılında yapılan bir çalışmada gentamisin ve tobramisin direnci bulunan *C. striatum* suşlarında aminoglikozid asetiltransferaz enzimini kodlayan *aac(3)-XI* olarak adlandırılan yeni bir gen bulunmuştur (161).

*Corynebacterium striatum* suşları ile yapılan başka bir çalışmada ise kanamisin direnci olan suşlarda *aph(3')-Ic*, streptomisin direnci olan suşlarda *aph(3'')-Ib* ve *aph(6)-Id*, gentamisin ve tobramisin direnci olan suşlarda *aac(3)-XI* genlerine rastlanmıştır (72)

### **Tetrasiklin direnci**

Tetrasiklinler 30S ribozomal alt üniteye bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe ederler. Ribozomal alt üniteye bağlanma ile mRNA; ribozomal 'acceptor' bölgeye aminoasit tRNA'nın bağlanmasını engeller ve büyüyen peptid zincirine yeni bir aminoasit eklenemediği için bakteriyel protein sentezi gerçekleşemez (162).

Tetrasiklin direnci dört mekanizma ile oluşur. Aktif akış pompa (efluks) sistemi, hücre içi tetrasiklin konsantrasyonunun azaltılmasına dolayısıyla ilacın etkisiz hale gelmesine yol açmaktadır. Bu sistem ile oluşan direnç en yaygın görülen tiptir. Ribozomal koruma proteinleri tarafından tetrasiklinin ribozomun 30S alt birimi ile etkileşiminin bozulması da ikinci en yaygın direnç mekanizmasıdır. Ribozomal koruma proteinleri ribozoma bağlanarak tetrasiklinin ribozoma bağlanmasını engellerler. Bir diğer direnç mekanizmasında ise hidrosilasyonda rol oynayan *tetX* ve *tet37* gibi tetrasiklin direnci belirleyicileri, flavin adenin dinükleotit (FAD) monooksijenazları üreterek tetrasiklinlere karşı direnç gelişmesine yol açarlar. Hidrosilasyon ribozomal bağlanma bölgelerine bağlanma afinitesini azaltır. Tetrasiklinler için 30S alt birimdeki bağlanma yerinde oluşan mutasyon da bir başka direnç mekanizmasıdır (163).

Yaklaşık 50 farklı tetrasiklin direnç geni (*tet*) tespit edilmiştir. Bu tetrasiklin direnç genlerinin 28 tanesi aktif pompa (efluks) mekanizmasına ait taşıyıcı proteinlerle, 12 tanesi hedef modifikasyon mekanizmasına ait ribozomal koruma proteinleriyle, 2 tanesi enzim aktivitesini bozarak, 5 tanesinin de ribozomal mutasyonlarla etki gösterdiği bildirilmiştir (163).

Tam nükleotit sekansı yapılan *C. glutamicum* suşlarında *tetZ* adı verilen R-plazmidi pAG1 üzerinde kodlanmış efluks sistemi aracılığıyla dirence neden olan yeni bir gen tespit edilmiştir (164).

*Corynebacterium striatum* R-plazmidi pTP10 üzerinde *tetAB* genlerinin bulunduğu tetrasiklin direnç bölgesi, bir ABC taşıyıcısı ile kodlanır. Tauch ve ark.

çalışmasında tetrasiklin, oksitetrasiklin ve oksasilin direnci olan *Corynebacterium glutamicum* suşlarında *tetAB* genleri tespit edilmiştir (165).

*Corynebacterium urealyticum* suşlarının antibiyotik duyarlılığı ve direnç mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada yüksek MİK değerlerinin saptandığı fenotipik olarak tetrasiklin dirençli suşlarda *tetAB* genleri saptanmıştır (71).

Ribozomal koruma proteinini kodlayan *tetW* geni ilk kez lösemi hastalarının kan örneklerinden izole edilen çoklu ilaca dirençli *Corynebacterium resistens* suşlarının tam genom analizinde tespit edilmiştir (166). Granülamatöz mastitli hastalardan izole edilen *Corynebacterium kroppenstedtii* suşlarında da ribozomal koruma proteinini kodlayan *tetW* geni tespit edilmiştir (167, 168). Protez eklem enfeksiyonu olan 75 yaşındaki erkek hastanın sinovyal sıvı örneğinden yapılan kültürden izole edilen *C. striatum*'a ait genom sekansında *tetW* geni saptanmıştır (103).

### **Biyofilm oluşumu**

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik ekzopolisakkarit matriks içine gömülmüş halde ve hareketsiz bir şekilde birbirine, katı bir yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu bir topluluktur. Bu matriks, ekstraselüler polimerik maddeler (extracellular polymeric substances-EPS) olarak adlandırılan polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitlerden oluşmaktadır. Biyofilm özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ve kalıcı tıbbi kateteri olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir (169). Biyofilm tabakasının oluşmasında protein ve ekzopolisakkaritten oluşan hücre dışı matriks ve tutunma yüzeyi önemli yer tutar. Bu bileşenlerden herhangi biri olmadığında biyofilm oluşamaz. Biyofilm yapısında %97 su, %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarit, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlar bulunmaktadır (170). Biyofilm oluşumu; mikroorganizmanın bir yüzeye tutunması, geri dönüşümsüz bağlanması, kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu ve kopma evreleri olmak üzere dört aşamada gerçekleşmektedir (171).

*C. diphtheriae*'nın üç tane majör virülans faktörü bulunmaktadır. Bunlar; adherensde rol oynayan pili, difteri toksini ve post-translasyonel modifikasyonda rol oynayan monoderm disülfid bağ oluşumunda görevli MdbA (monoderm disulfide bond-forming) proteini (172).

NDC'ler gibi cilt flora elemanlarının göreceli olarak düşük virulansa sahip oldukları kabul edilmektedir. Ancak 2015 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar çoklu ilaca dirençli *C. striatum* izolatlarının biyofilm ürettiğini göstermişler ve biyofilm üretiminin bu mikroorganizma için yeni bir virülans faktörü olabileceğini öne sürmüşlerdir (89, 137). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada araştırmacılar kan dolaşımı ve kateter ile ilişkili enfeksiyona neden olan çoklu ilaca dirençli *C. striatum* izolatlarında biyofilm üretiminin olduğunu tespit etmişlerdir (102).

Biyofilm üretimini tespit etmek için kullanılan yöntemler arasında; mikropalak yöntemi, tüp yöntemi, kongo red agar metodu, piezoelektrik sensörler, biyoluminesans metod, floresan mikroskop ve taramalı elektron mikroskop incelemesi yer almaktadır (173). Bunlar arasında en sık kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen yöntem spektrofotometrik olarak belirlenen mikropalak yöntemidir (174).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Örneklerin toplanması ve saklanması

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, Aralık 2020–Ocak 2023 tarihleri arasında, farklı klinik birimlerden gönderilen çeşitli klinik örneklerden (kan, kateter içi kan, yara, trakeal aspirat, balgam, abse, plevral sıvı) izole edilen *Corynebacterium* cinsine ait 140 izolat çalışmaya dahil edildi. Aynı hastaya ait birden fazla örnek gönderilmiş ise sadece tek bir örnek çalışmaya alındı.

Çalışmaya alınan izolatlar %20 gliserollü brain-heart infüzyon broth içerisinde çalışma zamanına kadar -80 °C'de saklandı.

### Örneklerin izolasyonu ve tanımlanması

Çalışma sırasında suşlar, %5 koyun kanlı agara pasajlanarak 35-37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kanlı agar plaklarında üreme saptanan beyaz opak ya da krem rengi kolonilerden Gram boyama yapılarak mikroskopik incelemeye alındı. Mikroskopik inceleme sonucunda sporsuz Gram pozitif difteroid basil morfolojisindeki tüm basillere katalaz testi yapıldı. Temiz bir lam üzerine birkaç damla %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatıldı. Steril plastik öze ile taze bakteri kültüründen alınan koloniler hidrojen peroksitle karıştırıldı. Hava kabarcıklarının varlığının görülmesi üzerine katalaz testi pozitif olarak yorumlandı.

Gram boyamada difteroid basil morfolojisinde ve katalaz pozitifliği olan *Corynebacterium* cinsine ait olduğu düşünülen izolatlar MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlandı.

### Antimikrobiyal duyarlılığının saptanması

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi.

Bu yöntem için penisilin G (1 ünite), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), tetrasiklin (30 µg), rifampisin (5 µg), siprofloksasin (5 µg), vankomisin (5 µg), linezolid (10 µg) ve gentamisin (10 µg) (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) antibiyotik diskleri kullanıldı. Diskler, kullanılmaya kadar +4°C'de saklandı.

18-24 saatlik taze kültürlerden 0,5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β-NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) içeren Mueller-Hinton Fastidious agar (MH-F) (Liofilchem, İtalya) yüzeyine steril eküvyon ile yayıldı. Agar yüzeyine oda sıcaklığına getirilmiş antibiyotik diskleri yerleştirildi. Etüvde 35-37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında antibiyotik diskleri çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü. Elde edilen zon çapları EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirildi ve duyarlı veya dirençli olarak kaydedildi (81). EUCAST rehberinde *Corynebacterium* türleri için eritromisin ve gentamisine ait belirlenmiş kriterler olmamasından dolayı eritromisin ve gentamisin duyarlılık test sonuçları EUCAST *Staphylococcus* spp. kriterlerine göre değerlendirildi (143).

### **Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi**

Biyofilm oluşumu mikrotitrasyon plak yöntemiyle semikantitatif olarak değerlendirildi (101). Çalışma izolatlarından %5 koyun kanlı agara taze pasajlar yapıldı. Brain-heart infüzyon (BHI) broth içerisinde 0,5 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. 96 kuyucuklu düz tabanlı steril polistiren mikrotitrasyon plak içine her bir kuyucuğa 200 µL olmak üzere hazırlanan bakteri süspansiyonu dağıtıldı. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Her izolat için üçer kuyucuk kullanıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklar boşaltıldı. Biyofilm yapısına katılmayan maddelerin uzaklaştırılması amacıyla her kuyucuk 3 kere 200 µL fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Her yıkama sonrasında kuyucuklardaki PBS boşaltıldı ve ters çevrilip kurumaya bırakıldı. Kuruyan kuyucuklara 200 µL %99'luk metanol eklendi ve 5 dakika fikse edildi. Ardından içerik boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 200 µL %0,5 kristal viyole eklenerek 5 dakika boyandı. Boyama işleminden sonra kuyucuklar boşaltıldı ve ters çevrilip kurumaya bırakıldı. Son olarak 160 µL %95'lik etanol her kuyucuğa dağıtıldı ve boyanın çözünmesi için 20 dakika bekletildi. Plaktaki

içerik yeni bir plağa aktarılarak okuma aşamasına geçildi. Optik dansite (OD) ölçümleri 590 nm dalga boyunda spektrofotometrik mikropalak okuyucu (ELISA Reader, Pasteur Diagnostic, Fransa) ile yapıldı. Her bir kuyucuk için optik dansite (OD) değeri belirlendi. Pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturduğu bilinen *S. epidermidis* ATCC 35984 ve negatif kontrol olarak *S. epidermidis* ATCC 12228 kullanıldı.

Sonuçlar literatürde tanımlandığı şekilde değerlendirildi (175). OD590'de üç kez ölçüm yapıldıktan sonra tüm suşlar ve negatif kontrol için ortalama OD değeri hesaplandı. Daha sonra cut-off değeri (OD<sub>c</sub>) oluşturuldu. Negatif kontrolün ortalama değerlerinin (OD) üç standart sapma (SS) üstü cut-off değer (OD<sub>c</sub>) olarak belirlendi. Cut-off değer OD'si (OD<sub>c</sub>) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$OD_c = OD (\text{negatif kontrol}) + 3 \times SS (\text{negatif kontrol}).$$

Her izolat için hazırlanan 3 kuyucuktan elde edilen OD değerlerinin ortalaması cut-off değer OD'si üzerinde olan suşlar pozitif, altında olan suşlar negatif olarak kabul edildi. OD değer; cut-off değer altında ise negatif (-), cut-off değer ve cut-off değer 2 katı arasında olanlar zayıf (+), cut-off değer 2 katı ile 4 katı arasında olanlar orta (++) , cut-off değer 4 katı ve üzerinde olanlar güçlü (+++) pozitif olarak değerlendirildi. Optik yoğunluklarına göre suşlarda biyofilm oluşumu:

$$OD \leq OD_c = \text{biyofilm negatif}$$

$$OD_c \leq OD \leq 2 \times OD_c = \text{zayıf düzeyde biyofilm pozitif (+)}$$

$$2 \times OD_c \leq OD \leq 4 \times OD_c = \text{orta düzeyde biyofilm pozitif (++)}$$

$$4 \times OD_c \leq OD = \text{güçlü düzeyde biyofilm pozitif (++++)}$$

### **Kaynatma yöntemi ile bakteriyel DNA ekstraksiyonu**

Tür düzeyinde tanımlanıp -80°C'de saklanmış olan izolatlar çıkartıldı. %5 koyun kanlı agar pasajlandı ve 35-37°C'de 24 saat inkübe edildi. Besiyerinde saf kültür halinde üreyen koloniler steril öze ile alınarak, beyin kalp infüzyon broth içine ekim yapıldı. 35-37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra homojenizasyonun sağlanması için bakteri süspansiyonuna vorteks işlemi yapıldı. Homojen bir süspansiyon elde

edildikten sonra, 1 ml alınıp ependorf tüplere aktarıldı. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki süpernatant atıldı. Dipteki pellet üzerine 200 µl distile su ilave edilip 100°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 10 dakika kaynatıldı. Süre sonunda tüpler 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmak üzere steril, DNase ve RNase içermeyen mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Elde edilen DNA'lar çalışmada kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı (139).

### **İn-house PCR ile antimikrobiyal direnç geni araştırılması**

Suşlardaki *bla*, *ampC*, *aac(3)-XI*, *aphA1*, *ermX*, *ermB*, *tetA*, *tetB* ve *gyrA* direnç genlerinin varlığı in-house PCR ile araştırıldı (71, 87, 94, 150, 153, 161, 176, 177).

Liyofilize halde bulunan primerler üretici firmanın (Oligomer) talimatları doğrultusunda sulandırıldı. 100 pmol/µl konsantrasyonda stok primerler elde edildi.

DNA amplifikasyonu için 2 ml'lik steril ependorf tüpte toplam hacim 50 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 µl, 10X PCR Buffer 5 µl, dNTP karışımı (her biri 10 mM) 1 µl, 0,5 µL forward ve reverse primerler (100 pmol/µl) ve TaqDNA Polimeraz (5 U/µL) 0.5 µl olacak şekilde PCR karışımı elde edildi (Tablo 5).

Amplifikasyon koşulları; 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, ardından 35döngü şeklinde 94°C'de 30 saniye denatürasyon, her bir gen için belirlenen sıcaklıkta 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 10 dakika son uzatma olarak belirlendi (Tablo 6).

Amplifikasyon işlemi termal döngü cihazı (Mycycler, BIO-RAD, ABD) kullanılarak yapıldı.

Direnç genlerine ait primer dizileri, beklenen bant büyüklükleri ve bağlanma ısıları Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.** PCR karışımı

<b>İçerik</b>	<b>Miktar (µl)</b>
10X PCR buffer	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5
dNTP mix	1
Forward primer (100 pmol/µl)	0,5
Reverse primer (100 pmol/µl)	0,5
Taq polimeraz	0,5
Kalıp DNA	5
Deiyonize su	32,5
<b>Toplam hacim</b>	<b>50</b>

**Tablo 6.** Amplifikasyon koşulları

<b>İşlem</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü sayısı</b>
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Bağlanma	*	1dk	35
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

\*Her primer için literatürde belirtilmiş olan bağlanma sıcaklığı

**Tablo 7.** Direnç genlerine ait primer dizileri, beklenen bant büyüklükleri ve bağlanma ısıları

Hedef gen	İlişkili direnç	Primer	DNA dizilimi (5'-3')	Sıcaklık (°C)	Size (bp)	Referans
<i>erm(X)</i>	Eritromisin, Klindamisin	erm(X)-F erm(X)-R	AACCATGATTGTGTTTCTGAACG ACCAGGAAGCGGTGCCCT	57	560	150
<i>erm(B)</i>	Eritromisin, Klindamisin	erm(B)-F erm(B)-R	GAAAAGGTTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	52	639	176
<i>bla</i>	Penisilin, Sefotaksim	bla-F bla-R	CAGTCTAGCCACTTCGCCAAT TGACTGCACGGATGGAGATGG	55	808	87
<i>ampC</i>	Penisilin, Sefotaksim	ampC-F ampC-R	CAATCGGATTCCTGGTCGCT TGGTTCGCGTGATGTTTTTCG	55	965	87
<i>gyrA</i>	Siprofloksasin	gyrA-F gyrA-R	GCGGCTACGTAAAGTCC CCGCCGGAGCCGTTTCAT	60	337	153
<i>tetA</i>	Tetrasiklin	tetA-F tetA-R	TTAGCGTTCGGCGACCTGG GGTGGTCTTGTCTGCCCTCA	60	552	177
<i>tetB</i>	Tetrasiklin	tetB-F tetB-R	ACGGTGTTCAACGCCCTGTT AACTGGGTGCCTTCAGGGTC	59	506	71
<i>aphA1</i>	Gentamisin	aphA1-F aphA1-R	GGCAAGATCCTGGTATCGGTCT AGACTAAACTGGCTGACGGCAT	57	480	94
<i>aac(3)-XI</i>	Gentamisin	aac(3)-XI-F aac(3)-XI-R	ATGACTACAACCAACGAGATC CTAAAGCTCCCGGATGTAGAG	52	452	161

### **Agaroz jel elektroforezi ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi**

Amplifikasyon işlemi sonucu elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile yürütüldü. Bunun için %1,5'lük agaroz jel hazırlandı. 100 ml 1xTBE içine 1,5 gr agaroz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) eklendi ve çözelti 3-5 dakika mikrodalga fırında eritilerek agarozun tam olarak çözülmesi sağlandı. Oluşan çözelti 55-60°C'ye soğutulduktan sonra içerisine 5 µL etidyum bromür eklendi. Jel elektroforez tablası içine taraklar yerleştirildikten sonra sıvı haldeki jel tabla içerisine yavaş yavaş kabarcık oluşturmayacak şekilde döküldü. Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Katılaştıran jel, jel elektroforez tankının içerisine yerleştirildi ve taraklar çıkarıldı. Elektroforez tankına jel yüzeyini örtecek şekilde 1xTBE tamponu dolduruldu. 5 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl yükleme boyası karıştırıldı ve karışım 5 µl olarak yükleme kuyucuklarına yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 110-120V/cm<sup>2</sup> voltaj uygulanarak 45-50 dakika yürütüldü. Sonra jel transillüminatör cihazına (BIO-RAD UV Transillüminatör 2000, Milan, İtalya) yerleştirilerek ultraviyole ışık altında değerlendirildi. DNA bant büyüklüğünün ölçümü için marker olarak 100 bp Plus Blue GeneON ve 100 bp Vivantis VC Plus kullanıldı.

### **PFGE yöntemi ile klonal analiz**

Çalışmaya dahil edilen suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla PFGE yöntemi kullanıldı. Navas ve ark. protokolü uygulandı (72).

### **İzolatların hazırlanması**

Tür düzeyinde tanımlanmış olan izolatların %5 koyun kanlı agar tek koloni ekimleri yapıldı. 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Saf kültür olarak üreyen tek koloniler bir öze yardımıyla toplanarak 5 ml beyin kalp infüzyon broth içerisinde süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyon 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki süpernatant atıldı ve kalan pellet üzerine 2 mg/ml lizozim içeren 300 µl 1xTE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) eklendi. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometrik okuyucu ile (ELISA Reader, Pasteur Diagnostic, France) 600 nm'de 2 absorbans olacak şekilde ayarlandı (72).

### **İzolatların agaroz gömülmesi**

%2'lik agar hazırlamak için 0,2 gr düşük erime ısılı agaroz (Low melting agarose, LMA) (Bio Basic) hassas terazide tartılıp uygun bir erlen içerisine aktarıldı, daha sonra üzerine 10 ml 1xTE tamponu eklendi ve mikrodalga fırında eritildi ve 50°C'ye ısıtılmış kuru ısı bloğu üzerine koyuldu. Agaroz içine %20'lik sodyum dodezil sülfat (SDS) (Bio Basic, Kanada) ve 0,2 mg/ml proteinaz K (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) ilave edildi. Daha sonra her bir izolat için steril ependorf tüpler hazırlandı. Agaroz-SDS karışımından 200 µl ve bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak bu ependorflara aktarıldı, homojen bir karışım elde etmek için birkaç defa pipetaj yapıldı. Bakteri süspansiyonu-agaroz karışımının 100 µl'si hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde "plug mold" adı verilen kalıplara aktarıldı, katılaşmaya kadar 2-8°C'de 15-20 dk bekletildi. Bu şekilde agaroz kalıpları elde edildi (72).

### **Agaroz gömülü hücrelerin parçalanması**

Hücrelerin parçalanmasını ve DNA'nın açığa çıkmasını sağlamak için hücre lizis tamponu hazırlandı. Bunun için 4 ml 1xTE tamponu içine %1'lik sarkozil (Bio Basic, Kanada) ve 0,15 mg/ml proteinaz K (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) eklendi. 10 ml'lik steril cam tüplere bu tampondan 4'er ml dağıtıldı, bir aparat yardımıyla plug moldda bulunan kalıplar tüplere aktarıldı. Kalıplar 55°C'de su banyosunda 1 gece bekletildi (72).

### **Agaroz kalıpların yıkanması**

İçinde agaroz kalıp bulunan TE tampon döküldü, her bir tüp üzerine 50°C'ye ısıtılan steril ultra saf sudan 4'er ml eklenerek 3'er defa yıkama yapıldı. Yıkama işlemi sonrası su tamamen aspire edildi. Daha sonra agaroz kalıpları 50°C'ye ısıtılan 4 ml 1xTE tamponu ile 3'er defa yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz kalıp, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu (72).

### ***Xba*I restriksiyon enzimi ile DNA'nın kesilmesi**

Yıkama işlemi bittikten sonra agaroz kalıpları, steril bir lam üzerinde agaroz kalıbın 1/4'ü 2mm genişliğinde olacak şekilde bir bistüri yardımıyla kesildi. Kesilen kalıp steril bir ependorf tüpe alınarak, üzerine 100 µl enzim tamponu konuldu ve su

banyosunda 37°C’de 10-15 dakika bekletildi. Sonra tampon aspire edildi. 100 µl olarak hazırlanmış *XbaI* enzimi ve enzim tamponu ilave edildi. Su banyosunda 37°C’de 4 saat bekletildi. Enzimle kesme işlemi gerçekleşmiş oldu (72).

### **Jelin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi**

%1’lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 100 ml 0,5xTBE (44,5 mM Trisma base, 44,5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,0) tamponu içine 1 gr pulsed-field certified agarose (Bio-Rad Laboratories) eklendi ve mikrodalga fırında eritildi, 50°C’ye soğutuldu. 15’lik dişli tarağın uç kısımlarına DNA kalıpları (5. ve 10. diş kontrol suşa ait, diğer dişlere çalışmaya ait DNA kalıpları) yerleştirildi. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra tarak agaroz dökülecek tabla içine yerleştirildi. 50°C’ye soğutulmuş olan agaroz jel dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturmadan tabla içine döküldü. Oda ısısında 20-30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Agaroz jel katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Tablanın kenarları dikkatlice çıkarıldı. Tabla üzerindeki agaroz jel, içerisinde 1900 ml 0,5xTBE tamponu bulunan PFGE tankı içindeki siyah çerçeveye düzgünce yerleştirildi (72).

### **Elektroforez işlemi**

CHEF DR II “Drive Module” Sistemi (BioRad, California, ABD) ile elektroforez işlemi gerçekleştirildi ve PFGE koşulları Tablo 8’de belirtildiği şekilde uygulandı (178) .

**Tablo 8.** PFGE koşulları

<b>1. blok</b>		<b>2. blok</b>	
Başlangıç vuruş süresi	5 sn	Başlangıç vuruş süresi	2 sn
Bitiş vuruş süresi	30 sn	Bitiş vuruş süresi	5 sn
Vuruş açısı	120°	Vuruş açısı	120°
Sıcaklık	14 °C	Sıcaklık	14 °C
Akım	6V	Akım	6V
Süre	7 saat	Süre	7 saat

### **PFGE sonuçlarının görüntülenmesi ve analizi**

Elektroforez işleminden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içinde 20 dakika bekletilerek boyandı. UV ışık altında görüntülendi. CCD kamera ile 'Gel Logic 2200 Kodak Imaging System' (Kodak, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak DNA bantlarının fotoğrafı çekildi ve fotoğraflar TIFF formatında bilgisayara kaydedildi. Syngene Gene Directory Application Version 2.01.02 (İngiltere) yazılım sistemi kullanılarak bant profillerinin analizi gerçekleştirildi. Öncelikle her resimde bulunan iki adet kontrol suşun (5. ve 10. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. Aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup (UPGMA- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) metodu ve "Dice" benzerlik (Dice similarity coefficient) katsayısı kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %2 olarak alındı. Marker olarak *C. striatum* ATCC6940 suşu kullanıldı (*C. striatum* ATCC6940 suşu Dr. Elisabet GUİRAL-VİLALTA'dan temin edildi).

### **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Verilerin analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Ver. 25.0 (Armonk, NY: IBM Corp. ABD) istatistiksel yazılım programı kullanılarak yapılmıştır. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Kategorik veriler arasındaki ilişkiyi saptamak için ki-kare testi kullanılmıştır.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### Hastaların demografik ve klinik özellikleri

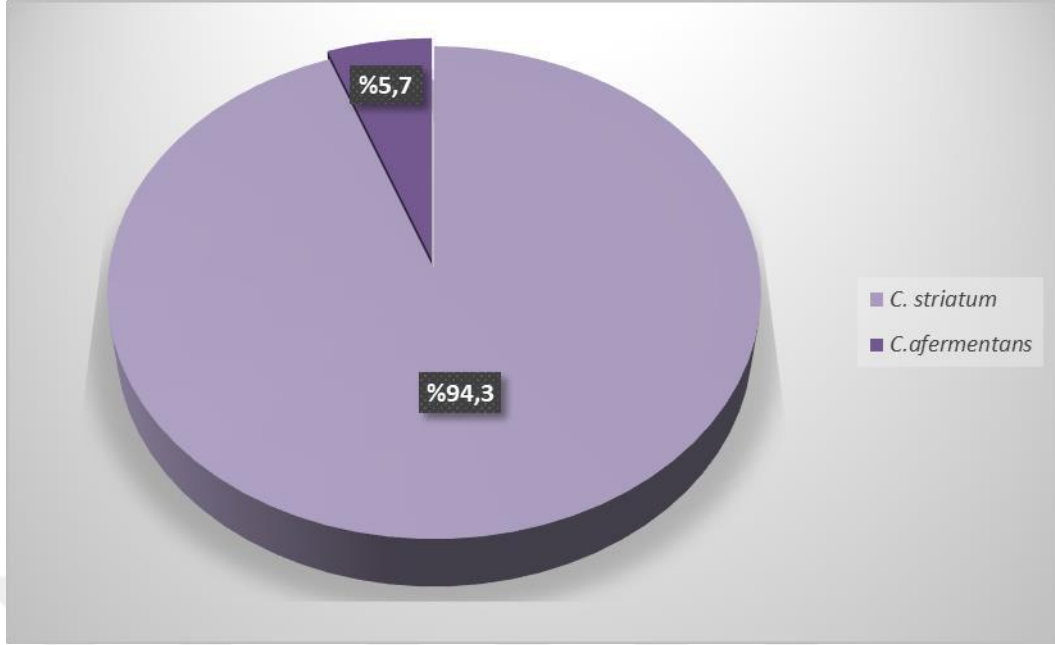
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, Aralık 2020-Ocak 2023 tarihleri arasında, klinik birimlerden gönderilen çeşitli klinik örneklerden (kan, kateter içi kan, yara, trakeal aspirat, balgam, abse ve plevral sıvı) izole edilen *Corynebacterium* cinsine ait 140 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Her hastadan bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

*Corynebacterium* izole edilmiş hasta grubunun 48'i (%34,3) kadın, 92'si (%65,7) erkek hastadır.

Hastaların yaş gruplamasında 18 hasta (%12,9) 20-44 yaş, 21 hasta (%15) 45-59 yaş, 60 hasta (%42,9) 60-74 yaş ve 41 hasta (%29,3) 75-95 yaş aralığındadır. Hastaların yaş ortalaması 65,5'tir.

Hastaların %22,9'unda malignite, %27,9'unda kronik hastalık, %11,4'ünde travma ve %37,9'unda enfeksiyon öyküsü bulunmaktadır. Enfeksiyon öyküsü olan hastaların %41,5'inde diyabetik ayak enfeksiyonu, %24,5'inde cerrahi yara enfeksiyonu ve %33,9'unda ise diğer enfeksiyonlar (pnömoni, ürosepsis, menenjit, hidradenitis süpurativa, fournier gangreni, dekübit ülser) bulunmaktadır.

Çalışmaya dahil edilen 140 adet *Corynebacterium* izolatının tür düzeyinde tanımlaması MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. Tür dağılımında 132'sinin (%94,3) *C. striatum* ve 8'inin (%5,7) *C. afermentans* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** *Corynebacterium* izolatlarının tür dağılımı

Çalışmaya dahil edilen 140 klinik örnekten 21'i (%15) kan, 7'si (%5) kateter içi kan, 48'i (%34,3) yara, 46'sı (%32,9) trakeal aspirat (TA), 11'i (%7,9) balgam, 4'ü (%2,9) abse materyali ve 3'ü (%2,1) plevral sıvı örneklerinden izole edilmiştir. En sık izole edilen klinik örnek yara (%34,3), ikinci en sık klinik örnek trakeal aspirat (%32,9) iken; en az izole edilen klinik örnek ise %2,1 ile plevral sıvı örneği olmuştur(Tablo 9).

**Tablo 9.** *Corynebacterium*'ların izole edildiği klinik örneklerin dağılımı (N: 140)

Örnek	n	%
Kan	21	15,0
Kateter içi kan	7	5,0
Yara	48	34,3
Trakeal aspirat	46	32,9
Balgam	11	7,9
Abse materyali	4	2,9
Plevral sıvı	3	2,1
<b>Toplam</b>	<b>140</b>	<b>100,0</b>

Çalışmamızda 25 örnek (%17,9) dahili birimlerden, 46 örnek (%32,9) cerrahi birimlerden ve 69 örnek (%49,3) yoğun bakım ünitelerinden (YBÜ) gönderilmiştir. En çok örneğin (%49,3) yoğun bakım ünitelerinden gelmiş olduğu tespit edilmiştir (Tablo 10).

**Tablo 10.** Klinik birimlerden gönderilen örneklerin sayısı ve oranları (N: 140)

<b>Klinik</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Dahili birimler*	25	17,9
Cerrahi birimler**	46	32,9
Yoğun bakım üniteleri***	69	49,3
<b>Toplam</b>	<b>140</b>	<b>100,0</b>

\*Onkoloji, hematoloji, enfeksiyon hastalıkları, nefroloji, kardiyoloji, göğüs hastalıkları, dermatoloji, kronik yara bakım ünitesi, fizik tedavi ve rehabilitasyon

\*\*Ortopedi, plastik cerrahi, göğüs cerrahisi, beyin cerrahi, genel cerrahi, üroloji, kardiyovasküler cerrahi (KVC)

\*\*\*Anestezi YB, dahiliye YB, beyin cerrahi YB, KVC YB, kardiyoloji YB

Örneklerin klinik birimlere göre dağılımında; dahili birimlerden gönderilen örneklerin beşi (%20) kan, biri (%4) kateter içi kan, onu (%40) yara, sekizi (%32) balgam örneği ve biri (%4) abse materyalidir. Cerrahi birimlerden gönderilen örneklerin dördü (%8,7) kan, biri (%2,2) kateter içi kan, 34'ü (%73,9) yara, üçü (%6,5) trakeal aspirat, üçü (%6,5) abse materyali ve biri (%2,2) plevral sıvı örneğidir. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerin 12'si (%17,4) kan, beşi (%7,2) kateter içi kan, dördü (%5,8) yara, 43'ü (%62,3) trakeal aspirat, üçü (%4,3) balgam ve ikisi (%2,9) plevral sıvı örneğidir. Yara örneği dahili ve cerrahi birimlerden en çok gönderilen örnek iken YBÜ'lerinden en çok gönderilen örnek ise trakeal aspirat örneğidir (Tablo 11).

**Tablo 11.** Örneklerin klinik birimlere göre dağılımı

Örnek	Dahili		Cerrahi		YBÜ	
	n	%	n	%	n	%
Kan	5	20,0	4	8,7	12	17,4
Kateter içi kan	1	4,0	1	2,2	5	7,2
Yara	10	40,0	34	73,9	4	5,8
Trakeal aspirat	-	-	3	6,5	43	62,3
Balgam	8	32,0	-	-	3	4,3
Abse	1	4,0	3	6,5	-	-
Plevral sıvı	-	-	1	2,2	2	2,9
<b>Toplam</b>	<b>25</b>	<b>100,0</b>	<b>46</b>	<b>100,0</b>	<b>69</b>	<b>100,0</b>

Kan kültürü örneklerinden izole edilen *Corynebacterium* izolatlarının %71,4'ü *C. striatum* iken %28,6'sı *C. afermentans*, kateter içi kan kültürü örneklerinden izole edilen *Corynebacterium* izolatlarının %85,7'si *C. striatum*, %14,3'ü *C. afermentans*'tır. Trakeal aspirat örneklerinden izole edilen *Corynebacterium* izolatlarının %97,8'i *C. striatum* iken %2,2'si *C. afermentans*'tır. Yara, balgam, abse ve plevral sıvı örneklerinin tamamından (%100,0) *C. striatum* izole edilmiştir (Tablo 12).

**Tablo 12.** Klinik örneklerin türlere göre dağılımı (N: 140)

Örnek	<i>C. striatum</i> (N: 132)		<i>C. afermentans</i> (N:8)	
	n	%	n	%
Kan	15	71,4	6	28,6
Kateter içi kan	6	85,7	1	14,3
Yara	48	100,0	0	0,0
Trakeal aspirat	45	97,8	1	2,2
Balgam	11	100,0	0	0,0
Abse	4	100,0	0	0,0
Plevral sıvı	3	100,0	0	0,0

### Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının yorumlanması

Antibiyotik duyarlılığını saptamak amacıyla yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi sonuçları, EUCAST rehberinde *Corynebacterium* cinsi için verilen direnç sınır değerlere göre yorumlanmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmış 140 adet *Corynebacterium* izolatının tamamı (%100) linezolid ve vankomisine duyarlı iken tamamı (%100) siprofloksasin dirençli bulunmuştur. İzolatların 138'i (%98,6) penisiline, 135'i (%96,4) klindamisine, 139'u (%99,3) rifampisin ve tetrasikline, 124'ü (%88,6) gentamisine ve 106'sı (%75,7) eritromisine dirençli bulunmuştur (Tablo 13).

**Tablo 13.** Tüm izolatların antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları

Antimikrobiyal ajan	Duyarlı (S)		Dirençli (R)	
	n	%	n	%
Penisilin	2	1,4	138	98,6
Eritromisin	34	24,3	106	75,7
Klindamisin	5	3,6	135	96,4
Siprofloksasin	-	-	140	100,0
Gentamisin	16	11,4	124	88,6
Tetrasiklin	1	0,7	139	99,3
Rifampisin	1	0,7	139	99,3
Vankomisin	140	100,0	-	-
Linezolid	140	100,0	-	-

*Corynebacterium striatum* izolatlarının tamamı (%100) siprofloksasin ve tetrasikline dirençli bulunmuştur. İzolatların %98,5'i penisiline, %99,2'si rifampisine, %97'si klindamisine, %90,2'si gentamisine ve %74,2'si eritromisine dirençli saptanmıştır. *C. striatum* izolatlarının tamamı (%100) linezolid ve vankomisine duyarlı bulunmuştur (Tablo 14).

**Tablo 14.** *C. striatum* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları

Antimikrobiyal ajan	Duyarlı (S)		Dirençli (R)	
	n	%	n	%
Penisilin	2	1,5	130	98,5
Eritromisin	34	25,8	98	74,2
Klindamisin	4	3,0	128	97,0
Siprofloksasin	-	-	132	100,0
Gentamisin	13	9,8	119	90,2
Tetrasiklin	-	-	132	100,0
Rifampisin	1	0,8	131	99,2
Vankomisin	132	100,0	-	-
Linezolid	132	100,0	-	-

*Corynebacterium afermentans* izolatlarının tamamı (%100,0) penisilin, eritromisin, siprofloksasin ve rifampisine dirençli bulunmuştur. İzolatların %87,5'i klindamisin ve tetrasikline, %62,5'i ise gentamisine dirençli saptanmıştır. *C. afermentans* izolatlarının tamamı (%100) linezolid ve vankomisine duyarlı bulunmuştur (Tablo15).

**Tablo 15.** *C. afermentans* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları

Antimikrobiyal ajan	Duyarlı (S)		Dirençli (R)	
	n	%	n	%
Penisilin	-	-	8	100,0
Eritromisin	-	-	8	100,0
Klindamisin	1	12,5	7	87,5
Siprofloksasin	-	-	8	100,0
Gentamisin	3	37,5	5	62,5
Tetrasiklin	1	12,5	7	87,5
Rifampisin	-	-	8	100,0
Vankomisin	8	100,0	-	-
Linezolid	8	100,0	-	-

Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarına bakıldığında; hem *C. striatum* hem de *C. afermentans* izolatlarının çoklu ilaç direncine sahip oldukları ve antimikrobiyal direnç oranlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

#### **Direnç genlerinin moleküler sonuçlarının yorumlanması**

Tüm izolatların %94,3'ünde *bla* geni, %95'inde *ampC* geni, %95,7'sinde *ermX* geni, %90'nında *aac(3)-XI* geni, %92,1'inde *aphA1* geni, %97,9'unda *gyrA* geni ve %32,9'unda *tetA* geni pozitif saptanmıştır. *ermB* ve *tetB* genleri izolatların hiçbirinde pozitif bulunmamıştır (Tablo 16).

**Tablo 16.** Tüm izolatlarının direnç geni oranları

Direnç geni	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
<i>bla</i>	132	94,3	8	5,7
<i>ampC</i>	133	95,0	7	5,0
<i>ermX</i>	134	95,7	6	4,3
<i>ermB</i>	-	-	140	100,0
<i>aac(3)-XI</i>	126	90,0	14	10,0
<i>aphA1</i>	129	92,1	11	7,9
<i>tetA</i>	46	32,9	94	67,1
<i>tetB</i>	-	-	140	100,0
<i>gyrA</i>	137	97,9	3	2,1

*Corynebacterium striatum* izolatlarının %99,2'sinde *bla* ve *ampC* geni, %96,2'sinde *ermX* geni, %93,2'sinde *aac(3)-XI* geni, %91,7'sinde *aphA1* geni ve %34,8'inde *tetA* geni pozitif saptanmıştır. *gyrA* geni *C. striatum* izolatlarının tamamında pozitif saptanmıştır. *ermB* ve *tetB* genleri ise *C. striatum* izolatlarının hiçbirinde pozitif bulunmamıştır (Tablo 17).

**Tablo 17.** *C. striatum* izolatlarının direnç geni oranları

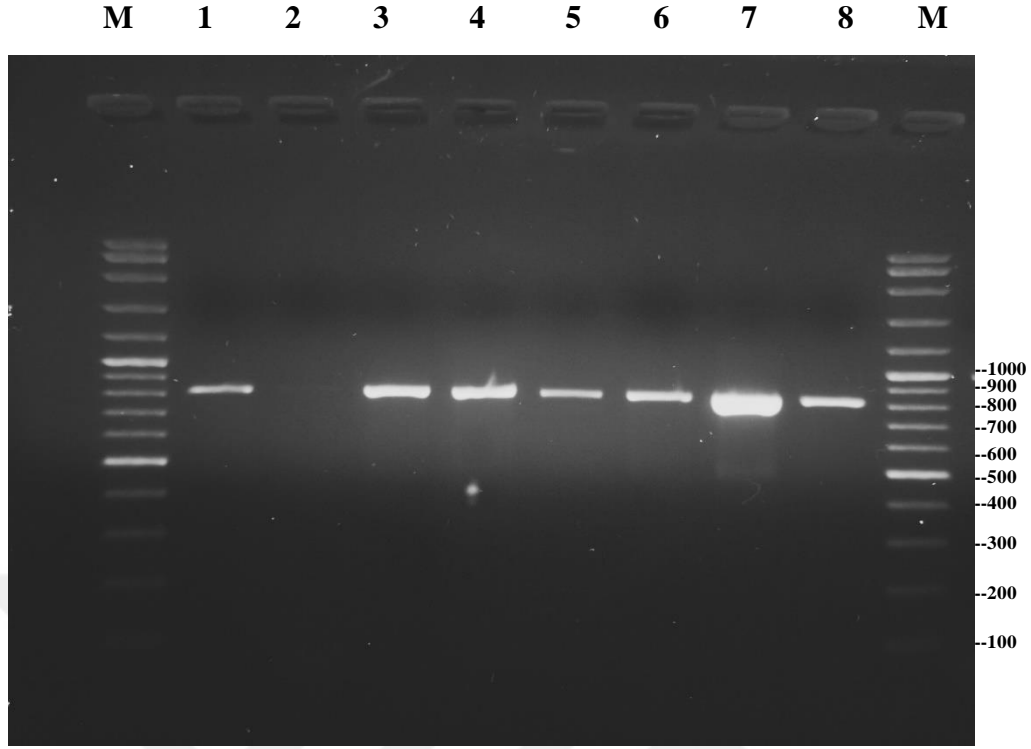
Direnç geni	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
<i>bla</i>	131	99,2	1	0,8
<i>ampC</i>	131	99,2	1	0,8
<i>ermX</i>	127	96,2	5	3,8
<i>ermB</i>	-	-	132	100,0
<i>aac(3)-XI</i>	123	93,2	9	6,8
<i>aphA1</i>	121	91,7	11	8,3
<i>tetA</i>	46	34,8	86	65,2
<i>tetB</i>	-	-	132	100,0
<i>gyrA</i>	132	100,0	-	-

*C. afermentans* izolatlarının %12,5'sinde *bla* geni, %25'inde *ampC* geni, %87,5'inde *ermX* geni, %37,5'inde *aac(3)-XI* geni ve %62,5'inde *gyrA* geni pozitif saptanmıştır. *C. afermentans* izolatlarının tamamında (%100,0) *aphA1* geni pozitif saptanmıştır. *ermB*, *tetA* ve *tetB* genleri ise *C. afermentans* izolatlarının hiçbirinde pozitif bulunmamıştır (Tablo18).

**Tablo 18.** *C. afermentans* izolatlarının direnç geni oranları

Direnç geni	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
<i>bla</i>	1	12,5	7	87,5
<i>ampC</i>	2	25,0	6	75,0
<i>ermX</i>	7	87,5	1	12,5
<i>ermB</i>	-	-	8	100,0
<i>aac(3)-XI</i>	3	37,5	5	62,5
<i>aphA1</i>	8	100,0	-	-
<i>tetA</i>	-	-	8	100,0
<i>tetB</i>	-	-	8	100,0
<i>gyrA</i>	5	62,5	3	37,5

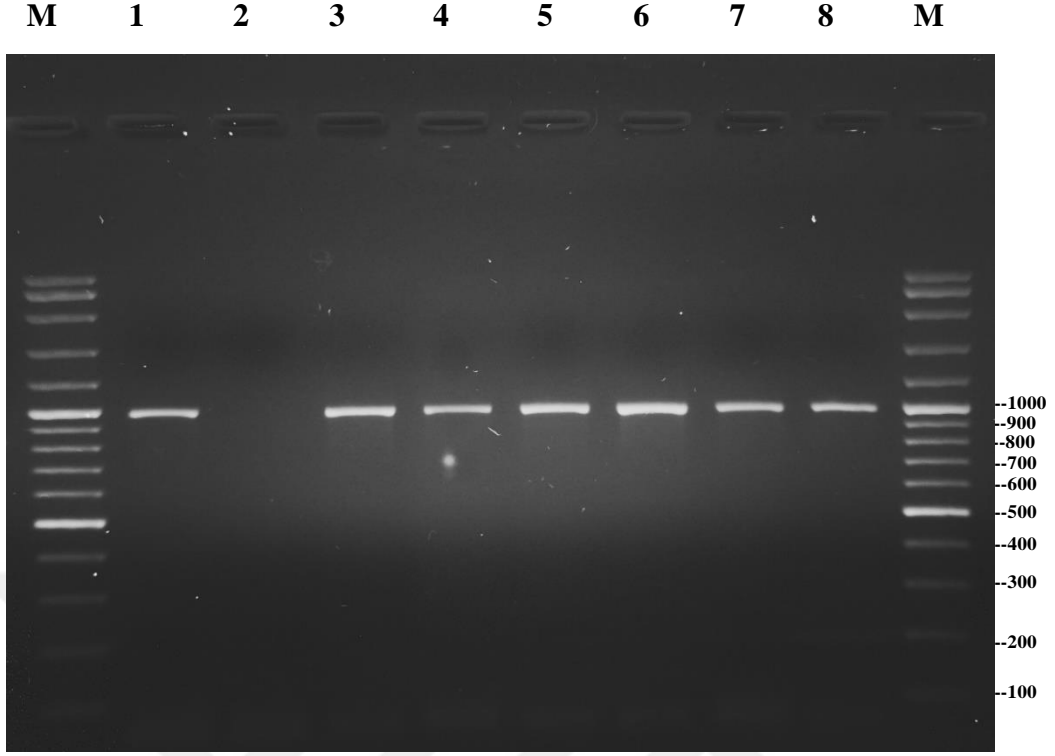
Penisiline dirençli 138 izolatın %94,2'sinde *bla* geni pozitif saptanmıştır. Penisiline duyarlı 2 izolatın her ikisinde de *bla* geni pozitif saptanmıştır. *bla* geni pozitif olan 132 izolatın 130'unda (%98,5) penisilin direnci görülürken, iki izolatın (%1,5) penisiline duyarlı olduğu görülmüştür. İzolatlarda *bla* geni pozitifliği ile fenotipik olarak yüksek penisilin direnç oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Tür bazında bakıldığında ise penisiline dirençli 130 *C. striatum* izolatının %99,2'sinde *bla* geni pozitif bulunmuştur. Penisiline duyarlı olan iki adet *C. striatum* izolatının ikisinde de *bla* geni pozitifliği saptanmıştır. *C. striatum* izolatlarında penisilin direnci ile *bla* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Tamamı penisiline dirençli olan *C. afermentans* izolatının %12,5'inde *bla* geni pozitif bulunmuştur. *bla* geni (808 bp) jel görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.** *bla* geni (808 bp) jel görüntüsü

M: DNA marker; 1, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. bant: pozitif hasta izolatları; 2 negatif hasta izolatı

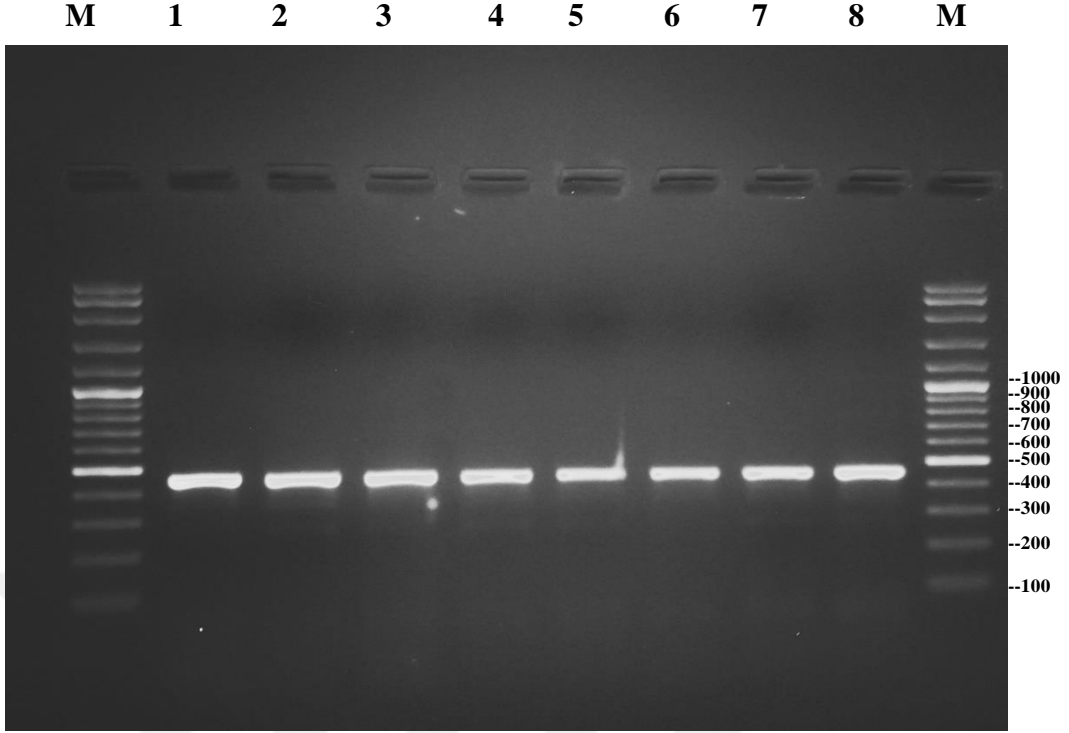
Penisiline dirençli *Corynebacterium* 138 izolatin %94,9'unda *ampC* geni pozitif saptanmıştır. Penisiline duyarlı iki izolatin her ikisinde de *ampC* geni pozitif saptanmıştır. *ampC* geni pozitif olan 133 izolatin 131'inde (%98,5) penisilin direnci görülürken, iki izolatin (%1,5) penisiline duyarlı olduğu görülmüştür. İzolatlarda *ampC* geni pozitifliği ile fenotipik olarak yüksek penisilin direnç oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Penisiline dirençli 130 *C. striatum* izolatinin %99,2'sinde *ampC* geni pozitifliği görülmüştür. *C. striatum* izolatlarında penisilin direnci ile *ampC* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Tamamı penisiline dirençli olan *C. afermentans* izolatinin %25'inde *ampC* geni pozitifliği görülmüştür. *ampC* geni (965 bp) jel görüntüsü Şekil 3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.** *ampC* geni (965 bp) jel görüntüsü

M: DNA marker; 1, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. bant: pozitif hasta izolatları; 2 negatif hasta izolatu

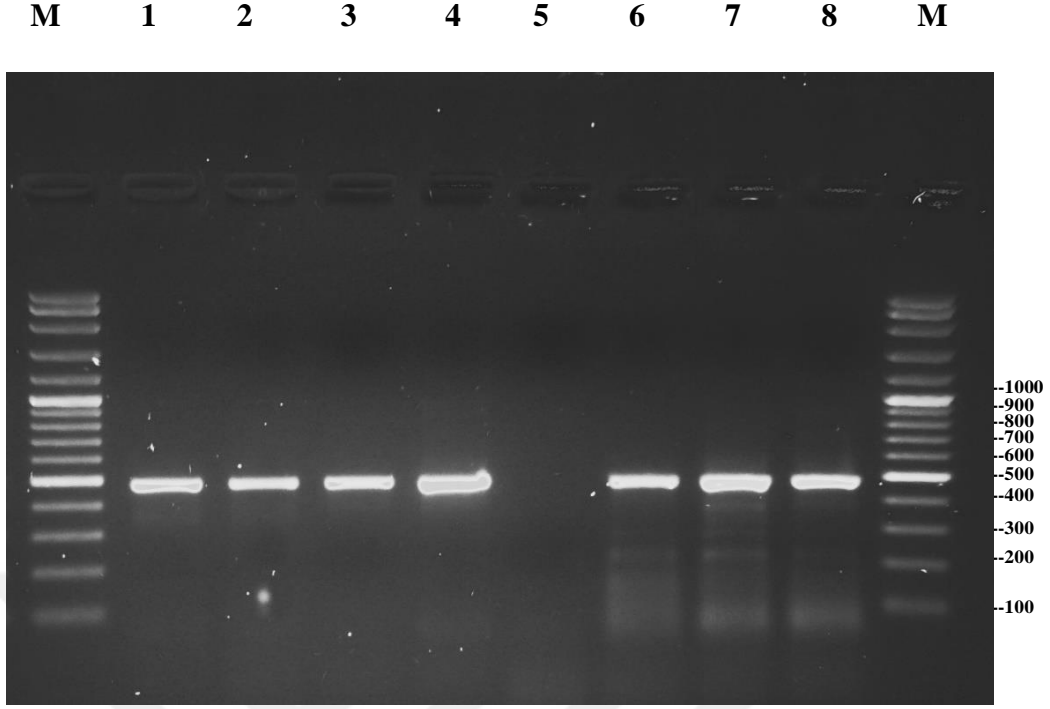
Gentamisine dirençli 124 izolatuın %96'sında *aac(3)-XI* geni pozitif saptanmıştır. Gentamisine duyarlı 16 izolatuın ise %43,8'inde *aac(3)-XI* geni pozitif saptanmıştır. *aac(3)-XI* geni pozitif olan 126 izolatuın 119'unda (%94,4) gentamisin direnci görülürken, yedi izolatuın (%5,6) gentamisine duyarlı olduğu görülmüştür. *aac(3)-XI* geni pozitif olan izolatlarda anlamlı bir şekilde gentamisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Tür bazında bakıldığında; gentamisine dirençli 119 *C. striatum* izolatuının %97,5'inde *aac(3)-XI* gen pozitifliği saptanmıştır. *C. striatum* izolatlarında gentamisin direnci ile *aac(3)-XI* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Gentamisine dirençli 5 *C. afermentans* izolatuının %60'ında *aac(3)-XI* gen pozitifliği görülmüştür. *C. afermentans* izolatlarında gentamisin direnci ile *aac(3)-XI* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). *aac(3)-XI* geni (452 bp) jel görüntüsü Şekil 4'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.** *aac(3)-XI* geni (452 bp) jel görüntüsü

M: DNA marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. bant: pozitif hasta izolatları

Gentamisine dirençli 124 izolatın %94,4'ünde *aphA1* geni pozitifliği görülmüştür. Gentamisine duyarlı 16 izolatın %75'inde *aphA1* geni pozitif saptanmıştır. *aphA1* geni pozitif olan 129 izolatın 117'sinde (%90,7) gentamisin direnci görülürken, 12 izolatın (%9,3) gentamisine duyarlı olduğu görülmüştür. *aphA1* geni pozitif olan izolatlarda anlamlı bir şekilde gentamisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Gentamisine dirençli 119 *C. striatum* izolatının %94,1'inde *aphA1* geni pozitifliği görülmüştür. *C. striatum* izolatlarında gentamisin direnci ile *aphA1* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Gentamisine dirençli 5 *C. afermentans* izolatının tamamında (%100) *aphA1* geni pozitif saptanmıştır. *aphA1* geni (480 bp) jel görüntüsü Şekil 5'te gösterilmiştir.



**Şekil 5.** *aphA1* geni (480 bp) jel görüntüsü

M: DNA marker; 1, 2, 3, 4, 6, 7 ve 8. bant: pozitif hasta izolatları; 5 negatif hasta izolatu

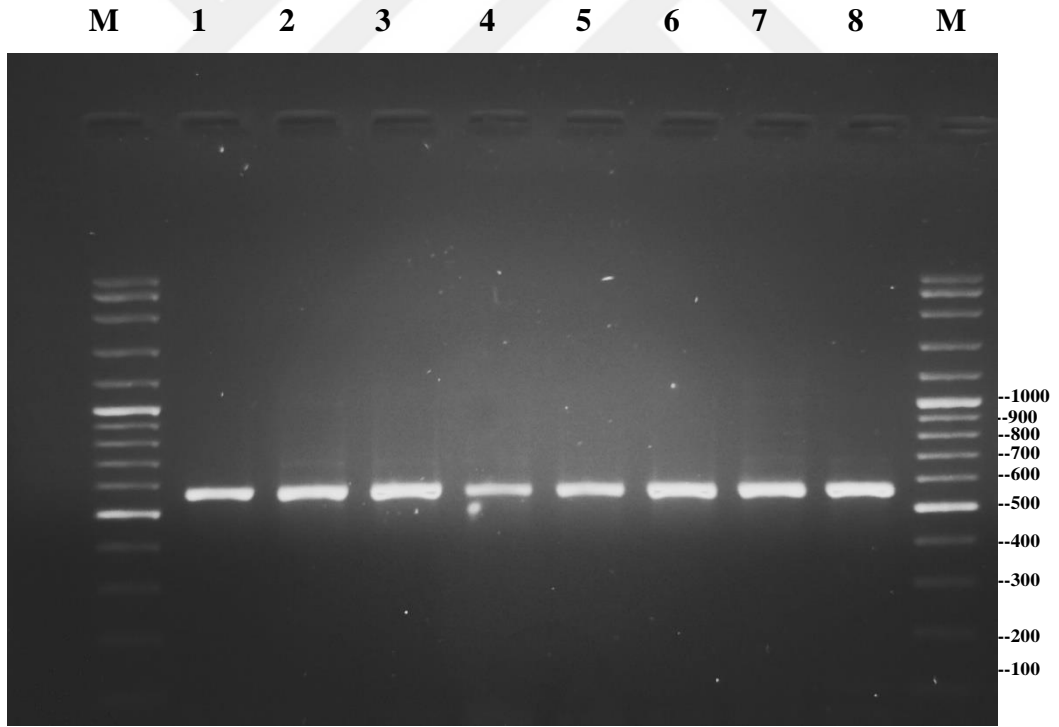
Eritromisine dirençli 106 izolatuın %98,1'inde *ermX* geni pozitifliği görülmüştür. *ermX* geni pozitif olan 134 izolatuın 104'ünde (%77,6) eritromisin direnci görülrken, 30 izolatuın (%22,4) eritromisine duyarlı olduğu görülmüştür. *ermX* geni pozitif olan izolatlarda anlamlı bir şekilde eritromisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tür bazında bakıldığında; 98 *C. striatum* izolatuının %99'unda *ermX* geni pozitifliği görülmüştür. *C. striatum* izolatlarında eritromisin direnci ile *ermX* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tamamı eritromisine dirençli olan 8 *C. afermentans* izolatuının %87,5'inde *ermX* geni pozitifliğine rastlanmıştır.

Klindamisine dirençli 135 izolatuın %98,5'inde *ermX* geni pozitifliği görülmüştür. *ermX* geni pozitif olan 134 izolatuın 133'ünde (%99,3) klindamisindirenci görülrken, bir izolatuın (%0,7) klindamisine duyarlı olduğu görülmüştür. *ermX* geni pozitif olan izolatlarda anlamlı bir şekilde klindamisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Tür bazında bakıldığında; 128 *C. striatum* izolatuının %98,4'ünde *ermX* gen pozitifliği görülmüştür. *C. striatum* izolatlarında klindamisin direnci ile *ermX* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur

( $p < 0,05$ ). Klindamisine dirençli yedi *C. afermentans* izolatının hepsinde (%100) *ermX* geni pozitifliği görülmüştür. Klindamisine duyarlı bir *C. afermentans* izolatında *ermX* geni negatif saptanmıştır. *C. afermentans* izolatlarında klindamisin direnci ile *ermX* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Eritromisine duyarlı 34 izolatın tamamını *C. striatum* izolatları oluşturmakta olup bunların %88,2'sinde *ermX* geni pozitifliği görülmüştür. Klindamisine duyarlı beş *Corynebacterium* izolatının %20'sinde *ermX* geni pozitifliği saptanmıştır. Klindamisine duyarlı dört *C. striatum* izolatının %25'inde *ermX* geni pozitifliği görülmüştür. Klindamisine duyarlı bir *C. afermentans* izolatında ise *ermX* geni negatif olarak saptanmıştır. *ermX* geni (560 bp) jel görüntüsü Şekil 6'da gösterilmiştir.

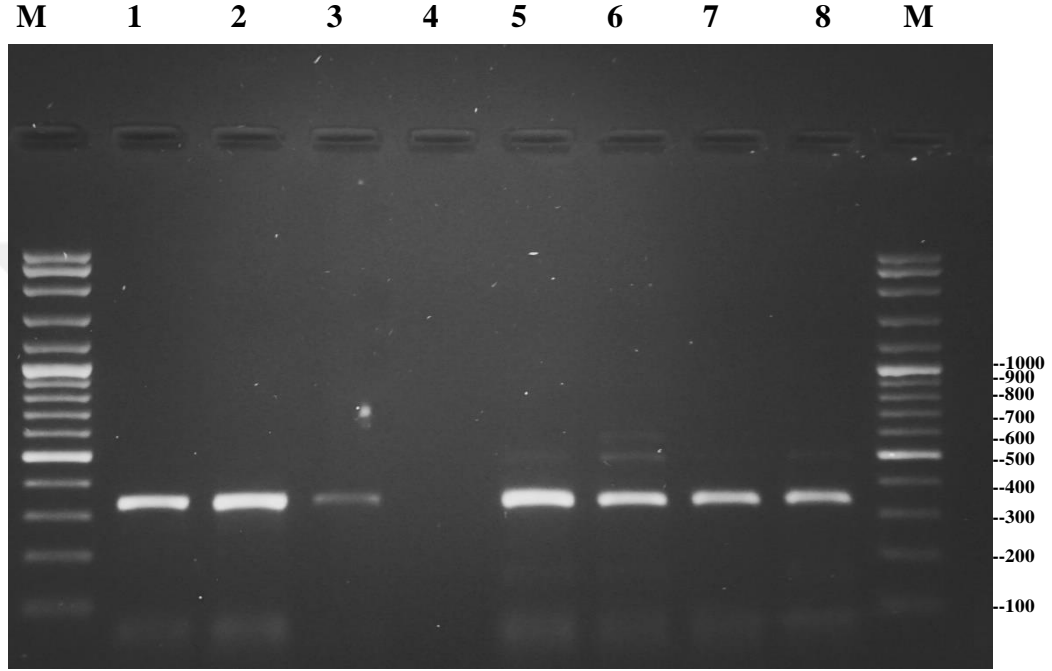
Eritromisin ve klindamisine duyarlı ve dirençli izolatların hiçbirinde *ermB* geni pozitifliği saptanmamıştır.



**Şekil 6.** *ermX* geni (560 bp) jel görüntüsü

M: DNA marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. bant: pozitif hasta izolatları

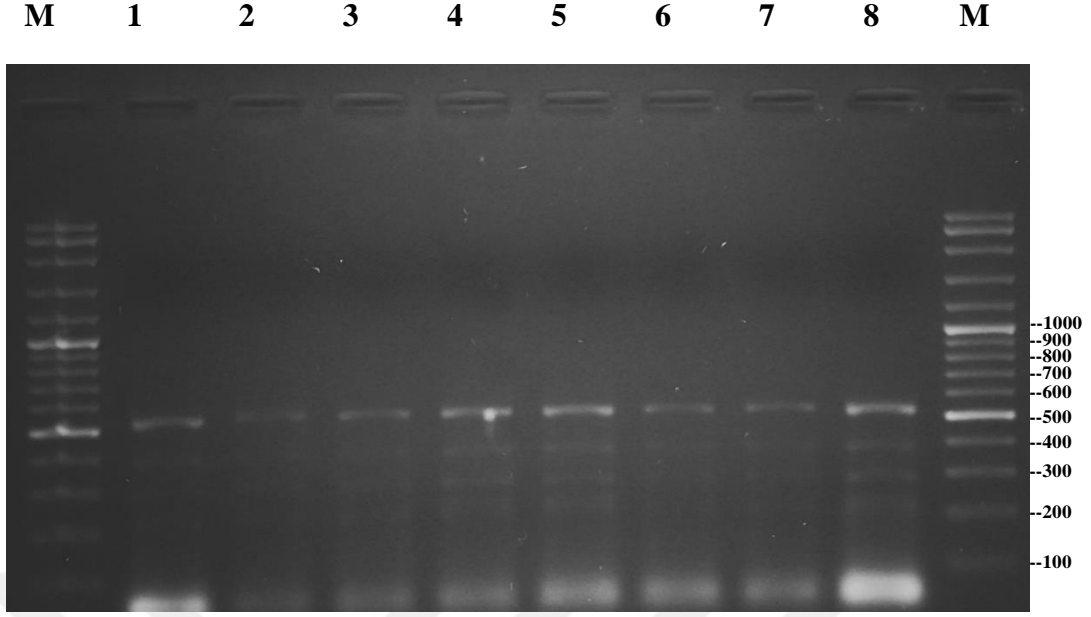
Fenotipik olarak siprofloksasine tamamı dirençli olan izolatların %97,9'unda *gyrA* geni pozitifliği görülmüştür. Tamamı siprofloksasine dirençli olan 132 *C. striatum* izolatlarının hepsinde *gyrA* geni pozitifliği bulunmuştur. Tamamı siprofloksasine dirençli olan *C. afermentans* izolatının %62,5'inde *gyrA* gen pozitifliği görülmüştür. *gyrA* geni (337 bp) jel görüntüsü Şekil 7'de gösterilmiştir.



**Şekil 7.** *gyrA* geni (337 bp) jel görüntüsü

M: DNA marker; 1, 2, 3, 5, 6, 7 ve 8. bant: pozitif hasta izolatları; 4 negatif hasta izolatı

*tetA* geni pozitif olan 46 izolatın tamamında fenotipik olarak tetrasikline direnç saptanmıştır. İzolatlarda *tetA* geni pozitifliği ile fenotipik olarak yüksek tetrasiklin direnç oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Tamamı tetrasikline dirençli olan 132 *C. striatum* izolatlarının %34,8'inde *tetA* geni pozitifliği görülürken, bu izolatların hiçbirinde *tetB* geni pozitifliğine rastlanmamıştır. Tetrasikline dirençli olan yedi *C. afermentans* izolatının hiçbirinde ne *tetA* geni ne de *tetB* geni pozitifliğine rastlanmıştır. *tetA* geni (502 bp) jel görüntüsü Şekil 8'de gösterilmiştir.



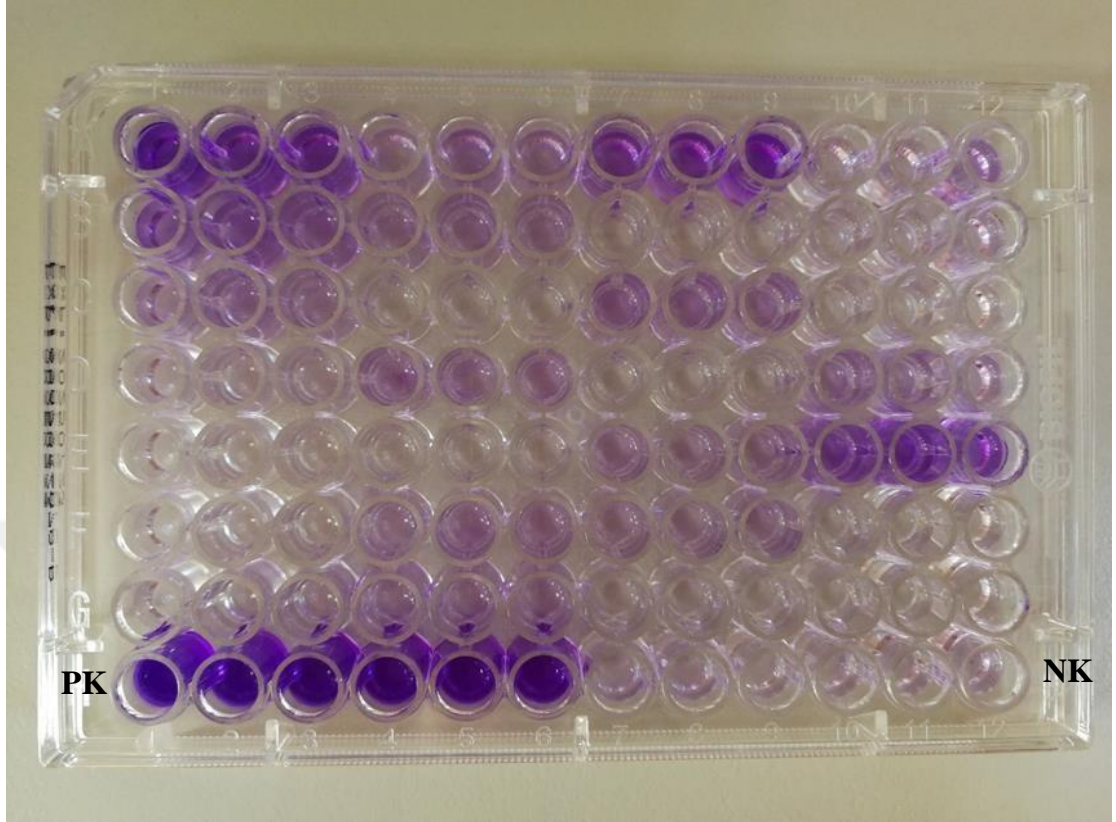
**Şekil 8.** *tetA* geni (502bp) jel görüntüsü  
M: DNA marker; 1, 2, 3, 4,5, 6, 7 ve 8. bant: pozitif hasta izolatları

### İzolatlarda biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

İzolatlarda biyofilm oluşumu mikrotitrasyon plak yöntemi ile semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 140 izolatın 37 tanesinde (%26,4) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Biyofilm oluşturan izolatların üç tanesinin (%2,1) güçlü, dokuz tanesinin (%6,4) orta derecede ve 25 tanesinin (%17,9) zayıf derecede biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. İzolatların 103 tanesinde (%73,6) ise biyofilm oluşumu görülmemiştir.

**Tablo 19.** İzolatların biyofilm oluşturma oranları

Tür	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif	
	n	%	n	%
<i>C. striatum</i> (N: 132)	37	28,0	95	72,0
<i>C. afermentans</i> (N:8)	0	0,0	8	100,0



**Şekil 9.** Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plağındaki görüntüsü

PK: Pozitif kontrol; NK: Negatif kontrol

*C. striatum* izolatlarının %28'inde biyofilm oluşumu görülürken, %72'sinde biyofilm oluşumu görülmemiştir. *C. afermentans* izolatlarının hiçbirinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. *Corynebacterium* türleri ile biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

**Tablo 20.** İzolatların biyofilm oluşturma durumları

Tür	Negatif		Zayıf		Orta		Güçlü	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>C. striatum</i> (N:132)	95	72,0	25	18,9	9	6,8	3	2,3
<i>C. afermentans</i> (N:8)	8	100,0	-	-	-	-	-	-

Kan örneklerinin %23,8'inde, kateter içi kan örneklerinin %28,6'sında, yara örneklerinin %31,3'ünde, trakeal aspirat örneklerinin %17,4'ünde, balgam örneklerinin %27,3'ünde, abse materyali örneklerinin %50'sinde ve plevral sıvı örneklerinin %66,7'sinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

Tekrarlayan kültürü olan hastalardan elde edilen izolatların %29,5'inde, tekrarlayan kültürü olmayan hastalardan elde edilen izolatların ise %22,6'sında biyofilm üretimi görülmüştür. Tekrarlayan kültürü olan ve olmayan hastalar arasında biyofilm oluşturma durumu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

Biyofilm oluşturan örneklerin %21,6'sı dahili birimlerden, %40,5'i cerrahi birimlerden ve %37,8'nin YBÜ'lerinden gönderilmiştir.

Biyofilm oluşumu ile antimikrobiyal ajanların direnç oranları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 21).

**Tablo 21.** Biyofilm üreten suşlarda antimikrobiyal direnç oranları

Antimikrobiyal ajan	Duyarlı		Dirençli		p değeri
	n	%	n	%	
<b>Penisilin</b>	2	5,4	35	94,6	>0,05
<b>Eritromisin</b>	11	29,7	26	70,3	>0,05
<b>Klindamisin</b>	2	5,4	35	94,6	>0,05
<b>Gentamisin</b>	6	16,2	31	83,8	>0,05
<b>Tetrasiklin</b>	0	0	37	100	>0,05
<b>Rifampisin</b>	0	0	37	100	>0,05
<b>Siprofloksasin</b>	0	0	37	100	-
<b>Vankomisin</b>	37	100	0	0	-
<b>Linezolid</b>	37	100	0	0	-

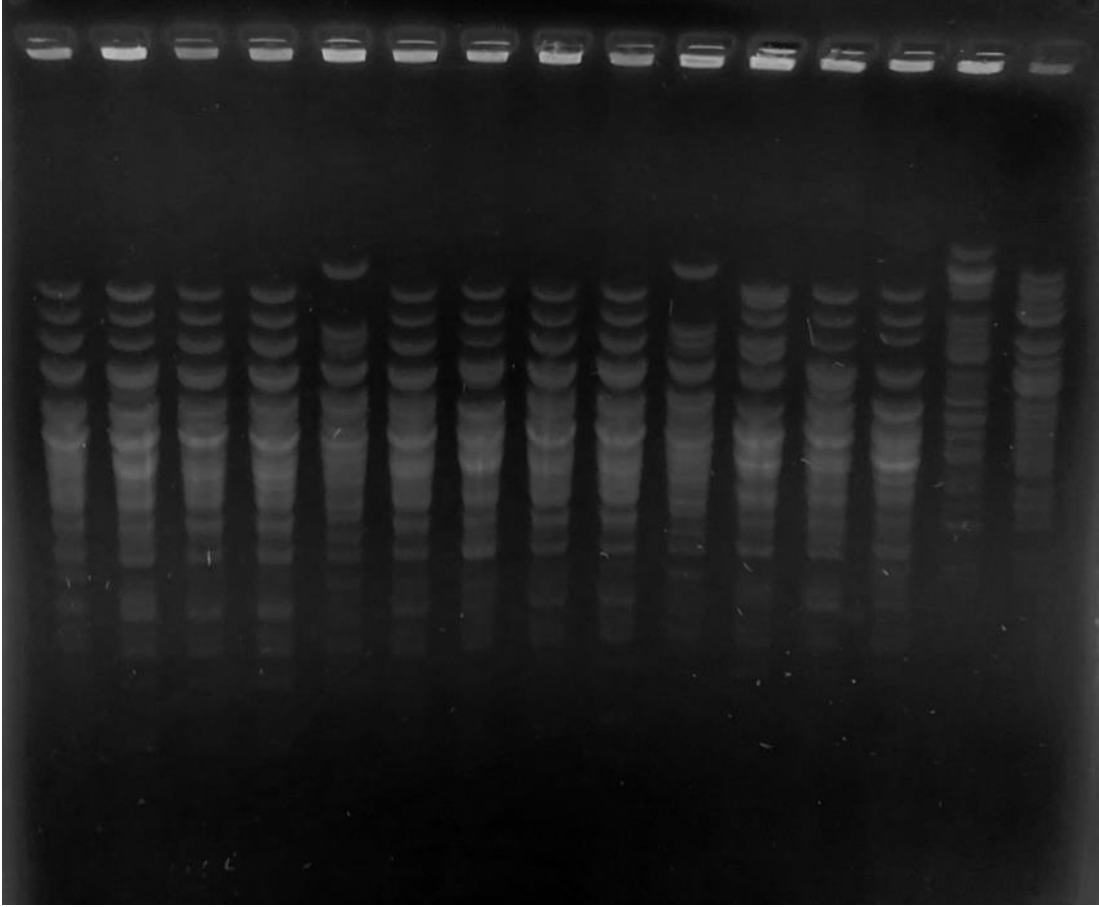
### **PFGE sonuçlarının değerlendirilmesi**

Çalışmaya dahil edilen 140 suşun klonal ilişkisi PFGE yöntemi ile araştırılmıştır. PFGE ile elde edilen bant paternlerinin kümeleşme analizi, Syngene Gene Directory Application Version 2.01.02 (İngiltere) yazılım programı ile Dice benzerlik katsayısı ve aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup (UPGMA- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) yöntemi kullanılarak, %2 optimizasyon ve toleransla gerçekleştirilmiştir. 140 suş 46 farklı PFGE paterni göstermiştir. Bu paternlerden 13 tanesi yalnızca birer suş içermektedir. Kalan 33 patern ise küme oluşturan suşları içermekte olup küme genişliği 2-12 arasında değişmektedir. Kümeleşme oranı %90,7 olarak saptanmıştır. En büyük küme; 12 izolatın yer aldığı A ile kodlanan kümedir. Bunu sırasıyla; A1 (10 izolat), V1 (8 izolat), L1 (7 izolat), F ve Y (6 izolat), B1, D, E, G, G1, H, J, L, P1, U1 ve V (4 izolat), M1 ve T1 (3 izolat), B, C, C1, D1, F1, H1, I, K1, N1, O, S1, T, U ve Y1(2 izolat) kümeleri takip etmektedir. A kümesindeki 12 suşun altı tanesi YBÜ'sinden, dört tanesi cerrahi birimlerden ve iki tanesi dahili birimlerden gelmiştir. A kümesine ait suşların dört tanesi kan, beş tanesi yara ve üç tanesi de TA örneğinden izole edilmiştir. A kümesine en yakın benzerlik gösteren küme on suş içeren A1 kümesidir. A1 kümesine ait suşların beş tanesi TA, dört tanesi yara ve bir tanesi balgam örneğinden izole edilmiştir (Şekil 11). A kümesine ait izolatların Kasım 2022-Ocak 2023 tarihleri arasında ortopedi, plastik cerrahi, hematoloji, gastroloji servisleri ve yoğun bakım ünitelerinden gelen örneklerden elde edildiği tespit edilmiştir. *XbaI* ile kesilen izolatların genomik DNA bant görüntüleri Şekil 10'da gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki tüm *C.striatum* izolatlarının küme içinde kaldığı, ancak *C. afermentans* izolatlarının küme dışında kaldığı görülmüştür. Tüm paternler içinde iki tane PFGE kümesinin baskın klonlar içerdiği ve tamamının *C.striatum* izolatları olduğu tespit edilmiştir. Baskın klona ait suşların yakın tarihlerde izole edilmesi ve benzer antimikrobiyal direnç paterni göstermesi, farklı kliniklerden izole edilmiş olmalarına rağmen klinikler arası hasta transferlerinden, ortak kullanılan cihaz ve sağlık personelinin hastadan hastaya bulaş olabileceğini düşündürmektedir. Suşların farklı kliniklerden ve örneklerden izole edilmiş olması hastane ortamında çapraz kontaminasyonla yayılmış olabileceğini göstermektedir. Baskın klondaki (A) suşların

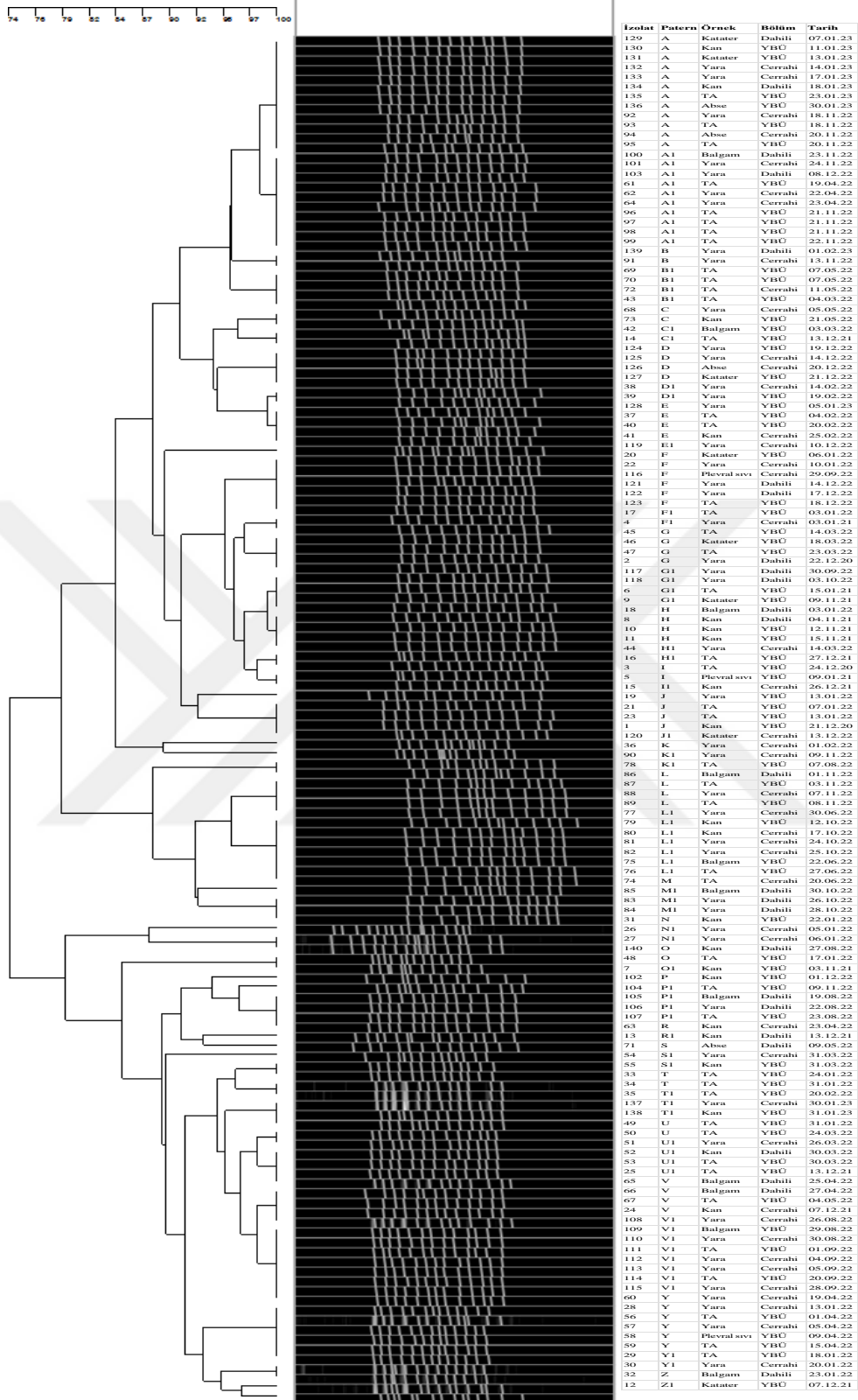
biyofilm oluşturma oranı %33,3 olarak saptanmıştır. Baskın klondaki izolatların hepsi çoklu ilaca dirençli oldukları görölmüştür. Kümeleşme oranının %90,7 gibi oldukça yüksek bir oranda çıktığı görölmektedir. Bu da hastanemizde 26 aylık süreçte aynı kümeye ait suşların çeşitli kliniklerde hem hastalarda enfeksiyona hem de çevrede kolonizasyona neden olduğunu göstermektedir.

1 2 3 4 M 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13



**şekil 10.** *XbaI* ile kesilen izolatların genomik DNA bant görüntüleri

M: Marker, *C. striatum* ATCC6940 suşu



Şekil 11. Tüm izolatların PFGE bant profilleri ve patern dağılımı

## TARTIŞMA

Non-difterik korineform bakteriler (NDC) insan cilt ve mukoz membranlarının kommensal florasında ve çevrede (toprak ve su) yaygın olarak bulunmaktadır (8, 9). *Corynebacterium* cinsi içinde patojenik olmayan saprofitik türlerin yanısıra patojenik fırsatçı türler de bulunmaktadır (5).

Önceleri insan klinik örneklerinden izole edilen NDC'ler çoğu zaman laboratuvar kontaminantları olarak değerlendirilip göz ardı edilmiştir. Uygun ticari tanımlama kitleri bulunmamasından ve klinik mikrobiyologların tanımlama için klasik testlerle sınırlı deneyime sahip olmasından dolayı bu mikroorganizmaları tanımlamak kolay olmamıştır. Bu gibi faktörler nedeniyle NDC'ler dahil birçok gram pozitif basilin klinik önemi birçok laboratuvarda gözden kaçabilmiştir (12). Uzun yıllar boyunca *Corynebacterium* türlerinin patojenik potansiyeli, tanımlamada ve kolonizasyon, kontaminasyon ve enfeksiyon ayırımında zorluk nedeniyle ihmal edilmiştir (15).

Son yıllarda, *Corynebacterium* cinsinin klasik patojeni olan *C. diphtheriae* dışında birçok türün yüzeysel ve invaziv enfeksiyonlarda rol oynadığı çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (13). *C. striatum* başta olmak üzere *C. jeikeum*, *C. urealyticum*, *C. afermentans*, *C. amycolatum*, *C. ulcerans*, *C. minutissimum*, *C. propinquum* ve *C. pseudodiphtheriticum* türleri artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak bildirilmektedir (17).

Günümüzde NDC'lerin hastane enfeksiyonlarının özellikle de immün sistemi baskılanmış olan hastalarda ortaya çıkan enfeksiyonların önemli nedenleri arasında olduğu bilinmektedir. NDC'lerin ne zaman gerçek bir patojen ne zaman kontaminant olduğunu bilmek önemlidir. Bu nedenle gerçek patojenlerin hızlı tanısı ve uygun tedavisi, bu bakterilerle enfeksiyonun kontrolünde çok önemli bir rol oynamaktadır (179). Numune doğru bir şekilde alınmışsa, Gram boyamada lökositlerle beraber görülmüş ise, saf kültür şeklinde üremiş ise, birden çok örnekte üremiş ise, steril örneklerde baskın mikroorganizma ise ve enfeksiyon için klinik endikasyon varsa

korineform bakteriler önemli kabul edilmeli ve kesin tanımlaması yapılmalıdır (12, 26, 180, 181). Şüpheli *Corynebacterium* bakteriyemisi vakalarında, steril olmasa bile hastalara ait diğer örneklerde (balgam, idrar vs.) korineform bakterilerin aktif olarak tanımlanması gerekmektedir (182). İzole edildikleri zaman konağa ait faktörler de göz önünde bulundurularak tür düzeyinde identifikasyonları yapılmalı ve antibiyotik duyarlılıklarına bakılmalıdır (183).

Gerçek enfeksiyon kaynağını belirlemek ve enfeksiyon için uygun tedaviyi planlamak için *Corynebacterium* türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması çok önemlidir. Geleneksel fenotipik ve biyokimyasal yöntemlere dayalı bakteri tanımlama yöntemlerinin çoğu zahmetli, zaman alıcıdır ve benzer özelliklere sahip birçok tür olduğu için de her zaman tür düzeyinde güvenilir tanımlama sağlamamaktadır. *Corynebacterium* türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması, klinisyenlerin bu izolatların patojenik mi, kontaminant mı olduğuna karar vermesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda *Corynebacterium* türleri dahil çoğu mikroorganizmanın tanımlanması için hızlı, güvenilir bir tanı aracı olan MALDI-TOF MS kullanılmaktadır (50, 54, 112, 184). Hem patojen tespitinde hem de yeni ortaya çıkan patojenlerin, özellikle korinebakteriler gibi genellikle gözden kaçan mikroorganizma grupları için tanımlamada önemli bir rol oynamaktadır (185).

MALDI-TOF MS ile *Corynebacterium* izolatlarında tür düzeyinde kesin tanımlama yapılabildiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Bao ve ark. 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada *Corynebacterium* türlerinin identifikasyonlarında MALDI-TOF MS'in oldukça güçlü bir tanı aracı olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmaya dahil edilen 75 adet *Corynebacterium* cinsine ait bakterinin tanımlanmasında *rpoB* gen sekans analizi ile doğrulanan tüm suşlar sırasıyla API Coryne, Phoenix ve MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. Tür düzeyinde tanımlamada bu üç sistem karşılaştırıldığında; MALDI-TOF MS %92 gibi yüksek bir oranda tür düzeyinde tanımlama yapabilirken, Phoenix ve API tanımlama yüzdeleri sırası ile %78,7 ve %65,3 gibi daha düşük oranlarda kalmıştır. Çalışmada bu üç sistemin tanımlama süreleri de kıyaslanmıştır. MALDI-TOF MS 3-5 dakika gibi çok kısa sürede tanımlama yapabilirken, Phoenix ve API 15-24 saat gibi oldukça uzun zaman

aralığında tanımlama yaptığı gözlenmiştir. Zaman tasarrufu, maliyet etkinliği ve kullanım kolaylığı açısından klinik laboratuvarlarda en çok tercih edilecek identifikasyon sisteminin MALDI-TOF MS olduğunu bildirmişlerdir (52).

Suwantarat ve ark. benzer bir çalışma ile 231 adet *Corynebacterium* izolatının tanımlanmasında MALDI-TOF MS ve API Coryne sistemini karşılaştırmışlardır. İzolatların MALDI-TOF MS ile %99,6 oranında cins düzeyinde ve %88,7 oranında tür düzeyinde tanımlaması yapılmıştır. API Coryne ile tür düzeyinde tanımlama %89,2 oranında yapılmıştır (186). Alibi ve ark. çalışmasında 97 adet *Corynebacterium* izolatı MALDI-TOF MS ile % 94,8 oranında tanımlanırken, Api Coryne ile % 88,6 gibi daha düşük bir oranda tanımlama yapılmıştır (187).

Barberis ve ark. 22 cins ve 60 tür içeren 333 tane farklı Gram pozitif klinik izolatı tanımlarken MALDI-TOF MS ve konvansiyonel fenotipik metodkarşılaştırması yapmışlardır. 216 adet *Corynebacterium* izolatının tür düzeyinde identifikasyonu MALDI-TOF MS ile %93,5 oranında saptanırken, konvansiyonel metod ile %92,1 oranında saptanmıştır. Aynı çalışmada tüm izolatlar için MALDI- TOF MS ile %92,4 gibi yüksek oranda tanımlama yapılmış iken konvansiyonel metodile %85,8 oranında tanımlama yapılmıştır (188). Zsada ve ark. çalışmalarında da *Corynebacterium* cinsine ait bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında MALDI- TOF MS ve diğer otomatize sistemler karşılaştırılmıştır. MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde tanımlama oranı oldukça yüksek (%92-93) bulunmuştur (38). Theel ve ark.2012 yılında yaptıkları çalışmada 90 tane mayayı ve 78 tane *Corynebacterium* cinsineait bakteriyi MALDI-TOF MS ile tanımlamıştır. MALDI-TOF MS analizi ile, *Corynebacterium* izolatlarının cins düzeyinde %96,2 ve tür düzeyinde ise %92,3 oranında doğru tanımlandığını ortaya koymuşlardır (189).

İnsan ve veteriner klinik orijinli 116 *Corynebacterium* izolatının tanımlanmasında MALDI-TOF MS yönteminin tür düzeyinde ayırım gücü araştırılmıştır. Çalışmada *rpoB* gen sekans analizi ile MALDI-TOF MS yöntemi karşılaştırıldığında, 116 izolatın 115'i (%99,1) MALDI-TOF MS tarafından tür düzeyinde doğru bir şekilde tanımlanmıştır ve sadece bir izolat cins düzeyinde

tanımlamayla sınırlı kalmıştır (50). Fransa’da pediatrik kistik fibrozis hastalarından izole edilen 18 tane *Corynebacterium* izolatında MALDI-TOF MS kullanılarak yapılan tanımlama ile *rpoB* sekans analizi ile yapılan tanımlamanın %100 uyumlu olduğu görülmüştür (185).

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole ettiğimiz *Corynebacterium* türlerinin identifikasyonları literatür göz önüne alındığında *Corynebacterium* türleri için en doğru tanımlama yapan MALDI-TOF MS (Bruker, Daltonics, Germany) ile yapılmıştır. MALDI-TOF MS ile tanımlamasını yaptığımız 140 izolat arasında *C. striatum* ve *C. afermentans* olmak üzere iki adet *Corynebacterium* türü tanımlanmıştır. İzolatların %94,3’ü *C. striatum* ve %5,7’si *C. afermentans* olarak tanımlanmıştır (Şekil 1).

Çalışmamızda izolatların büyük yüzdesini (%94,3) *C. striatum* oluşturmuştur. Yapılan çalışmalara bakıldığında *C. striatum* daha sık rapor edildiği görülmüştür. Benzer şekilde Yamamuro ve ark. *Corynebacterium* bakteriyemisini araştırdıkları çalışmalarında çalışmaya dahil edilen 115 *Corynebacterium* izolatlarının %58,2’si *C. striatum* ve %5,2’si *C. afermentans* olarak tanımlanmıştır (182). Barberis ve ark. 143 *Corynebacterium* klinik izolatının antimikrobiyal duyarlılığını disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak belirledikleri çalışmalarında da 143 *Corynebacterium* izolatında en büyük yüzdeyi *C. striatum* oluşturmuş olup izolatların %38,4’ü *C. striatum* olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada *C. afermentans* oranı ise %1,3 olarak bulunmuştur (79). Abe ve ark. hematolojik hastalığı olan bakteriyemik hastalardan izole edilen 147 adet *Corynebacterium* türünün klinik özellikleri ve ilaç duyarlılık paternlerini inceledikleri çalışmada en sık izole edilen tür %84,4 ile *C. striatum* olmuştur (190). Sun ve ark. difteri dışı *Corynebacterium* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıkları, ilaç direnç mekanizmaları ve biyofilm oluşturma yeteneklerini araştırdıkları çalışmada 45 *Corynebacterium* izolatı arasında %33,3 ile en yaygın tür *C. striatum* olarak bulunmuştur (176). Çelik ve ark. 107 *Corynebacterium* türünde antimikrobiyal duyarlılık testi yaptıkları çalışmada suşların %49,5’i *C. striatum* ve %8,4’ü *C. afermentans* bulunmuştur (24). Tanrıverdi ve ark. 2014-2017 yılları arasında üreyen 199 adet *Corynebacterium* izolatını

değerlendirdikleri çalışmada %61,8 ile en sık izole edilen tür *C. striatum* olmuştur (18).

Önceki yıllarda *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. xerosis* ve *C. frenesi* gibi NDC'ler insan cilt ve mukoz membranlarının da normal flora elemanı oldukları için klinik örneklerden izole edildiklerinde kontaminant olduğu düşünülmüştür (7). Ancak son yıllarda *C. striatum* başta olmak üzere *C. jeikeum*, *C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. afermentans*, *C. ulcerans*, *C. minutissimum*, *C. propinquum* ve *C. pseudodiphtheriticum* türleri özellikle de bağışıklığı baskılanmış hastalarda artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak bildirilmektedir (18).

Düşük virülanslı mikroorganizmalar olan *Corynebacterium*'ların potansiyel patojenler olarak rolü, ağırlıklı olarak belirli risk faktörleriyle ilişkilendirilmiştir. Konak bağışıklık sisteminin azalmış olması, önde gelen predispozan risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Kemik iliği baskılanmış hastalar, maligniteler, transplant alıcıları, kortikosteroid ve yoğun antibiyotik tedavisi alan birçok hasta grubunda immünsüpresyon görülmektedir. Yaşlı debil hastalar, diyabet, yaygın travma, yara, yanık ve HIV enfeksiyonu olan hastalar fırsatçı enfeksiyona açık hastalardır. Vasküler greftlerin, protez kalp kapakçıklarının ve eklem protezlerinin implantasyonu da enfeksiyon gelişme riskini artırmaktadır. Steril vücut bölgelerine yapılan invaziv tıbbi işlemler de ek bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (138).

Hem bağışıklığı baskılanmış hem de bağışıklığı yeterli olan hastalarda, çeşitli enfeksiyöz süreçlerin etyolojisinde *Corynebacterium* cinsine ait mikroorganizmaların rol aldığına dair çok sayıda rapor yayınlanmıştır. Özellikle cerrahi/invaziv işlemler, uzun süreli hastanede yatış, ileri yaş, neoplastik hastalıklar, organ nakli, diyabet, uzun süreli antibiyotik tedavisi, kateterizasyon, protez ve implant kullanımı gibi durumlarda fırsatçı patojen olarak enfeksiyonlara yol açmaktadırlar (15).

Çalışmamızda 140 örneğin izole edildiği hasta grubunun %72,1'i yaşlı hastalardan oluşmaktadır. Hastalara ait klinik özellikler arasında malignite (%22,9), kronik hastalık (%27,9), travma (%11,4) ve enfeksiyon (%37,9) (diyabetik ayak

enfeksiyonu, cerrahi yara enfeksiyonu, pnömoni, ürosepsis, menenjit, hidradenitis süpürativa, fournier gangreni, dekübit ülser) öyküsü bulunmaktadır. Hastaların anamnezleri incelendiğinde özellikle travma ve malignitesi olan hastalarda uzun süreli hastanede yatış, uzun süreli antibiyotik tedavisi ve kateterizasyon gibi enfeksiyona yol açabilecek durumların olduğu görülmüştür. Abe ve ark. hematolojik hastalığı olan bakteriyemik hastalarda *Corynebacterium* türlerinin klinik özellikleri ve ilaç duyarlılık paternlerini inceledikleri çalışmada AML (Akut miyeloid lösemi), ALL (Akut lenfoblastik lösemi), myelodisplastik sendrom ve malign lenfoması olan hastaların %76,2'sinde allojenik kök hücre transplantasyonu, %10,2'sinde diyabet ve %25,6'sında kronik böbrek yetmezliği gibi komorbid hastalıklar mevcuttur. Hastaların %8,8'inde mekanik ventilasyon, %83'ünde santral venöz kateter ve %17'sinde periferik kateter bulunmaktadır. Hastaların %87,8'inde nötropeni ve %55,1'inde sistemik kortikosteroid kullanımı gibi immünsüpresyona neden olan durumlar gözlenmiştir (190). Yamamuro ve ark. *Corynebacterium* bakteriyemisini araştırdıkları çalışmalarında hastaların altta yatan hastalıklarını incelediklerinde, hastaların %23'ünde diyabet, %14'ünde kronik böbrek yetmezliği, %4'ünde karaciğer hastalığı, %24'ünde solid tümör, %17'sinde lösemi, %12'sinde malign lenfoma ve %33'ünde hematolojik malignite olduğunu gözlemlemişlerdir (182).

Çalışmamızdaki 140 suşun izole edildiği klinik örneklerin 21'i (%15) kan, yedisi (%5) kateter içi kan, 48'i (%34,3) yara, 46'sı (%32,9) trakeal aspirat (TA), 11'i (%7,9) balgam, dördü (%2,9) abse materyali ve üçü (%2,1) plevral sıvı örneği olduğu görülmüştür. En sık izole edilen klinik örnek yara (%34,3), ikinci en sık klinik örnek trakeal aspirat (%32,9) iken; en az izole edilen klinik örnek ise %2,1 ile plevral sıvı örneği olmuştur (Tablo 9). Çelik ve ark. 107 adet *Corynebacterium* izolatu üzerinde antimikrobiyal duyarlılık testi yaptıkları çalışmalarında örneklerin %48,6'sı yara, %22,4'ü balgam, %11,2'si kan, %7,5'i kateter, %1,9'u steril sıvı (plevra, periton) örneğidir (24). Mumcuoğlu ve ark. 2010-2013 yılları arasında *C. striatum* izolatlarını değerlendirmeye aldıkları çalışmalarında suşların %49,5'i yara, %20'si trakeal aspirat, %18,8'i kan, %5,1'i steril vücut sıvısı, %4,2'si idrar, %2,5'i abse örneklerinden izole edilmiştir. En sık izolasyon YBÜ'lerinden (%37,9) yapılmıştır (191). Tanrıverdi ve ark. 2014-2017 yılları arasında üreyen *Corynebacterium* izolatlarının antimikrobiyal

duyarlılıklarını değerlendirdikleri çalışmada örneklerin %55,2'i alt solunum yolu, %20'si yara, %11,5'i kan, %5'i katater ucu, %2,5'i abse ve %8'i diğer (steril vücut sıvıları, ameliyat materyali) örneklerdir. *Corynebacterium* cinsi bakteriler en çok alt solunum yollarına ait örneklerden (%55,2) izole edilirken, ikinci sırayı yara kültürü almıştır (18). Çalışmalarda *Corynebacterium* türlerinin en sık izole edildiği klinik örneklerin yara, alt solunum yolu örnekleri ve trakeal aspirat örnekleri; en az izole edilen klinik örneklerin ise abse ve steril sıvı örneklerinin olduğu görülmüştür. Çalışmamızda diğer çalışmalara benzer şekilde en sık izole edilen örnek yara iken, en az izole edilen örnek steril sıvılar olmuştur.

*Corynebacterium jeikeium*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum*, *C. pseudodiphtheriticum* ve *C. afermentans* dahil olmak üzere *Corynebacterium* türlerinde çoklu ilaç direnci (ÇİD) profilleri ve virülans mekanizmalarına bağlı olarak bu mikroorganizmalarla enfekte hastalarda klinik etkiler giderek daha fazla görülmeye başlamıştır (140).

*C. striatum* ve *C. jeikeium*'un *Corynebacterium* türlerinin iki ana patojeni olduğu bildirilmektedir (190). *Corynebacterium* türleri ile ilgili ilk yayınlanan raporlarda bu mikroorganizmaların  $\beta$ -laktamlar, tetrasiklin ve florokinolonlar dahil olmak üzere birçok antimikrobiyal ilaca sıklıkla duyarlı olduğu bildirilmiştir (180). Ancak son yıllarda yapılan yeni çalışmalarda çoklu ilaca dirençli (ÇİD) *C. striatum* izolatlarının neden olduğu nozokomiyal salgınlar artık dünya çapında birçok ülkede daha sık rapor edilmektedir (192). Özellikle *C. striatum*'a bağlı nozokomiyal salgınlar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde artmaktadır. *C. striatum* pulmoner enfeksiyonlar, sepsis, kan dolaşımı ve katater ilişkili enfeksiyon, endokardit, menenjit, osteomyelit, artrit, sinüzit, yara yeri enfeksiyonu gibi pek çok enfeksiyon ile ilişkilidir (89).

Çalışmamızın sonuçlarında ülkemizdeki ve diğer ülkelerdeki çalışmalarda olduğu gibi bizim hastanemizde de *Corynebacterium* türleri arasında *C. striatum*' un daha sık klinik etken olduğu ve *C. striatum*'a karşı çoklu direnç sorununun olduğu görülmüştür.

Barberis ve ark. 143 *Corynebacterium*'a ait klinik izolatta antimikrobiyal duyarlılığı belirlemek için disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada da tüm suşların vankomisin ve linezolide duyarlı olduğunu bulmuşlardır (79). Sun ve ark. hastanede yatmakta olan hastaların steril orta akım idrar kültürü örneklerinden izole edilen 45 tane non-difterik *Corynebacterium* izolatu antimikrobiyal duyarlılık, ilaç direnç mekanizmaları ve biyofilm oluşumuna baktıkları çalışmada izolatların tamamı vankomisin ve linezolide duyarlı bulunmuştur (176).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda da tüm suşlar vankomisin ve linezolide duyarlı bulunmuştur (24, 36, 142, 191). Bahsedilen tüm bu çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda tüm suşlar vankomisin ve linezolide duyarlı bulunmuştur. Literatürden farklı olarak Türkiye'de bir üniversite hastanesinde 2014-2017 yılları arasında yapılan bir çalışmada 2015 yılına ait bir izolatta linezolide karşı direnç görülmüştür (18). *Corynebacterium* türlerinde artan ilaç direnci tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır (23). NDC'ler birçok antibiyotiğe karşı direnç durumu sergilediğinden NDC'lerin ampirik tedavi seçenekleri vankomisin ve linezolid ile sınırlıdır (21, 29). Şu anda vankomisin, teikoplanin ve linezolid *Corynebacterium* türlerine karşı en etkili in vitro ilaçlardır (15). Birçok çalışma, invaziv *C. striatum* enfeksiyonundan şüphelenildiğinde ilktedavi seçeneği olarak vankomisini önermektedir, çünkü *Corynebacterium* suşlarının hiçbirinin vankomisine in vitro direnç göstermediği rapor edilmiştir (142).

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda, *C. striatum* başta olmak üzere birçok *Corynebacterium* türü birçok antibiyotiğe duyarlı bulunmaktaydı. Ancak yeni yapılan son çalışmalarda çoklu ilaca dirençli oldukları bildirilmiştir (23). *C. striatum* ve diğer *Corynebacterium* türleri  $\beta$ -laktamlar, aminoglikozidler ve florokinolonlar dahil olmak üzere çoklu ilaç sınıflarına karşı direnç geliştirmiştir (96). Sorumlu genlerin ekspresyonundan kaynaklanan farklı direnç mekanizmaları vardır (193).

Aminoglikozidler, *Corynebacterium* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ikinci basamak veya tamamlayıcı antibiyotiklerdir (72). Ancak *Corynebacterium* türlerinde aminoglikozid direnci sık görülmeye başlamıştır. Aminoglikozidlere karşı direnç ribozomal hedef değişikliği, enzimatik inaktivasyon ve ilacın sitoplazmaya

geçişinin engellenmesi şeklinde üç mekanizma ile oluşmaktadır (158). *Corynebacterium* türlerinde ise en sık karşılaşılan direnç mekanizması enzimatik inaktivasyondur (140). Enzimatik inaktivasyon aminoglikozid modifiye edici enzimler tarafından asetilasyon, adenilasyon veya fosforilasyon mekanizmaları ile gerçekleşir (159).

Galimand ve ark. 2015 yılında yayınladıkları çalışmada diyabeti olan 80 yaşındaki kadın hastanın topuk biyopsi materyalinden elde ettikleri *C. striatum* izolatının fenotipik olarak gentamisin ve tobramisine dirençli iken kanamisin ve amikasinine duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Bu fenotipin, Gram-pozitif bakterilerde aminoglikozidlere karşı bilinen direnç mekanizmaları ile açıklanamayacağını düşünmüşlerdir. Bu dirence neden olan durumu açıklamak için bu izolata tam genom analizi yapılmıştır. Tam genom analizinde bu izolatın tip XI olarak adlandırılan yeni bir aminoglikozid 3-N-asetiltransferaz ürettiği ve 3-N asetil transferazı kodlayan *aac(3)-XI* geni varlığı ortaya çıkarılmıştır (161).

İspanya'da *C. urealyticum* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık ve direnç mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada çalışmaya alınan kırk *C. urealyticum* izolatında gentamisin direnci %82,5 olarak bulunmuştur. Gentamisin direnci olan suşların hiçbirinde *aac(3)-XI* geni saptanmamıştır (71).

Navas ve ark. *C. striatum* izolatlarında aminoglikozid direnç genlerini araştırdıkları çalışmada çalışmaya dahil edilen 64 *C. striatum* izolatında altı tane aminoglikozid (gentamisin, amikasin, kanamisin, netilmisin, tobramisin ve streptomisin) için antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmıştır. Altmış dört izolatın 44'ünde birden fazla aminoglikozide direnç, 52'sinde altı aminoglikozidin en az birinde direnç görülürken, 12 izolat ise aminoglikozidlere duyarlı saptanmıştır. Yeni bir aminoglikozid direnç geni olan *aac(3)-XI* geni izolatların 44'ünde görülmüştür. *aac(3)-XI* geni taşıyan izolatların hepsinin hem gentamisin hem de tobramisine dirençli olduğu saptanmıştır (72).

Tunus'ta Alibi ve ark. yaptığı çalışmada 63 *C. striatum* izolatu test edilen beş aminoglikozidin direnç oranları %6,3 ile gentamisine, %4,8 ile amikasine, %17,5 ile kanamisine, %11,1 ile tobramisine ve %15,9 ile streptomisine direnç görülmüştür. Aminoglikozid direnç genlerinden *aac(3)-XI* geni 7 izolatta pozitif saptanmıştır. Bu izolatlardan ikisi hem gentamisine hem de tobramisine duyarlı (MİK <0,06 mg/L), geri kalan beşi gentamisin (MİK=8 mg/L) ve tobramisine (MİK=16 mg/L) dirençli saptanmıştır. *aac(3)-XI* geni gentamisine dirençli üç izolatta saptanmamıştır. Bunun nedeni olarak dirence başka bir mekanizmanın aracılık ettiği düşünülmüştür. Kanamisine (MİK>64 mg/L) dirençli olan on izolatta ve duyarlı olan 14 izolatta *aph(3')-Ic* geni pozitif saptanmıştır. Sekiz izolatta da *aph(3'')-Ib* ve *aph(6)-Id* genleri pozitif saptanmıştır. Bu izolatlardan beşinde streptomisin (MİK>64 mg/L) direnci görülürken, üçünde MİK değeri 1-4 mg/L olarak saptanmıştır. Bu durumun muhtemelen *aph(3'')-Ib* ve *aph(6)-Id* genlerinde veya promotörlerindeki mutasyon sonucu olabileceği kanaatine varılmıştır. Bu izolatlarda streptomisin direncine efluks pompası aktivasyonu ve bakteri hücrelerine alımın azalması gibi diğer direnç mekanizmalarının katkıda bulunduğu düşünülmüştür (87).

Sun ve ark. çalışmalarında çalışmaya alınan kırk beş tane difteri-dışı *Corynebacterium* izolatının %77,8'i gentamisine duyarlı saptanmıştır. Kırk beş izolatın 29'unda (%64,4) *aac(3)-XI* geni pozitif saptanmıştır. *aac(3)-XI* geni pozitif olan izolatların 10 tanesi gentamisine dirençli iken, 19'u duyarlı saptanmıştır. Buna göre *aac(3)-XI* geninin, gentamisin direncinin yalnızca bir kısmından sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır (176).

Çalışmamızda tüm suşların %88,6'sı gentamisine fenotipik olarak dirençli bulunmuştur (Tablo 13). Çalışmamızda gentamisine direnç oranı literatürde yer alan bazı çalışmalarla benzer bulunmuştur. Gentamisine dirençli 124 *Corynebacterium* izolatının %96'sında *aac(3)-XI* geni pozitif saptanmıştır, %4'ünde ise *aac(3)-XI* gen pozitifliği görülmemiştir. Gentamisine duyarlı 16 izolatın ise %43,8'inde *aac(3)-XI* geni pozitif saptanmıştır. *aac(3)-XI* geni pozitif olan 126 izolatın 119'unda (%94,4) gentamisin direnci görülürken, yedi izolatın (%5,6) gentamisine duyarlı olduğu

görülmüştür. Yapılan diğer çalışmalarda da bahsedildiği gibi bu durumun başka bir direnç mekanizmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (87).

Fernández-Natal ve ark. 38 ve 45 yaşlarında granülomatöz mastitli iki kadın hastanın ince iğne aspirasyon biyopsilerinden elde edilen nadir görülen ve genellikle antibiyotiklere duyarlı bir *Corynebacterium* türü olan *C. kroppenstedtii*'nin fenotipik ve genotipik özelliklerinin incelendiği çalışmada izolatlardan biri çoklu ilaca dirençli iken diğeri antimikrobiyal ajanlara duyarlı bulunmuştur. Her iki izolat da fenotipik olarak gentamisine duyarlı bulunmuştur. Çoklu ilaca dirençli izolatta *aphA1* dahil diğer direnç genleri de pozitif saptanmıştır (168).

Campanile ve ark. otuz altı tane çoklu ilaca dirençli çalışmasında *C. striatum* izolatının moleküler karakterizasyonunun incelendiği çalışmalarında suşların tamamı gentamisine (MİK= 32 mg/L) fenotipik dirençli bulunmuş olup bu suşlarda genotipik olarak aminoglikozid direncinden sorumlu genlerden biri olan *aphA1* geni pozitif saptanmıştır (94).

Çalışmamızda da gentamisine dirençli 124 *Corynebacterium* izolatının %94,4'ünde *aphA1* geni pozitifliği görülmüştür, izolatların %5,6'sında *aphA1* geni pozitif saptanmamıştır. Çalışmamızda Campanile ve ark. çalışmasına benzer şekilde fenotipik olarak gentamisine dirençli olan izolatların büyük bir yüzdesinde *aphA1* geni varlığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda *aphA1* geni pozitif olan 129 izolatın 117'sinde (%90,7) gentamisin direnci görülürken, 12'sinde (%9,3) gentamisin duyarlı bulunmuştur.

Birçok enfeksiyonun tedavisinde  $\beta$ -laktam antibiyotikler en yaygın kullanılan antimikrobiyal sınıftır. Bazı çalışmalarda penisilin veya amoksisilin ile *C. striatum* enfeksiyonlarının başarılı tedavileri bildirilmiştir. Bununla birlikte  $\beta$ -laktamlar arasında penisilin ve sefotaksim duyarlılığının düşük olduğu bildirilse de; direncin genetik mekanizması şimdiye kadar net bir şekilde karakterize edilememiştir (87).

$\beta$ -laktam antibiyotiklerin  $\beta$ -laktamazlar tarafından hidrolizi, klinik olarak önemli bakterilerde bu antimikrobiyal ajan sınıfına karşı en yaygın direnç mekanizmasıdır.  $\beta$ -laktamazlar; A, B, C ve D olmak üzere dört moleküler sınıfta sınıflandırılır (87). *Corynebacterium* türlerinde, son yıllarda penisilin gibi iyi bilinen  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direnç oranları oldukça yüksektir. *C. striatum*'da beta-laktam direnci, beta-laktam antibiyotikleri parçalayan *bla* ve *ampC* genleri tarafından kodlanan  $\beta$ -laktamazlardan kaynaklanır. *C. jeikeium*, *C. urealyticum* ve *C. resistens* gibi diğer korinebakterilerin de *bla* genini barındırdıkları, ancak beta-laktamlara dirençle ilişkilendirilmedikleri kaydedilmiştir. Ambler moleküler sınıflamasına göre serin hidrolazlar olarak da bilinen sınıf A beta laktamazlar *bla* geni tarafından kodlanırlar ve *Corynebacterium* türlerinde penisilin direncinden sorumludurlar (23, 140). Sefalosporinazlar olarak bilinen sınıf C beta laktamazlar ise *ampC* geni tarafından kodlanırlar, sefalosporinler başta olmak üzere, sefamisin ve penisilin direncinden sorumludurlar (140).

Tunus'ta Alibi ark. çalışmasında 63 tane *C. striatum* suşuna yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonucunda izolatların 52 tanesinde (%82,5) penisilin ve 38 tanesinde (%60,3) sefotaksime direnç görülmüştür. Penisiline direnç gösteren 52 izolatın tamamında, A sınıfı bir  $\beta$ -laktamazı kodlayan *bla* geni için pozitif saptanmıştır. *bla* geni, A sınıfı  $\beta$ -laktamaz ailesi proteinine ait bir serin hidrolazı kodlar. Altmış üç izolatın 46 tanesinde C sınıfı beta-laktamaz kodlayan *ampC* geni için pozitif saptanmıştır. 46 *ampC* pozitif izolattan 42'si penisiline dirençli, dört izolat ise duyarlı saptanmıştır. *ampC* geni sefotaksime dirençli 28 *C. striatum* izolatında 22'sinde tespit edilmiştir (87).

Asgin ve ark. 2015-2016 yılları arasında üçüncü basamak bir üniversite hastanesinde yatan hastaların klinik örneklerinden elde edilen 81 adet *C. striatum* izolatının antimikrobiyal direnç ve moleküler epidemiyolojisini araştırmışlardır. Suşların tamamı  $\beta$ -laktam antibiyotiklerden penisilin ve sefotaksime dirençli bulunmuştur (23).

Sun ve ark. 2018-2020 yılları arasında hastanede yatan hastaların idrar kültürlerinden elde edilen 45 adet difteri-dışı *Corynebacterium* izolatına sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık testinde suşların %66,7'si penisiline ve %53,3'ü sefotaksime dirençli bulunmuştur. Çalışmada *bla* geni tüm izolatların %44,4'ünde ve *ampC* geni ise %31,1'inde tespit edilmiştir. 45 izolatın yirmi tanesinde *bla* geni pozitif saptanmıştır. *ampC* geni sadece *C. striatum* izolatlarında saptanırken, on beş *C. striatum* izolatından 14'ünde *ampC* geni pozitif saptanmıştır. On dört *ampC* pozitif izolattan 12'si penisilin ve sefotaksime dirençli bulunmuştur. Penisiline ve sefotaksime dirençli tüm izolatlarda *bla* ve *ampC* geninin pozitif bulunmamış olması  $\beta$ -laktamazlar dışında başka mekanizmaların da penisilin ve sefotaksim direncine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür (176).

Çalışmamızda diğer çalışmalara benzer şekilde penisilin direnci oldukça yüksek bulunmuştur. Yüz kırk izolatın 138'i (%98,6) penisiline dirençli bulunmuştur (Tablo 13). Tüm izolatların %94,3'ünde *bla* geni, %95'inde *ampC* geni pozitif saptanmıştır. Penisiline dirençli izolatların %94,2'sinde *bla* geni ve %94,9'unda *ampC* geni pozitif saptanmıştır. Çalışmada penisiline dirençli 130 *C. striatum* izolatının biri hariç diğerlerinde (%99,2) hem *bla* hem de *ampC* geni pozitif saptanmıştır. Tamamı penisiline dirençli *C. afermentas* suşları arasında sadece bir tanesinde (%12,5) *bla* ve *ampC* geni pozitif bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda da bahsedildiği üzere bizim çalışmamızda da *C. striatum* suşlarında *bla* ve *ampC* genine daha sık rastlandığı görülmüştür.

1980'lerin başlarında *Corynebacterium* türlerinin neden olabileceği enfeksiyonlarda sıklıkla kullanılan makrolidler,  $\beta$ -laktamlara ve tetrasikline alternatif olarak kullanılan ilaç grubudur (70, 79, 150). Ancak son yıllarda makrolid grubu ilaçlara dirençte progresif bir artış görülmektedir (79). MLS<sub>B</sub> direnci özellikle çoklu ilaca dirençli izolatlarda belirgindir (145). *Corynebacterium* türlerinde MLS<sub>B</sub> direncine genellikle iki mekanizma aracılık eder. Bunlardan ilki *erm* genleri tarafından kodlanan ribozomal RNA metilazların aracılık ettiği hedef bölge modifikasyonu ikincisi ise aktif ilaç akışına *mefA-E* genleri tarafından kodlanan bir membran efluks pompasının aracılık ettiği aktif ilaç efluks mekanizmasıdır (140, 176). Bu direnç

mekanizmaları dışında 23S rRNA'nın "domain V" bölgesindeki mutasyonlar, protein L4 ve L22'deki modifikasyonlar, efluks pompa sistemleri ve hidrolitik enzimlerle de direnç görülebilmektedir (150).

*ermX* geni MLS<sub>B</sub> direncine katkıda bulunan en önemli genidir (176). *ermX* geni *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. xerosis*, *C. striatum* ve *C. pseudodiphtheriticum* gibi *Corynebacterium* cinsine ait farklı türlerde saptanmıştır (193). *ermB* geni grup A *Corynebacterium* türlerinde bulunmaktadır (70, 150).

Ortiz-Pe' rez ve ark. 120 tane *C. urealyticum*, 66 tane *C. amycolatum*, 20 tane *C. striatum*, 17 tane *C. jeikeium*, 12 tane *C. coyleae*, 11 tane *C. aurimucosum* ve sekiz tane *C. afermentans* olmak üzere *Corynebacterium* türlerine ait 254 klinik izolatın makrolid direncinin incelendiği çalışmada izolatların %76,3'ünde eritromisine ve %74'ünde klindamisine direnç görülmüştür. Tüm suşların %86,6'sında *ermX* geni pozitif bulunmuştur. 186 izolatta makrolidlere ve klindamisine yüksek düzeyde direnç görülmüştür ve bu suşların 171 tanesinde *ermX* geni pozitif saptanmıştır. *ermB* geni sadece iki tane *C. urealyticum* izolatında saptanmıştır. Diğer türlerin hiçbirinde *ermB* geni varlığına rastlanmamıştır. On dört suş fenotipik olarak makrolid ve klindamisin direnci göstermesine rağmen bu suşlarda *erm* geni pozitifliğine rastlanmamıştır (150).

Polonya'da Szemraj ve ark. sağlıklı genç erkeklerin cilt florasından elde edilen 18 suş ve kan, idrar, yara gibi klinik örneklerden elde edilen 19 suş olmak üzere toplamda 37 *Corynebacterium* izolatında MLS<sub>B</sub> direncini araştırdıkları çalışmada *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermX*, *lnuA*, *msrA*, *msrB* ve *mphC* genlerinin varlığı test edilmiştir. Klinik örneklerden izole edilen 17 suşta (%89) yapısal MLS<sub>B</sub> direnci gösterilmiştir, diğer iki klinik izolat ise iki antibiyotikten birine karşı direnç göstermiştir. Bu dirence *ermA*, *ermC* ve *ermX* genlerinin ya tek tek veya gruplar halinde eşlik ettiği görülmüştür. Hem eritromisin hem de klindamisine dirençli izolatların altı tanesinde sadece *ermX* geni, bir izolatta sadece *ermC* geni pozitif iken, izolatların sekiz tanesinde *ermX* ve *ermC* geni birlikte, iki izolatta ise *ermA*, *ermC* ve *ermX* genlerinin her üçü de pozitif bulunmuştur. Klinik izolatlar arasında eritromisine dirençli olup klindamisine duyarlı olan bir izolatta sadece *ermC* geni, eritromisine duyarlı olup klindamisine

dirençli olan bir izolatta ise hem *ermX* hem de *ermC* geni pozitif saptanmıştır. Sağlıklı insan cilt florasından izole edilen 13 suşta (%72) da yapısal MLS<sub>B</sub> direnci gösterilmiştir. Bu suşların tamamında sadece *ermX* gen pozitifliği görülmüştür. Çalışmada *Corynebacterium* türlerinde *ermX* gibi yaygın olarak tanımlanan genlerin yanı sıra *ermC* gibi esas olarak koagülaz negatif stafilokoklarda MLS<sub>B</sub> direncinden sorumlu olan bu genin de olabileceği vurgulanmıştır ki iki izolatta sadece *ermC* geni pozitif saptanmıştır. *Corynebacterium* türlerinde *ermX* geninin farklı yerleşiminden (Tn5432 üzerinde) dolayı bu bakterilerde yatay gen transferi olasılığı vurgulanmıştır (145).

Sun ve ark. çalışmasında çalışmaya dahil edilen 45 difteri-dışı *Corynebacterium* izolatu arasında %93,3 oranında eritromisine ve %91,1 oranında klindamisine fenotipik olarak direnç görülmüştür. Çalışmada makrolid direnci için *ermX* geni, *ermB* geni ve *mefA-E* genlerinin varlığına bakılmış olup izolatların %91,1'inde *ermX* geni pozitif saptanmıştır. Ancak izolatların hiçbirinde ne *ermB* geni ne de *mefA-E* genleri pozitif bulunmamıştır (176).

2007-2012 yılları arasında üçüncü basamak bir hastanede yapılan bir çalışmada yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 85 tane *C. striatum* suşunda makrolid ve linkozamid direncinin fenotipik ve moleküler karakterizasyonu incelenmiştir. Suşların %80'ni eritromisin ve klindamisine dirençli bulunmuştur. On izolatta eritromisin veya klindamisinden herhangi birine direnç görülürken, 53 izolatta her ikisine de direnç görülmüştür. Seksen beş *C. striatum* izolatının 62'sinde *ermX* geni, 21 tanesinde *ermB* geni, 12 tanesinde de hem *ermX* hem de *ermB* genini tespit etmişlerdir. Eritromisin ve klindamisine direnç ile *ermX* geninin varlığı arasında sırasıyla %85,5 ve %89,6 oranında yüksek bir korelasyon izlenmiştir. *ermB* geni eritromisine dirençli suşların %26,6'sında ve klindamisine dirençli suşların %20,6'sında pozitif saptanmıştır. Üç suşta da fenotipik olarak makrolid ve klindamisine direnç görülmesine rağmen, amplifikasyon ürünü tespit edilememiştir. Bu durumun nedeni olarak 23S rRNA'nın "domain V" bölgesindeki mutasyonlar, protein L4 ve L22'deki modifikasyonların ve L22'deki değişiklikler gibi diğer direnç

mekanizmalarının varlığından kaynaklanabilecek bir MLS<sub>B</sub> direnç fenotipi oluşturduğunu vurgulamışlardır (70).

Alina Olender'in yaptığı çalışmada 70 tane burunda kolonize olan ve 70 tane de klinik örneklerden izole edilen *Corynebacterium* suşunda sırasıyla %88,5 ve %87,1 oranında yapısal MLS<sub>B</sub> direnci görülmüştür. Yapısal MLS<sub>B</sub> direnci görülen suşların hepsinde *ermX* geni pozitif saptanmıştır (193).

Çalışmamızda literatüre benzer şekilde yüksek düzeyde eritromisin (%75,7) ve klindamisin (%96,4) direnci görülmüştür (Tablo 13). Eritromisine dirençli 106 izolatın 104'ünde (%98,1) ve klindamisine dirençli 135 izolatın 133 tanesinde (%98,5) *ermX* geni pozitif saptanmıştır. Eritromisine ve klindamisine dirençli iki izolatta ise *ermX* geni pozitif saptanmamıştır. Bunun nedeni diğer çalışmalarda da bahsedildiği gibi (70, 150) sık görülen *ermX* geni tarafından kodlanan 23S ribozomal RNA metiltransferazın aracılık ettiği metilasyon nedeniyle ilaç hedefinin değişimi olan direnç mekanizması dışında başka bir direnç mekanizmasına bağlı olabilir. Çalışmamızdaki izolatların hiçbirinde *ermB* geni pozitif bulunmamıştır. Bunun nedeni de çalışmamızdaki izolatların çok büyük bir yüzdesinin *C. striatum* olması ve *C. striatum*'un *ermB* geninin en çok bulunduğu Grup A *Corynebacterium* içinde bulunmamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

Kinolonlar, *Corynebacterium* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde alternatif olarak kullanılan bir başka ilaç grubudur (79). Florokinolon direnç mekanizmaları; membran geçirgenliğinin değiştirilmesi, efluks pompası, asetilasyon yoluyla inaktivasyon ve en yaygın mekanizma da topoizomerez enzimlerinde antibiyotiğin etki bölgesindeki mutasyonları içerir (140). Kinolon direnci sıklıkla DNA giraz enziminin *gyrA* bölgesindeki kinolon direncini belirleyen bölgedeki (quinolone resistance-determining region-QRDR) nokta mutasyonlar sonucu gelişir. *Corynebacterium* türlerinde direnç en sık *gyrA* geninde oluşan mutasyon sonucu görülmektedir. Ortaya çıkan direnç seviyesi büyük ölçüde, önceden var olan aminoasitin yerine mutasyon sonucu gelen amino asidin tipine bağlıdır (140).

*C. striatum*, *C. amycolatum* ve *C. macginleyi* izolatlarında *gyrA* geninin QRDR sekans analizinde, florokinolonlara direncin bu gende spontan mutasyonlarla ilişkili olduğunu ve direncin mutasyon sayısına ve aminoasit türü ikamesine bağlı olduğu gösterilmiştir (154).

Sierra ve ark. İspanya'da bir üniversite hastanesinde klinik örneklerden izole edilen 17 tane *C. striatum* ve dokuz tane *C. amycolatum* izolatında kinolon direnci ve *gyrA* gen mutasyonunu araştırmışlardır (153). Yapılan antimikrobiyal duyarlılık testinde dokuz *C. amycolatum* izolatının iki tanesinde kinolonların MİK değerleri düşük bulmuşlardır. Bu iki suş için siprofloksasinin MİK değerleri 0,064 ve 0,047 µg/ml; levofloksasinin MİK değeri 0,094 µg/ml ve son olarak moksifloksasinin MİK değeri 0,016 µg/ml bulmuşlardır. Bir suшта 87. kodondaki Serin aminoasiti yerine Arjinin (Ser-87-Arg) aminoasitinin geçmesiyle nokta mutasyon saptamışlardır. Bu mutasyonun siprofloksasinin MİK değerini çok yükselttiğini gözlemlemişlerdir (MİK>32 µg/ml). Levofloksasin ve moksifloksasinin MİK değerleri de sırasıyla 8 ve 2 µg/ml'ye yükseldiğini saptamışlardır. Altı *C. amycolatum* klinik izolatında *gyrA* geninde iki tane çift mutasyon gözlemlemişlerdir. Bir suшта gözlemlenen çift mutasyonun, Ser-87-Arg mutasyonuna alışılmadık bir pozisyonda yeni bir mutasyon eklenerek 89. kodondaki izolösün aminoasiti yerine Valin (Ile-89-Val) aminoasitinin geçmesiyle oluştuğunu saptamışlardır. Bu mutasyon sonucunda siprofloksasinin MİK değeri 32 µg/ml ve levofloksasin ve moksifloksasinin MİK'leri sırasıyla 24 ve 6 µg/ml yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Beş tane *C. amycolatum* izolatında ise her üç florokinolonun MİK değeri >32 µg/ml olarak saptamışlardır. Bu suşların da çift mutasyon taşımakta olduğunu, 87. kodondaki Serin aminoasiti yerine Arjinin aminoasiti (Ser-87-Arg) ve 88. kodondaki Alanin aminoasiti yerine Prolin aminoasiti (Ala-88-Pro) geçmesiyle çift mutasyon meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. On yedi *C. striatum* suşundan iki tanesinde kinolonların MİK değerlerini düşük saptamışlardır. Siprofloksasinin MİK değeri 0,094-0,125 µg/ml arasında iken, levofloksasin ve moksifloksasinin MİK'leri sırasıyla 0,125 ve 0,047 µg/ml olarak saptamışlardır. Bu iki suшта *gyrA* geninde mutasyon saptamamışlardır. Dört suшта 87. kodondaki Serin aminoasiti yerine Fenilalanin aminoasiti (Ser-87-Phe) geçmesiyle mutasyon meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bu suşlarda MİK değerleri

siprofloksasinde 1 µg/ml 'den 3 µg/ml'ye ve levofloksasinde 1 µg/ml 'den 2 µg/ml 'ye orta düzeyde artışlar gösterdiğini bulmuşlardır. Moksifloksasin MİK değeri ise 0.19-0.38 µg/ml olarak saptamışlardır. İki suşta MİK değerleri yüksek saptanmış olup; siprofloksasin için 3 ve 6 µg/ml, levofloksasin için 1,5 µg/ml ve moksifloksasin için de 0,5 ve 0,38 µg/ml olarak saptamışlardır. Bu suşlarda 91. kodondaki Aspartat aminoasiti yerine sırasıyla Tirozin ve Glisin aminoasitlerinin (Asp-91-Tyr ve Asp-91-Gly) geçmesiyle mutasyon meydana geldiğini bulmuşlardır. Üç suşta 87. kodondaki Serin aminoasiti yerine Valin aminoasiti (Ser-87-Val) geçmesiyle mutasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bu suşlarda siprofloksasinin MİK değeri 32 µg/ml, levofloksasinin MİK değeri 8 µg/ml ve moksifloksasinin MİK değeri ise 0,75 µg/ml saptamışlardır. Altı suşta ise siprofloksasin ve levofloksasin MİK değerleri oldukça yüksek (>32 µg/ml) ve moksifloksasin MİK değeri ise 6-8 µg/ml arasında değiştiğini bulmuşlardır. Bu suşlarda da çifte mutasyon görülmüş olup 87. kodondaki Serin aminoasiti yerine Fenilalanin aminoasiti (Ser-87-Phe) ve 91. kodondaki Aspartat aminoasiti yerine Alanin aminoasiti (Asp-91-Ala) geçmesiyle oluştuğunu gözlemlenmişlerdir. Çalışmada genel olarak kinolon direncinin seviyesi, amino asit ikamesinin tipine ve ikame edilen amino asit türüne bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (153).

Ramos ve ark. çalışmasında 2009-2013 yılları arasında hastanede yatan hastaların kan ve katater kültürlerinden elde edilen yedi tanesi *C. striatum*, dört tanesi *C. jeikeium* ve üç tanesi *C. urealyticum* olmak üzere toplamda 14 tane çoklu ilaca dirençli *Corynebacterium* suşlarının hepsinde *gyrA* geni pozitif saptamışlardır ve QRDR bölgesinde Ser-87 ve Asp-91 için kodonlarında mutasyon gözlemlenmişlerdir. Tüm *C. striatum* izolatlarında sadece 87. kodonda mutasyon, iki izolatta ise 87 ve 91. kodonlarda çifte mutasyon gözlemlenmişlerdir. İki tane *C. jeikeium* izolatında 87 ve 91. kodonlarda Ser-87-Ile ve Asp-91-Tyr şeklinde çifte mutasyona bağlı olarak bu izolatlarda test edilen tüm kinolonların MİK değeri >32 µg/ml olarak bulmuşlardır. *C. urealyticum* izolatlarında da 87 ve 91. kodonlarda çifte mutasyonlar görmüşlerdir. İki izolatta Ser-87-Tyr ve Ser-87-Val şeklinde, iki izolatta Asp-91-Ala ve bir izolatta Asp-91-Tyr şeklinde mutasyonlar görmüşlerdir. Tüm *C. urealyticum* izolatlarında tüm kinolonların MİK değeri >32 µg/ml olarak bulmuşlardır. 87 ve 91. kodonlarda mutasyon bulunan tüm *Corynebacterium* izolatlarında, moksifloksasin için en yüksek

MİK değerlerini görmüşlerdir. Çalışmada siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasine karşı yüksek düzeyde direnç oluşturan QRDR *gyrA* genindeki 87 ve 91 amino asit pozisyonlarında yeni mutasyonların ortaya çıktığını görmüşlerdir (154).

Wang ve ark. Çin'deki üç üçüncü basamak hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen 410 kinolon dirençli *C. striatum* klinik suşunda kinolon direncinin altında yatan mekanizmayı ve epidemiyolojik özelliklerini araştırmışlardır. Tüm izolatlar siprofloksasine dirençli ve çoğunda yüksek MİK değerleri ( $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ) görmüşlerdir. Tüm izolatlarda 87. kodonda mutasyonlar görmüşlerdir. İzolatların %97,3'ü (399/410) 87 ve 91 numaralı kodonlarda çift mutasyona sahipken, izolatların yalnızca %2,7'si (11/410) 87 numaralı kodonda tek bir mutasyona sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. *C. striatum* izolatlarının %72,2'sinde Ser-87-Tyr ve Asp-91-Ala şeklinde çift mutasyon gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada *gyrA* geninde dört yeni mutasyon bulmuşlardır: 101 izolatta Ser-87-Tyr ve Asp-91-Ala şeklinde çift mutasyon, bir izolatta Ser-87-Val ve Asp-91-Gly şeklinde çift mutasyon, bir izolatta Ser-87-Val ve Asp-91-Ala şeklinde çift mutasyon ve bir izolatta ise Ser-87-Ile şeklinde tekli mutasyon görmüşlerdir. *gyrA* geninde çift mutasyon görülen izolatların %96,5'inde ve tek mutasyonlu *C. striatum* suşlarının %72,7'sinde siprofloksasin için  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$  şeklinde yüksek MİK değeri görmüşlerdir. Çalışmada kinolon direncinin seviyesi, amino ikamesinin tipine bağlı olduğu görülmüş olup 87 ve 91. kodonlarda çift mutasyona sahip izolatlar, 87. kodonda tek bir mutasyona sahip olanlardan daha yüksek düzeyde kinolon direnci gösterdiğini tespit etmişlerdir (155).

Alibi ve ark. çalışmasında izolatların üçte biri, siprofloksasin ve moksifloksasine orta veya yüksek düzeyde direnç gösterdiğini belirtmişlerdir. 63 *C. striatum* izolatının %36,5'inde siprofloksasin ve %34,9'unda moksifloksasin direnci görmüşlerdir. Çalışmada 87. pozisyonundaki tekli mutasyonlar sadece siprofloksasin direnci oluşturmuş iken 87 ve 91. pozisyonlarda oluşan çift mutasyonlar, siprofloksasin ve moksifloksasine karşı yüksek düzeyde dirençli bulmuşlardır. Kinolona dirençli yirmi bir *C. striatum*'un 14 tanesinde siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değeri 16 mg/L'ye kadar artmış olması 87 ve 91. pozisyonlardaki çift mutasyonla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. 87 veya 91. pozisyonlarında tekli mutasyona sahip suşlardan

beş tanesi daha düşük MİK'lere (2-8 mg/L) sahip olmasına rağmen siprofloksasine hala dirençli olduğunu ancak moksifloksasinin MİK değeri 1 mg/L şeklinde orta derecede yüksek kaldığı görmüşlerdir. Kinolona dirençli iki izolatın QRDR'lerinde mutasyon görülmediğini belirtmişlerdir. Çalışmada yüksek düzey moksifloksasin direncinin, *gyrA* genindeki mutasyonlara ek bir direnç mekanizmasının varlığını düşündürdüğünü vurgulamışlardır. İki suşta QRDR bölgesinde mutasyon görülmemiş olmasının da dirence farklı bir mekanizmanın aracılık ettiğini belirtmişlerdir (87).

Sun ve ark. çalışmasında çalışmaya alınan 45 adet difteri-dışı *Corynebacterium* izolatlarının %93,3'ünde fenotipik olarak siprofloksasin direnci görmüşlerdir. Siprofloksasine dirençli 42 izolatın 18'inde MİK değerleri 32µg/mL olarak bulunmuş olup bu yüksek MİK değerinin 87 ve 91. pozisyonlarındaki çifte mutasyonla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. 87. pozisyonda tekli mutasyona sahip 21 suş siprofloksasine karşı hala dirençli bulunmuş ancak daha düşük MİK değerlerine (4-16µg/mL) sahip olduğunu görmüşlerdir. QRDR'lerinde hiçbir değişiklik olmayan üç tane siprofloksasine dirençli suş tespit etmişlerdir, bu durumun nedeni olarak dirence başka mekanizmaların aracılık edebileceğini vurgulamışlardır (176).

Çalışmamızda diğer çalışmalarda görüldüğü gibi kinolon direnci oldukça yüksek bulunmuştur. Çalışmamıza dahil ettiğimiz izolatların tamamında siprofloksasine direnç görülmüştür. 140 izolatın 137 tanesinde (%97,9) *gyrA* geni pozitif saptanmıştır. *gyrA* geni pozitif olarak saptanan izolatların tamamında fenotipik olarak siprofloksasine direnç görülmüştür.

Tetrasiklinler, esas olarak protein sentezine müdahale ederek bakterilerin büyümesini engelleyen geniş spektrumlu bir antibiyotik sınıfıdır (176). Tetrasiklin direnci eflüks pompa sistemi, ribozomal koruma proteinlerinin oluşması, 30S alt birimdeki rRNA mutasyonları ve modifikasyon yoluyla ilacın degradasyonu olmak üzere dört mekanizma ile oluşmaktadır. En yaygın direnç mekanizması eflüks pompa sistemi olup Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde 28 farklı eflüks pompa sınıfı tanımlanmıştır. Hücre membranında enerji bağımlı eflüks pompa sisteminin oluşması sonucunda tetrasiklinlerin bakteri hücresi içine girmesi engellenir ve bakteri hücresi

içine girmiş olan tetrasiklinler dışarı pompalanır. Böylece hücre içi tetrasiklin konsantrasyonunun azaltılmasına dolayısıyla ilacın etkisiz hale gelmesine yol açmaktadır. Bu mekanizma tetrasiklin direncindeki en yaygın direnç mekanizmasıdır. Eflüks pompa sistemlerinin çoğu tetrasikline direnç sağlar, ancak ikinci nesil doksisisiklin ve minosikline karşı daha az etkilidir ve tigesiklin gibi üçüncü nesil glisilsiklinlere karşı çok az direnç gösterir veya hiç direnç göstermezler. İkinci en yaygın direnç mekanizması ise ribozomal koruma proteinleri ile oluşan dirençtir. Ribozoma bağlanan ve ilacı bağlanma bölgesinden uzaklaştıran ribozom koruma proteinleri olarak adlandırılan 12 farklı sınıf rapor edilmiştir. Monooksijenazları kodlayan iki farklı genin tetrasiklinleri modifiye edip degradasyonuna yol açarak oluşan direnç ve 16S rRNA'da ilacın ribozoma bağlanma afinitesini azaltan mutasyonlar yoluyla oluşan direnç daha az görülen direnç mekanizmalarıdır (163).

Zhang ve ark. çalışmasında yeni bir patojen olarak tanımlanan ve eritromisin, klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, siprofloksasin, penisilin, seftriakson, fosfomisin gibi antibiyotiklere karşı çoklu ilaç direnci fenotipi gösteren *C. kroppenstedtii* antibiyotik direnç mekanizmasını incelemişlerdir. 2018-2019 yılları arasında mastadeniti olan hastaların doku ve abse örneklerinden elde edilen 90 adet *C. kroppenstedtii* izolatlarının %62,2'sinde tetrasikline karşı fenotipik direnç görülmüştür. İzolatların %62,2'sinde ribozomal koruma proteinini kodlayan *tetW* geni pozitif saptanmıştır (167).

Chapartegui-González ve ark. çalışmasında İspanya'da 2005-2017 yılları arasında hastanede yatan hastaların klinik örneklerinde izole edilen 40 adet *C. urealyticum* suşunun %50'sinde tetrasiklin direnci görülmüştür. Tetrasikline dirençli suşlar, farklı direnç mekanizmalarının varlığını düşündüren bimodal MİK dağılımı göstermiştir. Çalışmada *tetAB* genlerinin tetrasikline dirençli hiçbir suşta tespit edilmediği, bunun da alternatif direnç mekanizmasının varlığını düşündürdüğü belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca geniş spektrumlu bir eflüks pompası inhibitörü olan PAβN varlığında yedi *C. urealyticum* suşunda tetrasiklin MİK değerlerinde dikkate değer düşüşün olması, bu suşlarda tetrasiklin direncine bir eflüks pompa mekanizmasının aracılık ettiğini göstermiştir (71).

Sun ve ark. çalışmasında çalışmaya dahil edilen 45 adet difteri-dışı *Corynebacterium* izolatlarının tetrasiklin direnç oranı %37,8 olarak bulunmuştur. *C. glucuronolyticum* izolatları en yüksek direnç oranını (%77,8) sergilerken, *C. tuberculostearicum* izolatları tetrasikline duyarlı bulunmuştur. Tetrasiklin direnç genlerinden hem *tetA* geni hem de *tetB* geni, *C. tuberculostearicum* ve *C. jeikeium* dışındaki tüm *Corynebacterium* türlerinde tespit edilmiştir. Ancak *tetB* geninin (%64,4) *tetA* geninden (%24,4) daha yaygın olduğu tespit edilmiştir (176).

Campanile ve ark. çalışmasında 36 çoklu ilaca dirençli *C. striatum* izolatında tetrasiklin MİK değeri >256 mg/L olarak bulunmuştur. Bu izolatlarda tetrasiklin direnç genlerinden *tetA/B*'nin varlığı değerlendirilmiş olup hepsinde pozitif saptanmıştır (94).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda tetrasiklin direnç oranları Çelik ve ark. çalışmasında (24) tüm izolatlarda %86,9 oranında, *C. striatum* izolatlarında %88,7 oranında, *C. afermentans* izolatlarında %66,7 oranında; Balcı ve ark. çalışmasında (36) *C. striatum*'da %83,4 iken *C. afermentans* izolatlarında %50; Mumcuoğlu ve ark. çalışmasında (191) *C. striatum*'da %69,9 oranında; Asgin ve ark. çalışmasında (21, 23) *C. striatum*'da %93 ve %100 oranında; Tanrıverdi ve ark. çalışmasında (18) *Corynebacterium* izolatlarında %69,5 ve Özdemir ve ark. çalışmasında (142) *Corynebacterium* izolatlarında %45,2 oranında bulunmuştur. Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde tetrasiklin direnci yüksek bulunmuş olup %99,3'tür. Çalışmamızda tetrasiklin direnç genlerinden *tetA* ve *tetB* genlerinin varlığı incelenmiştir. Tüm izolatların %32,9'unda *tetA* geni pozitif saptanmıştır. Ancak literatürden farklı olarak bizim çalışmamızda *tetB* geni varlığı gösterilememiştir. Çalışmamızda hem *tetA* geninin düşük oranda pozitif bulunması hem de *tetB* geni pozitifliğine rastlanmamasının tetrasiklin direncine *tetA/B* genlerinin neden olduğu direnç dışında başka bir mekanizma ile direnç olabileceğini düşündürmektedir.

Biyofilmler ya tıbbi cihaz ve biyomateryaller gibi cansız yüzeyler üzerinde ya da konakçı hücreleri ve mukozal yüzeyleri gibi canlı ortamlar üzerinde oluşabilen mikroekosistemlerdir (171). Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yetenekleri olumsuz koşullar altında hayatta kalabilmek için oluşturdukları iyi bir stratejidir.

Biyofilm içinde büyüyen mikroorganizmalar insan immün sistemi bileşenlerine ve birçok antimikrobiyal ajana karşı oldukça dirençli hale gelmektedir (89). Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma özelliği ile hastane ortamında uzun süre canlı kalmasını sağlamanın yanısıra, bakteriyi bazı antimikrobiyal ajanlara karşı da korumaktadır. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanlara karşı aynı genetik yapıya sahip planktonik formlarına oranla 100-1000 kat daha dirençlidir (173).

Biyofilm oluşturma yeteneği medikal cihazlarla ilişkili olsun ya da olmasın, nozokomiyal enfeksiyonların patogeneğinde çok önemli bir rol oynar (89). Kronik bakteriyel enfeksiyonların %80'inden, nozokomiyal enfeksiyonların da %65'inden biyofilm yapısının sorumlu olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (171). Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir (173). Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar, artan yaşlı nüfus ve implante edilebilir tıbbi cihazların kullanımı nedeniyle giderek daha fazla rapor edilmektedir. Biyofilm fırsatçı patojenlerin kateterlere, implantlara, protezlere yapışmasını ve çoklu ilaç direnci oluşturmalarını kolaylaştırmaktadır (89). Yapay kalp kapakçığı, stent, katater, implant ve protez gibi çeşitli tıbbi cihazları olan hastalarda stafilkoklar, streptokoklar, enterokoklar, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida* spp. gibi birçok mikroorganizma biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlara neden olmaktadır (194). Bu mikroorganizmaların dışında *Corynebacterium* türlerinin de biyofilm ürettiği bilinmektedir (195).

Bir dizi çalışma invaziv enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen *C. striatum*'un biyofilm üretme yeteneğini göstermiştir, bu da biyofilm oluşumunun bu organizma için bir virülans faktörü olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, klinik enfeksiyonun *C. striatum*'un biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkili olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır (101). *Corynebacterium* türlerinde gözlemlenen biyofilm oluşturma kapasitesiyle ilişkili çoklu ilaç direnci endişe verici bir durum haline gelmektedir (102). Biyofilmle ilişkili enfeksiyonlar, hastanelerde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak kabul edilmektedir (89).

Biyofilm pek çok antibiyotik açısından tedavide sorun yaratan bir yapıdır. Biyofilm matriksi pek çok antibiyotik ve antiseptiğin penetrasyonunu azaltarak biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerine ulaşmasını engellemektedir (171). Bununla birlikte siprofloksasin, amoksisilin/klavulanik asit, fosfomisin ve rifampisin gibi bazı antibiyotiklerin biyofilm matriksinden geçişte sorun yaşamadığı ve biyofilm tabakasına iyi penetre olduğu bilinmektedir (196, 197).

Biyofilm ilişkili enfeksiyonların görülme sıklığının artmasıyla birlikte biyofilm oluşumunu tespit etme yöntemleri önem kazanmaya başlamıştır (171). Kongo red agar yöntemi, modifiye tüp yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi), mikropalak yöntemi, floresan mikroskopisi, konfokal lazer tarama mikroskopisi ve elektron mikroskopisi biyofilm oluşumunu saptamak için sık kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır (171, 173). Spektrofotometrik ölçümlerle değerlendirilen mikropalak yöntemi özellikle tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemin diğer yöntemlerden daha hassas, spesifik ve kantitatif sonuçlar elde edilebildiği belirtilmektedir. Biyofilm saptama amacıyla yeni teknolojiler de geliştirilmiştir. Bunlar arasında, elektrik akımına karşı dirençteki değişimin saptandığı “gerçek zamanlı hücre analizi” yöntemi, kızılötesi ışınların penetrasyonundaki değişimin ölçüldüğü “fiber-optik sensör” yöntemi ve biyofilm matriks komponentlerini saptamaya dayalı “luminisan konjue oligotiyofen” yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler ile daha duyarlı, hızlı ve kantitatif olarak biyofilm yapısı belirlenebilmektedir (171).

Qin ve ark. 2017 yılında yayınladıkları hastanede yatan hastaların kan kültürlerinden izole ettikleri çoklu ilaca dirençli *Corynebacterium* spp.’lerin karakterizasyonunu inceledikleri çalışmada izole edilen 22 adet çoklu ilaca dirençli *Corynebacterium* suşunda mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumuna baktıklarında 14 suş (%82,4) biyofilm oluşturabilmiş olup bunlardan dokuz tanesi (%64,3) *C. striatum* olarak tanımlanmıştır. Qin ve ark. bu çalışması kan örneklerinden izole edilen farklı *C. striatum* suşları tarafından değişken oranlarda biyofilm oluşumunu gösteren ilk rapor olarak literatüre girmiştir (195).

Brezilya’da nozokomiyal salgından izole edilen iki tanesi çoklu ilaca dirençli ve iki tanesi çoklu ilaca duyarlı olmak üzere dört farklı PFGE paternini temsil eden *C. striatum* suşlarının abiyotik yüzeylerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırılmıştır. Bu çalışmada *C. striatum* izolatları ağırlıklı olarak yoğun bakım ünitelerinde ve cerrahi servislerde endotrakeal entübasyon yapılan hastaların trakeal aspiratlarının saf kültürlerinden elde edilmiştir. İzole edilen çoklu ilaca dirençli *C. striatum*’un PFGE tip I ve II paternlerinin baskın olduğu görülmektedir. Bu PFGE paternlerine ait klinik izolatların, pozitif yüklü poliüretan kateter yüzeyleri dahil olmak üzere cam gibi pozitif yüklü hidrofilik ve polistiren gibi negatif yüklü hidrofobik abiyotik yüzeylerde daha fazla biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlar, *C. striatum*’un hem hidrofilik ve hem de hidrofobik abiyotik yüzeylere yapışabildiğini göstermiştir (89).

Ramos ve ark. kan dolaşımı enfeksiyonu ve kataterle ilişkili enfeksiyon belirti ve semptomları olan hastanede yatan 21 hastanın kan ve kateter örneklerinden elde edilen 23 *C. striatum* izolatının çoklu ilaca dirençli klonlarını ve abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneklerini 3 farklı yöntemle incelemiştir. Poliüretan ve silikon kateter yüzeyleri üzerinde biyofilm formasyonunu göstermek için semi-kantitatif testler, dört farklı abiyotik yüzey (cam, metal, poliüretan ve silikon) üzerinde kantitatif testler yapılmıştır. Poliüretan ve silikon kateter yüzeyinde biyofilm üretme yeteneği taramalı elektron mikroskobu ile de gösterilmiştir. Tip I paterni gösteren *C. striatum* izolatı, hidrofilik ve pozitif yüklü abiyotik bir yüzey olan cam yüzeye ve poliüretan yüzeye daha yüksek yapışma yeteneği göstermiştir. Tip II PFGE paterni gösteren *C. striatum* izolatı ise negatif yüklü ve hidrofobik polistiren yüzeye daha yüksek yapışma yeteneği göstermiştir. Her iki izolat metal yüzeye ise benzer düzeyde yapışma yeteneği göstermişlerdir. Semi-kantitatif test ile her iki *C. striatum* izolatının poliüretan ve silikon kateter yüzeyler üzerinde yapışık canlı sesil formlarının olduğu görülmüştür. Taramalı elektron mikroskobu ile de hem Tip I paterni gösteren hem de Tip II PFGE paterni gösteren *C. striatum* izolatlarının poliüretan ve silikon kateter yüzeyleri üzerinde biyofilm oluşumunun güçlü göstergelerinden biri olan mikrokoloni formasyonu oluşturduğu görülmüştür. *C. striatum* izolatlarında

gözlemlenen biyofilm oluşumu ile yüksek düzey çoklu ilaç direncinin ilişkili olduğunu ve bunun da endişe verici bir durum olduğu sonucuna ulaşılmıştır (102).

Çin’de ekstraselüler matriksi bozan ajanların çoklu ilaca dirençli *C. striatum* izolatlarının oluşturdukları biyofilm üzerindeki anti-biyofilm etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada yirmi yedi adet *C. striatum* izolatının biyofilm üretimini tespit etmek için kristal viyole ile boyanan mikropalak yöntemi ve taramalı elektron mikroskobu teknikleri kullanılmıştır. Mikropalak yöntemi ile izolatların tamamının değişen düzeylerde biyofilm ürettiği tespit edilmiştir. İzolatların %29,6’sı güçlü, %44,4’ü orta düzeyde ve %25,9’nun zayıf düzeyde biyofilm ürettiği gözlenmiştir. İzolatların çoğu (%51,8) alt solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir ve güçlü biyofilm üreten tüm izolatların baskın genotipe ait olduğu görülmüştür. Taramalı elektron mikroskobu ile zayıf biyofilm üreten suşlara göre güçlü biyofilm üreten suşların daha matür ve daha yüksek yoğunlukta biyofilm oluşturdukları görülmüştür. Çalışmada daha güçlü bir biyofilm oluşturma yeteneği sergileyen baskın klonların nozokomiyal bir salgına yol açtığı gözlemlenmiştir (198).

Kang ve ark. 2016 yılında Mayıs-Ağustos ayları arasında 51 hastanın kan kültürlerinden izole edilen 64 adet *C. striatum* izolatının klinik önemini etkileyen faktörleri araştırdıkları çalışmalarında izolatların biyofilm oluşumunu saptamak için mikropalak yöntemini kullanmışlardır. Birden fazla pozitif kan kültürü olan hastalara ait *C. striatum* izolatlarının tek pozitif kan kültürü olan hastalara ait *C. striatum* izolatlarına göre daha fazla biyofilm ürettiği görülmüştür (101).

Özdemir ve ark. beş yıllık süreçte hastanede yatan bakteriyemili hastaların kan kültürlerinden izole edilen difteri-dışı *Corynebacterium* suşlarının biyofilm oluşumu ve antimikrobiyal direnç prevalansını değerlendirdikleri çalışmalarında 126 *Corynebacterium* suşu izole edilmiştir. Biyofilm oluşumu Kongo red agar yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma Türkiye’de difteri-dışı *Corynebacterium* suşlarının biyofilm oluşumunu değerlendiren ilk rapor olmuştur. Biyofilm üretimi *C. striatum* suşlarında %62, *C. matruchotii* suşlarında %53,8, *C. afermentans* suşlarında %50, *C. amycolatum* suşlarında %50 ve *C. jeikeium* suşlarında %46 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada izole edilen 16 *Corynebacterium* suşu arasında en sık izole edilen ilk beş suşta biyofilm oranı %54 olarak bulunmuştur (142).

Çalışmamızda izolatlarda biyofilm oluşumu mikrotitrasyon plak yöntemi ile semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. Optik dansite ölçümleri 590 nm dalga boyunda spektrofotometrik mikroplak okuyucu (ELISA Reader, Pasteur Diagnostic, Fransa) ile yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 140 izolatin 37 tanesinde (%26,4) biyofilm oluşumu gözlenmiş olup biyofilm oluşturan suşların tamamı *C. striatum* olarak tanımlanmıştır. Biyofilm oluşturan izolatların üç tanesinin (%2,1) güçlü, dokuz tanesinin (%6,4) orta derecede ve 25 tanesinin (%17,9) zayıf derecede biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. *C. striatum* izolatlarının %28'inde biyofilm oluşumu görülürken, %72'sinde biyofilm oluşumu görülmemiştir. *C. afermentans* izolatlarının hiçbirinde biyofilm oluşumu görülmemiştir (Tablo 19).

Çalışmamızda biyofilm oluşturan örneklerin %21,6'sı dahili birimlerden, %40,5'i cerrahi birimlerden ve %37,8'nin YBÜ'lerinden gönderilmiştir. Cerrahi birimlerden ve YBÜ'lerinden gönderilen örneklerde biyofilm oluşumunun daha yüksek çıkması bu bölümlerde yatan hastaların kataterize olmasından kaynaklı olabileceği düşünülebilir.

Bazı çalışmalar, biyofilm oluşturan izolatlardaki antimikrobiyal direnç oranlarının biyofilm oluşturmayan izolatlardan daha yüksek olduğunu göstermiştir (142). Çalışmamızda literatürden farklı olarak hem biyofilm oluşturan hem de biyofilm oluşturmayan suşlarda antimikrobiyal direnç oranları yüksek bulunmuştur. Tüm izolatlarımızda çoklu ilaç direnci görüldüğü için, ilaç direnci ile biyofilm oluşturma durumu arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri; salgınların belirlenmesi, sürveyans ve filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (64). Moleküler tiplendirme yönteminin sahip olması gereken önemli özellikler vardır. Bunlar; güncel ve geçerli olması, ayırım gücünün yüksek olması, tiplendirilebilir ve tekrarlanabilir olması, standardize edilebilir olması, kolay uygulanabilir ve yorumlanabilir olması,

hızlı ve ekonomik olmasıdır (199). Bu özelliklerin birçoğunu taşıyan PFGE yöntemi, bakteri genomunun >%90'dan fazlasını makrorestriksiyona uğratan bant paternleri oluşturarak DNA parmak izini ortaya çıkaran bir yöntemdir. PFGE yöntemi, izolatlar arasındaki epidemiyolojik ilişkinin gösterilmesinde mükemmel bir yöntemdir. Birçok bakteri türü için PFGE yöntemi diğer moleküler yöntemlere göre daha fazla ayırt edici özelliğe sahiptir (64).

PFGE yöntemi, bakteriyel tiplendirmede “altın standart” yöntem olarak kabul edilse de tam genom analizi yönteminin kullanıma girmesiyle birlikte özellikle filogenetik çalışmalarda tam genom analizi PFGE yönteminin yerine geçmeye başlamıştır. Ancak tam genom analizi maliyet etkin olmadığı için tüm laboratuvarlarda uygulanabilir bir yöntem değildir (69). PFGE yöntemi hastanelerde salgının belirlenmesi ve enfeksiyon kontrolünde hala en çok başvurulan tiplendirme yöntemidir. PFGE yönteminin bazı dezavantajları vardır; bunlardan biri emek yoğun bir işlem olması bir diğeri ise sonuç verme süresinin diğer tiplendirme yöntemlerine göre daha uzun olmasıdır (64).

PFGE yönteminin birçok mikroorganizma için belirlenmiş olan standart protokolleri vardır. PFGE yönteminde bakteriyel DNA'yı makrorestriksiyona uğratan restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanırlar ve bu dizilimlere yakın bölgelerden ya da bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı keserler. PFGE için genellikle 6-8 nükleotidi tanıyan ve az sayıda tanıma bölgesine sahip olan RE'leri seçilmektedir (200). Birçok bakteri türü için belirlenmiş olan restriksiyon enzimleri vardır. En sık kullanılan restriksiyon enzimleri *XbaI*, *SmaI*, *ApaI*, *SfiI*, *NotI*, *SpeI*, *SwaI*, *PacI*, *XhoI*, *KpnI*, *AscI*, *BlnI*, *AvrII*, *AseI*, *SrfI* ve *NheI*'dir (69).

Alibi ve ark. 2019 yılında yayınladıkları 2007-2012 yılları arasında hastanede yatmakta olan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen makrolid ve linkozamide dirençli 85 adet *C. striatum* izolatının fenotipik ve moleküler karakterizasyonun inceledikleri çalışmada *XbaI* enzimi ile yapılan PFGE yönteminde 85 *C. striatum* suşunun, 18 farklı klona ait olduğunu bulmuşlardır (70).

Campanile ve ark. İtalya'da 2005-2007 yılları arasında üç hastaneden izole edilen 36 tane çoklu ilaca dirençli *C. striatum* izolatının DNA parmak izlerini karakterize etmek için yapılan çalışmada iki farklı yöntem kullanmışlardır. *EcoRI* enzimi ile otomatik ribotipleme, *XbaI* ve *SwaI* restriksiyon enzimleri ile PFGE yöntemini kullanmışlardır. CHEF DR II ile PFGE yöntemini çalışmışlardır. Çalışmada önce rastgele on suş üzerinde *XbaI*, *SwaI*, *SfiI* ve *PacI* restriksiyon enzimleri ile yaptıkları PFGE sonuçlarında *XbaI* ve *SwaI* enzimlerinin hem düşük hem de yüksek molekül ağırlıklı fragmanlarda daha iyi çözünürlük verdikleri görülünce çalışmaya sadece bu iki enzim (*XbaI* ve *SwaI*) ile devam edilmiştir. *SwaI* restriksiyon enzimi ile yapılan analizde 36 suş, sadece bir klona ait olup üç farklı alt tipe dağıldığı gösterilmiştir (a1 alt-tipte 30 suş, a2 alt-tipte 4 suş ve a3 alt-tipte 2 suş bulunmaktadır). *XbaI* restriksiyon enzimi ile yapılan analizde ise A1 alt-tipte 27 suş, A2 alt-tipte yedi suş ve A3 alt-tipte iki suş bulunmaktadır. Klinik izolatların PFGE paternleri *C. striatum* ATCC 6940 suşu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar çoklu ilaca dirençli tek *C. striatum* klonunun üç hastanede dolaştığını göstermiştir (94).

Chapartegui-González ve ark. İspanya'da 40 adet *C. urealyticum*'un antimikrobiyal duyarlılık ve direnç mekanizmalarını araştırmışlardır. Çalışmalarında moleküler epidemiyolojik yöntem olarak tiplendirilebilirliği ve ayırım gücü yüksek olan PFGE yöntemini kullanmışlardır. *XbaI* restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan analizde 40 suş 39 farklı PFGE paterni ortaya çıkarmıştır. PFGE paterninin bir tanesinde iki suş bulunmaktadır ve bu suşların aynı hastadan sekiz gün arayla alınan idrar örneklerinden izole edilmiş ve aynı antibiyotik direnç profilini gösterdiği tespit edilmiştir (71).

Verroken ve ark. Belçika Üniversite hastanesinde sekiz aylık bir süre zarfında hastanede yatan on farklı hastanın alt solunum yolu örneklerinden elde edilen *C. striatum* izolatları ile paralel olarak solunum örneklerinden elde edilen salgın ile ilişkisi olmayan beş *C. striatum* izolatlarının epidemiyolojik araştırmasını yapmışlardır. Epidemiyolojik analizde DiversiLab tiplendirme ve PFGE yöntemlerini kullanmışlardır. Salgınla ilgili on *C. striatum* izolatının tümü aynı rep-PCR paternine sahip olup birbirleri arasında %97,7 benzerlik göstermiştir. Salgınla ilişkili olmayan

beş suş arasındaki benzerlik <%97 olup farklı rep-PCR paterni sergilemişlerdir. Epidemiyolojik olarak salgınla ilişkisi olmayan iki izolat DiversiLab ile farklı bir rep-PCR paternine karşılık gelirken, PFGE dendrogramında salgın kümesi içinde yer almıştır. PFGE analizi, salgınla ilişkili on *C. striatum* suşunu üç farklı kümeye ayırmıştır (19).

Wang ve ark. çalışmalarında Çin'de üçüncü basamak bir hastanede 14 aylık bir süre boyunca yatan hastaların alt solunum yolu örneklerinden elde edilen 82 tane çoklu ilaca dirençli *C. striatum* izolatına *XbaI* restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan PFGE yönteminde tüm suşların toplam 14 PFGE paterni sergilediği tespit edilmiştir. Tüm paternler içindeki üç PFGE paterninin baskın klonları içerdiği tespit edilmiştir. Bu klonların beyin cerrahi ve yoğun bakım ünitelerinde dağıldığı görülmüştür (74).

2005-2009 yılları arasında İspanya'daki Marque's de Valdecilla Üniversite Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında klinik örneklerinden elde edilen altmış dört *C. striatum* izolatlarının PFGE yöntemi klonal yayılımına bakılmıştır. CHEF-DRIII sistemi kullanılarak *XbaI* restriksiyon enzimi ile PFGE yöntemi uygulanmıştır. Altmış dört *C. striatum* izolatı 46 farklı PFGE paterni sergilemiştir. Tüm paternler %63 ila %97 arasında değişen Dice benzerlik katsayısı ile değerlendirilmiştir. Çoğu PFGE paterni tek izolata karşılık gelirken, yedi izolat için bir PFGE paterni, her biri üç izolat içeren üç patern ve her biri iki izolat içeren altı patern gözlemlenmiştir. *C. striatum*'daki yüksek pulsotip sayısı, bu türde yüksek bir genetik çeşitliliğe işaret etmektedir. PFGE analizi, 64 *C. striatum* suşunun çoğunlukla ilişkisiz olduğunu ve sporadik enfeksiyonlara neden olduğunu göstermiştir (72).

Brezilya'da 2009-2013 yılları arasında 42 aylık periyotta hastanede yatan bakteriyemi ve kateter ilişkili enfeksiyon belirti ve semptomları olan 13 farklı servisten 21 hastanın kan ve kateter örneklerinden elde edilen 23 *C. striatum* izolatının yayılımının PFGE analizine tabi tutulduğu çalışmada on bir PFGE paterni bulunmuştur. Tip I PFGE paterni, dokuz izolat ile izolatlar arasında en sık gözlemlenen patern olup hematojen enfeksiyonu olan hastalar arasında baskın olarak bulunmuştur (102).

Çalışmamızda 26 aylık süreçte çeşitli klinik servislerde tedavi gören hastaların örneklerinden elde etmiş olduğumuz 140 *Corynebacterium* izolatının %90,7 kümeleşme oranı ile 46 farklı PFGE paterni gösterdiği tespit edilmiştir. En büyük küme; 12 *C. striatum* izolatının yer aldığı A kümesidir. A kümesindeki 12 suşun altı tanesi YBÜ'sinden, dört tanesi cerrahi birimlerden ve iki tanesi dahili birimlerden gelmiştir. A kümesine ait suşların dört tanesi kan, beş tanesi yara ve üç tanesi de TA örneğinden izole edilmiştir. A kümesine en yakın benzerlik gösteren küme on suş içeren A1 kümesidir. A1 kümesine ait suşların beş tanesi TA, dört tanesi yara ve bir tanesi balgam örneğinden izole edilmiştir. A kümesine ait izolatların Kasım 2022-Ocak 2023 tarihleri arasında ortopedi, plastik cerrahi ve yoğun bakım ünitelerinden gelen örneklerden elde edildiği tespit edilmiştir.

## SONUÇLAR

1. Çalışmaya dahil edilen 140 *Corynebacterium* izolatın tanımlanması MALDI-TOF MS ile yapıldı. Suşların 132'si (%94,3) *C. striatum* ve sekizi (%5,7) *C. afermentans* olarak tespit edildi.
2. Suşların 21'i (%15) kan, yedisi (%5) kateter içi kan, 48'i (%34,3) yara, 46'sı (%32,9) trakeal aspirat (TA), 11'i (%7,9) balgam, dördü (%2,9) abse materyali ve üçü (%2,1) plevral sıvı örneklerinden izole edildi.
3. En sık izole edilen klinik örnek yara (%34,3), ikinci en sık klinik örnek trakeal aspirat (%32,9) iken; en az izole edilen klinik örnek ise %2,1 ile plevral sıvı örneğidir.
4. Çalışmamızdaki suşlara ait örneklerden; 25 örnek (%17,9) dahili birimlerden, 46 örnek (%32,9) cerrahi birimlerden ve 69 örnek (%49,3) yoğun bakım ünitelerinden (YBÜ) gönderildi. En çok örneğin (%49,3) yoğun bakım ünitelerinden gelmiş olduğu tespit edildi.
5. Tüm suşlara EUCAST rehberindeki öneriler doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi çalışıldı. Suşların tamamı (%100) linezolid ve vankomisine duyarlı iken tamamı (%100) siprofloksasin dirençli saptandı. İzolatların 138'i (%98,6) penisiline, 135'i (%96,4) klindamisine, 139'u (%99,3) rifampisin ve tetrasikline, 124'ü (%88,6) gentamisine ve 106'sı (%75,7) eritromisine dirençli saptandı.
6. *C. striatum* izolatlarının tamamı (%100) siprofloksasin ve tetrasikline, %98,5'i penisiline, %99,2'si rifampisine, %97'si klindamisine, %90,2'si gentamisine ve %74,2'si eritromisine dirençli saptandı. *C. striatum* izolatlarının tamamı (%100) linezolid ve vankomisine duyarlı bulundu.
7. *C. afermentans* izolatlarının tamamı (%100,0) penisilin, eritromisin, siprofloksasin ve rifampisine dirençli bulundu. İzolatların %87,5'i klindamisin ve tetrasikline, %62,5'i ise gentamisine dirençli saptandı. *C. afermentans* izolatlarının tamamı (%100) linezolid ve vankomisine duyarlı bulundu.
8. Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarına göre; hem *C. striatum* hem de *C. afermentans* izolatları dikkat çekici bir şekilde çoklu ilaç direncine sahip oldukları ve antimikrobiyal direnç oranlarının yüksek olduğu tespit edildi.

9. Tüm izolatlarda PCR ile direnç geni varlığı araştırıldı. İzolatların %94,3'ünde *bla* geni, %95'inde *ampC* geni, %95,7'sinde *ermX* geni, %90'nında *aac(3)-XI* geni, %92,1'inde *aphA1* geni, %97,9'unda *gyrA* geni ve %32,9'unda *tetA* geni pozitif saptandı. *ermB* ve *tetB* genleri izolatların hiçbirinde pozitif bulunmadı.
10. *C. striatum* izolatlarının %99,2'sinde *bla* ve *ampC* geni, %96,2'sinde *ermX* geni, %93,2'sinde *aac(3)-XI* geni, %91,7'sinde *aphA1* geni ve %34,8'inde *tetA* geni pozitif saptandı. *gyrA* geni *C. striatum* izolatlarının tamamında pozitif saptandı. *ermB* ve *tetB* genleri ise *C. striatum* izolatlarının hiçbirinde pozitif bulunmadı.
11. *C. afermentans* izolatlarının %12,5'sinde *bla* geni, %25'inde *ampC* geni, %87,5'inde *ermX* geni, %37,5'inde *aac(3)-XI* geni ve %62,5'inde *gyrA* geni pozitif saptandı. *C. afermentans* izolatlarının tamamında (%100,0) *aphA1* geni pozitif saptandı. *ermB*, *tetA* ve *tetB* genleri ise *C. afermentans* izolatlarının hiçbirinde pozitif bulunmadı.
12. İzolatlarda *bla* geni ve *ampC* geni pozitifliği ile fenotipik olarak yüksek penisilin direnç oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). *aac(3)-XI* geni pozitif olanlarda anlamlı bir şekilde gentamisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). *aphA1* geni pozitif olanlarda anlamlı bir şekilde gentamisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). *ermX* geni pozitif olan izolatlarda anlamlı bir şekilde eritromisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). *ermX* geni pozitif olan izolatlarda anlamlı bir şekilde klindamisin direnç oranı yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İzolatlarda *tetA* geni pozitifliği ile fenotipik olarak yüksek tetrasiklin direnç oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).
13. İzolatlarda biyofilm oluşumu mikrotitrasyon plak yöntemi ile semikantitatif olarak değerlendirildi. Çalışmadaki 140 izolatın 37 tanesinde (%26,4) biyofilm oluşumu gözlemlendi. Biyofilm oluşturan izolatların üç tanesinin (%2,1) güçlü, dokuz tanesinin (%6,4) orta derecede ve 25 tanesinin (%17,9) zayıf derecede biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. İzolatların 103 tanesinde (%73,6) ise biyofilm oluşumu görülmedi.
14. *C. striatum* izolatlarının %28'inde biyofilm oluşumu görülürken, %72'sinde biyofilm oluşumu görülmedi. *C. afermentans* izolatlarının hiçbirinde biyofilm oluşumu gözlenmedi.

15. *Corynebacterium* türleri ile biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).
16. Çalışmadaki 140 suşun klonal ilişkisi PFGE yöntemi ile araştırıldı. 140 suş 46 farklı PFGE paterni gösterdi. Paternlerden 13 tanesi yalnızca birer suş içermekteydi. Kalan 33 patern ise küme oluşturan suşları içermekte olup küme genişliği 2-12 arasında değişmekteydi. Kümeleşme oranı %90,7 olarak saptandı. Bu da hastanemizde 26 aylık süreçte aynı kümeye ait suşların çeşitli kliniklerde hem hastalarda enfeksiyona hem de çevrede kolonizasyona neden olduğunu göstermektedir.
17. Hastanemizdeki *Corynebacterium* suşlarının antimikrobiyal direnç oranları ve direnç geni oranlarının yüksek oluşu oldukça dikkat çekicidir.
18. Özellikle riskli hasta gruplarında bu mikroorganizmaların etken olma olasılığı akılda tutulmalıdır ve hastalara uygun tedavi planları yapılmalıdır.
19. Hastane enfeksiyonlarına neden olan başta *C. striatum* olmak üzere diğer difteri dışı *Corynebacterium*'lara karşı farkındalığı artırmak ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonları önlemek için hastanelerde enfeksiyon kontrol komitesi tarafından difteri dışı *Corynebacterium* türleri ile ilgili aktif sürveyans çalışmaları yapılmalıdır.
20. Sağlık çalışanları ve ortak tıbbi ekipmanlarla hastadan hastaya bulaş olabileceğinden dolayı sağlık çalışanlarının el hijyenine uyması ve tıbbi ekipmanların ve hastane ortamındaki cansız yüzeylerin dezenfekte edilmesi önemlidir.

## KAYNAK

1. Uzun M. Murray tıbbi mikrobiyoloji. In: Dürdal Us, Ahmet Başustaoglu, editor. *Corynebacterium* ve diğer Gram pozitif basiller. 7 ed. Ankara: Pelikan Kitabevi; 2016. p. 222-7.
2. Rajamani Sekar SK, Veeraraghavan B, Anandan S, Devanga Ragupathi NK, Sangal L, Joshi S. Strengthening the laboratory diagnosis of pathogenic *Corynebacterium* species in the vaccine era. *Lett Appl Microbiol*. 2017;65(5):354-65.
3. Mochon AB, Sussland D, Saubolle MA. Aerobic actinomycetes of clinical significance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(4).
4. Busse H-J. The Actinobacteria. In: Aidan Parte WW, Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha Trujillo, Wolfgang Ludwig, Ken-ichiro Suzuki, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 5. 2 ed. New York: Springer; 2012. p. 244-89.
5. Carlos Leonardo Araújo JA, Alyne Lima, Larissa Dias, Patricia Silva, Joana Marques, Vasco Azevedo, Artur Silva and Adriana Folador. The genus *Corynebacterium* in the eonomic era. In: Enany S, editor. *Basic biology and applications of Actinobacteria*. 5 ed 2018. p. 59-77.
6. Chen FL, Hsueh PR, Teng SO, Ou TY, Lee WS. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012;45(3):255-8.
7. Daisuke U, Oishi T, Yamane K, Terada K. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with a catheter-related blood stream infection. *Case Rep Infect Dis*. 2017;2017:2682149.
8. Boltin D, Katzir M, Bugoslavsky V, Yalashvili I, Brosh-Nissimov T, Fried M, et al. *Corynebacterium striatum*--a classic pathogen eluding diagnosis. *Eur J Intern Med*. 2009;20(3):e49-52.
9. Winn W. Aerobic and facultative Gram positive bacilli. *Koneman's color atlas and text book of diagnostic microbiology*, 2006:765-857.
10. Gomila M, Renom F, Gallegos Mdel C, Garau M, Guerrero D, Soriano JB, et al. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach. *BMC Microbiol*. 2012, 4;12:52.
11. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(11):5607-12.
12. Casella P, Bosoni M, Tommasi A. Recurrent *Corynebacterium aquaticum* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clinical Microbiology Newsletter*. 1988;10(8):62-3.
13. Dragomirescu CC, Lixandru BE, Coldea IL, Corneli ON, Pana M, Palade AM, et al. Antimicrobial susceptibility testing for *Corynebacterium* species isolated from clinical samples in Romania. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(1):31.
14. VenkataSarada C, Rao R. Non diphtheritic corynebacteria (NDC) and their clinical significance: clinical microbiologist's perspective. *Am J Epidemiol*. 2014;2:83-7.

15. Silva-Santana G, Silva CMF, Olivella JGB, Silva IF, Fernandes LMO, Sued-Karam BR, et al. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976-2020. Arch Microbiol. 2021;203(5):1863-80.
16. Olender A, Bogut A, Magryś A, Król-Turmińska K. A novel approach to study the effect of ciprofloxacin on biofilms of *Corynebacterium* spp. using confocal laser scanning microscopy. Pol J Microbiol. 2018;67(4):431-40.
17. Bernard K. The genus *corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J Clin Microbiol. 2012;50(10):3152-8.
18. Tanrıverdi Y, Korkmaz F, Birinci A. Hastanemizde 2014-2017 yıllarında üreyen *Corynebacterium* izolatlarının değerlendirilmesi. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2017;3(2):6-8.
19. Verroken A, Bauraing C, Deplano A, Bogaerts P, Huang D, Wauters G, et al. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. Clin Microbiol Infect. 2014;20(1):44-50.
20. Wang X, Zhou H, Chen D, Du P, Lan R, Qiu X, et al. Whole-genome sequencing reveals a prolonged and persistent intrahospital transmission of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen. J Clin Microbiol. 2019;57(9).
21. Aşgın N. Klinik örneklerden izole edilen *Corynebacterium striatum* suşlarının in-vitro antibiyotik direnç profili. ANKEM Derg. 2019;33(3):102-7.
22. Silva CMF, Mota HF, Cabra FdO, Farias YV, Dimas SM, de Santana GS, et al. Multiresistance and endemic status of *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial infections: a critical situation in intensive care units and varied wards of a tertiary care hospital, Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. Brazilian Health Biomed Sci. 2021;20(2):114-28.
23. Asgin N, Otlu B. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Corynebacterium striatum* isolated in a tertiary hospital in Turkey. Pathogens. 2020;9(2):136.
24. Çelik C, Büyüktuna SA, Tutar U, Gözel MG, Uysal EB, Bakici MZ. Çeşitli enfeksiyonlarda patojen rolü yeniden önem kazanan korinebakteri türlerinde antimikrobiyal duyarlılık. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2016;36(3):138-42.
25. Trost E, Blom J, Soares Sde C, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schröder J, et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. Journal of bacteriology. 2012;194(12):3199-215.
26. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE 3rd, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin Microbiol Rev. 1997;10(1):125-59.
27. Lawson. PA. The Phylum Actinobacteria. In: Paola Mattarelli BB, Wilhelm H. Holzappel, Brian J.B. Wood, editor. The Bifidobacteria and Related Organisms. 1 ed: Elsevier; 2018. p. 1-8.
28. Booth J. Diseases Caused by Actinomyces Species. In: Enna SJ, Bylund DB, editors. XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. 1 ed. Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 1-4.
29. Neemuchwala A, Soares D, Ravirajan V, Marchand-Austin A, Kus JV, Patel SN. *In vitro* antibiotic susceptibility pattern of non-diphtheriae

- Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(4).
30. Hülya Şimşek, Demet Furkan Sevindi, Özlem Yılmaz, Arzu Akşit İlki, Rukiye Berkem, Yeşim Beşli, M. Kerem Çalgın. Aerop ve fakültatif Gram pozitif basiller. In: Ahmet Başustaoglu ADU, editor. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (Türkçe). 7 ed. Ankara: Hipokrat Kitabevi; 2017. p. 868-97.
  31. Liebl W. *Corynebacterium* taxonomy. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. 2005;11:9-34.
  32. Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The Prokaryotes: Actinobacteria: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
  33. Kathryn A. Bernard GF. *Corynebacterium*. In: M.E. Trujillo SD, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman, editor. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1 ed 2015. p. 1-70.
  34. [GOV.UK](https://www.gov.uk/government/publications/smid-2-identification-of-corynebacterium-species). {HYPERLINK“https://www.gov.uk/government/publications/smid-2-identification-of-corynebacterium-species”} Erişim tarihi: 2 Haziran 2023.
  35. Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods. Manual of clinical microbiology. 2011:413-42.
  36. Balci I, Ekşi F, Bayram A. Coryneform bacteria isolated from blood cultures and their antibiotic susceptibilities. J Int Med Res. 2002;30(4):422-7.
  37. Soriano F, Tauch A. Microbiological and clinical features of *Corynebacterium urealyticum*: urinary tract stones and genomics as the Rosetta Stone. Clin Microbiol Infect. 2008;14(7):632-43.
  38. Zasada AA, Mosiej E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. Lett Appl Microbiol. 2018;66(6):472-83.
  39. Soto A, Zapardiel J, Soriano F. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. J Clin Pathol. 1994;47(8):756-9.
  40. Funke G, Renaud FN, Freney J, Riegel P. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne database 2.0. J Clin Microbiol. 1997;35(12):3122-6.
  41. Freney J, Duperron MT, Courtier C, Hansen W, Allard F, Boeufgras JM, et al. Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. J Clin Microbiol. 1991;29(1):38-41.
  42. Adderson EE, Boudreaux JW, Cummings JR, Pounds S, Wilson DA, Procop GW, et al. Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes. J Clin Microbiol. 2008;46(3):921-7.
  43. Gavin SE, Leonard RB, Briselden AM, Coyle MB. Evaluation of the rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. J Clin Microbiol. 1992;30(7):1692-5.
  44. Funke G, Peters K, Aravena-Roman M. Evaluation of the RapID CB plus system for identification of coryneform bacteria and *Listeria* spp. J Clin Microbiol. 1998;36(9):2439-42.
  45. Adderson EE, Boudreaux JW, Hayden RT. Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. Pediatr Infect Dis J. 2008;27(2):136-41.

46. Duggal S, Gaiind R, Tandon N, Deb M, Chugh TD. Comparison of an automated system with conventional identification and antimicrobial susceptibility testing. *ISRN Microbiol.* 2012;2012:107203.
47. Pincus DH. Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods* Bethesda, MD: Parenteral Drug Association. 2006;2006:1-32.
48. Rennie RP, Brosnikoff C, Turnbull L, Reller LB, Mirrett S, Janda W, et al. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2646-51.
49. Van den Velde S, Lagrou K, Desmet K, Wauters G, Verhaegen J. Species identification of corynebacteria by cellular fatty acid analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54(2):99-104.
50. Konrad R, Berger A, Huber I, Boschert V, Hörmansdorfer S, Busch U, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro Surveill.* 2010;15(43):19699.
51. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):1946-54.
52. Bao R, Gao X, Hu B, Zhou Z. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for identification of *Corynebacterium* species. *J Thorac Dis.* 2017;9(9):3239-45.
53. De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Spanu T, Fiori B, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(9):1081-8.
54. Alatoon AA, Cazanave CJ, Cunningham SA, Ihde SM, Patel R. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50(1):160-3.
55. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):380-407.
56. Am Song S, Shin JH. Microbiological characteristics of *Corynebacterium striatum*, an emerging pathogen. *Hanyang Medical Reviews.* 2018;38(2):93-8.
57. Khamis A, Raoult D, La Scola B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1934-6.
58. Stackebrandt E. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 2006;33:152-5.
59. Yassin AF, Steiner U, Ludwig W. *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(Pt 3):1001-5.
60. Funke G, Ramos CP, Collins MD. *Corynebacterium coyleae* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(1):92-6.

61. Pascual C, Lawson PA, Farrow JA, Gimenez MN, Collins MD. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45(4):724-8.
62. Funke G, Lawson PA, Collins MD. *Corynebacterium mucifaciens* sp. nov., an unusual species from human clinical material. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(4):952-7.
63. Riegel P, Ruimy R, Renaud FN, Freney J, Prevost G, Jehl F, et al. *Corynebacterium singulare* sp. nov., a new species for urease-positive strains related to *Corynebacterium minutissimum*. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(4):1092-6.
64. Rıza Durmaz Özgen Eser, Barış Otlı, editor. Moleküler mikrobiyoloji tanı ve epidemiyoloji. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 2022.
65. Yıldırım İH, Yıldırım SC, Koçak N. Molecular methods for bacterial genotyping and analyzed gene regions. *J Microbiol Infect Dis.* 2011;1(01):42-6.
66. Yağcı A. İnfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojik analizinde kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri. *Flora.* 2001;6(2):67-73
67. Türe M, Altınok İ. Pulsed-Field Jel Elektroferez (PFGE) metodu ve akuatik organizmalarda kullanımı. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi. 2013;9(1):44-54.
68. Liu X, Huang M, Zhang H, Li W, Pang Z, Lin P, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in *Bacillus cereus* typing. *Int J Clin Exp Pathol* 2016;9(9):9497-502.
69. Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol.* 2019;74:103935.
70. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Navas Méndez J. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides and lincosamides in *Corynebacterium striatum* clinical strains isolated from Tunisia. *Clin Med Invest.* 2019;4:1-4
71. Chapartegui-González I, Fernández-Martínez M, Rodríguez-Fernández A, Rocha DJP, Aguiar ERGR, Pacheco LGC, et al. Antimicrobial susceptibility and characterization of resistance mechanisms of *Corynebacterium urealyticum* clinical isolates. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(7).
72. Navas J, Fernández-Martínez M, Salas C, Cano ME, Martínez-Martínez L. Susceptibility to aminoglycosides and distribution of *aph* and *aac(3)-XI* genes among *Corynebacterium striatum* clinical isolates. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167856.
73. García-Crespo D, Navas J, Gradillas G, Juste RA. Technical note: molecular typing of *Corynebacterium bovis* isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Dairy Sci.* 2005;88(5):1705-7.
74. Wang J, Wang Y, Du X, Cui J, Wang K, Zhang L, Han Y. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China. *J Infect Dev Ctries.* 2016;10(12):1299-305.
75. Basim E, Basim H. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. *Turkish journal of biology* 2001;25(4):405-18.

76. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.
77. Reddy BS, Chaudhury A, Kalawat U, Jayaprada R, Reddy G, Ramana BV. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). *Indian J Med Microbiol.* 2012;30(1):52-7.
78. Weiss K, Laverdière M, Rivest R. Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(4):930-3.
79. Barberis CM, Sandoval E, Rodriguez CH, Ramírez MS, Famiglietti A, Almuzara M, et al. Comparison between disk diffusion and agar dilution methods to determine in vitro susceptibility of *Corynebacterium* spp. clinical isolates and update of their susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;14:246-52.
80. Andrews JM; BSAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(3):454-89.
81. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics 2014 [p.]. Available from: [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
82. Salem N, Salem L, Saber S, Ismail G, Bluth MH. *Corynebacterium urealyticum*: a comprehensive review of an understated organism. *Infect Drug Resist.* 2015;8:129-45.
83. Gomila M, Renom F, Gallegos Mdel C, Garau M, Guerrero D, Soriano JB, et al. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach. *BMC Microbiol.* 2012;12:52.
84. Bowstead TT, Santiago SM. Pleuropulmonary infection due to *Corynebacterium striatum*. *Br J Dis Chest.* 1980;74(2):198-200.
85. Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S, Ezaki T, Kimura S. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54(2):109-14.
86. Renom F, Garau M, Rubí M, Ramis F, Galmés A, Soriano JB. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):2064-7.
87. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernández-Martínez M, Martínez-Martínez L, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Sci Rep.* 2017;7(1):9704.
88. Ramos JN, Rodrigues IDS, Baio PVP, Veras JFC, Ramos RTJ, Pacheco LG, et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(9):e180051.
89. Souza Cd, Faria YV, Sant'Anna Lde O, Viana VG, Seabra SH, Souza MC, et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(2):242-8.

90. Wang X, Zhou H, Du P, Lan R, Chen D, Dong A, et al. Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of China: an emerging national nosocomial epidemic. *J Hosp Infect.* 2021;110:67-75.
91. Tang J, Kornblum D, Godefroy N, Monsel G, Robert J, Caumes E, et al. *Corynebacterium striatum* thrombophlebitis: a nosocomial multidrug-resistant disease? *Access Microbiol.* 2021;3(12):000307.
92. Agrawal SK, Khullar S, Srivastava A, Kapil A, Dhawan B. *Corynebacterium striatum*: An emerging nosocomial skin and soft-tissue pathogen. *Natl Med J India.* 2021;34(2):88-9.
93. McMullen AR, Anderson N, Wallace MA, Shupe A, Burnham CA. When good bugs go bad: Epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant, opportunistic pathogen. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11):e01111-7.
94. Campanile F, Carretto E, Barbarini D, Grigis A, Falcone M, Goglio A, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):75-8.
95. Suh JW, Ju Y, Lee CK, Sohn JW, Kim MJ, Yoon YK. Molecular epidemiology and clinical significance of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical specimens. *Infect Drug Resist.* 2019;12:161-71.
96. Nudel K, Zhao X, Basu S, Dong X, Hoffmann M, Feldgarden M, et al. Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen of immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(9):1016.e7-.e13.
97. Alibi S, Ramos-Vivas J, Ben Selma W, Ben Mansour H, Boukadida J, Navas J. Virulence of clinically relevant multidrug resistant *Corynebacterium striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces. *Microb Pathog.* 2021;155:104887.
98. Wang J, Pei J, Liu M, Huang R, Li J, Liao S, Liang J. Identification and evolutionary relationship of *Corynebacterium striatum* clinical isolates. *Pathogens.* 2022;11(9):1012.
99. Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(1):23-9.
100. Selek MB, Atik TK, Bektöre B, Baylan O, Özyurt M. İmmün sistemi baskılanmış bir hastada *Corynebacterium striatum*'un etken olduğu pnömoni ve bakteriyemi olgusu. *Gülhane Tıp Derg.* 2015;57:193-5.
101. Kang SJ, Choi SM, Choi JA, Choi JU, Oh TH, Kim SE, et al. Factors affecting the clinical relevance of *Corynebacterium striatum* isolated from blood cultures. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199454.
102. Ramos JN, Souza C, Faria YV, da Silva EC, Veras JFC, Baio PVP, et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum*. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):672.
103. Söderquist B, Henningsson T, Stegger M. *Corynebacterium striatum* prosthetic joint infection successfully treated with long-term dalbavancin. *Microorganisms.* 2023;11(3):550.

104. Fernández-Esgueva M, Pérez-Jimeno N, Roda-Rojo V, Ferrer-Cerón I. *Corynebacterium striatum* prosthetic joint infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(7):480-1.
105. Streifel AC, Varley CD, Ham Y, Sikka MK, Lewis JS 2nd. The challenge of antibiotic selection in prosthetic joint infections due to *Corynebacterium striatum*: a case report. *BMC Infect Dis*. 2022;22(1):290.
106. Lee YW, Huh JW, Hong SB, Jung J, Kim MJ, Chong YP, et al. Severe pneumonia caused by *Corynebacterium striatum* in adults, Seoul, South Korea, 2014-2019. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(11):2147-54.
107. Yatera K, Mukae H. *Corynebacterium* species as one of the major causative pathogens of bacterial pneumonia. *Respir Investig*. 2020;58(3):131-3.
108. Zhang MJ, Cao XJ, Fan J, Yin ZG, Yu K. *Corynebacterium striatum* meningitis combined with suspected brain and lung abscesses: a case report and review. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):389.
109. Kammoun MM, Regaieg K, Bahloul M, Ammar R, Bouaziz M. *Corynebacterium striatum* meningitis. *Med Mal Infect*. 2016;46(8):454-6.
110. Melo N, Correia C, Gonçalves J, Dias M, Garcia RM, Palma P, et al. *Corynebacterium striatum* cardiac device-related endocarditis: A case report. *IDCases*. 2021;27:e01371.
111. Cabanilla MG, Jones E, Norville SV, Santana A. A case series of *Corynebacterium striatum* native valve infective endocarditis. *J Cardiol Cases*. 2022;26(3):194-6.
112. Bläckberg A, Falk L, Oldberg K, Olaison L, Rasmussen M. Infective endocarditis due to *Corynebacterium* species: Clinical features and antibiotic resistance. *Open Forum Infect Dis*. 2021;8(3):ofab055.
113. Hollnagel K, Willen J, Ellis M, Soleimanifard Y, Booth R, Nandi S. Chronic *Corynebacterium striatum* septic arthritis in a patient referred for total knee arthroplasty. *Case Rep Orthop*. 2020;2020:1392182.
114. Kawaguchi Y, Okamoto H, Endo K, Iwata H, Joyo Y, Nozaki M, et al. Pyogenic tenosynovitis of the wrist due to *Corynebacterium striatum* in a patient with dermatomyositis: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(3):e18761.
115. Zhang H, Tan X, Zhang Z, Yang X, Wang L, Li M, et al. Targeted antibiotics for lower respiratory tract infection with *Corynebacterium striatum*. *InfectDrug Resist*. 2023;16:2019-28.
116. Elkayam N, Urazov A, Tuneev K, Chapnick E. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with cellulitis in a patient with cirrhosis. *IDCases*. 2019;17:e00575.
117. Saito S, Kawamura I, Tsukahara M, Uemura K, Ohkusu K, Kurai H. Cellulitis and bacteremia due to *Corynebacterium striatum* identified by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Intern Med*. 2016;55(9):1203-5.
118. Kitayama S, Saito K, Sato Y. Peritoneal dialysis-related peritonitis due to *Corynebacterium striatum*: An emerging multidrug-resistant pathogen. *Ther Apher Dial*. 2021;25(2):254-5.
119. Molina Collada J, Rico Nieto A, Díaz de Bustamante Ussia M, Balsa Criado A. Septic arthritis in a native knee due to *Corynebacterium striatum*. *Reumatol Clin*. 2018;14(5):301-2.

120. Feced Olmos CM, Alegre Sancho JJ, Ivorra Cortés J, Román Ivorra JA. Septic arthritis of the shoulder due to *Corynebacterium striatum*. *Reumatol Clin*. 2013;9(6):383.
121. Bayram S, Bilgili F, Anarat FB, Saka E. Subacute osteomyelitis of the fibula due to *Corynebacterium striatum* in an immunocompetent child: A case report. *JBJS Case Connect*. 2019;9(2):e0220.
122. Beltrán-Arroyave C, Díaz-Díaz A, Loaiza-Díaz N. Chronic osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum* in a female adolescent. *Rev Chilena Infectol*. 2016;33(6):696-9.
123. Yamamoto T, Kenzaka T, Mizuki S, Nakashima Y, Kou H, Maruo M, et al. An extremely rare case of tubo-ovarian abscesses involving *Corynebacterium striatum* as causative agent. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):527.
124. Biswal I, Mohapatra S, Deb M, Dawar R, Gaiind R. *Corynebacterium striatum*: an emerging nosocomial pathogen in a case of laryngeal carcinoma. *Indian J Med Microbiol*. 2014;32(3):323-4.
125. Chatzopoulou M, Koufakis T, Voulgaridi I, Gabranis I, Tsiakalou M. A case of fatal sepsis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum*. *Hippokratia*. 2016;20(1):67-9.
126. Beteta López A, Gil Ruiz MT, Vega Prado L, Fajardo Olivares M. Cystitis and haematuria due to *Corynebacterium striatum*. A case report and review. *Actas Urol Esp*. 2009;33(8):909-12.
127. Stone N, Gillett P, Burge S. Breast abscess due to *Corynebacterium striatum*. *Br J Dermatol*. 1997;137(4):623-5.
128. Peiris V, Fraser S, Knowles C, Norris S, Bennett C. Isolation of *Corynebacterium striatum* from three hospital patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13(1):36-8.
129. Shanbhag SS, Shih G, Bispo PJM, Chodosh J, Jacobs DS, Saeed HN. Diphtheroids as corneal pathogens in chronic ocular surface disease in Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis. *Cornea*. 2021;40(6):774-9.
130. Das S, Rao AS, Sahu SK, Sharma S. *Corynebacterium* spp as causative agents of microbial keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2016;100(7):939-43.
131. Riegel P, de Briel D, Prévost G, Jehl F, Monteil H, Minck R. Taxonomic study of *Corynebacterium* Group ANF-1 strains: Proposal of *Corynebacterium afermentans* sp. nov. containing the subspecies *C. afermentans* subsp. *afermentans* subsp. nov. and *C. afermentans* subsp. *lipophilum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1993;43(2):287-92.
132. Dykhuizen RS, Douglas G, Weir J, Gould IM. *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*: multiple abscess formation in brain and liver. *Scand J Infect Dis*. 1995;27(6):637-9.
133. Kumari P, Tyagi A, Marks P, Kerr KG. *Corynebacterium afermentans* spp. *afermentans* sepsis in a neurosurgical patient. *J Infect*. 1997;35(2):201-2.
134. Minkin R, Shapiro JM. *Corynebacterium afermentans* lung abscess and empyema in a patient with human immunodeficiency virus infection. *South Med J*. 2004;97(4):395-7.
135. Sewell DL, Coyle MB, Funke G. Prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum* (CDC coryneform group ANF-1). *J Clin Microbiol*. 1995;33(3):759-61.

136. Yang T, Mauriallo CJIN. A case of delayed-onset ventriculo-peritoneal shunt infection with *Corynebacterium* presented as ascites. *Interdisciplinary Neurosurgery*. 2016;4:17-9.
137. Yanai M, Ogasawasa M, Hayashi Y, Suzuki K, Takahashi H, Satomura A. Retrospective evaluation of the clinical characteristics associated with *Corynebacterium* species bacteremia. *Braz J Infect Dis*. 2018;22(1):24-9.
138. Olender A, Bogut A, Bańska A. The role of opportunistic *Corynebacterium* spp. in human infections. *Eur J Clin Exp Med*. 2019(2):157-61.
139. Dragomirescu CC, Cristea VC, Murariu C, Corneli ON, Lixandru BE, Popa GL. The first case report of *Corynebacterium jeikeium* in blood culture in Romania. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*. 2020;79(2):144-9.
140. Leyton B, Ramos JN, Baio PVP, Veras JFC, Souza C, Burkovski A, et al. Treat me well or will resist: Uptake of mobile genetic elements determine the resistome of *Corynebacterium striatum*. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7499.
141. Philippon A, Arlet G, Labia R, Iorga BI. Class C  $\beta$ -Lactamases: Molecular characteristics. *Clin Microbiol Rev*. 2022;35(3):e0015021.
142. Ozdemir S, Aydogan O, Koksall Cakirlar F. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of Non-diphtheria *Corynebacterium* strains isolated from blood cultures: First report from Turkey. *Medeni Med J*. 2021;36(2):123-9.
143. Fernandez-Roblas R, Adames H, Martín-de-Hijas NZ, Almeida DG, Gadea I, Esteban J. In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(5):453-5.
144. Uyanık MH, Yazgı H, Bilici D, Özden K, Karakoç E. Hastane kökenli *Staphylococcus aureus* türlerinde makrolid-linkozamid-streptogramin B direncinin araştırılması. *ANKEM Derg*. 2009;23(2):66-70.
145. Szemraj M, Kwaszewska A, Szewczyk EM. New gene responsible for resistance of clinical *Corynebacteria* to macrolide, lincosamide and streptogramin B. *Pol J Microbiol*. 2018;67(2):237-40.
146. Ojo KK, Striplin MJ, Ulep CC, Close NS, Zittle J, Luis H, et al. *Staphylococcus* efflux msr(A) gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(3):1089-91.
147. Olender A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Corynebacterium* spp. causing infections in people. In: Pana M, editor. *Antibiotic Resistant Bacteria: A Continuous Challenge in the New Millennium* 2012. p. 387-402.
148. Rosato AE, Lee BS, Nash KA. Inducible macrolide resistance in *Corynebacterium jeikeium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(7):1982-9.
149. Szemraj M, Kwaszewska A, Pawlak R, Szewczyk EM. Macrolide, lincosamide, and streptogramin B resistance in lipophilic *Corynebacteria* inhabiting healthy human skin. *Microb Drug Resist*. 2014;20(5):404-9.
150. Ortiz-Pérez A, Martín-de-Hijas NZ, Esteban J, Fernández-Natal MI, García-Cía JI, Fernández-Roblas R. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb Drug Resist*. 2010;16(4):273-7.

151. Topcu A.W KMM. Kinolonlar. In: Topcu A.W SG, Doğanay M., editor. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 2008 p. 341-55.
152. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol.* 2009;2(1):40-61.
153. Sierra JM, Martinez-Martinez L, Vázquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):1714-9.
154. Ramos JN, Valadão TB, Baio PVP, Mattos-Guaraldi AL, Vieira VV. Novel mutations in the QRDR region *gyrA* gene in multidrug-resistance *Corynebacterium* spp. isolates from intravenous sites. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2020;113(4):589-92.
155. Wang Y, Shi X, Zhang J, Wang Y, Lv Y, Du X, et al. Wide spread and diversity of mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant *Corynebacterium striatum* strains isolated from three tertiary hospitals in China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021;20(1):71.
156. Yoon S, Kim H, Lee Y, Kim S. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean J Lab Med.* 2011;31(1):47-8.
157. Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, Nakayama-Imahiji H, Ichimura M, Hayashi T, et al. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):527-32.
158. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* 2005;105(2):477-98.
159. Zhang Y, Zhang N, Wang M, Luo M, Peng Y, Li Z, et al. The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes. *Biosaf Health.* 2023; 5(1):14-20.
160. Willke Topçu A. Aminoglikozitler. İçinde: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M.(Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre Enfeksiyonlar 2002;3:294-303.
161. Galimand M, Fishovitz J, Lambert T, Barbe V, Zajicek J, Mobashery S, et al. AAC(3)-XI, a new aminoglycoside 3-N-acetyltransferase from *Corynebacterium striatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(9):5647-53.
162. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(4):a025387.
163. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem.* 2014;395(5):559-75.
164. Tauch A, Pühler A, Kalinowski J, Thierbach G. *TetZ*, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems. *Plasmid.* 2000;44(3):285-91.
165. Tauch A, Krieft S, Pühler A, Kalinowski J. The *tetAB* genes of the *Corynebacterium striatum* R-plasmid pTP10 encode an ABC transporter and confer tetracycline, oxytetracycline and oxacillin resistance in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;173(1):203-9.

166. Schröder J, Maus I, Meyer K, Wördemann S, Blom J, Jaenicke S, et al. Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen *Corynebacterium resistens* DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient. *BMC Genomics*. 2012;13:141.
167. Zhang Q, Wu S, Song P, Liu Y, Ding L, Shi Q, et al. Antibiotic resistance and resistance mechanism of *Corynebacterium kroppenstedtii* isolated from patients with mastadenitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2023;42(4):525-8.
168. Fernández-Natal I, Rodríguez-Lázaro D, Marrodán-Ciordia T, Sáez-Nieto JA, Valdezate S, Rodríguez-Pollán H, et al. Characterization and antimicrobial susceptibility of one antibiotic-sensitive and one multidrug-resistant *Corynebacterium kroppenstedtii* strain isolated from patients with granulomatous mastitis. *New Microbes New Infect*. 2016;14:93-97.
169. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*. 2006;64(4):313-25.
170. Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling*. 2003;19(2):139-50.
171. Temel A, Eraç B. Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2018;48(1):1-13.
172. Tauch A, Burkovski A. Molecular armory or niche factors: virulence determinants of *Corynebacterium* species. *FEMS Microbiol Lett*. 2015 Dec;362(23):fzv185.
173. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(4):305-11.
174. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40(2):175-9.
175. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891-9.
176. Sun W, Ma L, Li Y, Xu Y, Wei J, Sa L, et al. In vitro studies of Non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates on antimicrobial susceptibilities, drug resistance mechanisms, and biofilm formation capabilities. *Infect Drug Resist*. 2022;15:4347-59.
177. Rather MA, Aulakh RS, Gill JP, Mir AQ, Hassan MN. Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (tetA and tetB) from food-borne *Bacillus cereus* isolates. *Asian Pac J Trop Med*. 2012 Sep;5(9):709-12.
178. Flores AE, Diedrick MJ, Ferrieri P. Development of a Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) method for molecular typing of clinical isolates of *Arcanobacterium haemolyticum*. *J Microbiol Methods*. 2011;86(3):387-9.
179. Salimiyan Rizi K, Farsiani H, Momen Ghalibaf M. Blood culture positive for Gram-positive rods: Contamination or a true infection-a literature review. *Rev Clin Med*. 2021;8(2).
180. Hahn WO, Werth BJ, Butler-Wu SM, Rakita RM. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* associated with increased use of parenteral antimicrobial drugs. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(11):1908-14.

181. Pezzlo MT. Coryneform Gram-Positive Bacilli. In: Luis M. de la Maza MTP, Cassiana E. Bittencourt, Ellena M. Peterson, editor. Color atlas of medical bacteriology. 3rd Edition ed2020. p. 36-47.
182. Yamamuro R, Hosokawa N, Otsuka Y, Osawa R. Clinical characteristics of *Corynebacterium* bacteremia caused by different species, Japan, 2014-2020. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(12):2981-7.
183. Patricia S. Conville FGW. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic Actinomycetes. In: James H. Jorgensen KCC, Guido Funke, Michael A. Pfaller, Marie Louise Landry, Sandra S. Richter, David W. Warnock, editor. Manual of Clinical Microbiology 2015. p. 504-35.
184. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(11):1614-9.
185. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):547-603.
186. Suwantarant N, Weik C, Romagnoli M, Ellis BC, Kwiatkowski N, Carroll KC. Practical utility and accuracy of Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Corynebacterium* species and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Am J Clin Pathol.* 2016;145(1):22-8.
187. Alibi S, Ferjani A, Gaillot O, Marzouk M, Courcol R, Boukadida J. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathol Biol (Paris).* 2015;63(4-5):153-7.
188. Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O, Ramírez MS, Famiglietti A, Vay C. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS One.* 2014;9(9):e106303.
189. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC, Patel R, et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):3093-5.
190. Abe M, Kimura M, Maruyama H, Watari T, Ogura S, Takagi S, et al. Clinical characteristics and drug susceptibility patterns of *Corynebacterium* species in bacteremic patients with hematological disorders. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(10):2095-104.
191. Mumcuoğlu İ, Hazırolan G, Kurşun Ş, Aksu NJTBoH, Biology E. Evaluation of the *Corynebacterium striatum* isolated with increasing frequency in one of the training and research hospital. *Turk Hij Den Biyol Derg.* 2015;72(4):281-8.
192. Jesus HNR, Ramos JN, Rocha DJPG, Alves DA, Silva CS, Cruz JVO, et al. The pan-genome of the emerging multidrug-resistant pathogen *Corynebacterium striatum*. *Funct Integr Genomics.* 2022;23(1):5.
193. Olender A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy.* 2013;59(4):294-306.
194. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med.* 2008;59:415-28.

195. Qin L, Sakai Y, Bao R, Xie H, Masunaga K, Miura M, et al. Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium* spp. isolated from blood cultures of hospitalized patients in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70(2):152-7.
196. Rodríguez-Martínez JM, Ballesta S, Pascual A. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30(4):366-8.
197. Daffinee KE, O'Neill ET, Bleick CR, Williams G, Antoci V, Garcia D, et al. Staphylococcal biofilm: penetration and bioavailability of vancomycin with or without rifampin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2023;106(3):115947.
198. Wen J, Wang Z, Du X, Liu R, Wang J. Antibiofilm effects of extracellular matrix degradative agents on the biofilm of different strains of multi-drug resistant *Corynebacterium striatum*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2022;21(1):53.
199. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13 Suppl 3:1-46.
200. Bulut Y, Doymaz MZ. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji. In: Durmaz R, editor. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ve mikrobiyolojideki önemi. 2 ed. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri; 2001. p. 109-22.