Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA**
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2019**

Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

# YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDEN İZOLE EDİLEN *CORYNEBACTERİUM* CİNSİ BAKTERİLERİN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ, ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI VE MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

MEHTAP BİÇER

DANIŞMAN
PROF. DR. GÖKHAN AYGÜN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

İSTANBUL-2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

**ÖĞRENCİNİN**

| | |
|---|---|
| Numarası | : 2701160107 |
| Adı Soyadı | : Mehtap Biçer |
| Anabilim Dalı | :Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |
| Programı | :Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı |
| Tez Savunma Sınav Tarihi | :21.05.2019 |
| Tez Savunma Sınav Saati | : 10.00 |
| Öğretim Yılı/Dönemi | : 2018-2019 Bahar |

**MEVCUT TEZİN**

| | |
|---|---|
| Tez Adı | Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen Corynebacterium Cinsi Bakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri, Antibiyotik Duyarlılığı ve Moleküler Özellikleri Yönünden Araştırılması |
| Yabancı Dilde Tez Adı | Investigation of Microbiological Characteristics, Antibiotic Susceptibility and Molecular Properties of Corynebacterium Species Isolated from Intensive Care Unit |

Yukarıda bilgileri sunulan öğrencinin tez savunma sınavı "İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'ne uygun olarak yapılmış ve jüri OY BİRLİĞİ ile tezin KABULÜNE karar vermiştir.

**JÜRİ TARAFINDAN DÜZELTİLEN TEZİN**

| | |
|---|---|
| Tez Adı | |
| Yabancı Dilde Tez Adı | |

Prof. Dr. Gökhan AYGÜN
Danışman

Prof. Dr. Sevgi ERGİN
Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe İSTANBULLU
Jüri Üyesi

*Açıklamalar*

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Mehtap BİÇER

(İmza)

# İTHAF

Anneme, babama, kardeşlerime ve sevgili eşime ithaf ediyorum.

# TEŞEKKÜR

Akademik bir yola girmem için beni yüreklendiren ve desteğini esirgemeyen Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlusu Uzm. Bio. Ayşe Nur HONDUR' a,

Eğitim ve öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini her durumda paylaşan, sadece bilimsel konularda değil sosyal konularda da ihtiyacım olan desteği veren tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gökhan AYGÜN' e,

Laboratuvarının kapısını açıp çalışma imkanı veren ve büyük bir titizlikle tez çalışmamı yürüten Malatya İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Sayın Prof. Dr. Barış OTLU ile Dr. Nafia Canan GÜRSOY ve biyolog Özkan YENER' e

Yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarımız Sayın Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Hrisi Bahar TOKMAN, Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI , Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Prof. Dr. Sevgi ERGİN ve Doç. Dr. Erdal POLAT, PhD. Mert Ahmet KUŞKUCU 'ya,

Bilgi, deneyim ve iyi niyetini esirgemeyen PhD. Sümeyye ŞEN' e

Anlayış, şefkat ve desteğini esirgemeyen HLA Doku Tiplendirme Laboratuvar sorumlusu Doç. Dr. Erkan YILMAZ' a ve çalışan tüm arkadaşlarıma,

Yüksek lisans öğrenimim süresince benimle beraber endişelenen, hüzünlenen ve mutlu olan tüm arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca hiçbir şeyin eksikliğini hissettirmeyen, ellerinden gelenin en iyisini yapmaya çalışan annem ve babama, varlıklarıyla huzur bulduğum kardeşlerime,

Uzun yıllardan beri hayatımda olan, beni her konuda destekleyen sevgi, ilgi ve şefkatini esirgemeyen bazen aile ve bazende en iyi dost olan varlığının hayatı anlamlı kıldığı sevgili eşime, sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27998

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR ..... V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... X
ÖZET ..... Xİ
ABSTRACT ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 3
2.1. *Corynebacterium*' ların Tarihçesi ..... 3
2.2. Corynebacterium' ların Sınıflandırılması ..... 4
2.3. *Corynebacterium*' ların Mikrobiyolojik Özellikleri ..... 4
2.4. *Corynebacterium*' ların Kültürel Özellikleri ..... 5
2.5. *Corynebacterium*' ların İdentifikasyonu ..... 5
2.6. Corynebacterium' ların Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri ..... 13
2.7. *Corynebacterium*' ların PFGE yöntemi ile epidemiyolojik analizi ..... 14
2.8. Bazı Corynebacterium Türleri ve Özellikleri ..... 18
Korineform bakteriler 3 grupta incelenir: ..... 18
2.8.1. Corynebacterium striatum ..... 18
2.8.2. Corynebacterium amycolatum ..... 22
2.8.3. Corynebacterium afermentans ..... 24
2.8.4. Corynebacterium aurimucosum ..... 26
2.8.5. Corynebacterium imitans ..... 27
2.8.6. Corynebacterium mucifaciens ..... 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 29
3.1. GEREÇ ..... 30
3.1.1. Kullanılan besiyerleri ..... 30

3.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskleri .....32
3.1.3. Moleküler Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve Malzemeler .....32
3.1.4. Kullanılan Cihaz, Ekipmanlar ve Diğer Gereçler .....34
3.2. YÖNTEM .....35
3.2.1. Örneklerin işleme alınması ve Corynebacterium' ların izolasyonu .....35
3.2.2. Corynebacterium' ların gram boyama ile analizi .....35
3.2.3. *Corynebacterium*' ların saflaştırılması ve saklanması .....36
3.2.4. *Corynebacterium*' ların identifikasyonu .....36
3.2.5. Corynebacterium' ların antimikrobiyal duyarlılığı .....37
3.2.6. *Corynebacterium*' ların PFGE yöntemi ile analizi .....38
3.2.6.1. İzolatların hazırlanması .....38
3.2.6.2. İzolatların agaroza gömülmesi .....38
3.2.6.3. Agaroza gömülü izolatların lizisi .....39
3.2.6.4. Bakteri plaklarının yıkanması .....40
3.2.6.5. *Xba*I Restriksiyon Enzimi ile DNA' nın kesilmesi .....40
3.2.6.6. Bakteri plakların jele yüklenmesi .....40
3.2.6.7. Elektroforez İşlemi .....41
3.2.6.8. Sonuçların görüntülenmesi ve analiz edilmesi .....41
4. BULGULAR .....42
5. TARTIŞMA .....51
KAYNAKLAR .....62
ETİK KURUL KARARI .....72
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI .....73
ÖZGEÇMİŞ .....74

# TABLOLAR LİSTESİ

**Tablo 2-1.** İnsanlardan izole edilen *Corynebacterium* türleri ve bu türlerin identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler ..... 9
**Tablo 2-2.** Bazı Elektroforetik Teknikler ..... 16
**Tablo 2-3.** Bazı *Corynebacterium* Türleri ve Özellikleri ..... 18
**Tablo 2-4.** *Corynebacterium striatum*' a atfedilen isimler ..... 19
**Tablo 3-1.** % 5 Koyun Kanlı Agar ..... 30
**Tablo 3-2.** Mueller Hinton Fastidious Agar ..... 30
**Tablo 3-3.** Triptic Soy Broth (TSB) ..... 31
**Tablo 3-4.** Beyin Kalp İnfüzyon Broth ..... 31
**Tablo 3-5.** Antibiyotik diskleri ..... 32
**Tablo 4-1.** *Corynebacterium* izolatlarının tür dağılımı ..... 42
**Tablo 4-2.** Corynebacterium' ların antimikrobiyal duyarlılıkları ..... 44
**Tablo 4-3.**Vankomisin MIC değer aralığı ..... 45
**Tablo 4-4.** PFGE ile analiz edilen izolatların detaylı bilgi tablosu ..... 46

# ŞEKİLLER LİSTESİ

**Resim 2-1.** Bazı Elektroforetik Tekniklerin Şematik Görünümü..... 16
**Resim 3-1.** İzolatların MALDITOF MS' den alınmış identifikasyon görüntüleri..... 37
**Resim 4-1.** *Corynebacterium*' ların izole edildiği çeşitli klinik örneklerin dağılımı ..... 43
**Resim 4-2.** PFGE ile analizi sonucu oluşan 54 C. *striatum* izolatının dendrogramı (1) 47
**Resim 4-3.** PFGE ile analizi sonucu oluşan 54 *C. striatum* izolatının dendrogramı (2) 48
**Resim 4-4.** *Xba*I ile kesilen C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri (1) ..... 49
**Resim 4-5.** *Xba*I ile kesilen C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri (2) ..... 49
**Resim 4-6.** *Xba*I ile kesilen C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri (3) ..... 50
**Resim 4-7.** *Xba*I ile kesilen C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri (4) ..... 50

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---|---|
| CHEF | : Contour Clamped Homogeneous Electric Fields |
| EDTA | : Etilendiamintetraasetik asit |
| E-test | : Epsilometer strip method |
| HST | : Hücre süspansiyon tamponu |
| HPT | : Hücre parçalama tamponu |
| Kb | : Kilobaz |
| LMA | : Düşük erime ısılı agar |
| MALDI-TOF MS | : Matriks aracılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi |
| MLEE | : Multilocus Enzym Electrophoresis" |
| MLST | : Multilocus Sequence Typing |
| µl | : Mikrolitre |
| NCCLS | : National Commitee For Clinical Laboratory Standarts |
| PCR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PFGE | : Pulsed-Field Gel Electrophoresis |
| RE | : Restriksiyon enzimi |
| SDS | : Sodyum dodezil sülfat |
| TBE | : Tris-Borat-EDTA |
| TSB | : Triptik soy broth |
| TE | : Tris-EDTA |
| CAMP | : Christie-Atkins-Munch-Petersen |

# ÖZET

Biçer M. Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen *Corynebacterium* Cinsi Bakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri, Antibiyotik Duyarlılığı Ve Moleküler Özellikleri Yönünden Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019

*Corynebacterium* cinsi heterojen özellikte türlerden oluşan bir bakteri grubudur. *Corynebacterium* türlerinin büyük bir çoğunluğu, insanların normal cilt, mükoz membran ve üst solunum yolları florasının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Normal florada bulunmalarından ve tanımlamadaki zorluklarından dolayı *Corynebacterium* türleri sıklıkla kolonizer veya kontaminant olarak düşünülmüştür ve bu durum *Corynebacterium* türlerinin patojenik potansiyelinin küçümsenmesi sonucunu ortaya çıkarmıştır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören ve hastanede uzun süre kalarak geniş spektrumlu antibiyotiklere tekrar tekrar maruz kalan hastalarda, çoklu antimikrobiyal dirence sahip *Corynebacterium* türlerinin fırsatçı enfeksiyon etkeni olabileceği ve salgınlara neden olabileceği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Ocak 2016-Ekim 2017 tarihleri arasında, yoğun bakım ünitelerinden gönderilen, çeşitli klinik örneklerden (kan kültürü, steril vücut sıvıları, doku örnekleri, solunum yolu örnekleri, kateter ucu örnekleri vb.) izole edilmiş 62 adet *Corynebacterium* cinsine ait mikroorganizma çalışmaya dahil edilmiştir. İdentifiye edilmiş 62 adet *Corynebacterium* izolatının 54(%87,09)' ü *Corynebacterium striatum* olarak tanımlanmıştır ve en sık izole edilen klinik örnek solunum sekresyon örneğidir. Antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmış *Corynebacterium* izolatlarının vankomisin ve linezolid dışındaki antimikrobiyallere çoklu dirence sahip olduğu görülmüştür. PFGE ile analiz edilmiş 54 *C. striatum* izolatının benzerlik oranı %85 olarak belirlenmiştir ve olası bir salgının meydana geldiği düşünülmüştür. Son yıllarda yoğun bakım ünitesinde tedavi gören hastalardan en sık izole edilen ve çalışmamızda da olduğu gibi çoklu antimikrobiyal dirence sahip olan *Corynebacterium* türü *C. striatum'* dur.

*Corynebacterium* cinsi organizmaların patojenitesini ve klinik etkisini netleştirmek için tür düzeyinde identifikasyonu yapılmalıdır. Ayrıca olası salgınları tespit etmek amacıyla klonal ilişki yönünden izolatlar analiz edilerek, enfeksiyon kontrolüne de katkıda bulunulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *Corynebacterium, C. striatum*, YBÜ, PFGE, Kontaminasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27998

## ABSTRACT

Biçer M. Investigation of Microbiological Characteristics, Antibiotic Susceptibility and Molecular Properties of *Corynebacterium* Species Isolated from Intensive Care Unit. Istanbul University-Cerrahpasa Graduate Education Institute, Medical Microbiology Department. Master Thesis. Istanbul. 2019

The genus *Corynebacterium* is a group of bacteria with heterogeneous species. The majority of *Corynebacterium* species are a significant part of the flora of normal skin, mucous membranes and upper respiratory tract. Because of their difficulty in identifying and identifying in normal flora, *Corynebacterium* species are often considered colonizer or contaminant, and this has led to the underestimation of the pathogenic potential of *Corynebacterium* species. It has been proven by studies that *Corynebacterium* species with multiple antimicrobial resistance may be opportunistic infectious agents and cause outbreaks in patients who have been treated especially in intensive care units and have been exposed to broad spectrum antibiotics for long time in hospital.

A total of 62 microorganisms belonging to the genus *Corynebacteriu*m isolated from various clinical specimens (blood culture, sterile body fluids, tissue samples, airway samples, catheter tip samples, etc.) sent from intensive care units between January 2016 and October 2017 were included in the study. Of the 62 Corynebacterium isolates, 54 (87.09%) were identified as *Corynebacterium striatum* and the most commonly isolated clinical example was a respiratory secretion. Antimicrobial susceptibility testing of *Corynebacterium* isolates was found to have multiple resistance to antimicrobials other than vancomycin and linezolid. The similarity rate of 54 C. striatum isolates analyzed by PFGE was determined to be 85% and a possible outbreak was thought to occur. *Corynebacterium* species, which is the most commonly isolated in the intensive care unit in recent years and has multiple antimicrobial resistance as in our study, is *C. striatum.*

To clarify the pathogenicity and clinical effect of the genus *Corynebacterium,* species level identification should be performed. In addition, in order to detect possible outbreaks, isolates should be analyzed for clonal relationship and infection control should be contributed.

Keywords: *Corynebacteriu*m, *C. striatum*, ICU, PFGE, Contamination

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpaşa Project No: 27998

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Korineform bakteriler grubu, morfolojik olarak değil aynı zamanda metabolik ve yapısal açıdan çok çeşitli bakteri cinslerini içerir [1]. *Corynebacterium* cinsi korineform bakteri grubundaki en büyük cinslerden biridir [2]. Yunanca tokmak, lobut yada çubuk anlamındaki "coryne" sözcüğünden türeyen *Corynebacterium*' lar, adından da anlaşılacağı gibi lobut şeklinde, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerobik veya aerobik, aside dirençli olmayan ve gram pozitif boyanan mikroorganizmalardır [3]. *Corynebacterium* türlerinin büyük bir çoğunluğu, insanların normal cilt, mükoz membran ve üst solunum yolları florasının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır [1, 4, 5]. Normal florada bulunmalarından ve tanımlamadaki zorluklarından dolayı *Corynebacterium diphtheriae* dışındaki *Corynebacterium* türleri sıklıkla kolonizer veya kontaminant olarak düşünülmüştür ve bu durum *Corynebacterium* türlerinin patojenik potansiyelinin küçümsenmesi sonucunu ortaya çıkarmıştır [1, 6, 7].

Teşhis ve tedavisi gittikçe daha yoğun ve invaziv hale gelen, mikroorganizmalar için daha iyi üreme ortamı sunan çok sayıda immün sistemi baskılanmış hasta varlığı, kateter ve protez cihazları olan, yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören ve hastanede uzun süre kalarak geniş spektrumlu antibiyotiklere tekrar tekrar maruz kalan hasta sayılarındaki artış vb. durumlar, *Corynebacterium* türlerinin fırsatçı enfeksiyon etkeni olabileceğini ve patojenik potansiyelinin gözardı edilmemesi gerektiğini akla getirmiştir [1]. *Corynebacterium diphtheriae* dışındaki *Corynebacterium* türlerinin sporadik olarak, santral venöz kateterlerle ilişkili bakteremi, endokardit, artrit, osteomiyelit, keratit, konjonktivit, menenjit, peritonit, solunum yolu ve üriner sistem enfeksiyonları gibi ciddi insan enfeksiyonlarında rol aldığını gösteren çok sayıda çalışma rapor edilmiştir [8-17]. Mevcut veriler, *Corynebacterium* türlerinin önemli kabul edilmesi gerektiğini ve steril vücut örneklerinden izole edilmesi durumunda, kültürde saf/baskın bir patojen olarak izole edildiğinde veya idrarda anlamlı koloni sayısı ile üremesi durumunda *Corynebacterium* türlerinin identifikasyonun yapılması gerektiğini göstermektedir [3].

Son yıllarda yoğun bakım ünitelerinde çoklu antibiyotik direnci bulunan *Corynebacterium* cinsi organizmalardan (özellikle *Corynebacterium striatum*) kaynaklı enfeksiyonlar ve salgınlar tanımlanmaktadır, bu organizmaların klinik önemi, virulansları ve yayılımları tam olarak ortaya konulmamıştır [4, 18-22]

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, yoğun bakım ünitelerinden gönderilen, çeşitli klinik örneklerden (kan kültürü, steril vücut sıvıları, doku örnekleri, solunum yolu örnekleri vb.) izole edilen *Corynebacterium* cinsindeki organizmaların tür düzeyinde identifikasyonları ve antibiyotik duyarlılıkları yapılarak, moleküler özelliklerinin araştırılıp tedavi seçeneklerine yardımcı olmak amaçlanmıştır.

# 2. GENEL BİLGİLER

Klinik laboratuvarlarda, "difteroid" terimi, Gram boyamada *Corynebacterium diphtheriae* ile morfolojik olarak benzerlik gösteren Gram pozitif çomaklar için kullanılan bir terimdir fakat taksonomistler arasında daha morfolojik bir terim olan "korineform", daha çok bilinen "difteroid" teriminin yerini almaktadır [6]. Korineform bakteriler grubu içerisindeki en büyük ve önemli bir cins olan *Corynebacterium*' lar, yakın zamana kadar *Corynebacterium diphtheriae* türü dışında genellikle kontaminant olarak kabul edilmiştir. Sistemik enfeksiyonlar, immün sistemin baskılanması, tramva, yoğun bakımda uzun süre yatış vb. durumlarda, normal flora elemanları olarak bilinen *Corynebacterium*' lar, konak savunma mekanizmalarını aşar ve enfeksiyonlara katkıda bulunabilen fırsatçı bir patojen haline dönüşürler [16]. Böyle durumlarda klinik uygulamalarda, antimikrobiyal dirençli organizmaların seçimine, hastanede yatış süresinin uzamasına ve maliyetlerin artmasına yol açabilecek antimikrobiyal ajanların gereksiz şekilde reçetelendirilmesini önlemek için, kontaminasyon ile gerçek enfeksiyonun ayırt edilmesi ciddi önem taşımaktadır [9].

## 2.1. *Corynebacterium*' ların Tarihçesi

*Corynebacterium* cinsine ait ilk veriler 1800'lü yıllara dayanmaktadır. *Corynebacterium* cinsi, Lehmann ve Neumann tarafından 1896'da difteri oluşumundan sorumlu Gram pozitif çomakları içeren taksonomik bir grup olarak tanımlanmıştır [23, 24]. *Corynebacterium* cinsi, tıbbi önemi olan *Mycobacterium, Nocardia* ve *Rhodococcus* gibi cinsleri de içeren Actinomycetales sınıfına dahil edilmiş, yıllarca giderek artan sayıda yeni türle birlikte ayrı bir monofiletik çizgi oluşturarak taksonomideki yerini sağlamlaştırmıştır. [24]. Toprakta, havada, suda ve daha bir çok yerde saprofit olarak bulunduklarından, *Corynebacterium*' lar klinik olarak önemsiz kabul edilmiş ve klinik mikrobiyologlardan çok az ilgi görmüştür [24]. Klinik örneklerden izole edilen korineform bakteriler sistematik olarak ilk defa D. G. Hollis ve R. E. Weaver tarafından incelenmiştir [1, 25]. D. G. Hollis ve R. E. Weaver Gram pozitif çomakların tanımlanmasına ilişkin bir rehber oluşturmuş ve oluşturmuş oldukları rehber, klinik izolatları belirlemeyi amaçlayan klinik mikrobiyologlar için paha biçilemez bir kaynak olmuş ve daha sonraki korineform bakteriler üzerine yapılan taksonomik araştırmaların temelini oluşturmuştur [1].

### 2.2. Corynebacterium' ların Sınıflandırılması

Lehmann ve Neumann tarafından, 1896 yılında taksonomik bir grup olarak tanımlandıktan sonraki birkaç on yıl boyunca *Corynebacterium* cinsi, esas olarak hücre morfolojisi, boyanma özellikleri ve solunum metabolizması (aerop) temeline dayalı, son derece farklı mikroorganizma topluluğundan oluşuyordu. Çoğunlukla 1970'ler ve 1980'lerde, kemotaksonomik belirteçlerin (ağırlıklı olarak hücre duvarı, lipid ve DNA baz kompozisyonu) kullanımı, taksonomiyi açıklığa kavuşturmuş ve araştırmacıların *Corynebacterium* cinsinin sınırlarını yeniden çizmelerine yardımcı olmuştur. Çeşitli *Corynebacterium* türleri diğer cinslere transfer edilmiş ve daha önce başka cinslerde bulunan diğer türler ise *Corynebacterium* cinsinin içine dahil edilmiştir [26].

Son on yılda moleküler uygulamaların (16S rRNA ve rDNA dizilimi, nükleik asit hibridizasyonu vb.), kemotaksonomik (peptidoglikan analizi, hücresel yağ asit çalışmaları, menakinon karakterizasyonu vb.) ve genişletilmiş fenotipik tanımlama yöntemlerinin (kit tanımlama sistemleri, organik bileşik asimilasyon testleri, glikosidaz veya aminopeptidaz enzimlerinin belirlenmesi vb.) giderek gelişmesi ile, çok sayıda yeni *Corynebacterium* türü izole edilmiş ve sınıflandırılmıştır [27]. Son verilere göre *Corynebacterium* cinsi 100'den fazla heterojen tür ve alt tür içermektedir [26, 28] Bu türlerden yaklaşık 55 tanesi insanlarda enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir [29].

### 2.3. *Corynebacterium*' ların Mikrobiyolojik Özellikleri

*Corynebacterium* cinsi heterojen özellikte türlerden oluşan bir bakteri grubudur. Lehmann ve Neumann 1896 yılında *Corynebacterium* cinsini, uçları çoğunlukla şişkin olan çomak morfolojisinde, agarda büyüyebilen, yumuşak ve yapışmaz koloniler olarak tasvir etmişlerdir [23]. 1918 yılında Kisskalt ve Berend ise mikroskopik olarak yığın halinde kümeleşen, düzensiz boyanan, çit yada V-formunda sıralanma eğiliminde olan organizmalar olarak tasvir etmişlerdir [23]. Bu cinsin klasik mikroskobik görüntüsü, tek başlarına ya da çiftler halinde dizilim göstererek birbirine paralel olmayan, bazen uçları biraz daha geniş, "bahçe çiti" yada "çin harfi" şeklini oluşturma eğiliminde olan tokmak benzeri çomaklar şeklinde tasvir edilir [3, 27, 28, 30].

*Corynebacterium* cinsi, pleomorfik, hareketsiz, kapsülsüz, katalaz pozitif, spor yapmayan, aside dirençli olmayan, bazı türleri metakromatik granül oluşturma özelliğine sahip, 2-6 μm uzunluğunda ve 0.5 μm çapında Gram pozitif çomaklardan oluşmaktadır [31]. *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium aurimucosum*,

*Corynebacterium doosanense* ve *Corynebacterium maris* dışındaki diğer türler oksidaz negatiftir [32].

*Corynebacterium* türlerinin çoğu, hücre duvarlarında korinomikolik asit olarak adlandırılan kısa zincirli mikolik asitler (22-38 karbon atomu) ve arabinogalaktan olarak adlandırılan arabinoz ile galaktoz bulundururlar [3]. Ayrıca hücre duvarlarında bulunan peptidoglikan tabakası, kurucu di-amino asit olarak meso-diaminopimelik asit (meso-DAP)' ten oluşmaktadır [27]. Bu organizmaların hücre membranlarında, ayırıcı hücresel yağ asitleri (palmitik, oleik, stearik asitler) ve menakinonlar MK-8 ($H_2$) ve MK-9 ($H_2$) bulunmaktadır [3, 27, 32, 33]. Yüksek oranda G + C (% 46-74) içeriğine sahiptirler [1]. Karbohidratları fermentatif yada oksidatif yolla kullanırlar.

### 2.4. *Corynebacterium*' ların Kültürel Özellikleri

*Corynebacterium* türleri, 35-37 °C' de $CO_2$' li veya $CO_2$' siz ortamda, çikolatamsı ve %5 koyun kanlı agarda genellikle 18-24 saatte belirgin S tipi koloniler oluştururlar [33]. Bazı türlerin üreme süresi 3-4 gün olabilmektedir. Koloni büyüklüğü, pigmentasyon ve hemoliz varlığı tür ayrımında önemlidir. Klasik koloni morfolojisi ve hemoliz varlığı, bazı türlerde at kanı içeren besiyeri ortamından ziyade % 5 koyun kanı içeren besiyeri ortamında daha iyi gözlemlenir [29]. Lipofilik *Corynebacterium* türleri gibi zor üreyen mikroorganizmalar için besiyeri ortamına % 5 koyun kanı ve % 0,1 - 1 Tween-80 ilave edildiğinde aerobik ortamda daha iyi üreme gözlenmiştir [1]. Lipid için gereklilik, bakterinin lipid içermeyen bir ortama (Müeller-Hinton agar, Brain heart infüzyon agar, triptik soy agar vb.) inokülasyonu ve inokülüm üstüne % 0,1 - 1 Tween-80 damlatılması ile belirlenir. İnkübasyondan sonra, lipofilik suşlar, Tween-80' nin olduğu bölgede daha iyi büyüme gösterirken, uzak bölgelerde ise ya zayıf yada hiç büyüme göstermeyecektir [27]. *Corynebacterium*'lar genellikle, herhangi bir büyüme gereksinimi göstermese de, sistin-tellurit, fosfomisin veya tween 80 (% 0.1-1) içeren kanlı agarın kullanımı, klinik olarak anlamlı türlerin gelişimini artırır [34] .

### 2.5. *Corynebacterium*' ların İdentifikasyonu

Primer kültürden izole edilen *Corynebacterium* türlerinin, üreme süresi ve miktarı, koloni morfolojisi ve kokusu, hemoliz varlığı, motilite ve pigmentasyon ile Gram boyama morfolojisi tanımlamada kullanılan temel özelliklerdir [1, 6]. Fermentatif veya oksidatif metabolizma, lipid gereksinimi, nitrat redüksiyonu, katalaz ve üreaz üretimi, eskülin ve jelatin hidrolizi, pirazinamidaz ve alkalen fosfataz varlığı ile

karbohidratlardan (glukoz, sukroz, maltoz, laktoz, mannitol, mannoz ve ksiloz) asit üretimi Corynebacterium türlerinin identifiye edilmesinde kullanılan önemli biyokimyasal özelliklerdir [26]. β-hemoliz yapan *Staphylococcus aureus* suşu (ATCC 25923) ile Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) reaksiyonu ise bazı *Corynebacterium* türlerini ayırmada kullanılan başka bir testtir [1].

D. G. Hollis ve R. E. Weaver 1981 yılında, klinik mikrobiyologlar için çok değerli bir referans olan yayınladıkları rehberde, *Corynebacterium* türlerinin tanımlanması için yukarıda belirtilen özellikleri tanımlamışlardır [25, 35]. Bu biyokimyasal özellikler kullanılarak *Corynebacterium* türlerinin tanımlaması için iyi kurulmuş sistemlerden biri, API Coryne strip sistemi (API-bioMérieux, France)' dir. Genelde 24-48 saat içinde sonuç alınabilen bu yöntem, 21 biyokimyasal testten oluşmaktadır. Test, 11 enzim testi (pirazinamidaz, pirolidonil arilamidaz, β-galaktosidaz, alkalin fosfataz, α-glukozidaz, N-asetilglukozaminidaz, β-glukuronidaz, nitrat redüksiyonu, üre, jelatin ve eskülin hidrolizi) ve 8 karbohidrat fermantasyon testi (glikoz, riboz, D-ksiloz, mannitol, maltoz, laktoz, sükroz ve glikojen) için substratları içeren 20 mikrotüp içermektedir [36, 37]. Katalaz aktivitesi ise eskulin veya jelatin hidroliz testlerine karşılık gelen iki mikrotüpten birine bir damla hidrojen peroksit (% 3) ilave edilmesi ile belirlenmektedir [38]. Bu sistemin, standart tanımlama yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha güvenilir ve hızlı olduğu belirtilmiştir [36].

Rapid CB Plus sistemi (Remel. Norcross, Ga), *Corynebacterium* türlerini tanımlamak için 14 enzim ve 4 karbohidrat testi için substrat içeren, 4 saatlik hızlı ticari bir başka identifikasyon yöntemidir. Katalaz testi ve sarı pigment üretiminin gözlemlenmesi, sistemde kullanılan tamamlayıcı testlerdir [39, 40]. Konvansiyonel yöntemler pahalı ve zaman alıcı olduğundan, uzun süreli inkübasyon (7-10 gün) gerektirdiğinden ve farklı türler için üst üste binen biyokimyasal reaksiyonlarla ilgili problemlere sahip olduklarından dolayı bu tür ticari identifiye yöntemlerinin, daha kolay yorumlandığından ve daha kısa inkübasyon süresi gerektirdiğinden daha ümit verici olduğu belirtilmiştir [39].

Vitek sistemi (Vitek-bioMérieux, France) ise kromojenik enzim substrat testlerini kullanan, kolorimetrik teknolojiye dayalı bir tanımlama sistemidir. Birçok biyokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği 64 kuyucuğa sahip bir plastik karta (ANC ID kart), mikroorganizma yoğun bir şekilde (3 McFarland) inoküle edilir ve yaklaşık 6

saatlik kısa bir inkübasyon süresi sonrasında otomatik olarak okuma gerçekleştirilir [41].

Matriks aracılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS, Bruker, Daltonics, Germany), mikrobiyal hücrelerin protein bileşimine dayanan türlerin tanımlanmasında kullanılan yeni bir teknolojidir [42]. MALDI-TOF MS kullanılarak, bir izolatın protein spektral profili üretilir ve tanımlama için bir referans veri tabanı ile karşılaştırılır. MALDI Biotyper referans veritabanında, difteri olmayan *Corynebacterium* türleri için 150'den fazla kütle spektral girişi vardır [43]. MALDI-TOF MS ile, direkt koloni ve ekstraksiyon yöntemleri olarak bakterilerin hazırlanması için iki yöntem tarif edilmiştir [44]. Direkt koloni yönteminde bakteri kolonisi çelik plaka üzerine ince bir tabaka halinde uygulanır ve 2 µl matriks solüsyonu (%50 asetonitril ve %2,5 trifloroasetik asit içinde doymuş siyano-4-hidroksisinnamik asit) ilave edilir ve plaka kurumaya bırakılır. Ekstraksiyon yönteminde ise 300 µl moleküler dereceli suda 1-2 bakteri kolonisi süspanse edilir, üzerine 900 µl %100 etanol eklenir, vortekslenir ve santrifüje edilir. Çökeltiye 50 µl %70 formik asit eklenir ve santrifüje edilir, bu ekstraksiyondan 2 µl plaka üzerine uygulanır ve 2 µl matriks solüsyonu ilave edilir ve plaka kurumaya bırakılır. MALDI-TOF MS, üreticinin önerilerine göre MicroFlex LT kütle spektrometresi ile gerçekleştirilir. Spectra, MALDI Biotyper otomasyon kontrolü ve Bruker Biotyper 2.0 yazılımı ve kütüphanesi kullanılarak analiz edilir [44].

*Corynebacterium* türlerini tanımlamak için kullanılan diğer tanımlama sistemleri, fizyolojik özelliklerinin analizine dayalı Biolog sistemi (Biolog, Hazelwood, CA), hücresel yağ asitleri analizine dayalı Sherlock sistemi (MIDI Inc., Newark, Del), Minitek sistem (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) ve Phoenix' tir. [1, 45]. High-performance liquid chromatography (HPLC) ve Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GLC-MS) yöntemleriyle ise *Corynebacterium*' ların korinomikolik asitleri analiz edilir ve tür ayrımına gidilir [1, 46]. *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium minutissimum* ve *Corynebacterium striatum* türlerini ayırt etmek için karbon substrat asimilasyonuna dayalı Biotype 100 sistemi (bioMérieux, France) ise, yardımcı bir araç olarak kullanılan bir başka sistemdir [47]. Sadece klinik örneklerden değil aynı zamanda çeşitli kaynaklardan elde edilen *Corynebacterium* türlerinin tanımlanmasını, organizmaların kimyasal bileşiminin analizine dayandıran Fourier-

transform infrared spektroskopisi (FTIR) yöntemiyle yapıldığını gösteren çalışmalar vardır [48].

Tüm bu yöntemlerle birlikte, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Corynebacterium* türlerinin tanımlanması için halen kullanılan yöntemler, tanımlanmaları beklenen organizmaların çeşitliliği ile karşılaştıklarında büyük ölçüde eksiktir. Çünkü çoğu zaman ticari tanımlama sistemlerinde mevcut olmayan çok sayıda titiz prosedürler gerektirmektedir.

Rutin kullanım alanı çok olmamakla birlikte moleküler yöntemlerle de tanımlama yapmak mümkündür. 16S rRNA ve DNA'ya bağlı RNA polimeraz alt birim (rpoB) genlerinin nükleik asit sekansı polimorfizmlerine dayanan genotipik sınıflandırma sistemleri geliştirilmiştir [2, 49, 50]. FDA tarafından onay almış, sadece bir 16S rRNA gen sekanslama sistemi (MicroSeq 500; Perkin-Elmer [PE] Biosystems, Foster City, CA) ticari olarak mevcuttur [51, 52]. Fakat pek çok laboratuvar, uygun primerler ve amplifikasyon protokollerini kullanarak bu çalışmaları araştırma amaçlı da gerçekleştirmektedir. Genotipik tanımlama sistemi olan MicroSeq 500 16S bakteriyel sekanslama kiti, bakteriyel tanımlama için 16S rRNA geninin ilk 527 bp' sini sıralamak üzere tasarlanmıştır. Sistem, tek bir PCR ürününü analiz etmek için sadece iki sekanslama primeri kullanan ve böylece tanımlama için gerekli olan maliyet ve emeği önemli ölçüde azaltan orijinal MicroSeq sisteminin basitleştirilmiş bir versiyonudur [52].

*Corynebacterium* türlerinin hücresel görünümü, koloni morfolojisi ve biyokimyasal özellikleri son derece çeşitlidir. Bu yüzden şeker fermentasyonu, nitrat redüksiyonu, lipaz aktivitesi, üreaz üretimi ve daha bir çok özelliklerinin kullanıldığı çeşitli gruplama şemaları önerilmiştir.

Şu ana kadar insan klinik örneklerinden izole edilip tanımlanmış *Corynebacterium* türleri ve bu türlerin tanımlanmasına yardımcı olacak fenotipik özellikler Tablo 2.1’ de sunulmuştur [27].

**Tablo 2-1.** İnsanlardan izole edilen *Corynebacterium* türleri ve bu türlerin identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler

| Tür adı | LİP | HEM | $NO_3$ | PYZ | PAL | ESC | ÜRE | GEL | CAMP | LAP | PYR | α-GAL | β-GAL | α-GLU | β-GLU | β-GUR | NAGA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C. *accolens* | + | - | + | D+ | - | - | - | - | - | ? | D | ? | - | - | - | - | - |
| C. *afermentans* subsp. *Afermentans* | - | - | - | + | + | - | - | - | D | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *afermentans* subsp. *Lipophilum* | + | - | - | + | + | - | - | - | D | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *amycolatum* | - | - | D+ | + | + | - | D- | - | - | ? | D- | - | - | - | - | - | - |
| C. *appendicis* | + | - | - | + | + | - | + | - | ? | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *argentoratense* | - | - | - | + | D- | - | - | - | - | D | - | ? | - | - | - | - | - |
| C. *atypicum* | - | - | - | - | - | - | - | - | ? | + | - | - | - | - | - | + | - |
| C. *aurimucosum* | - | - | - | + | + | - | - | - | ? | + | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *auris* | - | - | - | + | + | - | - | ? | + | ? | - | ? | - | - | - | - | - |
| C. *canis* | - | - | + | + | + | ? | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - |
| C. *confusum* | - | - | + | + | + | - | - | - | - | D | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *coyleae* | - | - | - | + | + | - | - | ? | + | + | D | - | - | - | - | - | - |
| C. *diphtheriae gravis* | - | - | + | - | - | - | - | D- | - | ? | - | - | - | + | - | - | - |
| C. *diphtheriae intermedius* | + | - | + | - | - | - | - | D- | - | ? | - | - | - | + | - | - | - |
| C. *diphtheriae mitis* | - | - | + | - | - | - | - | D- | - | ? | - | - | - | + | - | - | - |
| C. *diphtheriae belfanti* | - | - | - | - | - | - | - | D- | - | ? | - | - | - | + | - | - | - |
| C. *durum* | - | - | + | + | - | + | D+z | - | ? | ? | - | ? | D | - | ? | - | - |
| C. *falsenii* | - | - | - | D+z | + | - | +y | - | - | D | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *freiburgense* | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | + | - | - |
| C. *freneyi* | - | - | D | + | + | - | - | - | ? | ? | - | ? | - | + | - | - | - |
| C. *glucuronolyticum* | - | - | D | + | D- | D | D+ | - | + | + | - | - | - | - | - | + | - |
| C. *hansemii* | - | - | - | + | - | - | - | - | ? | ? | - | ? | - | - | ? | - | - |
| C. *imitans* | - | - | - | D+z | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *jeikeium* | + | - | - | + | + | - | - | - | - | ? | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *kroppenstedtii* | + | - | - | + | - | - | - | - | ? | + | ? | - | - | - | - | - | - |
| C. *lipophiloflavum* | + | - | - | + | + | - | + | ? | ? | + | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *macginleyi* | + | - | + | - | + | - | - | - | ? | ? | - | ? | - | - | - | - | - |

**Tablo 2.1.** İnsanlardan izole edilen *Corynebacterium* türleri ve bu türlerin identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler

| Tür adı | LİP | HEM | $NO_3$ | PYZ | PAL | ESC | ÜRE | GEL | CAMP | LAP | PYR | α-GAL | β-GAL | α-GLU | β-GLU | β-GUR | NAGA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C. *massiliense* | - | - | - | D+z | + | - | - | - | ? | + | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *matruchotii* | - | - | + | + | - | - | - | - | - | ? | + | ? | - | D | - | - | - |
| C. *minutissimum* | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *mucifaciens* | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | D | - | - | - | - | - | - |
| C. *nigricans* | - | - | - | D | D | - | - | - | - | ? | - | ? | - | - | - | - | - |
| C. *pilbarense* | - | - | - | + | + | - | - | - | ? | + | + | - | - | - | - | - | - |
| C. *propinquum* | - | - | D | D | D | - | - | - | - | ? | D | ? | - | - | - | + | - |
| C. *pseudodiphtheriticum* | - | - | + | + | D | - | + | - | - | ? | D | ? | - | - | - | - | - |
| C. *pseudotuberculosis* | - | + | - | - | D | - | + | - | - | ? | - | ? | - | D | - | - | - |
| C. *resistens* | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| C. *riegelii* | - | - | - | D | D | - | +H | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *sanguinis* | - | - | - | + | + | - | - | - | - | D | + | - | - | - | - | - | - |
| C. *simulans* | - | - | + | D | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *singulare* | - | - | - | + | + | - | + | - | ? | ? | + | ? | - | - | - | - | - |
| C. *sputi* | + | - | - | + | - | - | + | - | ? | + | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *striatum* | - | - | + | + | + | - | - | - | D | ? | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *sundvallanse* | - | - | - | D | D | - | + | - | - | D | - | - | - | + | - | - | ? |
| C. *thomssenii* | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + |
| C. *timonense* | - | - | - | + | + | +Z | - | - | ? | + | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *tuberculostearicum* | + | - | D | + | D | - | - | - | ? | D | ? | - | - | - | - | ? | ? |
| C. *tuscaniae* | - | - | - | + | + | - | - | - | - | ? | - | ? | - | - | - | - | - |
| C. *ulcerans* | - | + | - | - | + | - | + | + | T+ | ? | - | ? | - | + | - | - | - |
| C. *urealyticum* | + | - | - | + | D | - | +H | - | - | ? | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *ureicelerivorans* | + | - | - | + | + | - | + | - | ? | + | + | - | - | - | - | - | - |
| C. *xerosis* | - | - | D | + | + | - | - | - | - | ? | - | ? | - | + | - | - | - |
| CDC grup F1 | + | - | D+ | + | - | - | + | - | - | ? | - | ? | - | - | - | - | - |
| CDC grup G | + | - | D | + | + | - | - | - | - | ? | D | ? | - | - | - | - | - |

**Tablo 2.1.** İnsanlardan izole edilen *Corynebacterium* türleri ve bu türlerin identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler

| Tür adı | GLU | MAL | SUK | LAK | MNTL | MANN | KSİ | ARAB | SBTL | RİB | GLKJN | AMİG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C. *accolens* | + | - | D | - | - | + | - | - | - | + | - | ? |
| C. *afermentans* subsp. *Afermentans* | - | - | - | - | - | - | - | ? | - | - | - | ? |
| C. *afermentans* subsp. *Lipophilum* | - | - | - | - | - | - | - | ? | - | - | - | ? |
| C. *amycolatum* | + | D+ | D+ | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |
| C. *appendicis* | +Y | +Y | - | - | - | ? | - | - | - | - | ? | - |
| C. *argentoratense* | + | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | D | - | ? |
| C. *atypicum* | + | + | + | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |
| C. *aurimucosum* | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *auris* | - | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *canis* | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | + | ? |
| C. *confusum* | + | - | - | - | - | ? | - | - | - | + | - | - |
| C. *coyleae* | + | - | - | - | - | + | - | - | ? | + | - | - |
| C. *diphtheriae gravis* | + | + | - | - | - | ? | - | ? | ? | + | + | ? |
| C. *diphtheriae intermedius* | + | + | - | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |
| C. *diphtheriae mitis* | + | + | - | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |
| C. *diphtheriae belfanti* | + | + | - | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |
| C. *durum* | + | + | + | - | D+ | ? | - | ? | ? | + | - | - |
| C. *falsenii* | +Y | D+Y | - | D | - | ? | - | - | - | + | - | - |
| C. *freiburgense* | + | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - |
| C. *freneyi* | + | + | + | - | - | ? | - | ? | ? | +Y | - | ? |
| C. *glucuronolyticum* | + | D | + | ? | - | ? | D | ? | ? | + | - | - |
| C. *hansemii* | + | + | + | ? | ? | ? | ? | ? | ? | + | ? | ? |
| C. *imitans* | + | + | +Z | - | - | + | - | + | - | + | - | - |
| C. *jeikeium* | + | D | - | - | - | ? | - | ? | ? | D+ | - | - |
| C. *kroppenstedtii* | + | +Z | + | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *lipophiloflavum* | - | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *macginleyi* | + | - | + | - | D | ? | - | ? | ? | + | - | ? |

**Tablo 2.1.** İnsanlardan izole edilen *Corynebacterium* türleri ve bu türlerin identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler

| Tür adı | GLU | MAL | SUK | LAK | MNTL | MANN | KSİ | ARAB | SBTL | RİB | GLKJN | AMİG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C. *massiliense* | - | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *matruchotii* | + | + | + | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |
| C. *minutissimum* | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C. *mucifaciens* | + | - | D | - | - | + | - | - | - | D | - | - |
| C. *nigricans* | + | + | +Z | - | ? | + | - | ? | ? | D | D | ? |
| C. *pilbarense* | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| C. *propinquum* | - | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *pseudodiphtheriticum* | - | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *pseudotuberculosis* | + | + | - | - | - | + | - | ? | ? | + | - | ? |
| C. *resistens* | - | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *riegelii* | - | +Y | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| C. *sanguinis* | +Y | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |
| C. *simulans* | + | - | + | - | - | + | - | - | - | D | - | - |
| C. *singulare* | + | + | + | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *sputi* | + | - | - | - | - | - | - | ? | - | - | - | ? |
| C. *striatum* | + | - | D+ | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *sundvallanse* | + | + | + | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | - |
| C. *thomssenii* | +Y | +Y | +Y | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| C. *timonense* | + | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | + | + | ? |
| C. *tuberculostearicum* | + | D | D | - | - | + | - | ? | - | + | - | ? |
| C. *tuscaniae* | + | + | - | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *ulcerans* | + | + | - | - | - | + | - | + | ? | + | + | ? |
| C. *urealyticum* | - | - | - | - | - | ? | - | ? | ? | - | - | ? |
| C. *ureicelerivorans* | + | - | - | - | - | - | +Z | - | - | +Z | - | ? |
| C. *xerosis* | + | + | + | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |
| CDC grup F1 | + | + | + | - | - | ? | - | ? | ? | D- | - | ? |
| CDC grup G | + | D | D | - | - | ? | - | ? | ? | + | - | ? |

### 2.6. Corynebacterium' ların Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

*Corynebacterium* türlerinin antimikrobiyal duyarlılıkları, diğer Gram pozitif çomaklarla karşılaştırıldığında daha az incelenmiştir, çünkü uzun yıllar "difteroidler" kontaminant olarak düşünülmüş ve daha fazla çalışma için gerekli olan ilgiyi elde edememiştir. Haliyle standardize edilmiş bir protokol belirlenmediğinden klinik örneklerden elde edilen bu türler için birbirinden bağımsız bir çok yöntem denenmiştir. Gradient test (E-test), agar dilüsyon, disk difüzyon ve mikrobroth dilüsyon kullanılan bu yöntemlerdendir [53-57]. Kesin tür identifikasyonları yapılmadığından ve standardize edilmiş bir yöntem belirlenip antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılmadığından, bazı türler için dirençte önemli değişikliklerin meydana gelip gelmediğini görmek ve eski verileri güncel verilerle kıyaslamak mümkün olmamıştır.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2005 yılına kadar *Corynebacterium*' lar için belirli standartlarda herhangi bir duyarlılık testi yayınlamamıştır [1]. Bu durum, o yıllarda klinik örneklerden izole edilen *Corynebacterium*' ların yeterince tanınmadığını ya da identifiye edilmediğini ve sonucunda da herhangi bir duyarlılık testine ihtiyaç duyulmadığı sonucunu ortaya çıkartmaktadır. NCCLS, ilk kez 2005 yılında, ikinci baskısı da 2010 yılında yayınlanan, standart olarak *Corynebacterium*' lar için antimikrobiyal duyarlılık testini ele almıştır [27, 58]. Steril klinik örneklerden özellikle immünsupresif hastaların klinik örneklerinden izole edilen izolatlar için duyarlılık yapılması önerilmiştir [58]. % 2.5 - 5 at kanı içeren katyonu ayarlanmış Müeller-Hinton broth kullanılarak yapılan mikrobroth dilüsyon yöntemi standart yöntem olarak belirlenmiştir [27].

Bakteri süspansiyonu, direkt koloniden 0,5 McFarland standardına eşdeğer bir süspansiyon olarak hazırlanır [27]. Mikrobroth dilüsyon panelleri, 24 - 48 saat 35°C' de inkübe edilir. Antimikrobik duyarlılık sonuçları ilk 24 saatte değerlendirilmelidir. Direnç gösteren antimikrobiyal ajanlar ve ß-laktamlar dışında duyarlılık gösteren diğer antimikrobiyal ajanlar için sonuçlar 24 saatte rapor edilmelidir. ß-laktamlara duyarlı olan izolatlar için sonuçlar rapor edilmeden önce 24 saat daha inkübasyon gerekmektedir [27]. Öncelikli olarak test edilmesi gereken ajanlar, penisilin, eritromisin, gentamisin ve vankomisindir. Fakat rehberde sefolosporinler, karbapenemler, glikopeptidler, ciprofloksasin, tetrasiklin, doksisiklin, kindamisin, trimetoprim sülfametoksazol, rifampin, quinupristin/dalfopristin ve linezolid için duyarlılık sınır

değerleri mevcuttur. Belirtilen antimikrobiyal ajanlar için sınır değerler, mikroorganizmanın üremesini engelleyecek en düşük değer (minimum inhibisyon konsantrasyonu: MIK) olarak belirlenmiştir. NCCLS' da disk difüzyon yöntemi ile belirlenebilen disk zon çapı değerleriyle ilgili herhangi bir veri yoktur.

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ise 2014 yılındaki rehberinde (European Committee on Antimcirobial Susceptibility Testing (EUCAST) ilk defa *Corynebacterium*' lar için bir antimikrobiyal duyarlılık testi yayınlamıştır. % 5 defibrine at kanı ve 20 mg / L β-NAD içeren Mueller-Hinton Fastidious agar (MH-F) kullanılarak yapılan disk difüzyon yöntemi standart yöntem olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde 0,5 McFarland standardına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlanır. Besiyeri ortamının her tarafına eşit bir şekilde bakteri süspansiyonu inoküle edilir, belirlenmiş antimikrobiyal disker yerleştirilir ve petriler 16-20 saat 35± 1 °C' de inkübasyona bırakılır. Bu süre sonrasında yetersiz üreme gösteren izolatlar yeniden inkübasyona bırakılır ve 40-48 saat sonra inhibisyon bölgeleri okunur. Penisilin, ciprofloksasin, moksifloksasin, gentamisin, vankomisin, klindamisin, tetrasiklin, linezolid, rifampisin için MIK değerleri ve disk zon çapı değerleri rehberde mevcuttur [59].

### 2.7. *Corynebacterium*' ların PFGE yöntemi ile epidemiyolojik analizi

Tenover'in 1981 yılında tesadüfen bakteriyel suş tiplendirmesinin ilki olan 'plazmid fingerprinting' metoduyla ilgilenmesinin sonucu olarak bugün kullanmış olduğumuz ve epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinde halen 'altın standart' olarak tanımlanan darbeli alan jel elektroforez yöntemi (Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)) gün yüzüne çıkmıştır [60]. Plazmid fingerprinting yöntemi bir çok bakteri türünde etkili olmuşken plazmid içermeyen bakteri türlerinde etkili olmamıştır, bu sorun 1983 yılında ilk defa PFGE yönteminin tarif edilmesiyle çözüme kavuşmuştur [61].

Epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinde amaç; belli bir organizma izolatının birbiri ile kromozomal ilişkisinin değerlendirilip, sık görülen organizmanın yayılımı olup olmadığının belirlenmesiyle mevcut enfeksiyonu önlemeye ve kontrolüne katkıda bulunmaktır [61].

Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri, fenotipik ve genotipik yöntemler olarak iki ana başlık altında incelenebilir.

Fenotipleme, organizmaların genotipik ifadelerinden kaynaklanan benzerliklerine göre gruplandırılmasını ifade eder [62]. Biyotipleme, antibiyogram temelli tipleme, serotipleme, multilokus enzim elektrofororezi (MLEE) ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) gibi protein temelli tiplendirme, kütle spektrometresi ile tiplendirme, faj ve bakteriosin tayinine dayalı tiplendirme yöntemleri sık kullanılan fenotipik tiplendirme yöntemlerindendir [62].

Genotipik tiplendirme yöntemleri ise, organizmaları genomlarındaki kompozisyon (örn. plazmid varlığı ve yokluğu), genel yapı (örn. restriksiyon endonüklez profilleri, tekrarlayan kısımların sayısı ve pozisyonları) veya tüm nükleotid sekansındaki (örn bir veya birden fazla gen veya genler arası bölge) varyasyonları dikkate alınarak geliştirilmiştir [62]. Hibridizasyon aracılı yöntemler, ribotipleme, plazmid profil tipleme , polimorfik DNA'nın rastgele çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)), polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction (PCR)) temelli yöntemler en sık kullanılan genotipik tiplendirme yöntemlerindendir [27, 62]. Bu yöntemlerden darbeli alan jel elektroforez (Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)) yöntemi halen 'altın standart' olarak kabul edilmesinden dolayı ayrı bir öneme sahiptir.

Her yerde bulunması, tekniğin sadeliği, çok yönlülüğü ve ucuz bir yöntem olmasından dolayı jel elektroforez yöntemleri, proteinlerin ve nükleik asitlerin saflaştırılması ve ayrılması gibi biyolojik analizlerde yaygın kullanım alanı bulmuştur. Geleneksel jel eletroforez yöntemleri, DNA moleküllerinin katı bir matrikse (düşük erime ısılı agaroz, poliakrilamid vb.) yerleştirilmesi ve bu moleküllerin statik bir elektrik beraberinde jelden geçmeye zorlanması prensibine dayanmaktadır [61, 63]. Bu yöntemler 40-50 kb üzerindeki DNA moleküllerinin ayrımını mümkün kılmamıştır, oysa ki bakteriyel kromozomlar megabaz büyüklüğünde moleküllerdir [61]. Büyük, 50 kb üzerindeki moleküller çok büyük olduğundan jelin ayrım yapma yeteneği sekteye uğrar ve fragmentler çözümlenmemiş bir yumak şeklinde görülür. Tüm bu nedenlerden dolayı 1982 yılında Schwartz ve arkadaşları, iki alternatif elektrik alanı kullanarak yeni bir teknik geliştirmişler [63, 64]. PFGE olarak isimlendirilen bu yöntem, farklı yönlerden belli sürelerde verilen bir elektriksel akım yani 'pulse' ile kilobaz ve

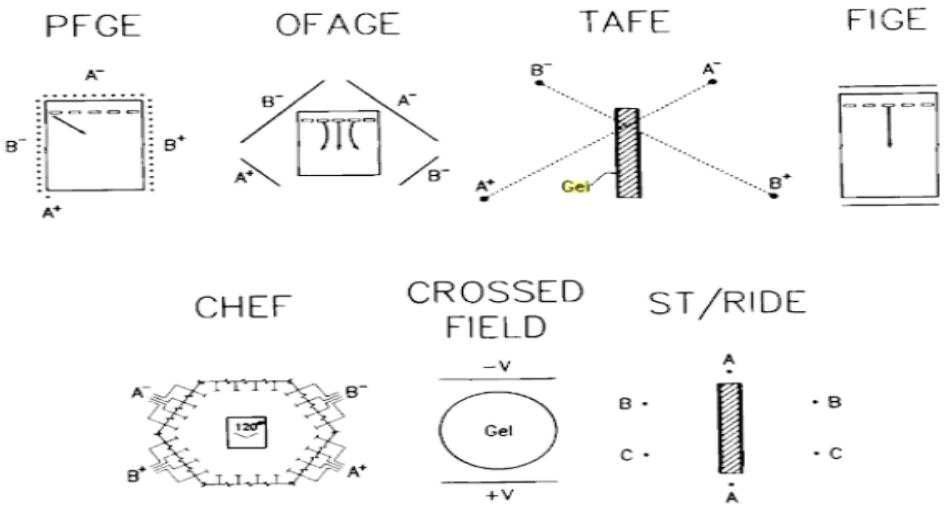
megabaz büyüklüğündeki moleküllerin jel alanında eletroforetik göçü prensibine dayanır [64].

Elektroforetik tekniklerden bazılarının isimleri Tablo 2.2' de, şematik görünümleri ise Resim 2.1'de sunulmuştur [61, 64, 65]

**Tablo 2-2.** Bazı Elektroforetik Teknikler

| | Elektroforez sistemleri |
|---|---|
| **PFGE** | Pulsed field gradient gel electrophoresis |
| **OFAGE** | Orthogonal field alternation gel electrophoresis |
| **TAFE** | Transverse alternating field electrophoresis |
| **FIGE** | Field inversion gel electrophoresis |
| **CHEF** | Contour clamped homogeneous electric field |
| **RGE** | Rotating gel electrophoresis |
| **Rotaphor** | Rotating electrodes gel electrophoresis |
| **Waltzer** | Crossed field gel electrophoresis |
| **PAGE** | Programmable autonomously controlled electrodes |
| **ZIFE** | Zero integrated field electrophoresis |
| **ST/RIDE** | Simulataneous tangential/rectangular inversion |
| | Decussate electrophoresis |

**Resim 2-1.** Bazı Elektroforetik Tekniklerin Şematik Görünümü



Adı geçen elektroforetik tekniklerin cihaz konfigürasyonlarında farklılıklar olmasına rağmen hepsi aynı amaca hizmet etmektedirler. Bir çok laboratuvarda altıgen biçiminde 120 derecelik açılarla yerleştirilmiş olan elektrodlardan, belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımının uygulandığı CHEF (Contour clamped homogenus electric field) sistemi kullanılmaktadır [61].

PFGE yönteminde, klonalite ayrımı yapılacak mikroorganizma suşlarının katı veya sıvı besiyeri ortamında taze olarak üremesi sağlanır. Hücre duvarının parçalanması ve kromozomal DNA'nın izolasyonu amacıyla, mikroorganizma suşları ısı ile muamele edilerek hücre duvarını parçalayan solüsyon içerisinde her mikroorganizma türü için farklı yoğunlukta olacak şekilde bir süspansiyon hazırlanır. Vizkozitesinin yüksekliğinden dolayı kromozomal DNA'nın eldesi zordur ve zarar görmesi daha kolaydır. PFGE yönteminde zarar görmemiş DNA gereklidir, bu durumu ekarte etmek için kromozomal DNA düşük erime ısılı agaroza gömülür ve kalıp halinde eldesi sağlanır. Lizis işlemi sonrası protein, karbonhidrat vb. kalıntıları elimine etmek amacıyla kalıplar çok sayıda yıkama işlemine tabi tutulur ve titizlikle yapılan yıkama işlemleri sonrasında restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele edilirler.

Enzimlerin bir makas görevi görmesiyle, restriksiyon bölgelerinden kesilen DNA farklı boyutlarda fragmentler halinde elde edilmiş olur. Bu DNA fragmentlerini içeren kalıplar elektroforez uygulanacak jelde var olan küçük kuyucuklara aktarılır. Farklı yönlerden ve belli bir süre boyunca elektrik akımına tabi tutulan DNA fragmentleri büyüklüklerine göre ayrılır. Elektroforeze tabi tutulan jelin içerdiği DNA moleküllerinin yerini belirlemek için UV ışığı altında floresan etki gösteren etidyum bromür vb. ajanlar kullanılır ve böylece DNA fragmentleri farklı bölgelerde bantlar halinde gözlemlenir. Her bir izolata ait bant profilleri bilgisayar programları aracılığıyla değerlendirilir ve izolatların birbiri ile yakınlık ilişkileri belirlenmiş olur .

### 2.8. Bazı Corynebacterium Türleri ve Özellikleri

**Korineform bakteriler 3 grupta incelenir:**

a) Non lipofilik, fermentatif grup

b) Non lipofilik, nonfermentatif grup

c) Lipofilik grup

Bu gruplara ait türlerden bazıları Tablo 2.3' te sunulmuştur.

**Tablo 2-3.** Bazı *Corynebacterium* Türleri ve Özellikleri [1]

| Nonlipofilik, fermentatif grup | Nonlipofilik, nonfermentatif grup | Lipofilik grup |
|---|---|---|
| *C. diphtheria* grubu | *C. afermentans* | *C. jeikeium* |
| *C. xerosis* | subsp. *afermentans* | *C. urealyticum* |
| *C. striatum* | *C. propinquum* | *C. afermentans* |
| *C. minutissimum* | | subsp. *lipophilum* |
| *C. amycolatum* | | *C. accolens* |
| *C. glucuronolyticum* | | *C. macginleyi* |
| *C. argentoratense* | | *C. urealyticum* |

#### 2.8.1. Corynebacterium striatum

*Corynebacterium striatum* 1889 yılında, ilk defa von Besser tarafından tasvir edilmiş ve *Bacillus striatus* olarak isimlendirmiştir [4]. Daha sonraki yıllarda da bir çok isimle anılmış olan *C. striatum*' a atfedilen isimler Tablo 2.4' te sunulmuştur [66]. 0.25-0.5 × 2.0-3.0 μm boyutlarında Gram pozitif çomak, pleomorfik, beklemiş kültürlerinde ise koksoid formlar ve uzun filamentler şeklinde gözlenebilmektedir. Ayrıca metakromatik granüller de gözlenebilir. Hücre duvarlarında mikolik asitlere ek olarak arabinoz ve galaktoz bulunur. Hücre membranlarında hücresel yağ asitleri ve menaquinone MK-8 ($H_2$) bulunur fakat tuberkülosterik asit bulunmaz [33]. DNA G + C içeriği % 57.6' dır [32].

**Tablo 2-4.** *Corynebacterium striatum*' a atfedilen isimler

| Yıl | Organizmanın adı | Yıl | Organizmanın adı |
|---|---|---|---|
| 1889 | *B. striatus albus and B. striatus flavus* | 1930 | *C. flavidum* |
| 1901 | *B. striatum* | 1934 | *C. flavidum* |
| 1912 | *B. flavidus* | 1939 | *C. flavidum* |
| 1918 | *C. striatum* | 1948 | *C. flavidum* |
| 1920 | *C. flavidum* | 1954 | *C. striatum* |
| 1923 | *C. flavidum* | 1957 | *C. flavidum* |
| 1925 | *C. flavidum* | 1974 | *C. striatum* |
| | | 1986 | *C. striatum* |
| | | | *C. striatum* |

*C. striatum* türleri nonlipofilik ve fermentatiftir. %5 koyun kanlı agarda 35-37 °C' de 48 saatlik inkübasyon sonrasında pürüzsüz kenarları olan düz, ıslak, gri-beyaz hemoliz yapmayan koloniler olarak görülmektedir. Bu görüntüsü biraz koagülaz negatif stafilokoka benzemektedir. Yirmidört saatlik inkübasyon sonrasında 1-2 mm çapında olan koloniler, genellikle 48 saatlik inkübasyon sonrasında daha belirgin renk ve düzgün morfolojiyle karşımıza çıkarlar [27].

Pirazinamidaz ve alkalin fosfataz üretirler, tirozini hidrolize ederler fakat eskülin ve jelatini hidrolize etmezler [32, 67]. Tirozin takviyeli besiyeri ortamında kahverengi pigmentin (muhtemelen melanin) artışı tirozin hidroliziyle ilişkilidir [1]. Üreaz üretilmez, metil kırmızısı ise değişkendir [32]. Bazı *C. striatum* türleri için Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) reaksiyonu pozitiftir [1]. Türlerin ayrımında kullanılan pirolidonil arilamidaz, α-β galaktosidaz, α-β glukosidaz, β-glukoronidaz, N-asetil-β-D-glukozaminidaz aktiviteleri *C. striatum* türleri için negatiftir. Nitrat redüksiyonu pozitiftir. Glukoz, sukroz, fruktoz ve galaktozu kullanıp asit üretirler, fakat maltoz, laktoz, mannitol, arabinoz, ramnoz, rafinoz, ksiloz, riboz ve glikojenden asit üretemezler. Diğer birçok tür gibi glukozdan laktik asit ve süksinik asit üretirler fakat

propionik asit üretmezler, ki bu durum kendisine çok benzer olan *C. amycolatum* türünden ayrılmasında kullanılan önemli bir özelliktir [27, 28, 32]. Maltozu ve ribozu fermente etmemesi ve tirozini hidrolize etmesiyle yine kendisine çok benzer tür olan *C. xerosis*' ten ayrılır [1].

Biyokimyasal özellikleri birbirine çok benzediğinden dolayı *C. striatum, C. xerosis, C. amycolatum* türleri zaman zaman yanlış tanımlanmalara sebep olmuştur. *C. striatum* ve kendisine çok benzer olan türler geçmişte net olarak tanımlanmamış ve özdeşleşmelerinin güvenilir olmadığı belirtilmiştir. Hatta o yıllarda iki büyük kültür koleksiyonunda (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) ve Ulusal Tip Kültürler Koleksiyonu (NTCC)) bulunan referans suşların hiçbirinin, orijinal yayınlarda tarif edilen suşlarla özdeşleşmediği ve bu türler için yanlış suşların biriktirilmiş ve saklanmış olduğu belirtilmiştir [32]. Coyle ve arkadaşları, sonraki yazarların *C. striatum* olarak kabul ettikleri orijinal tanımlamaları ile ATCC ve NCTC' nin *C. striatum* olarak belirlediği türlerle karşılaştırıp analiz ederek bu durumu rapor etmişlerdir. *C. striatum*' un saklanmış olan dört referans suşunun, yazarların yaptıkları özgün tanımlamalara uymadığı görülmüştür [66].

İnsanlarda, anterior burun ve deri normal flora elemanı olarak bulunur. Daha önce insanlarda hastalık etkeni olarak tarif edilmeyen *C. striatum,* ilk defa 1980 yılında Bowstead ve arkadaşları tarafından kronik lenfositik lösemili 79 yaşındaki bir erkek hastada, plöropulmoner enfeksiyon etkeni olarak rapor edilmiştir [4, 27, 68]. *C. striatum* balgam, iki set kan kültürü ve plevral sıvı kültüründen izole edilmiştir.

O yıllardan beri bu tür, çeşitli tipte klinik örnekten izole edilmiş ve birçok insan infeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Sporadik olarak ciddi enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır [69-72]. 1994' te Wolde Rufael ve Susan Cohn, daha önce *C. striatum* türünün etken olduğu bildirilmemiş bir doğal kapakçık endokardit olgusu rapor etmişlerdir [27, 73]. Sonraki yıllarda da, *C. striatum*' un etken olduğu birçok doğal kapak endokardit, prostetik kapak endokardit ve kalp pili ile ilişkili endokardit olgusu rapor edilmiştir [74-82].

Otolog kemik iliği transplantasyonu olan lenfoblastik lenfoma, allojenik kemik iliği transplantasyonu olan miyelodisplazi, amiyotrofik lateral skleroz, kronik böbrek yetmezliği, kolorektal kanser, diyabet ve HIV enfeksiyonu gibi hastalıklardan muzdarip olan immün sistemi baskılanmış hastalarda, önemli bir sepsis ve bakteriyemi etkeni

olarak karşımıza çıkmaktadır [10, 27, 83-86]. *C. striatum*, özellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olanlarda toplum kaynaklı ve nozokomiyal pnömoni, bronşit ve ampiyem dahil olmak üzere solunum yolu enfeksiyonlarının önemli bir nedenidir [72, 87, 88]. *C. striatum* ayrıca, vertebral osteomiyelit, septik artrit ve sinovit, meme apsesi, menenjit, serobrospinal sıvı (CSF) şant enfeksiyonu, pankreatik apse, periton diyaliz kateteri çıkış yeri enfeksiyonu ve sürekli ayaktan periton diyalizi (CAPD) ile ilişkili peritonit gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir [12, 15, 89-94] . Ayrıca yoğun bakım ünitelerinde, *C. striatum*' un nozokomiyal yolla bulaşacağını gösteren çalışmalar rapor edilmiştir [4, 18, 22, 72, 85].

Antimikrobiyal duyarlılık paternlerine ilişkin NCCLS tarafından herhangi bir veri yayınlanmadan önceki dönemde, farklı yöntemlerle (disk diffüzyon, mikrobroth dilüsyon, agar dilüsyon, E test vb.) antimikrobiyal duyarlılık testleri çalışılmış ve değişen oranlarda direnç durumları rapor edilmiştir. Belirlenmiş bir yöntem ve hangi antimikrobiyal ajanın kullanılacağı bildirilmediğinden birçok araştırmacı farklı farklı ajanı kullanarak duyarlılık testi çalışmalarını yürütmüşlerdir. 1995 yılında Martinez ve arkadaşları, 31 *C. striatum* izolatının duyarlılık testini çalışmış ve çoğu izolatın penisilin, ampisilin, sefolosporinlere duyarlı fakat klindamisin, eritromisin, tetrasiklin ve ciprofloksasine dirençli olduğunu belirlemişlerdir [67]. Bütün izolatlar vankomisine ve imipeneme duyarlı iken fosfomisine dirençli olarak rapor edilmiştir. Rifampisin, gentamisin, amikasin, ciprofloksasine direnç, izolatlar arasında değişmektedir. Benzer direnç oranları Soriano ve arkadaşları tarafından bildirilmiş, farklı olarak tüm izolatların doksisiklin ve fusidik aside duyarlı, nitrofurantoine ise dirençli olduğu rapor edilmiştir [53]. Çoğu izolatın ise oksasikline dirençli olduğu bildirilmiştir. Roberts ve arkadaşları, direnç genlerinin varlığına dikkatlerimizi çeken bir çalışma bildirmişler ve 17 izolattan 15' nin *erm* Cd geni taşıdığını, eritromisine dirençli olduğunu ve 13' nün ise *tet* M geni taşıdığını ve tetrasikline dirençli olduğunu rapor etmişlerdir [95].

Son yıllarda ise gittikçe artan direnç durumuna dikkatlerimizi çeken birçok çalışma rapor edilmiştir [19, 20, 77, 85, 88] Bir çok antimikrobiyal ajana direnç söz konusudur bu çalışmalarda izolatların vankomisin, teikoplanin ve linezolide duyarlı olduğu bildirilmiştir. Daptomisine heteroresistant olan *C. striatum*' un etken olduğu endokardit olgusu rapor edilmiştir. Alt popülasyonlardan bazıları daptomisine duyarlı

(MIC: <0,094 µg/ml) iken, bazıları dirençli (MIC: >256 µg/ml) olarak bildirilmiştir [96].

### 2.8.2. Corynebacterium amycolatum

*Corynebacterium amycolatum*, Collins ve arkadaşları tarafından 1988 yılında insan derisinden izole edilen yeni bir Corynebacterium türü olarak bildirilmiştir [1, 27, 32, 97].

Sporsuz, hareketsiz, fakültatif anaerobik, nonlipofilik, fermentatif, gram pozitif pleomorfik çomaklardır. %5 koyun kanlı agarda, 37 °C' de 24 saatlik inkübasyon sonrasında 1-1,5 mm çapında beyazımsı-grimsi, kuru, mat, pürüzlü, düzensiz kenarlı ve hemolizsiz koloniler şeklinde görünmektedir [1, 32]. Uzun süreli inkübasyon sonrasında koloniler buruşuk görülebilir ki, bu koloni morfolojisi ile gri-beyaz, ıslak koloniler şeklinde üreyen *C. minutissimum, C. striatum* türlerinden kolayca ayrılır [27]. Hücre duvarlarında, meso-diaminopimelik asit (meso-DAP), arabinoz ve galaktoz bulunduğu halde adından da anlaşılacağı gibi (a-mycolatum; mikolik asidi olmayan) korinemikolik asitler bulunmaz. Hücre membranlarında, hücresel yağ asitleri (palmitik, oleik, stearik asitler) cins için tarif edildiği gibidir, ayrıca menakinonlar da MK-8 ($H_2$) ve MK-9 ($H_2$) bulunmaktadır. DNA G + C içeriği % 61' dir [1].

Glukoz, fruktoz, gliserol, mannoz ve ribozdan asit üretirler fakat maltoz, sukroz, galaktoz ve trehalozdan asit üretimi değişiklik göstermektedir [32, 98]. Laktoz, mannitol, ksiloz ve glikojenden asit üretmezler. Pirazinamidaz ve alkalin fosfataz üretirler [1, 27, 32]. Nitrat redüksiyonu ve üre hidrolizi değişkendir. Eskülin ve jelatini hidrolize etmezler. Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) reaksiyonu negatiftir. Voges–Proskauer (VP) ve metil kırmızısı testi pozitiftir. Glukozdan propionik asit üretirler, daha öncede belirtildiği gibi bu durum kendisine çok benzer olan *C. striatum* türünden ayrılmasında rol oynar. Wauters ve arkadaşları 1998 yılında, konvansiyonel yöntemlerle ve özellikle propionik asitin saptanması ile bir çok klinik suşun türlere tahsil edildiğini bildiren çalışma rapor etmişler ve türlerin rutin tanımlamalarının zor ancak mikolik asit analizi ve glikozdan propiyonik asit üretiminin saptanması gibi kemotaksonomik prosedürlerle türlerin saptanmasının daha kolay olduğunu bildirmişlerdir [99].

Benzer morfolojileri ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı *C. amycolatum* türlerinin daha önceden yanlışlıkla *C. xerosis* türleri ile karıştırıldığını, rutin klinik

laboratuvarda tanımlanan çoğu *C. xerosis* suşunun *C. amycolatum* suşuna karşılık geldiğini, gerçek *C. xerosis* suşlarının klinik örneklerden çok nadiren izole edileceğini bildiren çalışmalar rapor edilmiştir [1, 100].

Wauters ve arkadaşları 1996 yılında, bu konuya açıklık getirmek amacıyla, C. *amycolatum* ile ilişkilerini belirlemek için daha önce *C. minutissimum, C. xerosis, C. striatum* suşları olarak tanımlanan, mikolik asitleri olmayan ve propiyonik asit üreten *Corynebacterium* suşlarını çalışmışlar ve propionik asit üretiminin *Corynebacterium* türlerini birbirinden ayırmada önemli bir biyokimyasal özellik olduğunu vurgulamışlardır [98]. Aynı şekilde *C. minutissimum* olarak tanımlanmış bazı suşların ayrıntılı olarak incelendiğinde aslında *C. amycolatum* olduğunu gösteren çalışmalar rapor edilmiştir [101]. Letek ve arkadaşları 2006 yılında ilk defa *C. amycolatum*' u kendisiyle yakın ilişkili *C. striatum, C. minutissimum ve C. xerosis*' den ayırmada, daha ileri moleküler analiz gerektirmeden, gerçek zamanlı (real-time) PCR ile hücre bölünmesi (*divIVA*) geninin amplifikasyonu için tasarladıkları farklı primerleri kullanarak bir yöntem geliştirmişlerdir. *divIVA* geninin büyüme için gerekliliği ve türlere özgü amplifikasyon için korunmuş iç bölgelerin varlığı gibi özel özellikleri, bu hedefi belirtilen türlerin moleküler ayrımı için iyi bir seçim haline getirmiştir [102].

Daha önceki yıllarda literatürde enfeksiyonun etkeni olarak *C. amycolatum*' u açık bir biçimde tanımlayan bir olgunun var olmadığı bildirilmiş, fakat *C. striatum, C. minutissimum* ve *C. xerosis*' e atfedilen bazı olguların etkeninin aslında *C. amycolatum* olduğu düşünülmüştür [1]. Van Bosterhaut ve arkadaşları 1992 yılında propionik asit üreten *C. minutissimum*' un etken olduğu üç olgu rapor etmişlerdir [103]. 60 yaşında erkek prolenfositik lösemi hastası, 50 yaşında kadın hemodiyaliz hastası ve 77 yaşında kadın kronik böbrek yetmezliği hastasının hepsinde aynı türün (*C. minutissimum*) izole edildiği rapor edilmiştir. Fakat bu suşların propionik asit üretmesi ve çok ilaca dirençli olmasından dolayı, bu suşların olası *C. amycolatum* olduğunu düşündürmüştür [1, 27].

De Miguel-Martinez ve arkadaşları, 1996 yılında *C. amycolatum*' a bağlı bir sepsis olgusu, 1997 yılında Berner ve arkadaşları ise septik şok sendromundan ölen bir prematüre yenidoğanda *C. amycolatum*' a bağlı neonatal sepsisin ilk olgusunu rapor etmişlerdir [104]. *C. amycolatum*' un etken olduğu enfeksiyonların büyük bir kısmı immün sistemi baskılanmış veya intravasküler cihazları bulunan hastalarda görülmüştür [8, 104-109].

Knox ve arkadaşları, 2002 yılında 74 yaşında antinötrofil sitoplazmik antikor (ANCA) vaskülit tanılı kadın hastada, ilk defa *C. amycolatum*' un etken olduğu bir endokardit olgusu rapor etmişler, daha sonrasında ise bir kaç araştırmacı doğal kapak endokardit olgusu bildirmişlerdir [8, 110-112].

Septisemi ve endokardit dışında, mastit, septik artrit, peritonit gibi bir çok enfeksiyon türünde etken olarak karşımıza çıkmaktadır [113-116].

Funke ve arkadaşları, 1996 yılında klinik örneklerden en çok izole edilen nonlipofilik *Corynebacterium* türünün *C. amycolatum* olduğunu ve bir çok antimikrobiyal ajana duyarlılığının azalmış olduğunu rapor etmişlerdir [55]. Esteban ve arkadaşları 18 tane *C. amycolatum* suşunun neredeyse tamamının eritromisin, klindamisin ve siprofloksasine dirençli olduğunu, bütün suşların vankomisin ve tetrasikline duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir [117]. Rapor edilen bütün çalışmalarda glikopeptit ve lipopeptitlere duyarlılığın var olduğu belirtilmiş ve farklı antimikrobiyal ajanların *C. amycolatum* üzerindeki etkisi araştırılmıştır [118-123].

### 2.8.3. Corynebacterium afermentans

*Corynebacterium afermentans*, 1981 yılında Centers for Disease Control (CDC) tarafından yayınlanan tıbbi açıdan önemli Gram pozitif organizmaların tanımlanmasına yönelik klavuzda CDC grup ANF-1 (absolute nonfermenter) olarak adlandırılmıştır [1, 25]. 1993 yılında Riegel ve arkadaşları, 11 adet CDC grup ANF-1 suşunun genetik ve biyokimyasal özelliklerini incelemiş ve yeni bir tür olarak nonlipofilik ve iyi üreyen *Corynebacterium afermentans* subsp. *afermentans* ile lipofilik *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum* alt türlerini içeren *Corynebacterium afermentans* türünü önermişlerdir [124].

Fenotipik olarak her iki alt tür, %5 koyun kanlı agarda hemolizsiz ve beyazımsı koloniler oluştururlar ve bu koloni büyüklüklerine göre kolayca ayırt edilebilir. *C.afermentans* subsp. *afermentans* 24 saatlik inkübasyon sonrasında %5 koyun kanlı agarda 1-2 mm boyutlarında koloniler oluştururken *C. afermentans* subsp. *lipophilum* ise 0,5 mm boyutlarından daha küçük koloniler oluşturur. %1 Tween 80 varlığında % 5 koyun kanlı agarda *C. afermentans* subsp. *lipophilum* 2-3 mm boyutlarında koloniler oluşturmasına rağmen *C. afermentans* subsp. *afermentans* %1 Tween 80 varlığından çok fazla etkilenmez [1]. % 6,5 NaCl'de büyüme gerçekleştirirler [32].

Glukoz, fruktoz, mannoz, arabinoz, riboz, maltoz, sukroz, galaktoz, trehaloz, laktoz, mannitol, ksiloz, glikojen ve nişastayı kullanamazlar yani herhangi bir karbonhidrattan asit üretmeyen, mutlak nonfermenter, pleomorfik gram-pozitif çomaklardır [1, 27, 32, 124]. Nitrat redüksiyonu yoktur. Üre, eskülin ve jelatini hidrolize etmezler. Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) reaksiyonu değişkendir. Voges–Proskauer (VP) ve metil kırmızısı testi negatiftir. α-β galaktosidaz, α-β glukosidaz, β-glukoronidaz, N-asetil-β-D-glukozaminidaz aktiviteleri *C. afermentans* türleri için negatiftir [27, 32]. Pirolidonil arilamidaz aktiviteleri yoktur. Metabolik ürün olarak propionik asit üretmezler. Pirazinamidaz, alkalin fosfataz, esteraz, lipaz ve asit fosfataz üretirler. Hücre duvarlarında, meso-diaminopimelik asit (meso-DAP), arabinoz ve galaktoz bulunduğu gibi korinemikolik asitler de bulunur [27, 32].

*C. afermentans* subsp. *afermentans'*ın DNA G + C içeriği % 66 iken, *C.afermentans* subsp. *lipophilum* alt türünün DNA G + C içeriği % 68' dir [32]. *C.afermentans* subsp. *lipophilum*' un heptadekanoik gibi dallanmış doymuş yağ asidi ve oleik, linoleik, arakidonik gibi düz zincirli doymamış yağ asitleri hariç birçok kemotaksonomik özellikleri *C. afermentans* subsp. *afermentans'* ınkine benzer [32].

Riegel ve arkadaşları, 1993 yılında deri, kulak ve kan örnekleri gibi insan klinik materyallerinden bu türü izole etmişler, fakat herhangi bir patojenik ilişki bildirmemişlerdir [124]. Sonraki yıllarda ise bu türün patojenik potansiyelini gözler önüne seren bir çok çalışma rapor edilmiştir. Sewell ve arkadaşları, 1995 yılında 76 yaşında erkek hastada *C. afermentans* subsp. *lipophilum*' un etken olduğu prostetik kapak endokardit vakası, Dykhuizen ve arkadaşları ise 39 yaşında erkek hastada *C.afermentans* subsp. *lipophilum*'a bağlı gelişen beyin ve karaciğer apsesi vakası bildirmişlerdir [125, 126]. Kumari ve arkadaşları 1997 yılında nöroşirurji hastalarında *C.afermentans*'ın etken olduğu sepsis vakası, 2004 yılında ise Minkin ve arkadaşları, HIV (insan immunyetmezlik virüsü) enfeksiyonu olan 27 yaşında kadın hastada *C. afermentans*'ın etken olduğu akciğer apsesi ve ampiyemi vakası bildirmişlerdir [127, 128]. Bunlar dışında 2016 yılında ise Yang ve Mauriallo ilk defa, hidrosefali tedavisi gören 5 yaşında bir kız çocuğunda, *C. afermentans*' ın etken olduğu ventrikülo-peritoneal şant enfeksiyonu vakası bildirmişlerdir [129].

### 2.8.4. Corynebacterium aurimucosum

Yassin ve arkadaşları, 2004 yılında *Corynebacterium* üzerine araştırmalarını sürdürürken daha önceden taksonomik ve filogenetik olarak belirlenen *Corynebacterium* türlerinden farklı ve yeni kemotaksonomik özelliklere sahip bir tür tespit etmişler ve *Corynebacterium aurimucosum* ismini önermişlerdir . Bu yeni tür bronşit olan bir hastanın kan kültürü materyalinden izole edilmiştir [130]. Islak yapışkan ve altın sarısı renginde koloniler oluşturduğundan bu isim verilmiştir [32].

%5 koyun kanlı agarda yapışkan, ıslak, sarı yada kömür karası renginde hemolizsiz koloniler oluştururken, triptik soy agarda ise renksiz yada kömür karası renginde koloniler oluştururlar. % 1 Tween 80 içeren beyin kalp infüzyon agarda bazı suşlar, $CO_2$ varlığında presipitin oluştururlar. Aside dirençli olmayan, fakültatif anaerop ve nonlipofiliktirler. Glukoz, maltoz ve sukrozdan asit üretirken, laktoz, mannitol, mannoz, ksiloz, arabinoz, trehaloz, sorbitol, ramnoz ve ribozdan asit üretemezler [32]. Laktik asit, glukoz fermentasyonu sonucu asetik asit ve az miktarda süksinik asit ile birlikte açığa çıkan başlıca üründür [27]. Üre, eskülin ve jelatini bazen hidrolize ederler fakat nişastayı hidrolize edemezler. Nitrat rediksüyonları nadirdir. Alkalin fosfataz, pirazinamidaz, lösin aminopeptidaz aktiviteleri pozitifken, fosfataz, arginin dihidrolaz, esteraz, lipaz, fosfoamidaz, pirolidonil arilamidaz, α-β galaktosidaz, α-β glukosidaz, β-glukoronidaz, N-asetil-β-D-glukozaminidaz aktiviteleri ise *C. aurimucosum* türleri için negatiftir [27, 32, 130]. Asetoin pozitif, oksidaz nadiren pozitif fakat indol negatiftir. Hücre duvarlarında, meso-diaminopimelik asit (meso-DAP), arabinoz ve galaktoz yanısıra kısa zincirli korinemikolik asitler de mevcuttur. Yağ asit profilleri ise doymuş, doymamış ve tuberkülostearik asitleri içerir. DNA G + C içeriği % 63,7' dir [32].

Genotipik ve fenotipik olarak *C. minutissimum*'a çok benzerdir. *C. aurimucosum* sarı renkte koloniler yapıp ve hippurat hidrolizi pozitifken, *C. minutissimum*' un ise gri-beyaz renkte kolonileri vardır ve hippurat hidrolizi negatiftir [27] .

*C. aurimucosum*' da diğer türler gibi farklı enfeksiyon odakları oluşturmaktadır. Daneshvar ve arkadaşları 2004 yılında kadın ürogenital örneklerinden izole edilen ve daha önceden CDC grup F4 olarak belirlenmiş kömür karası renginde kolonilere sahip *C. aurimucosum* türlerini rapor etmişlerdir [131]. Yine aynı yıl Roux ve arkadaşları, kemik ve eklem infeksiyonları şikayeti olan hastalardan 31 adet Corynebacterium türü izole etmişler ve 16S rRNA dizi analizi sonucunda 7 suşun *C. aurimucosum* olduğunu

belirlemişlerdir [132]. Goldstein ve arkadaşları, 2008 yılında *C. aurimucosum*'un diyabetik ayak infeksiyonuna neden olduğunu da rapor etmişlerdir [133]. Trost ve arkadaşları, daha önceden *C. nigricans* olarak tanımlanmış spontan kürtajlı bir hastanın genital materyalinden tüm genom analizi yaparak türün *C. aurimucosum* olduğunu sonucunu rapor etmişlerdir [134]. Lo ve arkadaşları, 52 yaşında erkek hastada idrar yolu enfeksiyonuna neden olan *C. aurimucosum* vakasını rapor etmişlerdir [135].

### 2.8.5. Corynebacterium imitans

İlk olarak 1996 yılında, Ukrayna yolu üzerinden Romanya'dan Polonya'ya ailesiyle birlikte seyahat eden, difteri şüphesiyle Polonya' da bir klinikte tedavi olan 5 aylık erkek çocuğunun boğaz kültüründen izole edilmiştir [136]. İmitans ismi de difteriyi taklit etmesinden dolayı verilmiştir [32, 136]. Ayrıca aynı süre zarfında 7 farklı hastada da benzer klinik tablo gözlenmiş, 7 hastadan üçünün ve 5 aylık erkek hastanın suşlarının *C. diphtheriae*' ye benzediği sonucuna varılmıştır. Fakat yapılan incelemeler sonrasında herhangi bir difteri toksinine sahip olmadıkları ayrıca ELEK testinin de negatif olduğu rapor edilmiştir [27, 136].

%5 koyun kanlı agarda, 37 °C' de 24 saatlik inkübasyon sonrasında 1-2 mm çapında, gri-beyaz, parlak, yuvarlak, konveks düzgün kenarlı koloniler oluştururlar. Nonlipofiliktirler ki bu özellikleriyle *C. diphtheriae*' den kolaylıkla ayırtedilirler. C. *imitans*'ın glukoz fermentasyonu sonucu laktik asit ve süksinat açığa çıkarken, C. *diphtheriae* ise propionik asit açığa çıkartır [27]. *C. diphtheriae*' nin aksine, *C. imitans* pirazinamidaz zayıf pozitif, α glukosidaz negatif, CAMP testi ise pozitiftir [27]. DNA G + C içeriği % 62' dir.

Glukoz, maltoz, sukroz, fruktoz, mannan, arabinoz ve ribozdan asit üretiler fakat laktoz, mannitol, ksiloz, sorbitol, trehaloz, ramnoz ve glikojenden asit üretemezler [32, 136]. Nitrat redüksiyonu değişkendir. Üre, eskülin ve tirozini hidrolize etmezler. Alkalin fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, asit fosfataz ve fosfoamidaz aktiviteleri belirlenmişken, lipaz, pirolidonil arilamidaz, lösin arilamidaz, α-β galaktosidaz, β-glukoronidaz ve N-asetil-β-D-glukozaminidaz aktiviteleri belirlenmemiştir [32]. Hücre duvarlarında, meso-diaminopimelik asit (meso-DAP) ve korinemikolik asitler bulunur.

### 2.8.6. Corynebacterium mucifaciens

Funke ve arkadaşları, 1997 yılında İsviçre Zürih Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kan kültürlerinden izole edilen 4 adet *Corynebacterium* suşunu, yara sürüntüsünden ve eklem sıvısından izole edilen diğer 4 adet *Corynebacterium* suşunu ise referans laboratuvarından alıp fenotipik ve genotipik olarak incelemeye almış ve sonrasında bu türlerin daha önceden tanımlanan *Corynebacterium* türlerine benzemediği sonucuna varmışlardır . 16S rRNA dizi analizi sonucunda slime üreten anlamına gelen *C. mucifaciens* ismini önermişlerdir [137].

%5 koyun kanlı agarda, 37 °C' de 24 saatlik inkübasyon sonrasında hemoliz yapmadan üreyen koloniler bu cinsin diğer türlerine göre oldukça sıradışı bir görünüme sahiptir. Oldukça mukuslu, parlak, yuvarlak düzgün kenarlı ve hafif sarımtrak renkte 1-1,5 mm çapında kolonilerdir [32]. Glukoz, fruktoz ve mannozdan asit üretirken, ksiloz, arabinoz, laktoz, glikojen, mannitol, ramnoz, trehaloz ve sorbitolden asit üretemez. Riboz ve sukrozdan asit üretimi değişkendir. Nitrat redüksiyonu yoktur ve nonlipofiliktir. Üre, eskülin ve jelatini hidrolize etmezler. CAMP reaksiyonu negatiftir. Pirazinamidaz, alkalin fosfataz, esteraz, esteraz lipaz aktiviteleri varken, α-β galaktosidaz, α-β-glukoronidaz ve N-asetil-β-D-glukozaminidaz aktiviteleri yoktur. Pirolidonil arilamidaz ve fosfoamidaz aktiviteleri ise değişkendir [27, 32]. Hücre duvarlarında, meso-diaminopimelik asit (meso-DAP) ve korinemikolik asitler bulunur. DNA G + C içeriği % 63-65' tir [32].

Morinaka ve arkadaşları *C. mucifaciens*' in etken olduğu kulak ve burun enfeksiyon vakası, Cantarelli ve arkadaşları ise ölümle sonuçlanan bakteremi vakası rapor etmişlerdir [138, 139]. Djossou ve arkadaşları, 50 yaşında immunsüpresif erkek hastanın kan kültürlerinden izole edilen *C. mucifaciens* ile ilişkili ilk kaviter pnömoni vakasını rapor etmişlerdir [140]. Kaya ve arkadaşları, 68 yaşında kadın hastada *C. mucifaciens*' in etken olduğu ilk endokardit vakasını rapor etmişlerdir [141].

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' na, Ocak 2016-Ekim 2017 tarihleri arasında, yoğun bakım ünitelerinden gönderilen, çeşitli klinik örneklerden (kan kültürü, steril vücut sıvıları, doku örnekleri, solunum yolu örnekleri, kateter ucu örnekleri vb.) izole edilmiş 62 adet *Corynebacterium* cinsine ait mikroorganizma çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik örneklerinden *Corynebacterium* izole edilmiş hasta grubunun 42' si (%67,7) erkek, 20'si (%32,3) kadın olarak saptanmıştır.

Çalışmaya alınan klinik izolatlar; Yoğun bakım ünitesinde tedavi gören ve erişkin olan (18 yaş ve üzeri) hastaların klinik örneklerinden izole edilen izolatlar olarak belirlenmiştir. Bir hastanın birden çok örneğinde üreme oldu ise sadece ilk üretilen izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmamız 20.10.2017 tarihinde İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi etik kurulu tarafından onaylanmıştır. (Onay no: 64414572-903.99-393564)

Bu çalışmada kullanılan gereçler aşağıdaki gibidir.

## 3.1. GEREÇ

### 3.1.1. Kullanılan besiyerleri

- ✓ **% 5 Koyun Kanlı Colombia Agar** (pH 7,3 ± 0,2)

**Tablo 3-1.** % 5 Koyun Kanlı Agar

| | |
|---|---|
| Kazeinin pankreait dijesti | 12,0 gr |
| Hayvan dokularının peptik dijesti | 5,0 gr |
| Maya ekstraktı | 3,0 gr |
| Sığır eti ekstraktı | 3,0 gr |
| Mısır nişastası | 1,0 gr |
| Sodyum klorür | 5,0 gr |
| Agar | 13,5 gr |
| Defibrinleştirilmiş koyun kanı | 5 % |

(*1 Litre distile su için gerekli saplementler)

- ✓ **Mueller Hinton Fastidious Agar** (pH 7,3 ± 0,1)

**Tablo 3-2.** Mueller Hinton Fastidious Agar

| | |
|---|---|
| Et ekstraktı | 2,0 gr |
| Kazein asit hidrolizatı | 17,5 gr |
| Nişasta | 1,5 gr |
| Agar | 17,0 gr |
| At kanı, mekanik olarak | 5 % |
| β-NAD | 0,02 gr |

(*1 Litre distile su için gerekli saplementler)

Kullanıma hazır plak besiyeri üretici firmadan (BD,Heilderberg,Germany) temin edildikten sonra firmanın belirttiği koşullarda (2-8 °C, kontaminasyondan izole edilmiş alan) saklanmıştır. Kuruma nedeniyle besiyerlerinin aşırı büzüşmesi hatalı duyarlılık sonuçlarını vereceğinden ayrıca özen gösterilmiştir.

- ✓ **Saklama besiyeri - Triptic Soy Broth** (pH 7,3 ± 0,2)

**Tablo 3-3.** Triptic Soy Broth (TSB)

| | |
|---|---|
| Kazein pepton | 17 gr |
| Soya unundan elde edilmiş pepton | 3 gr |
| Glukoz | 2,5 gr |
| Sodyum klorür | 5 gr |
| Potasyum hidrojen fosfat ($K_2HPO_4$) | 2,5 gr |
| Gliserol | 10 mL |

(*1 Litre distile su için gerekli saplementler)

Yukarıda belirtilen saplementleri içeren dehidre besiyeri 500 gr' lık hazır kutuda üretici firmadan (Merck,Almanya) temin edilmiştir. 1 litre distile su içerisinde 30 gr dehidre besiyeri eritildikten amaca uygun kaplara aktarıldı ve otoklavda 121 °C' de 15 dk steril edildi. Steril edildikten sonra soğuması beklendi ve 2-8 °C' ye kaldırıldı.

- ✓ **Beyin Kalp İnfüzyon Broth**

**Tablo 3-4.** Beyin Kalp İnfüzyon Broth

| | |
|---|---|
| Beyin kalp infüzyonu | 8 gr |
| Hayvan dokularının peptik dijesti | 5 gr |
| Kazeinin pankreatik dijesti | 16 gr |
| Sodyum klorür | 5 gr |
| Disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4$) | 2,5 gr |
| Agar | 13,5 gr |

(*1 Litre distile su için gerekli saplementler)

Yukarıda belirtilen saplementleri içeren dehidre besiyeri 500 gr' lık hazır kutuda üretici firmadan (BD,Heilderberg,Germany) temin edilmiştir. Bir Litre distile su içerisinde 37 gr dehidre besiyeri eritildikten amaca uygun kaplara aktarıldı ve otoklavda 121 °C' de 15 dk steril edildi. Steril edildikten sonra soğuması beklendi ve 2-8 °C' ye kaldırıldı.

### 3.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskleri

**Tablo 3-5.** Antibiyotik diskleri

| | |
|---|---|
| Penisilin G | 1 µg |
| Siprofloksasin | 5 µg |
| Moksifloksasin | 5 µg |
| Gentamisin | 10 µg |
| Vankomisin* | 5 µg |
| Klindamisin | 2 µg |
| Tetrasiklin | 30 µg |
| Linezolid | 10 µg |
| Rifampisin | 5 µg |

*****Gradient E-Testi ayrıca kullanılmıştır.

EUCAST önerilerine göre belirtilen µg' larda antibiyotik diskleri üretici firmadan (Oksoid, Basingtone,UK) temin edilmiş ve belirtilen koşullara uygun (2-8 °C, kontaminasyondan izole edilmiş alan) olarak saklanmıştır.

### 3.1.3. Moleküler Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve Malzemeler

✓ **Kullanılan Tamponlar**

**1-** 1 M TE tamponu (pH 7,6)

- 10 mM Tris HCl …….. 1,58 gr
- 1 mM EDTA ……..... 0,38 gr
- Steril ultra saf su ……. 1 lt

**2-** 0,5 M TBE tamponu (pH 8.0)

- 44,5 mM Trizma Base …… 5,89 gr
- 44,5 mM Borik Asit …… 2,75 gr
- 1 mM EDTA ……... 0,37 gr
- Steril ultra saf su ……. 1 lt

**3-** Hücre Süspansiyon Tamponu (pH 8.0)

- 100 mM Tris HCl …….. 7,88 gr

- 100 mM EDTA ……. 18,61 gr
- Steril ultra saf su …… 500 ml

**4-** Hücre Parçalama Tamponu-1 (pH 8.0)

- 100 mM Tris HCl …… 3,152 gr
- 10 mM EDTA ……. 0,74 gr
- 0,5 ml NaCI ……. 0,058 gr
- Steril ultra saf su ……..... 200 ml

**5-** Hücre Parçalama Tamponu-2 (pH 9.2)

- 0,5 M EDTA …… 46.,53 gr
- %1 N-Lauroylsarcosine sodium salt …… 2,5 gr

Tris, EDTA, Trizma Base (Sigma,Missouri,USA) Borik asit (Merck,Germany)

✓ **Kullanılan Restriksiyon Enzimi (RE)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Buffer D ……. 10 µl
- BSA ……. 1 µl
- *XbaI* (10 U/ µl) …… 3 µl
- Steril ultra saf su …….. 86 µl

✓ **Kullanılan Kimyasallar**

- N-Lauroylsarcosine sodium salt (Sigma,Missouri, USA)
- Lizozim (Applichem, Germany)
- Proteinaz K (Sigma,Missouri, USA)
- Sükroz
- LM Agaroz
- Sodyum Dodesil Sülfat
- Agaroz (Sigma,Missouri, USA)

### 3.1.4. Kullanılan Cihaz, Ekipmanlar ve Diğer Gereçler

✓ **Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar**

- BACTEC™ FX (Becton, Dickson and Company, Maryland, USA)
- MALDİTOF MS (Bruker, Daltonics, Germany)
- MALDİTOF VİTEK MS (bioMérieux, France)
- CHEF DR II "Drive Module" Sistemi (BioRad, California, USA)
- "Gel logic 2200 görüntüleme sistemi" (1708x1280 pixel, Kodak, USA)
- "Gel compare II yazılım sistemi" (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)
- Plug- mold aparatı
- Çalkalamalı su banyosu
- Etüv
- Isı blok inkübatörü
- Otomatik mikropipetler
- Vorteks
- Hassas tartı

✓ **Ayıraç ve Boyalar**

- Kristal viyole
- Lugol
- %96' lık alkol
- Sulu fuksin
- Katalaz ayıracı (% 3' lük Hidrojen peroksit ($H_2O_2$))
- % 0,9 NaCl izotonik solüsyon
- Matriks solüsyonu (HCCA; siyano-4-hidroksisinamik asit)
- % 70 Formik asit
- Etidyum bromür

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Örneklerin işleme alınması ve Corynebacterium' ların izolasyonu

Ocak 2016-Ekim 2017 tarihleri arasında yoğun bakım ünitelerinde tedavi görmekte olan hastaların idrar, steril vücut sıvıları, kateter ucu örnekleri, doku örnekleri, solunum yolu örnekleri uygun steril kaplara, kan örnekleri ise BACTEC aerop hemokültür şişelerine alınmıştır. Örnekler laboratuvarımıza ulaştıktan sonra kültürü yapılmak üzere çalışmaya alınmıştır. % 5 koyun kanlı agara ekimi yapılan hasta örnekleri 35-37 °C' de $CO_2$ etüvüne inkübasyona kaldırılmıştır. 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında izole edilen 62 adet Corynebacterium türüne ait izolat, ilk aşamada besiyerindeki koloni büyüklüğü ve pigmentasyonu, hemoliz varlığı ve gram morfolojisi açısından değerlendirilmiştir.

### 3.2.2. Corynebacterium' ların Gram boyama ile analizi

% 5 koyun kanlı agarda üreyen ve korinebakteri olduğu tahmin edilen beyaz-krem rengi, kapsülsüz, 1-2 mm boyutlarında düzgün kenarlı kolonilerden temiz bir lama uygun miktarda alınarak, bir damla % 0,9 NaCl izotonik solüsyonla karıştırılarak preparatlar hazırlanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar kuruduktan sonra alevden geçirilerek fikse edilmiş ve Gram boyama işlemine geçilmiştir. Gram boyamada kullanılacak malzemelerin taze olmasına özen gösterilmiştir.

Gram boyamada takip edilen adımlar aşağıdaki gibidir [142].

1. Fikse edilmiş preparatlar uygun bir zemine yerleştirilir ve pipet yardımıyla her bir preparatın yüzeyini tamamen kapatacak miktarda kristal viyole damlatılır ve 1 dakika bu şekilde beklendikten sonra mevcut boya preparat hafif eğilerek uzaklaştırılır.
2. Kristal viyole uzaklaştırıldıktan sonra preparatın yüzeyini kaplayacak şekilde lugol damlatılır ve 1 dakika beklenir.
3. Lugolle boyanan preparat mevcut boyaları tamamen uzaklaştırmak için alkolle yıkanır bu aşamada dikkat edilmesi gerekmektedir. Rengin tamamen giderilmesi sağlanır fakat alkolde tutma işlemi gereğinden çok olmamalıdır ki, Gram pozitif bakteriler aldıkları kristal viyoleyi bırakmasınlar diye.
4. Daha sonra preparat su ile yıkanır ve zıt boya olarak sulu fuksin damlatılır.

5. 15 saniye sulu fuksinde bekletilen preparat su ile yıkanır ve havada kurumaya bırakılır.

Preparatın tamamen kuruduğundan emin olunduktan sonra bir damla immersion yağı damlatılarak 100X' lük objektifli ışık mikroskobunda mikroorganizmanın gram morfolojisi değerlendirildi. Korinebakterilere özgü "bahçe çiti" yada "çin harfi" gibi tokmağa benzer yapıda gram pozitif çomak morfolojisi mikroskopta gözlenmiştir.

### 3.2.3. *Corynebacterium*' ların saflaştırılması ve saklanması

Gram boyamada korinebakteri morfolojisi gözlenen benzer tek kolonilerden saf kültür elde edilmek amacıyla % 5 koyun kanlı agara pasajlar alınmış ve 35-37 °C' de $CO_2$ etüvüne 18-24 saatlik inkübasyona kaldırılmıştır. Üreme sonrasında bu kolonilerin büyüklüğü, pigmentasyonu, hemoliz varlığı yeniden değerlendirilmiştir. Bu kolonilerin katalaz enzimi varlığını tespit etmek amacıyla temiz bir lama bir damla katalaz ayıracı (% 3' lük hidrojen peroksit ($H_2O_2$)) damlatılmış ve bir miktar koloni ile karıştırılmış enzimin varlığı açığa çıkan su ($H_2O$) ve oksijen ($O_2$) kabarcıklar şeklinde gözlenmiştir. Daha sonra saf kültür olarak elde edilen her bir izolat, %1 gliserollü saklama besiyeri (TSB) içeren 1,5 ml'lik ependorflara aktarılmış, kolonilerin saklama besiyeri ile homojen karışmasına özen gösterilmiş ve -80 °C' ye kaldırılmıştır.

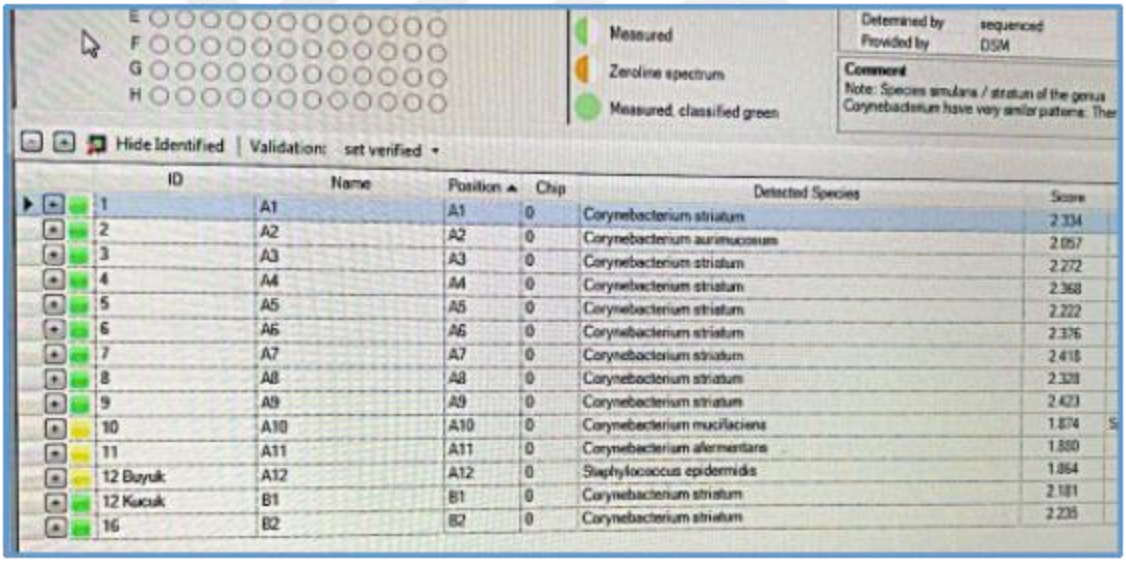
*Corynebacterium* türleri için diğer biyokimyasal test yöntemleri için gerekli malzemeler laboratuvarımızda mevcut olmadığından ve artık otomatize yöntemlerle daha kolay ve güvenilir identifikasyon işlemi yapıldığından bizde çalışmamızda hedef mikroorganizma için otomatize sistemlere yönelmiş bulunmaktayız.

### 3.2.4. *Corynebacterium*' ların identifikasyonu

Tek kolonilerden pasaj alınarak saf kültür elde edilen ve ependorflarda -80 °C' ye kaldırılmış olan izolatlar, %5 koyun kanlı agar tekrardan pasajlanmış ve bu şekilde MALDITOF MS için önemli bir ayrıntı olan taze kültürler elde edilmiştir. Pasajlar alınarak üretilmiş olan bakteri kültürleri bekletilmeden ertesi gün MALDITOF işlemine tabi tutulmuştur. Bekleyen kültürlerde ribozomal proteinler parçalanacağından ve sonucu etkileyeceğinden bu duruma dikkat edilmiştir. MALDITOF MS için özel hazırlanmış çelikten hedef plakanın her bir kuyucuğuna, ince uca sahip öze, kürdan vb. aracılığıyla bakteri kolonisinden az bir miktar sürülmüş ve 1 µl matriks solüsyonu (HCCA; siyano-4-hidroksisinamik asit) ile kaplanmıştır. Tanımlama verimini arttırmak

için ayrıca % 70 formik asit solüsyonu eklenebilmektedir. Hedef plakaya sürülen kolonilerden fazla miktarda alınmamaya ve ince bir tabaka şeklinde sürülmeye özen gösterilmiş daha sonra plakanın kuruması beklenmiştir. Plaka cihaza yerleştirilmiş, örnekler lazer bombardımanına maruz bırakılmıştır. Spektrum verileri, ilgili yazılım tarafından işlendikten sonra bakteri tanımlanması cihazda mevcut referans kütüphane ile karşılaştırılmıştır. Her mikroorganizma için özgün bir spektrum verisinin elde edilmesi, hücre yapılarında mevcut olan temel proteinlerin farklılığından kaynaklanmaktadır [143, 144]. Çalışmamızda izolatların tanımlanması hem MALDITOF MS ile hemde MALDITOF VITEK MS ile yapılmıştır. Her iki cihazın verdiği veriler aynıdır. log(skor) 2.0 ile 2,5 arasında değişmekte olup güvenilir bir tür identifikasyonunu göstermektedir. İzolatların MALDITOF MS' den alınmış identifikasyon görüntüleri Resim 3.2' de sunulmuştur.

**Resim 3-1.** İzolatların MALDITOF MS' den alınmış identifikasyon görüntüleri




### 3.2.5. Corynebacterium' ların antimikrobiyal duyarlılığı

Tek kolonilerden alınarak saflaştırılmış izolatlar, bir gün önceden -80 °C' den çıkartılmış oda ısısında bir süre bekletilmiş ve % 5 koyun kanlı agara antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılması için tekrar pasajlanmıştır . Ertesi gün, EUCAST' ın 2014 yılındaki rehberinde Corynebacterium' lar için belirtilen kriterler referans alınarak % 5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β-NAD içeren Mueller-Hinton Fastidious agar (MH-F) kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmıştır [59].

2-8 °C' de muhafaza edilen MH-F agarlar oda ısısına getirilmiştir. % 5 koyun kanlı agarda üremiş olan izolatların her birinden tek koloni alınarak, % 0,9 NaCl izotonik solüsyon içeren ayrı ayrı tüplere 0,5 McFarland standardına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Oda ısısında bulunan MH-F agarların her tarafına eşit bir şekilde bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. Antimikrobiyal diskler arası mesafe zon çapını belirlemek bakımından önemli olduğundan dispanser yardımıyla yerleştirilmiştir. Penisilin G, siprofloksasin, moksifloksasin, gentamisin, vankomisin, klindamisin, tetrasiklin, linezolid ve rifampisin antimikrobiyal diskleri düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir. Ayrı bir petriye vankomisin gradient E-testi yerleştirilmiştir. İnokülüm yapılan tüm petriler 16-20 saat 35± 1 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin yeterli olmadığı ve zayıf üreme gösteren izolatlar yeniden inkübasyona bırakılmış ve 40-48 saat sonrasında inhibisyon bölgeleri milimetrik olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Antimikrobiyal disk zon çap değerleri ve MIK değerleri, rehberin belirttiği referans değerler baz alınarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.6. *Corynebacterium*' ların PFGE yöntemi ile analizi

#### 3.2.6.1. İzolatların hazırlanması

Tür düzeyinde tanımlaması yapılmış ve *Corynebacterium* olduğu kesinleşmiş izolatlar PFGE yapmak için bir gün önceden -80 °C' den çıkartılmış ve oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra % 5 koyun kanlı agara tek koloni pasajları alınmıştır. 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında saf kültür olarak üreyen tek koloniler bir öze yardımıyla toparlanmış ve 5 ml hücre beyin kalp infüzyon sıvısında içerisinde süspanse edilmiştir. Elde edilen bakteri süspansiyonu 16.000 x g' de 10 dk santrifüj edilmiş, santifüj sonrası süpernatant atılmış ve pellet iki defa 1 M TE tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemleri sonrasında pellet üzerine 200 µl hücre süspansiyon tamponu eklenmiştir. Bakteri süspansiyonu, spektrofometre aracılığla 600 nm' de 0,95 absorbans olacak şekilde ayarlanmıştır [145, 146].

#### 3.2.6.2. İzolatların agaroza gömülmesi

İzolatların sonraki aşaması olan agaroza gömülmesi için tercih edilecek agar DNA' nın zarar görmemesi amacıyla düşük erime ısılı olmalıdır. % 1,5 LM agar hazırlamak için 1,5 gr LM agar hassas terazide tartılmış ve uygun bir balon jojeye aktarılmıştır, daha sonra 100 ml HST eklenmiştir. % 1,5 LM agar içeren balon joje

mikrodalgada iyice çözülene kadar tutulmuş (10-12 sn), agaroz iyice çözülene kadar bu işlem yapılmıştır. Çözündüğünden emin olunan % 1,5 LM agar kısa sürede katılaşacağından çalışma süresince uygun bir ortamda (45- 50 °C su banyosu, kuru ısı bloğu vb) tutulmuştur. Daha sonra her bir izolat için bir ependorf hazırlanmış, 200 µl LM agar ve 200 µl önceden elde edilmiş bakteri süspansiyonu bu ependorflara aktarılmış, homojen bir karışım eldesi için mikropipetle karıştırma işlemi birkaç defa tekrarlanmıştır. Bakteri süspansiyonu-agaroz karışımının 100 µl' si hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde plug moldlara aktarılarak 2-8 °C' de 15 dk bekletilmiş ve bu şekilde agaroz kalıpları elde edilmiştir. PFGE yönteminde bakteri DNA' sının zarar görmeden elde edilmesi önemlidir. Elde edilen bakteri plakları uygun koşullarda uzun süre saklanabilir.

#### 3.2.6.3. Agaroza gömülü izolatların lizisi

Hücrelerin parçalanmasını ve DNA' nın açığa çıkmasını sağlamak için hücre lizis tamponu-1 hazırlanmıştır. Hücre parçalama tamponu hazırlandıktan sonra çalışılacak izolat sayısı belirlenmiş ve çalışma sırasında izolat sayısına uygun olacak ölçüde 5 mg/ml lizozim ile %20 sükroz, HPT-1 solüyonuna ilave edilmiştir. Çalışmamızda otuzar olacak şekilde iki grup yapıldığından her grup için yeterli miktarda HPT-1 solüsyonu hazırlanmıştır. 30 izolat için 27 ml HPT-1, 3 ml elimizde bulunan 50 mg/ml stok lizozim ve % 20 oranında olacak şekilde 5,4 gr sukroz falkon tüpünde karıştırılarak hücreleri parçalamak için gerekli solüsyon elde edilmiştir.

Bakteri süspansiyonu-agaroz karışımı, tamamen katılaştığından emin olunduktan sonra 2-8 °C' den alınmış ve bir aparat yardımıyla plug moldda bulunan kalıplar ependorflara aktarıldı. Daha sonra ependorflara, içinde bulunan bakteri plakları zarar görmeyecek şekilde hazırlanmış 1 ml HPT-1 eklenmiştir. Ve 37 °C' ye 48 saatliğine kaldırılmıştır. Fakat 24 saat sonrasında % 0,1' lik N-Lauroylsarcosine sodium salt stok solüsyonundan 110 µl her bir ependorfa eklenmiş, 48 saatin dolması beklenmiştir.

Kırksekiz saat dolduktan sonra HPT-2 solüsyonu hazırlanmış ve izolat sayına uygun olacak ölçüde endojen endonükleazların elde edilmeye çalışılan DNA' ya zarar vermemesi amacıyla 1 mg/ml proteinaz K ilave edilmiştir. 30 izolat için 30 ml HPT-2 solüsyonuna elimizde bulunan 20mg/ml proteinaz K stok çözeltisinden 1,5 ml ilave edilmiştir. Ependorflarda bulunan bakteri plaklarına zarar vermeden mevcut solüsyon

dökülerek taze hazırlanmış HPT-2 solüsyonundan 1’ er ml ilave edilmiş ve 50 °C’ de 48-60 saat beklenmiştir.

#### 3.2.6.4. Bakteri plaklarının yıkanması

Bakteri plaklarının içerisinde bulunduğu HPT-2 solüsyonu dökülerek, plaklar cam tüplere alınmıştır. Her bir tüpe 4 ml steril ultra saf su aktarılmış ve 50 °C’ de 30 dk bekletilmiştir. Bu yıkama işlemi her bir tüpe ayrı ayrı 3 defa uygunlanmıştır. Daha sonra TE tampon ile yıkama işlemi yapılmış, aynı şekilde bu işlem de 3 defa uygulanmıştır. Yıkama işlemlerindeki amaç hücresel kalıntıları ve kullanılmış solüsyonları gidermek içindir [61]. Yıkama işlemleri sonrasında bakteri plaklarının renginin açılması yani şeffaflaşması gözlenmiştir. Yıkama işlemleri yapılırken dökülen sıvının tamamen uzaklaştırılmasına dikkat edilmiştir.

#### 3.2.6.5. *Xba*l Restriksiyon Enzimi ile DNA’ nın kesilmesi

Yıkama işlemi bittikten sonra TE tamponu içerisinde bulunan bakteri plakları çıkartılarak, steril bir lam üzerinde 2mm genişliğinde, yaklaşık parçalanmamış bakteri plağının 1/4’ ü, dilimler halinde bir bistüri yardımıyla kesilmiştir. Kesilen bakteri plak dilimleri bir ependorfa alınarak, 100 µl hazırlanmış *Xbal* enzim solüsyonundan ilave edilmiştir. Enzimle kesme işlemi 37 °C’ de 4 saatte gerçekleşmiştir. Bu süre sonunda 2-8 °C’ de bakteri plakları 15 dk bekletilmiş ve elektroforez aşamasına geçilmiştir.

#### 3.2.6.6. Bakteri plakların jele yüklenmesi

100 ml 0,5 M TBE tamponu içerisinde 1 gr agaroz eklenerek mikrodalgada 60 sn tutulmuş ve homojen bir hal alması sağlanmıştır ve böylece elektroforez için gerekli % 1’ lik agaroz hazırlanmıştır. Katılaşmaması için 50 °C’ de bir süre bekletilmiştir.

Enzimle kesme işlemi bittikten sonra ependorflardaki her biri faklı izolata ait bakteri plak dilimleri taraklara yerleştirilmiş ayrıca her çalışmada tarakların kenarına kontrol suşu eklenmiştir. Elektroforez işlemi için tank ve jelin dökületeceği kaset hazırlanmıştır. Tanka 1900 ml 0,5 M TBE tamponu aktarılmıştır. Taraklardaki plak dilimleri titizlikle kasete yerleştirilmiş daha sonra 50 °C’ de bekletilen % 1’ lik agaroz hava kabarcığı oluşturulmadan kasete aktarılmıştır. Oda ısında bir süre katılaşması bekletildikten sonra jel tanktaki siyah çerçeveye düzgünce yerleştirilmiş ve elektroforeze tabi tutulmuştur.

### 3.2.6.7. Elektroforez İşlemi

CHEF DR II "Drive Module" Sistemi (BioRad, California, USA) ile elektroforez işlemi gerçekleştirilmiş ve uygulanan PFGE koşulları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

**Tablo 3.6.** PFGE koşulları

| | |
|---|---|
| Başlangıç vuruş süresi | 0,1 sn |
| Bitiş vuruş süresi | 0,5 sn |
| Vuruş açısı | 120° |
| Sıcaklık | 14 °C |
| Akım | 6V |
| Süre | 18 saat |

### 3.2.6.8. Sonuçların görüntülenmesi ve analiz edilmesi

Belirtilen koşullarda elektroforez işlemi gerçekleştirilmiş ve 18 saat sonra işlem sonlandırılarak 1 mg/ml etidyum bromür içeren steril ultra saf su içerisine jel aktarılmıştır. 20 dk restriksiyon enzimiyle kesilmiş DNA' nın boyanması beklenmiş ve jel UV ışığı altında görüntülenmiştir. "Gel logic 2200 görüntüleme sistemi" (1708x1280 pixel, Kodak, USA) kullanılarak her bir izolata ait DNA bant profilleri fotoğraflanmış ve kaydedilmiştir.

"Gel compare II yazılım sistemi" (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak DNA bant profilleri analiz edilmiştir. Her bir bant profilinin benzerliği, 'Dice' benzerlik katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) ilişki parametresi kullanılarak değerlendirilmiştir. PFGE bant profillerinin filogenetik dendrogramı oluşturulmuş, kümeleşmeler saptanmış ve böylece klonal ilişki tespit edilmiştir [147]. Klonal ilişkinin belirlendiği PFGE çalışmalarının tamamı, Malatya İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarı' nda gerçekleştirilmiştir.

# 4. BULGULAR

İstanbul-Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' na, Ocak 2016-Ekim 2017 tarihleri arasında, yoğun bakım ünitelerinden gönderilen, çeşitli klinik örneklerden (kan kültürü, steril vücut sıvıları, doku örnekleri, solunum yolu örnekleri, kateter ucu örnekleri vb.) izole edilmiş 62 adet *Corynebacterium* cinsine ait mikroorganizma çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik örneklerinden *Corynebacterium* izole edilmiş hasta grubunun 42' si (%67,7) erkek, 20'si (%32,3) kadın olarak saptanmıştır. İdentifiye edilmiş 62 adet *Corynebacterium* izolatının tür dağılımı Tablo 4.1' de izole sunulmuştur. İdentifiye edilmiş 62 adet *Corynebacterium* izolatının 54(%87,09)' ü *Corynebacterium striatum* olarak tanımlanmıştır.

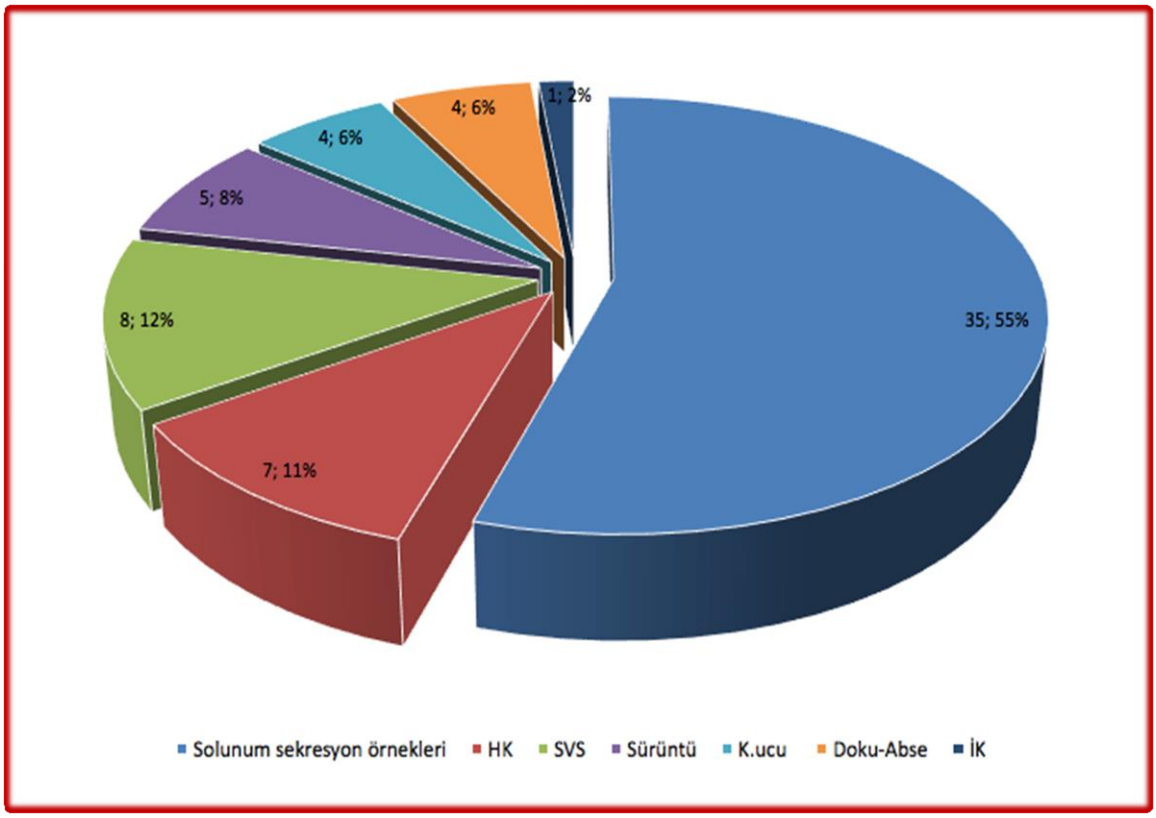
**Tablo 4-1.** *Corynebacterium* izolatlarının tür dağılımı

| **Tür** | **Sayı (n)** | **Oran (%)** |
|---|---|---|
| *Corynebacterium striatum* | 54 | 87,09 |
| *Corynebacterium amycolatum* | 4 | 6,45 |
| *Corynebacterium afermentans* | 1 | 1,62 |
| *Corynebacterium aurimucosum* | 1 | 1,62 |
| *Corynebacterium imitans* | 1 | 1,62 |
| *Corynebacterium mucifaciens* | 1 | 1,62 |
| **TOPLAM** | **62** | **100** |

İdentifiye edilmiş 62 adet *Corynebacterium* izolatının en sık izole edildiği klinik örneklerin 35(%55)' i solunum sekresyon örneğidir (endotrakeal aspirat 32, bronkoalveolar lavaj 2, balgam 1adet olmak üzere). En az izole edildiği klinik örnek ise idrardır (1adet %2). *Corynebacterium striatum* dışında izole edilen türler kateter ucu, steril vücut sıvısı, sürüntü ve kan kültürlerinden izole edilmiştir. Batın sıvısı 2, dren sıvısı 2, periton sıvısı 1, safra sıvısı 1 adet olmak üzere steril vücut sıvıları (SVS) adı

altında toplanmıştır ve grafikte de SVS olarak belirtilmiştir. Aynı şekilde doku parçası 2, abse 2 adet olarak doku-abse grubu şeklinde belirtilmiştir. *Corynebacterium* izolatların izole edildiği çeşitli klinik örneklerin dağılımı Resim 4.1' de detaylı olarak sunulmuştur.

**Resim 4-1.** *Corynebacterium*' ların izole edildiği çeşitli klinik örneklerin dağılımı




Solunum sekresyon örnekleri; Endotrakeal aspirat (ETA), bronkoalveolar lavaj (BAL), balgam
Steril vücut sıvıları (SVS); Batın sıvısı, dren sıvısı, periton sıvısı, safra sıvısı
Hemokültür (HK), idrar kültürü (İK), kateter ucu (K.ucu)

Antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmış 62 adet *Corynebacterium* izolatının tamamı (%100) linezolid ve vankomisine duyarlı, 61 (%98,4)' i penisilin G' ye ve klindamisine dirençli bulunmuştur. En fazla direncin olduğu antimikrobiyaller penisilin G ve klindamisindir. Penisilin G' ye ve klindamisine duyarlı bulunan izolat ise *Corynebacterium striatum* olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu izolatların yalnızca 2(%3,2)' si siprofloksasin ve moksifloksasine duyarlı, 60(%96,8)' ı dirençli bulunmuştur. Aynı zamanda 8(%13)' i rifampisin ve gentamisine duyarlı, 9(%14,5)' u tetrasikline duyarlı, 54(%87)' si rifampisin ve gentamisine dirençli, 53(%85,5)' i tetrasikline dirençli bulunmuştur. Bu izolatların tamamına vankomisin gradient E-test yapılmış ve 0,125 ile

0,5 (µg/mL) arasında MIC değerleri tespit edilmiştir. EUCAST' ın vankomisin MIC kesme noktası değerleri ile kıyaslandığından bütün izolatların vankomisine duyarlı olduğu tespit edilmiştir [59]. Tüm bu verilerden yola çıkarak çalışmış olduğumuz türlerin çoğunun C. *striatum* olmasından ve çoklu dirence sahip olmasından antimikrobiyal direnç oranlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Corynebacterium* antimikrobiyal duyarlılık test verileri Tablo 4.2' de sunulmuştur.

**Tablo 4-2.** Corynebacterium' ların antimikrobiyal duyarlılıkları

| **Antimikrobiyal ajanlar** | **Duyarlı** | | **Dirençli** | |
|---|---|---|---|---|
| | **sayı(n:62)** | **oran(%)** | **sayı(n:62)** | **oran(%)** |
| Siprofloksasin | 2 | %3,2 | 60 | %96,8 |
| Moksifloksasin | 2 | %3,2 | 60 | %96,8 |
| Gentamisin | 8 | %13 | 54 | %87 |
| Vankomisin* | 62 | %100 | 0 | 0 |
| Klindamisin | 1 | %1,6 | 61 | %98,4 |
| Tetrasiklin | 9 | %14,5 | 53 | %85,5 |
| Linezolid | 62 | %100 | 0 | 0 |
| Rifampisin | 8 | %13 | 54 | %87 |
| Penisilin | 1 | %1,6 | 61 | %98,4 |

***Gradient E-Testi ayrıca kullanılmıştır.

Vankomisin MIC değeri en düşük 0,125 µg/mL, en yüksek MIC değeri ise 0,5 µg/mL olarak belirlenmiştir. İzolatların %50' sini inhibe eden $MIK_{50}$ değeri 0,38 µg/mL $MIK_{90}$ değeri ise 0,38 µg/mL olarak belirlenmiştir. Vankomisin MIK değer aralığı Tablo 4,3' te sunulmuştur.

**Tablo 4-3.**Vankomisin MIC değer aralığı

| | **Aralık değerler** | **$MIK_{50}$ (µg/mL)** | **$MIK_{90}$ (µg/mL)** | **Dirençlilik** |
|---|---|---|---|---|
| **Vankomisin** | 0.125-0,50 | 0,38 | 0,38 | 0 |

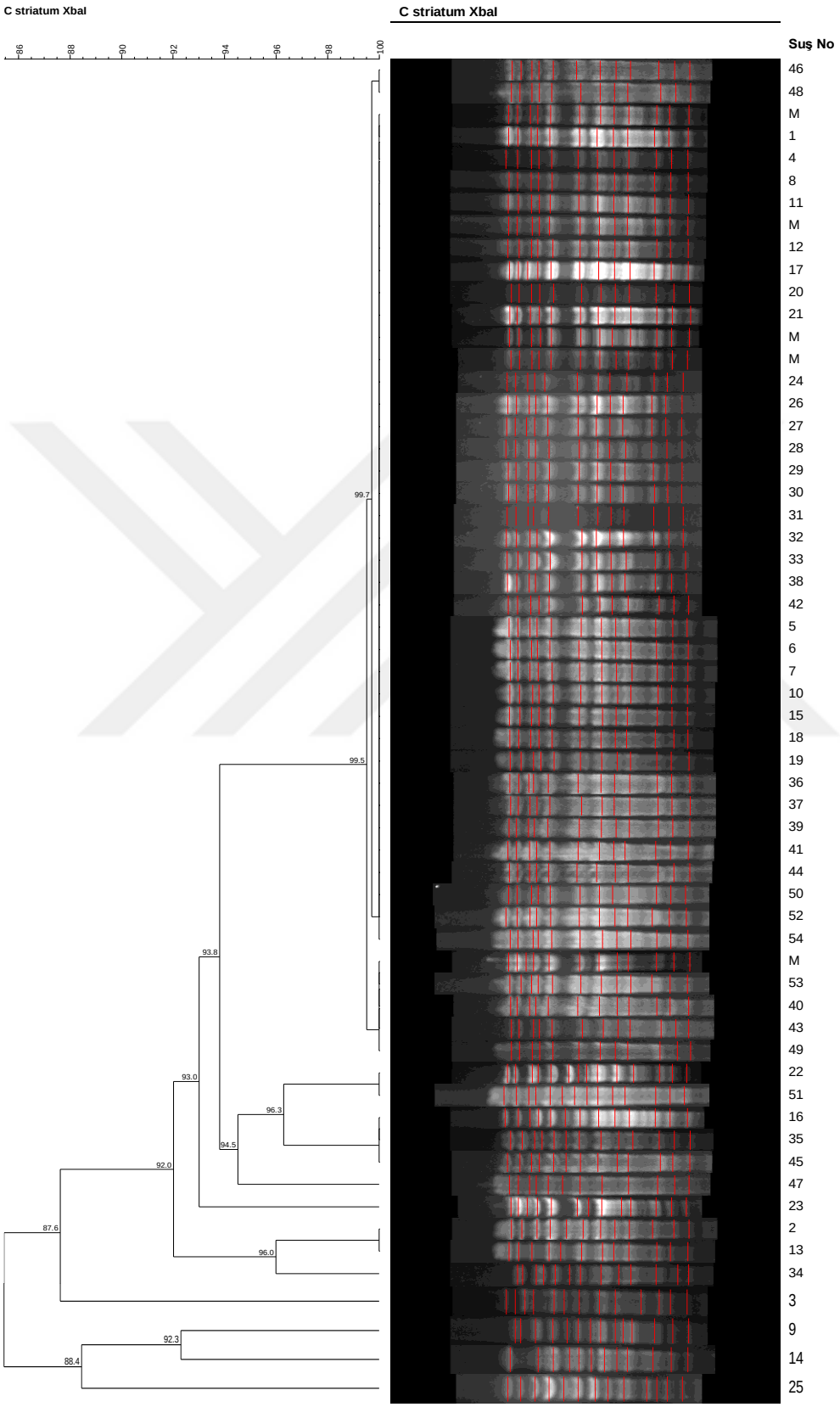
*MIK:Minimum inhibitör konsantrasyon $MIK_{50}$ /$MIC_{90}$: İzolatların %50 ve %90' nını inhibe eden konsantrasyon değerleri

PFGE ile klonal ilişkisi belirlenmiş olan 54 adet C.*striatum* izolatının yoğun bakım ünitelerinden gönderilme tarihleri, klinik örnek çeşitliliği, antimikrobiyal direnç durumları, izolat numaraları Tablo 4.4' te, bant profillerinin analizi sonucu oluşturulan dendrogram ise Resim 4.1 ve Resim 4.2' de sunulmuştur. Ayrıca *Xba*I restriksiyon enzimi ile kesilen 54 adet C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri Resim 4.3, Resim 4.4, Resim 4.5 ve Resim 4.6' da sunulmuştur. PFGE ile analiz edilmiş 54 C.*striatum* izolatının benzerlik oranı %85 olarak belirlenmiştir. %80-85 genotipik benzerlik gösteren bu izolatlar 11 kümeden oluşmaktadır. En fazla izolat sayısına sahip olan 1 numaralı küme 1a, 1b, 1c olmak üzere 3 alt kümeden oluşmaktadır. Herhangi bir tarih aralığında ve herhangi bir hasta grubunda kümelenme olmadığı için bu klonal yayılmanın çevresel odaklar veya sağlık çalışanlarının el hijyeni eksikliğinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. İzolatların oluşturduğu kümlenmeler Tablo 4.4' te detaylı olarak sunulmuştur.

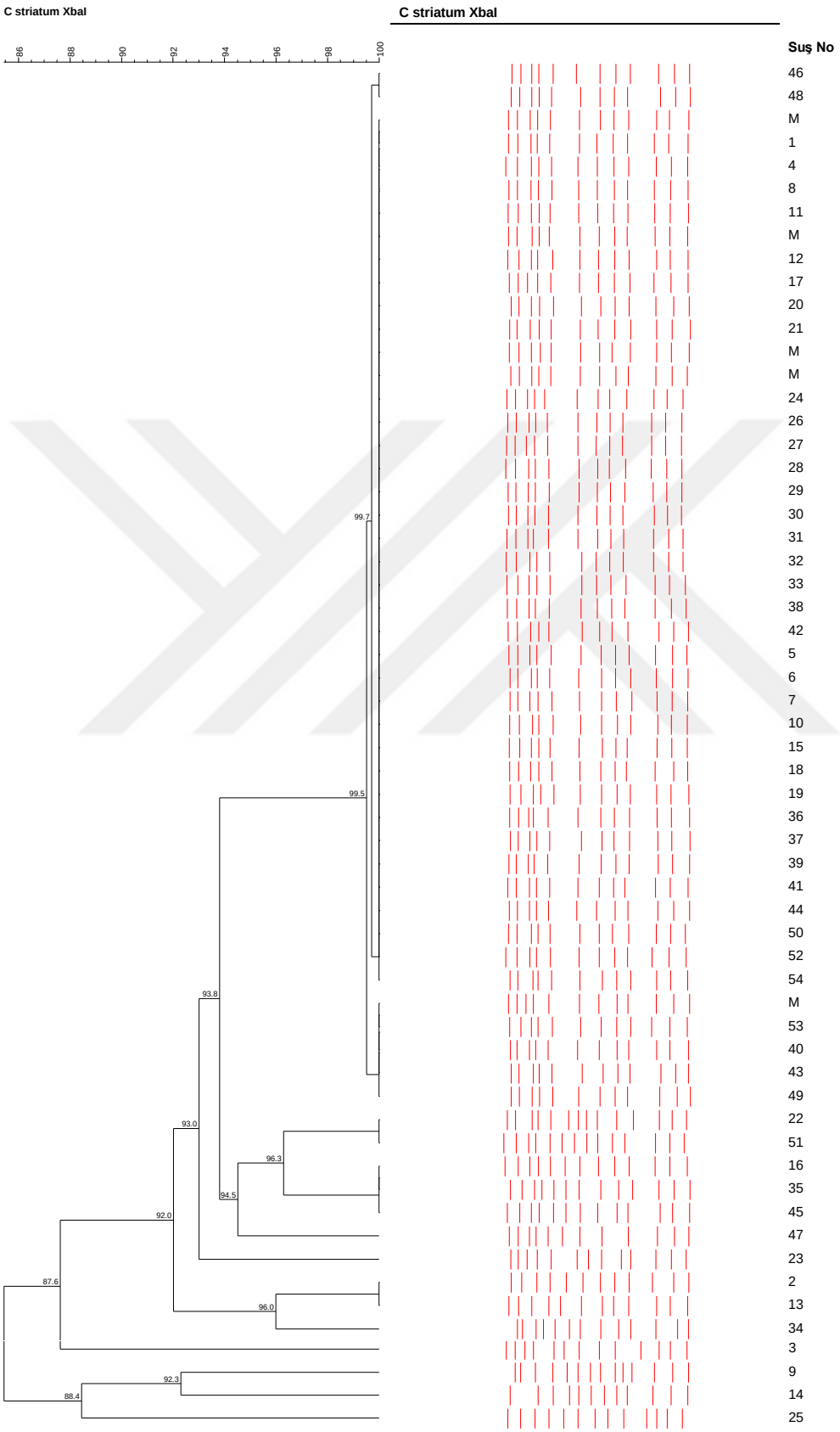
**Tablo 4-4.** PFGE ile analiz edilen izolatların detaylı bilgi tablosu

| | Suş No | Klinik Örnek | Tarih | PEN | CIP | MOX | GN | CC | TE | LZD | RD | VA(zon) | VA(mic) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1a | 46 | ETA | Şubat 17 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 48 | ETA | Ekim 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 1b | 1 | SÜRÜNTÜ | Aralık 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 4 | ETA | Mart 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 5 | BATIN SIVISI | Ağustos 17 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,25 |
| | 6 | ETA | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 7 | ETA | Kasım 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,5 |
| | 8 | ETA | Kasım 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 10 | ETA | Ocak 17 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,25 |
| | 11 | ETA | Şubat 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 12 | HK | Ekim 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 15 | ABSE | Haziran 17 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,25 |
| | 17 | ETA | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 18 | BALGAM | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 19 | DOKU | Kasım 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 20 | İDRAR | Ağustos 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 21 | ETA | Temmuz 16 | R | S | S | S | R | S | S | S | S | 0,38 |
| | 24 | HK | Nisan 17 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,5 |
| | 26 | ETA | Haziran 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 27 | ETA | Aralık 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 28 | ETA | Ağustos 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 29 | ETA | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,5 |
| | 30 | ETA | Şubat 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 31 | ETA | Mart 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 32 | ETA | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 33 | BAL | Ocak 16 | S | R | R | S | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 36 | KATETER UCU | Mart 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 37 | BATIN SIVISI | Temmuz 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 38 | ETA | Mart 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 39 | ETA | Mart 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 41 | ETA | Mayıs 17 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,25 |
| | 42 | YARA | Ağustos 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 44 | ETA | Temmuz 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 50 | ETA | Eylül 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 52 | ETA | Aralık 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 54 | SÜRÜNTÜ | Aralık 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 1c | 40 | ETA | Aralık 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,5 |
| | 43 | SIVILAR | Eylül 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 49 | ETA | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 53 | HK | Ekim 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 2 | 22 | ETA | Aralık 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 51 | ETA | Nisan 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 3 | 16 | ETA | Ağustos 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,25 |
| | 35 | DOKU | Ekim 17 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| | 45 | KATETER UCU | Aralık 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 4 | 47 | ETA | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 5 | 23 | ETA | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 6 | 2 | PERİTON SIVISI | Ocak 17 | R | R | R | S | R | S | S | R | S | 0,25 |
| 7 | 13 | ETA | Ocak 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 8 | 34 | ETA | Nisan 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,25 |
| 9 | 3 | ABSE | Aralık 16 | R | S | S | S | R | R | S | S | S | 0,38 |
| 10 | 9 | BAL | Aralık 16 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | 0,38 |
| 11 | 14 | YARA | Aralık 16 | R | R | R | S | S | S | S | R | S | 0,25 |
| | 25 | SAFRA SIVISI | Mart 17 | R | R | R | S | R | S | S | R | S | 0,25 |

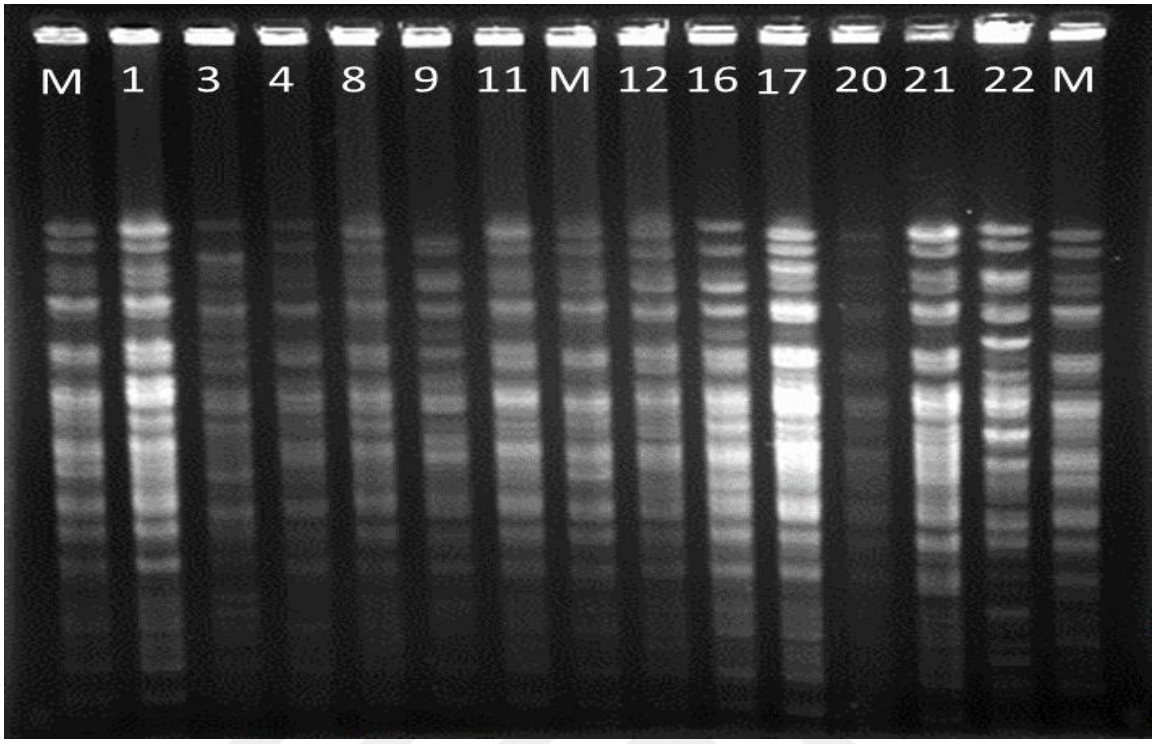
**Resim 4-2.** PFGE ile analizi sonucu oluşan 54 C. *striatum* izolatının dendrogramı (1)



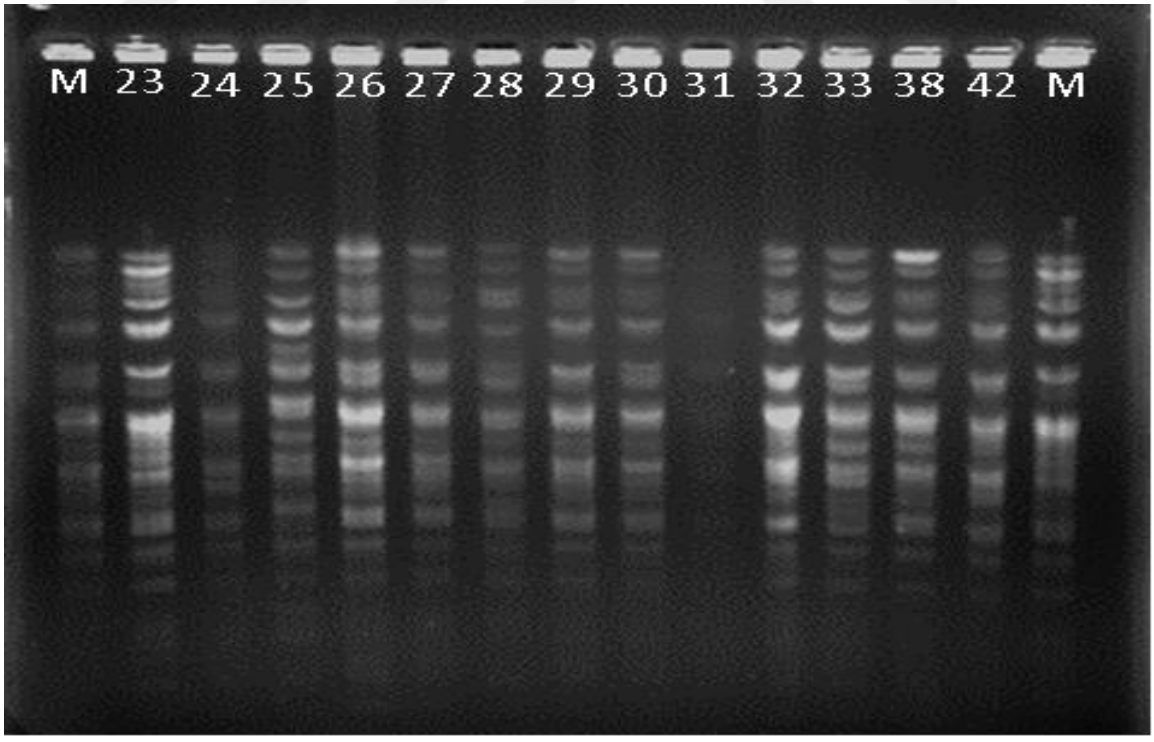
**Resim 4-3.** PFGE ile analizi sonucu oluşan 54 *C. striatum* izolatının dendrogramı (2)



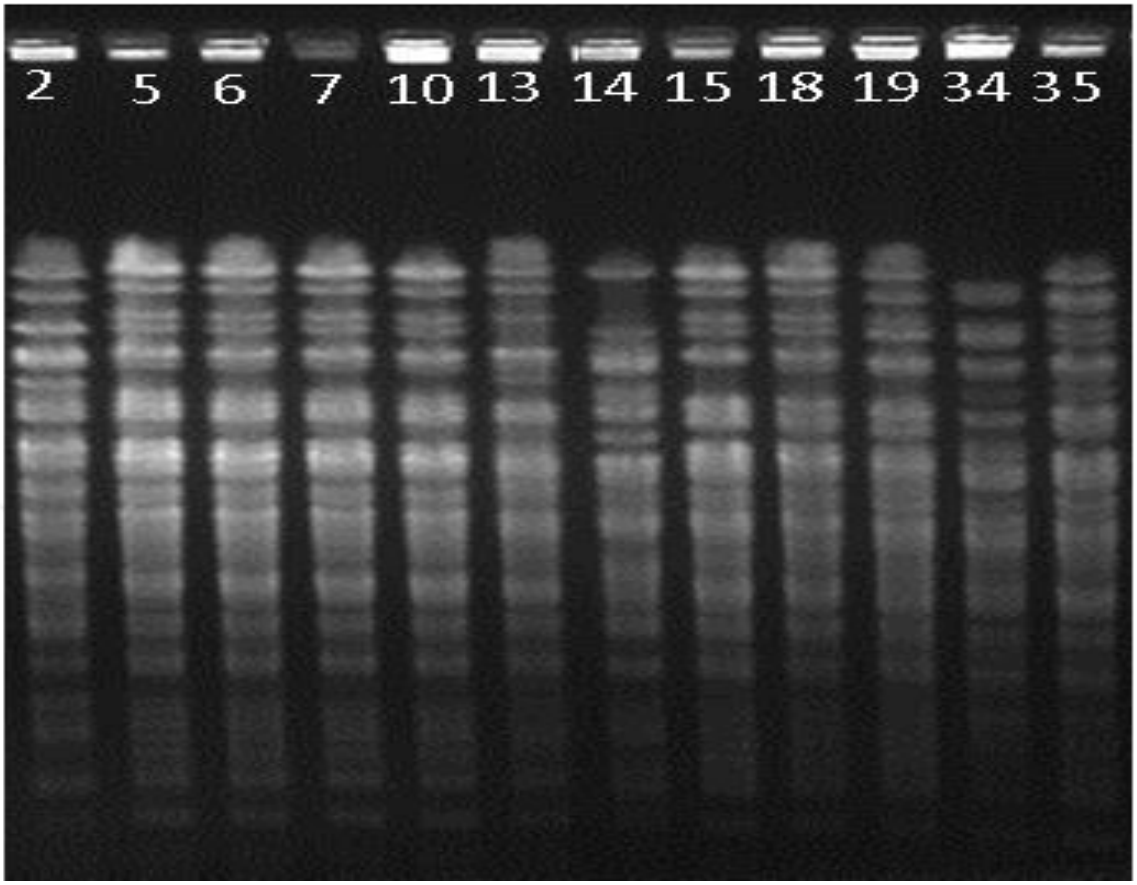
**Resim 4-4.** *Xba*I ile kesilen C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri (1)



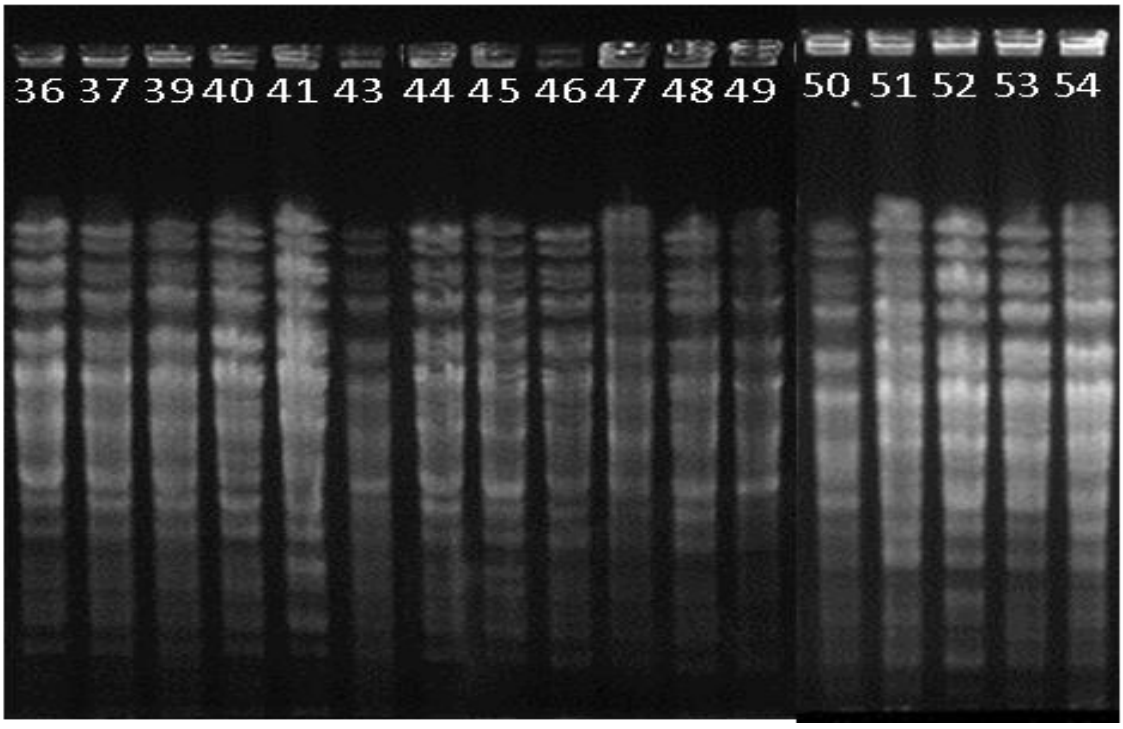

**Resim 4-5.** *Xba*I ile kesilen C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri (2)



**Resim 4-6.** *Xba*I ile kesilen C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri (3)




**Resim 4-7.** *Xba*I ile kesilen C. *striatum* izolatlarının genomik DNA bant görüntüleri (4)



# 5. TARTIŞMA

*Corynebacterium* cinsine ait ilk veriler 1800' lü yıllara dayanmasına rağmen klinik açıdan önem arz etmesi 1900' lü yıllara tekabül etmektedir [1]. Daha önceden klinik örneklerden nadiren izole edilmiş olsa bile , ilk defa 1981 yılında D. G. Hollis ve R.E. Weaver, Atlanta' da bulunan özel bakteriyoloji laboratuvarında (CDC), klinik örneklerden izole edilen, bugün daha çok fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan korineform türlerini sistematik olarak tanımlamışlardır [1, 25, 148-150]. Klinik mikrobiyologlar için paha biçilmez bir rehber yayınlayarak taksonomik araştırmaların temelini oluşturmuşlardır. İlerleyen yıllarda ise Coyle ve Lipsky ise fırsatçı enfeksiyonlara maruz kalacak daha çok tehlikede bulunan (immun sistemi baskılanmış, invaziv işlemlere ve yoğun bakım ünitelerinde uzun süre geniş spektrumlu antimikrobiyal tedaviye maruz kalmış hastalar vb.) hasta sayısı artacağından Corynebacterium türlerinin daha yoğun bir şekilde araştırılmasını önermişlerdir [6]. Ve o yıllarda bu türlerin tanımlanmasında hücre duvar analizleri, nükleik asit hibridizasyon yada sekanslama çalışmalarının gelişmesi gerektiği vurgulanmıştır. O yıllardan bu yılllara gelindiğinde bir çok gelişme sağlanmış olsa da hala bu türlere gereken önem verilmemiştir. Bunun nedeni ise sıklıkla kolonizer veya kontaminant olarak kabul edilmiş olmaları ve potansiyel patojenitelerinin gözardı edilmiş olmasıdır. Potansiyel patojenitelerinin varlığını ve fırsatçı enfeksyonlara neden olduklarını gösteren çalışmalar rapor edilmiştir [10, 14, 68, 91, 92, 104, 139]. Korineformların koagülaz negatif stafilokoklarla dinamik dengede oldukları ve yerleşik aerobik floranın %4,7' sini oluşturmuş olmalarından, bu fırsatçı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar genellikle endojen kökenli olarak düşünülmektedir [151]. Bununla birlikte *Corynebacterium* türlerinin hastadan hastaya yayıldığını gösteren çalışmalar bildirilmiş fakat bu çalışmalarda ortak bir kaynak gösterilmemiştir [4, 18, 152, 153].

*Corynebacterium* türleriyle ilgili tatmin edici olmayan taksonomik çalışmalar, identifikasyonda karşılaşılan ciddi sorunlar, bir çok laboratuvarın halen bu türlerin identifikasyonu için yeterli donanıma sahip olmamaları, hangi türün gerçekten enfeksiyon etkeni olduğunun tam anlamıyla tespit edilememiş olması gibi bir çok nedenden dolayı hangi türün daha iyi göz önüne alınması gerektiği de tespit edilememiştir.

Bir çok çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *Corynebacterium*' ların tür düzeyinde identifiye edilmesinin öncelikli olduğu rapor edilmiştir [1, 6, 37, 151]. İdentifikasyonda ucuz ve basit bir yöntem olması nedeniyle ve ayrıca *Corynebacterium*' ların tipik bir mikroskop görüntüsüne sahip olmaları nedeniyle gram boyamanın önemli olduğu bildirilmiştir [1, 6].

Çalışmamızda yoğun bakım ünitelerinden gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş *Corynebacterium* türleri öncelikle gram boyama yapılarak analiz edilmiş daha sonra identifikasyonları MALDİTOF MS (Bruker, Daltonics, Germany) ve MALDİTOF VİTEK MS (bioMérieux, France) sistemleri kullanılarak yapılmıştır. Her iki sistemin identifiye verileri kıyaslandığında benzer sonuçların olduğu görülmüştür. Gram boyamadan sonra, konvansiyonel tanımlama yöntemleri kullanılarak ek biyokimyasal testler (CAMP testi, VP testi, eskülin ve üre hidrolizi, metil kırmızısı testi vb.) emek yoğun olduğundan ve identifiye süresini uzatıp ayrıca otomatize sistemle doğrulanmayı da gerektireceğinden yapılmamıştır. Bu emek ve maliyet yoğun testler yerine doğrudan saf halde üretilmiş olan kültür petrilerinden kolonilerin alınması ile sadece birkaç saat içerisinde identifikasyon gerçekleştirilmiş ciddi bir zaman tasarrufu sağlanmıştır. Bu radikal, yeni, metodik basit yaklaşımla ayrıca sarf malzeme ihtiyacı da ciddi oranda azalmıştır. MALDITOF MS yöntemi konvansiyonel yöntemlerle kıyaslandığında kısmen daha yeni bir yöntem olmasından dolayı bir izolatın yanlış olarak identifiye edilmesi ya da identifiye edilememesi sistemin veritabanında identifikasyonu yapılan mevcut mikroorganizma ile ilgili yeterli referans spektrumun bulunmayışıdır, sistemin eksikliklerini yakın zamanda tamamlayacağı düşünülmektedir. Fakat sistemin güvenilirliği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [144].

Konrad ve ark., 116 potansiyel toksijenik *Corynebacterium* türünü MALDITOF MS ile identifiye etmiş ve 115' inin rpoB gen sekansı ile aynı sonuçları gösterdiğini rapor etmişlerdir. rpoB gen sekansı ile C. *tuberculostearicum* olarak tespit edilen bir izolat MALDITOF MS ile C. *tuberculostearicum* da olsa 1,8 olan daha düşük log(skor) değeri vermiştir. 116 izolatın 104' ü API Coryne strip sistemi ile identifiye edilebilmiş ve rpoB gen sekansı ile aynı sonuçları vermiştir. API Coryne strip sistemi ve rpoB gen sekansı ile kıyaslandığında MALDITOF MS ile nerdeyse 15 dk gibi kısa bir sürede sonuç alınmasının bu yöntemi çok daha cazip hale getirdiğini rapor etmişlerdir [42].

Bizzini ve ark., benzer bir çalışmayla 32 *Corynebacterium* türünü, 16S rRNA dizi analizine alternatif olarak MALDITOF MS ile identifiye etmiş ve 16S rRNA dizi analizi ile C. *aurimucosum* sonucunu veren izolatın genotipik olarak çok yakın olan C. *minutissimum* sonucunu, 16S rRNA dizi analizi ile C. *glucuronolyticum* sonucunu veren izolatın ise yine genotipik olarak çok yakın olan C. *seminale* sonucunu MALDITOF MS ile verdiğini rapor etmişlerdir [154]. Fakat MALDITOF MS sisteminin veritabanı güncellenmiş ve bu türlerin artık doğru tanımlandığı sonucuna varmışlardır [154].

Alatoom ve ark., aynı şekilde rpoB gen sekansı ile MALDITOF MS sisteminin 92 *Corynebacterium* izolatını identifiye etme kabiliyetlerini karşılaştırmışlardır. Ayrıca MALDITOF MS sisteminde direkt koloni ve ekstraksiyon olarak belirlenmiş iki farklı mikroorganizma hazırlama yöntemini karşılaştırarak bu izolatları çalışmışlardır. Yalnızca düşük skor değeriyle (<2000) iki C. *aurimucosum* izolatının MALDITOF MS ile C. *minutissimum* olarak sonuçlandığı bildirilmiştir. Skor değeri 1500-1600 arasında olan izolatların bile doğru sonuç verdiği burada önemli olan noktanın genotip olarak benzer iki türün ayrımında MALDITOF MS ile zorlanılabileceği, fakat rpoB gen sekansı ile kıyaslandığında zaman ve maliyet etkinlik açısından avantajlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca mikroorganizmaları hazırlarken ekstraksiyon yöntemini kulanmayla daha verimli sonuçlar alındığı, bunun nedeninin de Corynebacterium' larda kalın bir peptidoglikan tabakaya ek olarak meso-diaminopimelik asit ve korinemikolik asitlerin var olduğu belirtilmiştir [43].

Theel ve ark., ise MALDITOF MS ile 78 *Corynebacterium* türünü identifiye etmiş ve rpoB gen sekansı ile C. *aurimucosum* olarak identifiye edilen izolatın MALDITOF MS ile identifikasyonda C. *minutissimum* olarak sonuçlandığını rapor etmişlerdir. [155]

Çalışmamızın bu çalışmalara benzer yönü MALDITOF MS ile izolatlarımızın tanımlanabildiği, C. *striatum* olan izolatların %90' ının skor değerinin 2000 ve üstü olduğu C. *affermentans,* C. *mucifaciense* ve C. *amycolatum* türlerinin identifiye skor değerlerinin 2000' in altında olduğu görülmüştür. Farklı yönü ise 1 tane olan C. *aurimucosum* olan izolatımızın skor değerinin 2057 olmasıdır. C. *striatum* türü dışındaki türlerin sayısı çok az olduğundan etkin bir değerlendirme yapılamasa da C. *aurimucosum* türü C. *minutissimum* olarak tanımlanmamıştır.

Çalışmamızda cihazımız yeterli donanıma sahip olmadığından izole ettiğimiz türler her ne kadar bu şekilde çalışılmamış olsa bile, üremiş olan kolonilerden değil de direkt olarak klinik materyalin (kan, idrar vb.) kendisinden de mevcut patojenin varlığı tespit edilebilmekte ayrıca konvansiyonel antimikrobiyal duyarlılık testlerine gerek kalmadan da patojen için gerekli antimikrobiyal testler cihaza yüklenmiş referans değerlerle yapılabilmektedir [144, 156]. İlerleyen zamanlarda *Corynebacterium*' lar içinde bir çok laboratuvarın kolay erişebileceği otomatize antimikrobiyal testlerin yapımına imkan sağlayan cihazların yaygınlaşması umut edilmektedir.

Daha önceki çalışmalara bakıldığında *Corynebacterium* türleri çok farklı identifiye metodu ile analiz edilmiştir. Klinik örneklerden ilk defa izole edildiklerinde mikroskobik görüntüleri, koloni morfolojileri, pigmentasyon, hemoliz varlığı ve bir çok biyokimyasal özellikleri identifikasyon için yararlı bulunmuş ve 90' lı yıllarda ise API Coryne strip sisteminin (API-bioMérieux, France) kullanıma sunulmasıyla bu yarı otomatize sistem yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu sistemin günümüz identifiye yöntemleriyle karşılaştırıldığında, sonuca ulaşmak için bazen 48 saati bile aşacak süreye ihtiyaç duymasıdır [1].

Freney ve ark., büyük bir çoğunluğunun *Corynebacterium* türü olduğu 240 korineform bakteri grubunu API Coryne strip sistemi ile identifiye etmiş bunlardan 158 izolatın ek identifiye yöntemine gerek kalmadan identifiye edildiğini fakat 76 izolatın ise ek identifiye yöntemi gerektirdiğini rapor etmişlerdir [38] . Ayrıca API Coryne strip sisteminin mevcut veritabanında bazı korineformların verilerinin mevcut olmadığını, klinik laboratuvarlarda rutin olarak izole edilen gram pozitif çomakların yalnızca %60' nın konvansiyonel yöntemlerle identifiye edildiğini ve bu durumun bu bakteri gruplarıyla çalışılırken karşılaşılan ciddi bir sorun olduğunu belirtmişlerdir.

Benzer çalışmalar Gavin ve ark., Soto ve ark. tarafından da rapor edilmiş, Gavin ve ark. 177 korineform bakteri grubunun %84' nün, Soto ve ark. ise 160 korineform bakteri grubunun %88' inin API Coryne strip sistemi ile identifiye edildiğini, yanlış identifiye edilen yada edilemeyen türlerin veri tabanında mevcut olmadığı sonucuna varmışlardır [37, 157].

Knox ve ark. ise nozokomiyal endokardit etkeni olan 3 farklı *Corynebacterium* türünün API Coryne strip sistemine ek olarak gaz sıvı kromotografisi ile identifiye ettiklerini rapor etmişlerdir. 3 farklı Corynebacterium türünün 1' i API Coryne profili

ile eşleşmediğinden, gaz sıvı kromotografisi ile identifikasyonu için referans laboratuvarına gönderilmiş ve bu yöntemle C. *amycolatum* olarak rapor edilmiştir [8].

Leonard ve arkadaşları da 9 hastanın balgam örneğinden izole edilen C. *striatum* izolatlarını API Coryne strip sistemi, gaz sıvı kromotografisi ve DNA hibridzasyonu ile identifiye ettiklerini bildirmişlerdir [18].

*Corynebacterium*' ların identifikasyonunda en sık kullanılan yöntem yakın zamana kadar API Coryne strip sistemi olmuştur ve bu yöntemle çalışılarak rapor edilmiş çok sayıda çalışma vardır [19, 20, 36, 67, 158].

Iaria ve arkadaşlarının, farklı bir identifiye yöntemi olan ve kolorometrik kart temeline dayanan Vitek sistemi ile yaptıkları çalışmanın sonuçları kayda değerdir, Vitek (GP kart) ile 8 yoğun bakım ünitesi hastasından izole edilen 13 izolatın *Kocuria kristinae* olarak identifiye edildiği fakat 16S rRNA dizi analizi ile bu izolatların tamamının C. *striatum* oldukları belirlenmiştir. Vitek GP kart kullanılarak C. *striatum*' un *Kocuria kristinae* olarak yanlış identifiye edilebileceği, olağandışı klinik senaryolarda türlerin 16S rRNA dizi analizi gibi genotipik bir yöntemle identifiye edilmesinin doğru olacağı sonucuna varılmıştır [22].

Rennie ve ark. ise yine Vitek sistemi ile fakat ANC ID kart kullanarak anaerop ve *Corynebacterium* türlerini identifiye etmiş, 16S rRNA dizi analizi ile karşılaştırıldığında performans kriterinin %95 güven aralığında olduğu sonucuna varmışlardır. ANC ID kartın antimikrobiyallere daha dirençli olan C. *jeikeium* ve C. *amycolatum* türlerini de kolay ayırdığını ve böylece rutin klinik laboratuvarlarda *Corynebacterium* türleri için kullanımının kabul edilebilir olduğunu rapor etmişlerdir [41].

*Corynebacterium* türlerinin identifikasyonunda RAPID CB Plus, Biolog, Sherlock, Minitek, Phoenix, HPLC, FTIR sistemleri kullanılmış fakat her biri çok az çalışmayla sınırlı kalmıştır [39, 40, 45, 46, 48, 159]. *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium minutissimum* ve *Corynebacterium striatum* türlerini ayırt etmek için ayrıca karbon substrat asimilasyonuna dayalı Biotype 100 sisteminin kullanıldığı çalışmada rapor edilmiştir [47].

Rapor edilen bir çok çalışmada belirtildiği gibi klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanım alanı kısıtlı olmasına rağmen moleküler yöntemlerle

de tanımlama yapmakta mümkündür. Khamis ve ark. 56 *Corynebacterium* türüyle yaptıkları çalışmalarında, rpoB gen dizisinin (yaklaşık 3500 bp) tamamının dizilimini gerektirmeyen bir alan tanımlamışlar ve yalnızca 434 ile 452 bp' lik fragmentin (universal primer) sekansının türlerin doğru şekilde identifikasyonuna izin vereceği ve rutin olarak sekans laboratuvarlarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir [2, 50]. Bir yıl sonra 168 *Corynebacterium* izolatını çalışarak 16S rRNA dizi analizi ile buldukları bu kısmi rpoB gen dizisini karşılaştırmış ve aynı şekilde bu daha kısa baz çifti ile daha hızlı sonuçlar alınabileceğini vurgulamışlardır [50].

Pascual ve ark. 30 farklı *Corynebacterim* türünün 16S rRNA dizi analizine dayalı filogenetik analizini rapor etmişlerdir. *Corynebacterium* olduğu daha önceden onaylanmış 23 tür ile Corynebacterium türü olduğu kesinleşmemiş 7 türü analiz ederek 29 türün 16S rRNA dizi analizinin gerçekleştirilebildiği yalnızca C.*minutissimum* türünün 16S rRNA dizi analizine ek 16S ribosomal DNA ürünlerininde klonlanması ve dizi analizinin yapılmasıyla bulunduğu sonucuna varılmıştır [49].

Adderson ve ark., farklı bir çalışmayla 50 farklı izolatı çalışarak 3 ticari identifikasyon kiti ve 3 nükleik asit amplifikasyon testini karşılaştırmışlardır. BBL Crystal Rapid Gram Pozitif ID, API Coryne Strip ve RapID CB Plus sistemlerini kullanarak identifiye etmişler duyarlılığı en yüksek olan ve en iyi identifikasyon yapan sistemin API Coryne sistemi olduğunu belirtmişlerdir. Geniş aralıklı (broad-range) 16S rRNA dizi analizi, rpoB gen sekansı ve korineform ile optimize edilmiş 16S rRNA dizi analizi yaparak 3 sistemde de en başarılı veriyi korineform ile optimize edilmiş 16S rRNA dizi analizi sonucunda aldıklarını belirtmişlerdir. Fakat diğer çalışmaların aksine nükleik asit amplifikasyon analizlerinin bazı bakterileri tür seviyesine tanımlamada sınırlı yeteneklere sahip olduğunu bildirmişlerdir [51].

Tang ve arkadaşları ise 52 *Corynebacterium* türünü tek onaylı 16S gen dizileme sistemi olan MicroSeq 500 ile identifiye etmişler, konvansiyonel identifikasyon yöntemleri ile tür düzeyinde 32 türün MicroSeq 500 sistemi ile uyumlu sonuç verdiğini bildirilmişlerdir [52].

Bu çalışmalarda belirtilen moleküler yöntemler çalışmamızda kısıtlı imkanlardan ve maliyet etkinliği olmadığından çalışılmamıştır.

*Corynebacterium*' ların klinik örneklerden izole edildikleri ilk dönemlerde fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak karşımıza daha çok çıkan tür C. *jeikeium*' dur.

1979 yılında Riley ve ark., bugün C. *jeikeium* olarak isimlendirdiğimiz 95 CDC group JK izolatını büyük çoğunluğu kan kültürü olan çeşitli klinik örneklerden izole etmişlerdir. Bir çok antimikrobiyale dirençli olduklarını vankomisini kullanmanın tedavide yararlı olacağını rapor etmişlerdir [150].

Gilly ve arkadaşları da, oluşma ve yayılma sıklığını belirlemek için belirli servislerde yatan bir çok hastadan alınan kasık sürüntü kültürleriyle CDC group JK bakterisinin hastaların %30-35' inde kolonizer olduğunu ve bu kolonizasyonun bazen aylarca sürebildiğini yapılan antimikrobiyal testler sonucunda da en güvenilir antimikrobiyalin vankomisin olduğunu rapor etmişlerdir. Önceki yıllarda CDC group JK olduğu tahmin edilen benzer çalışmalar birkaç araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir[148].

Rozdzinski ve ark., daha sonraki yıllarda 23 hastanın kan kültürlerinden C. *jeikeium* izole etmişler ve antimikrobiyallere oldukça dirençli olduklarını bildirmişlerdir [160] .

Sonraki yıllarda ise C. *striatum*' un etken olduğu çalışmalar rapor edilmeye başlanmıştır. 1994 yılında Tumbarello ve ark., 26 yaşında erkek AIDS hastasında, vankomisin, teikoplanin, rifampisin ve tetrasiklin dışında antimikrobiyallere dirençli C. *striatum*' un etken olduğu bakteremi vakası bildirmişlerdir [86].

1996 yılında Tattevin ve ark., C. *striatum*' un etken olduğu 24 yaşında erkek hastada ilk doğal kapak endokardit vakası tespit edip, 7 haftalık amoksisilin tedavisi sonucunda hastanın hala şikayetlerinin olduğunu ve vejetasyonda hiç değişiklik olmadığını bu yüzden tedaviyi amoksisilin, netilmisin ve teikoplanin ile değiştirdiklerini ve bu tedavinin başarılı sonuç verdiğini bildirmişlerdir [75]. Aynı yıl Juurlink ve ark., yine C. *striatum*' a bağlı 68 yaşında erkek hastada doğal kapak endokarditi vakası tespit edip vankomisin ile tedaviye başlamış, fakat daha sonra penisiline duyarlı olduğu antimikrobiyal testlerle tespit edildikten sonra tedavi penisilin ile değiştirilmiş [74]. Melero ve ark. ise aynı yıl, 73 yaşındaki erkek hastada C. *striatum*' un etken olduğu kalp piline bağlı endokardit vakası tespit edip, mikroorganizmanın penisiline dirençli olduğundan vankomisin ile başarılı bir şekilde tedavi edildiği rapor edilmiştir [78].

De Ariba ve ark., 72 yaşında kadın hastada C. *striatum*' a bağlı olarak gelişen ilk prostetik kapak endokardit vakası rapor ederek literatüre yeni bir çalışma eklemişlerdir [80]. C. *striatum*' a bağlı 2006 yılında Mashavi ve ark., bir başka prostetik kapak

endokardit vakası, 2006 yılında Tibrewala ve ark. ile 2012 yılında Tran ve ark., doğal kapak endokardit vakası ve 2010 yılında ise Oliva ve ark., kalp piline bağlı endokardit vakası rapor etmişlerdir [77, 81, 82].

Weiss ve ark., C. *striatum*' un etken olduğu 23 yaşında erkek hastada ilk menenjit vakası tespit edip vankomisin ile başarılı bir tedavi gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir [12].

Martinez ve arkadaşları 24 hastanın çoğunluğu yara olan çeşitli klinik örneklerinden 31 C. *striatum* izole ettiklerini, identifikasyonlarının API Coryne Strip sistemi ile yaptıklarını ve penisiline çoğunlukla duyarlı olduklarını rapor etmişlerdir [67]. Oysa bizim çalışmamızda da olduğu gibi sonraki yıllarda izole edilen çoğu C. *striatum* izolatı penisiline dirençlidir.

Robert ve ark., antimikrobiyallere dirençli 17 C. *striatum* izolatını eritromisin, klindamisin ve tetrasiklin direnç geni taşıyıp taşımadıklarını incelemiş ve *erm*Cd ile *tet*M genlerini taşıdıklarını rapor etmişler [95].

Rapor edilmiş olan bu vakalar sonucunda, fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak C. *striatum*' un, C. *jeikeium*' un yerini aldığı görülmüş, hatta neredeyse bütün hakimiyeti ele geçirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir .

2018 yılında Kalt ve arkadaşlarının, 2006-2015 yılları arasında nadiren ortopedik enfeksiyonlara neden olan Corynebacterium' larla ilgili yaptıkları çalışmada C. *jeikeium*' un hiç izole edilmediğini fakat en sık izole edilmiş türlerden birinin C. *striatum* olduğunu rapor etmişlerdir [161].

Bao ve arkadaşlarının 2015 yılında, büyük bir çoğunluğu kan kültürü olan bir çok klinik örnekten izole 75 Corynebacterium türü üzerinde yaptıkları çalışmada yoğun olarak üreyen türün (44 adet) C. *striatum* olduğunu C. *jeikeium*' un (12 adet) daha az izole edildiğini rapor etmişlerdir. Hatta bu çalışmada rpo B gen sekansı, Phoenix, API Coryne ve MALDITOF VITEK MS ile izolatların identifikasyonunu gerçekleştirdiklerini zaman tasarrufu, maliyet etkinliği, kullanım kolaylığı açısından klinik laboratuvarlarda en çok tercih edilecek identifikasyon sisteminin MALDITOF MS olduğunu bildirmişlerdir [162].

Neemuchwala ve arkadaşları ise 1970 klinik *Corynebacterium* izolatını büyük bir çoğunluğu kan ve balgam örneği olan çeşitli klinik örnekten izole ederek

MALDITOF MS ile identifikasyonlarını yapmış ve sonuç vermeyen izolatlar için 16S rRNA dizi analizine başvurduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca belirttiğimiz gibi bu çalışmada da en fazla izole edilen türün C. *striatum* (931) olduğunu ve vankomisin ile linezolid dışında neredeyse test edilmiş bütün antimikrobiyallere dirençli olduklarını rapor etmişlerdir. Antimikrobiyal duyarlılık testinin mikrodilüsyon yöntemiyle yapılmış olduğunu ve MIC değerlerinin CLSI kriterlerine göre değerlendirildiğini bildirmişlerdir [163].

Belirtilen tüm bu çalışmalardakine benzer şekilde çalışmamızda en çok izole edilen tür C. *striatum* (%87,09) olmuştur. Çalışmamızın farklı yönü ise C. *striatum*' un en çok izole edildiği klinik örnek kan değil alt solunum yolu örnekleridir (ETA, BAL).

Ülkemizde de benzer çalışmalar rapor edilmiştir. 2017 yılında Tanrıverdi ve ark., çeşitli klinik servislerden gönderilen, büyük bir çoğunluğu alt solunum yolu örnekleri (%55,2) olan çeşitli klinik örnekten 199 *Corynebacterium* izole etmiş ve en sık izole edilen türün C. *striatum* (123) olduğunu belirtmişlerdir [164]. Çalışmamıza benzer şekilde EUCAST kriterlerine göre disk difüzyon yöntemi ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık sonucunda bu izolatların çoklu dirence sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Çalışmamızdan farklı yönü ise bu çalışmada bir izolatın linezolide dirençli olduğu bildirilirken, izolatlarımızın hiçbirinde linezolide direnç saptanmamıştır.

2016 yılında Çelik ve ark., çeşitli klinik örnekten 107 *Corynebacterium* izolatının büyük çoğunluğunun C. *striatum* (53) olduğunu ve bu türün çoklu antimikrobiyal dirence sahip olduğunu rapor etmişlerdir [165]. Turgut ve ark., yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören 6 hastanın trakeal aspirasyon örneklerinden C. *striatum* izole ettiklerini rapor etmişlerdir [166].

2015 yılında Mumcuoğlu ve ark., 5 yıllık süreçte çoğunluğu yoğun bakım ünitesinden ve yara yeri ile ETA örneğinden izole edilen 746 C. *striatum* izolatının özellikle riskli hasta gruplarında enfeksiyon etkeni olabileceğini bildirmişlerdir [167].

2007 yılında Renom ve ark., solunum ünitesine başvuran 21 KOAH hastasında sıradışı bir şekilde sadece bir ay içerisinde 8 hastanın 11 C. *striatum* izolatının aynı anda oluştuğunu tespit ederek, C. *striatum*' un ileri, şiddetli KOAH' lı hastalarda nozokomiyal enfeksiyonlara ve solunumsal kolonizasyona neden olabilen çoklu dirence sahip bir patojenik potansiyel olduğu rapor edilmiştir. Hastalar arasında, kişiden kişiye yada hasta bakıcılar aracılığıyla bulaşabileceğini daha fazla yayılmasını ve salgınları

önlemek için evrensel hijyen önlemleri alınması ile bu patojenlere antimikrobiyal testlerin yapılarak hastaların tedavi edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Leonard ve ark., 1994 yılında kahverengi pigmentli C. *striatum* izolatının 14 aylık bir süreçte yoğun bakım ünitesinde tedavi gören 9 hastanın, çalışmamıza benzer olarak solunum örneklerinden izole edildiğini ve bu hastalarda nozokomiyal enfeksiyona neden olduğunu rapor etmişlerdir [18].

1996 yılında Brandenburg ve ark., yoğun bakım ünitesinde tedavi gören 14 hastadan izole edilen 10 adet C. *striatum*' un aynı klon olduğunu ve hastadan hastaya muhtemel bulaşma yolunun personel aracılığıyla olduğunu rapor etmişlerdir. Meydana gelen küçük çaplı salgının, personele el dezenfeksiyonu hakkında eğitim verilmesiyle ve problemle ilgili personelin daha iyi bilgilendirmesiyle önlendiği rapor edilmiştir [4].

Iaria ve ark., 2007 yılında yaptıkları benzer çalışmada yoğun bakım ünitesinde tedavi gören hastalardan izole edilen 13 adet C. *striatum* izolatının aynı antimikrobiyal direnç paterni göstermesi ve olguların zamansal dağılımının yakın tarihler olarak belirlenmesinden dolayı bu izolatların benzer klon olduğunu ve bir hastadan diğerine bulaştığını rapor etmişlerdir [22]

Otsuka ve ark., 4 yıllık bir süreçte uzun süre hastanede yatarak tedavi gören 48 hastadan izole ettikleri C. *striatum* izolatının PFGE ile analizi sonucu nozokomiyal bir patojen olarak kabul edilmesi ve salgınlara neden olabileceğini bildirmişlerdir [85].

C. *striatum* türünün çoklu antimikrobiyal dirence sahip olduğu ve nozokomiyal salgınlara neden olabilecek potansiyel yayılım özelliklerine sahip olduğu başka çalışmalarda da bildirilmiştir [19-21].

Çalışmamızda 20 aylık süreçte yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalardan izole ederek değerlendirmiş olduğumuz 62 *Corynebacterium* izolatının 54' ünün *C. striatum* olduğu ve bu izolatların çoklu antimikrobiyal dirence sahip olduğu ayrıca %85 oranında benzerlik göstererek, yüksek oranda klonal yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum, *C. striatum*' un yoğun bakım ünitesinde önemli bir etken olabildiğini ve hastalar arasında yayılarak sorun oluşturacağını göstermektedir. Daha sonraki süreçte yoğun bakım ünitesinden gönderilen hasta klinik örneklerinden bu sıklıkta C. *striatum* izole edilmemiştir ve bu durum olası bir salgının mevcudiyetini fakat daha sonra sonlandığını göstermektedir.

Çalışmalar, *Corynebacterium* türlerinin ve özellikle normal cilt florasının bir parçası olarak bulunan çeşitli taksonların, klinik materyallerin önemli kontaminantları olduğunu göstermiştir. Zaman zaman doğru kararı vermek zor olsa da bu bakterilerin klinikle ilişkili bir etken yada kontaminant olup olmadığı belirlenmelidir [168].

*Corynebacterium* cinsi organizmaların patojenitesini ve klinik etkisini netleştirmek, tür düzeyinde identifikasyonunu yapıp, antibiyotik duyarlılık testleri ile dirençli kökenleri mikrobiyolojik ve moleküler yöntemlerle belirleyerek, enfeksiyon kontrolüne de katkıda bulunmak için rehberlere ve daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu aşamada kontaminasyon ve gerçek enfeksiyonu ayırt edecek özelliklerin tanımlanması, etkenlerin virulanslarının anlaşılması için kolay yöntemler belirlenmesi hedeflenmektedir. Böylece daha önce kontaminant kabul edilen fakat gittikçe artan oranda antibiyotik direncine sahip kökenler belirlenmiş, bu kökenlerle enfekte olmuş riskli hasta grupları arasında olası salgınlar engellenmiş olacaktır. Tüm bu çalışmalardan ve sunduğumuz çalışmamızdan yola çıkarak olağandışı klinik senaryolar için *Corynebacterium* türlerinin identifikasyonu belirlenmeli, antimikrobiyal direnç paternlerini belirlemek için duyarlılık testleri yapılmalı ve hatta genotipik analizlere de ihtiyaç duyulacağı düşünülüp uygun yöntemlerle klonalite çalışmaları yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR


1. Funke, G., et al., Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clinical microbiology reviews, 1997. **10**(1): p. 125-159.
2. Khamis, A., D. Raoult, and B. La Scola, rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(9): p. 3925-3931.
3. Funke, G. and K.A. Bernard, Coryneform Gram-positive rods, in Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. 2011, American Society of Microbiology. p. 413-442.
4. Brandenburg, A.H., et al., Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. Journal of clinical microbiology, 1996. **34**(9): p. 2089-2094.
5. von Graevenitz, A., et al., Coryneform bacteria in throat cultures of healthy individuals. Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(7): p. 2087-2088.
6. Coyle, M.B. and B. Lipsky, Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. Clinical Microbiology Reviews, 1990. **3**(3): p. 227-246.
7. Qin, L., et al., Characteristics of Multidrug-Resistant *Corynebacterium* spp. Isolated from Blood Cultures of Hospitalized Patients in Japan. Japanese journal of infectious diseases, 2017. **70**(2): p. 152-157.
8. Knox, K.L. and A.H. Holmes, Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. Emerging infectious diseases, 2002. **8**(1): p. 97.
9. Yanai, M., et al., Retrospective evaluation of the clinical characteristics associated with *Corynebacterium* species bacteremia. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2018.
10. Chen, F.-L., et al., *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2012. **45**(3): p. 255-258.
11. Westblade, L.F., et al., Septic arthritis of a native knee joint due to *Corynebacterium striatum*. Journal of clinical microbiology, 2014. **52**(5): p. 1786-1788.
12. Weiss, K., A. Labbé, and M. Laverdière, *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. Clinical infectious diseases, 1996. **23**(6): p. 1246-1248.
13. Otsuji, K., et al., The first fatal case of *Corynebacterium ulcerans* infection in Japan. JMM case reports, 2017. **4**(8).
14. Barraclough, K., et al., *Corynebacterium* peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients: predictors, treatment and outcomes in 82 cases. Nephrology Dialysis Transplantation, 2009. **24**(12): p. 3834-3839.
15. Fernández-Ayala, M., D.N. Nan, and M.C. Fariñas, Vertebral osteomyelitis due to Corynebacterium striatum. The American journal of medicine, 2001. **111**(2): p. 167.
16. Das, S., et al., *Corynebacterium* spp as causative agents of microbial keratitis. British Journal of Ophthalmology, 2016. **100**(7): p. 939-943.
17. Joussen, A.M., et al., *Corynebacterium macginleyi*: a conjunctiva specific pathogen. British journal of ophthalmology, 2000. **84**(12): p. 1420-1422.

18. Leonard, R.B., et al., Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. Journal of clinical microbiology, 1994. **32**(1): p. 164-169.
19. Campanile, F., et al., Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. Emerging infectious diseases, 2009. **15**(1): p. 75.
20. Baio, P.V.P., et al., Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2013. **108**(1): p. 23-29.
21. Verroken, A., et al., Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(1): p. 44-50.
22. Iaria, C., et al., Outbreak of multi-resistant *Corynebacterium striatum* infection in an Italian general intensive care unit. Journal of Hospital Infection, 2007. **67**(1): p. 102-104.
23. Conn, H. and I. Dimmick, Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. Journal of bacteriology, 1947. **54**(3): p. 291.
24. Clark, F.E., The generic classification of the soil corynebacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1952. **2**(1): p. 45-56.
25. Hollis, D.G. and R.E. Weaver, Gram-positive organisms: a guide to identification. 1981: Special Bacteriology Section, Centers for Disease Control.
26. Liebl, W., *Corynebacterium* taxonomy. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2005: p. 9-34.
27. Koneman E.W, et al., Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology. 7th ed. 2017, Philadelphia: Lippincott.
28. Murray R.P, Rosenthal S.K, and Pfaller A.M, Tıbbi Mikrobiyoloji. 7.baskı ed. 2016, Ankara: Pelikan Kitabevi. 222-228.
29. Public Health England (PHE) and National Health Service (NHS). UK Standards for Microbiology Investigasions. 2014 4.1].
30. Somerville, D.A., A taxonomic scheme for aerobic diphtheroids from human skin. Journal of medical microbiology, 1973. **6**(2): p. 215-224.
31. Barksdale, L., *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. Bacteriological Reviews, 1970. **34**(4): p. 378.
32. Bernard, K.A. and G. Funke, *Corynebacterium*, in Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. p. 1-70.
33. Bernard, K.A., M. Bellefeuille, and E.P. Ewan, Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. Journal of clinical microbiology, 1991. **29**(1): p. 83-89.
34. VenkataSarada, C. and R. Rao, Non diphtheritic corynebacteria (NDC) and their clinical significance: clinical microbiologist's perspective. Am J Epidemiol, 2014. **2**: p. 83-87.
35. Funke, G., C.P. Ramos, and M.D. Collins, Identification of some clinical strains of CDC coryneform group A-3 and A-4 bacteria as Cellulomonas species and proposal of Cellulomonas hominis sp. nov. for some group A-3 strains. Journal of clinical microbiology, 1995. **33**(8): p. 2091-2097.
36. Dorella, F.A., et al., *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Veterinary research, 2006. **37**(2): p. 201-218.

37. Gavin, S., et al., Evaluation of the rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. Journal of clinical microbiology, 1992. **30**(7): p. 1692-1695.
38. Freney, J., et al., Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. Journal of clinical microbiology, 1991. **29**(1): p. 38-41.
39. Hudspeth, M.K., et al., Evaluation of the RapID CB Plus system for identification of *Corynebacterium* species and other gram-positive rods. Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(2): p. 543-547.
40. Funke, G., K. Peters, and M. Aravena-Roman, Evaluation of the RapID CB Plus System for Identification of Coryneform Bacteria and Listeriaspp. Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(9): p. 2439-2442.
41. Rennie, R.P., et al., Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. Journal of clinical microbiology, 2008. **46**(8): p. 2646-2651.
42. Konrad, R., 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. Eurosurveillance, 2010. **15**(43): p. 19699.
43. Alatoom, A.A., et al., Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology, 2012. **50**(1): p. 160-163.
44. Alatoom, A.A., et al., Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of Gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology, 2011. **49**(8): p. 2868-2873.
45. Slifkin, M., G.M. Gil, and C. Engwall, Rapid identification of group JK and other corynebacteria with the Minitek system. Journal of clinical microbiology, 1986. **24**(2): p. 177-180.
46. Athalye, M., et al., Gas chromatography-mass spectrometry of mycolic acids as a tool in the identification of medically important coryneform bacteria. Microbiology, 1984. **130**(3): p. 513-519.
47. Renaud, F.N., et al., Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, and *C. striatum* by carbon substrate assimilation tests. Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(12): p. 3698-3702.
48. Oberreuter, H., H. Seiler, and S. Scherer, Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2002. **52**(1): p. 91-100.
49. Pascual, C., et al., Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1995. **45**(4): p. 724-728.
50. Khamis, A., D. Raoult, and B. La Scola, Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(4): p. 1934-1936.
51. Adderson, E.E., et al., Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and rpoB genes. Journal of clinical microbiology, 2008. **46**(3): p. 921-927.

52. Tang, Y.-W., et al., Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(4): p. 1676-1678.
53. Soriano, F., J. Zapardiel, and E. Nieto, Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming Gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1995. **39**(1): p. 208-214.
54. Weiss, K., M. Laverdiere, and R. Rivest, Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1996. **40**(4): p. 930-933.
55. Funke, G., V. Pünter, and A. Von Graevenitz, Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1996. **40**(12): p. 2874-2878.
56. SANTAMARiA, M., et al., Antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium* group D2. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1985. **28**(6): p. 845-846.
57. Riegel, P., et al., Species identities and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1996. **15**(8): p. 657-662.
58. CLSI, Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Second ed. CLSI document M45-A2. 2006, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institue.
59. EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. . Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameter. 2017: Version 7.01.
60. Tenover, F.C., Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections. Clinics in laboratory medicine, 1985. **5**(3): p. 413-436.
61. David H. Persing, F.C.T., James Versalovic, Yi-Wei Tang, Moleküler Mikrobiyoloji-Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. 2006, Ankara: Palme Yayıncılık. 183-196.
62. Van Belkum, A., et al., Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clinical Microbiology and Infection, 2007. **13**: p. 1-46.
63. Çetinkaya, E. and K. Ayhan, Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi, 2012. **2**(1): p. 53-62.
64. Birren, B. and E. Lai, Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide. 2012: Academic Press.
65. BASIM, E. and H. BASIM, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. Turkish journal of biology, 2001. **25**(4): p. 405-418.
66. COYLE, M.B., R.B. LEONARD, and D.J. NOWOWIEJSKI, Pursuit of the *Corynebacterium striatum* type strain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1993. **43**(4): p. 848-851.
67. Martinez-Martinez, L., et al., Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples. Journal of clinical microbiology, 1995. **33**(9): p. 2458-2461.

68. Bowstead, T.T. and S.M. Santiago Jr, Pleuropulmonary infection due to *Corynebacterium striatum.* British journal of diseases of the chest, 1980. **74**: p. 198-200.
69. Scholle, D., A spontaneous joint infection with *Corynebacterium striatum.* Journal of clinical microbiology, 2007. **45**(2): p. 656-658.
70. Yoo, G., et al., Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* bacteremia: first case in Korea. Annals of laboratory medicine, 2015. **35**(4): p. 472-473.
71. Superti, S.V., et al., *Corynebacterium striatum* infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2009. **51**(2): p. 115-116.
72. Renom, F., et al., Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Journal of clinical microbiology, 2007. **45**(6): p. 2064-2067.
73. Rufael, D.W. and S.E. Cohn, Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: case report and review. Clinical infectious diseases, 1994. **19**(6): p. 1054-1061.
74. Juurlink, D., A. Borczyk, and A. Simor, Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1996. **15**(12): p. 963-965.
75. Tattevin, P., et al., Native valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: first reported case of medical treatment alone. Clinical infectious diseases, 1996. **23**(6): p. 1330-1331.
76. Marull, J. and P.A. Casares, Nosocomial valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: a case report. Cases journal, 2008. **1**(1): p. 388.
77. Oliva, A., et al., Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. Journal of clinical microbiology, 2010. **48**(12): p. 4669-4671.
78. Melero-Bascones, M., et al., *Corynebacterium striatum*: an undescribed agent of pacemaker-related endocarditis. Clinical infectious diseases, 1996. **22**(3): p. 576-577.
79. Boltin, D., et al., *Corynebacterium striatum*—a classic pathogen eluding diagnosis. European journal of internal medicine, 2009. **20**(3): p. e49-e52.
80. De Arriba, J., et al., *Corynebacterium striatum* first reported case of prosthetic valve endocarditis. Journal of Infection, 2002. **44**(3): p. 193.
81. Mashavi, M., et al., First report of prosthetic mitral valve endocarditis due to *Corynebacterium striatum*: successful medical treatment. Case report and literature review. Journal of Infection, 2006. **52**(5): p. e139-e141.
82. Tibrewala, A.V., et al., Native valve endocarditis caused by *C. striatum*. Scandinavian journal of infectious diseases, 2006. **38**(9): p. 805-807.
83. Yang, H.-S., et al., Central venous catheter-related bloodstream infection by *Corynebacterium striatum* identified by 16S rRNA and rpoB gene sequencing. Annals of laboratory medicine, 2015. **35**(5): p. 548-550.
84. Martin, M., et al., Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin. Journal of medical microbiology, 2003. **52**(7): p. 599-602.
85. Otsuka, Y., et al., Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2006. **54**(2): p. 109-114.

86. Tumbarello, M., et al., *Corynebacterium striatum* bacteremia in a patient with AIDS. Clinical infectious diseases, 1994. **18**(6): p. 1007-1008.
87. Renom, F., et al., Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. New microbes and new infections, 2014. **2**(4): p. 106-114.
88. Tarr, P., et al., Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. Transplant infectious disease, 2003. **5**(1): p. 53-58.
89. Cone, L.A., et al., Septic synovitis and arthritis due to *Corynebacterium striatum* following an accidental scalpel injury. Clinical infectious diseases, 1998. **27**(6): p. 1532-1533.
90. Hoy, C., K. Kerr, and J. Livingston, Cerebrospinal fluid-shunt infection due to *Corynebacterium striatum*. Clinical infectious diseases, 1997. **25**(6): p. 1486-1487.
91. Batson, J., et al., Pulmonary abscess due to *Corynebacterium striatum.* Journal of the Tennessee Medical Association, 1996. **89**(4): p. 115-116.
92. Bhayani, N., et al., *Corynebacterium striatum* septic arthritis and bacteremia: case report and review. Infectious Diseases in Clinical Practice, 2009. **17**(3): p. 187-190.
93. Crabtree, J. and N. Garcia, *Corynebacterium striatum* peritoneal dialysis catheter exit site infection. Clinical nephrology, 2003. **60**(4): p. 270-274.
94. Stone, N., P. Gillett, and S. Burge, Breast abscess due to *Corynebacterium striatum*. British Journal of Dermatology, 1997. **137**(4): p. 623-625.
95. Roberts, M.C., et al., Characterization of antibiotic-resistant *Corynebacterium striatum* strains. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1992. **30**(4): p. 463-474.
96. Tran, T.T., et al., Native valve endocarditis caused by *Corynebacterium striatum* with heterogeneous high-level daptomycin resistance: collateral damage from daptomycin therapy? Antimicrobial agents and chemotherapy, 2012. **56**(6): p. 3461-3464.
97. Collins, M.D., R.A. Burton, and D. Jones, *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. FEMS microbiology letters, 1988. **49**(3): p. 349-352.
98. Wauters, G., et al., Propionic acid-producing strains previously designated as *Corynebacterium xerosis, C. minutissimum, C. striatum*, and CDC group I2 and group F2 coryneforms belong to the species *Corynebacterium amycolatum.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1996. **46**(3): p. 653-657.
99. Wauters, G., et al., Identification of *Corynebacterium amycolatum* and other nonlipophilic fermentative corynebacteria of human origin. Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(5): p. 1430-1432.
100. Funke, G., et al., Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. Journal of clinical microbiology, 1996. **34**(5): p. 1124-1128.
101. Zinkernagel, A.S., A. Von Graevenitz, and G. Funke, Heterogeneity within *Corynebacterium minutissimum* strains is explained by misidentified *Corynebacterium amycolatum* strains. American journal of clinical pathology, 1996. **106**(3): p. 378-383.

102. Letek, M., et al., Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential divIVA gene as a target. FEMS microbiology letters, 2006. **265**(2): p. 256-263.
103. Van Bosterhaut, B., et al., Three cases of opportunistic infection caused by propionic acid producing *Corynebacterium minutissimum*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1992. **11**(7): p. 628-631.
104. Berner, R., et al., Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant. Journal of clinical microbiology, 1997. **35**(4): p. 1011-1012.
105. de Miguel-Martinez, I., et al., Sepsis due to Multiply Resistant *Corynebacterium amycolatum*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 1996. **15**(7): p. 617-618.
106. Rodríguez, E. and A. Martín, *Corynebacterium amycolatum*: sepsis in hematologic patients. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica, 1999. **17**(7): p. 340-341.
107. Vaneechoutte, M., et al., Cardioverter-lead electrode infection due to *Corynebacterium amycolatum*. Clinical infectious diseases, 1998. **27**(6): p. 1553-1554.
108. Oteo, J., B. Aracil, and I. Alós, Significant bacteremias by *Corynebacterium amycolatum*: an emergent pathogen. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica, 2001. **19**(3): p. 103-106.
109. Adderson, E.E., J.W. Boudreaux, and R.T. Hayden, Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients. The Pediatric infectious disease journal, 2008. **27**(2): p. 136-141.
110. Daniels, C., D. Schoors, and G. Van Camp, Native valve endocarditis with aorta-to-left atrial fistula due to *Corynebacterium amycolatum*. European Journal of Echocardiography, 2003. **4**(1): p. 68-70.
111. Dalal, A., C. Urban, and S. Segal-Maurer, Endocarditis due to *Corynebacterium amycolatum*. Journal of medical microbiology, 2008. **57**(10): p. 1299-1302.
112. Belmares, J., et al., *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. BMC infectious diseases, 2007. **7**(1): p. 4.
113. Paviour, S., et al., *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. Clinical Infectious Diseases, 2002. **35**(11): p. 1434-1440.
114. Clarke, R., et al., Septic arthritis caused by *Corynebacterium amycolatum* following vascular graft sepsis. Journal of Infection, 1999. **38**(2): p. 126-127.
115. Chiu, Y., et al., Recurrent peritonitis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. Clinical nephrology, 2005. **63**(3): p. 241-242.
116. Sonmezer, M.C., et al., Relapsing peritonitis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis: a case report. International Journal of Infection Control, 2013. **9**(1).
117. Esteban, J., et al., Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1999. **18**(7): p. 518-521.
118. Balci, I., F. Ekşi, and A. Bayram, Coryneform bacteria isolated from blood cultures and their antibiotic susceptibilities. Journal of international medical research, 2002. **30**(4): p. 422-427.
119. Fernandez-Roblas, R., et al., In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. International journal of antimicrobial agents, 2009. **33**(5): p. 453-455.

120. Martínez-Martínez, L., et al., Activities of gemifloxacin and five other antimicrobial agents against Listeria monocytogenes and coryneform bacteria isolated from clinical samples. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2001. **45**(8): p. 2390.
121. Camello, T.C.F., et al., Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 2003. **34**(1): p. 39-44.
122. Martinez-Martinez, L., et al., In-vitro activity of levofloxacin, ofloxacin and D-ofloxacin against coryneform bacteria and Listeria monocytogenes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999. **43**(suppl_3): p. 27-32.
123. Reddy, B., et al., Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial Corynebacteria (Diphtheroids). Indian journal of medical microbiology, 2012. **30**(1): p. 52.
124. Riegel, P., et al., 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. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1993. **43**(2): p. 287-292.
125. Sewell, D.L., M.B. Coyle, and G. Funke, Prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum* (CDC coryneform group ANF-1). Journal of clinical microbiology, 1995. **33**(3): p. 759-761.
126. Dykhuizen, R.S., et al., *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*: multiple abscess formation in brain and liver. Scandinavian journal of infectious diseases, 1995. **27**(6): p. 637-639.
127. Minkin, R. and J.M. Shapiro, *Corynebacterium afermentans* lung abscess and empyema in a patient with human immunodeficiency virus infection. Southern medical journal, 2004. **97**(4): p. 395-398.
128. Kumari, P., et al., *Corynebacterium afermentans* spp. *afermentans* sepsis in a neurosurgical patient. Journal of Infection, 1997. **35**(2): p. 201-202.
129. Yang, T. and C. Mauriallo, A case of delayed-onset ventriculo-peritoneal shunt infection with *Corynebacterium* presented as ascites. Interdisciplinary Neurosurgery, 2016. **4**: p. 17-19.
130. Yassin, A., U. Steiner, and W. Ludwig, *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2002. **52**(3): p. 1001-1005.
131. Daneshvar, M.I., et al., Identification of some charcoal-black-pigmented CDC fermentative coryneform group 4 isolates as Rothia dentocariosa and some as *Corynebacterium aurimucosum*: proposal of Rothia dentocariosa emend. Georg and Brown 1967, *Corynebacterium aurimucosum* emend. Yassin et al. 2002, and *Corynebacterium nigricans* Shukla et al. 2003 pro synon. *Corynebacterium aurimucosum*. Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(9): p. 4189-4198.
132. Roux, V., et al., *Corynebacterium* species isolated from bone and joint infections identified by 16S rRNA gene sequence analysis. Journal of clinical microbiology, 2004. **42**(5): p. 2231-2233.
133. Goldstein, E.J., et al., In vitro activities of doripenem and six comparator drugs against 423 aerobic and anaerobic bacterial isolates from infected diabetic foot wounds. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2008. **52**(2): p. 761-766.

134. Trost, E., et al., Complete genome sequence and lifestyle of black-pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly C. nigricans CN-1) isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion. BMC genomics, 2010. **11**(1): p. 91.
135. Lo, S., et al., Urinary tract infection with *Corynebacterium aurimucosum* after urethroplasty stricture of the urethra: a case report. Journal of medical case reports, 2015. **9**(1): p. 156.
136. Funke, G., et al., *Corynebacterium imitans* sp. nov. isolated from patients with suspected diphtheria. Journal of clinical microbiology, 1997. **35**(8): p. 1978-1983.
137. Funke, G., P.A. Lawson, and M.D. Collins, *Corynebacterium mucifaciens* sp. nov., an unusual species from human clinical material. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997. **47**(4): p. 952-957.
138. Morinaka, S., et al., Unusual *Corynebacterium mucifaciens* isolated from ear and nasal specimens. Otolaryngology—Head and Neck Surgery, 2006. **135**(3): p. 392-396.
139. Cantarelli, V.V., et al., Fatal case of bacteremia caused by an atypical strain of *Corynebacterium mucifaciens*. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2006. **10**(6): p. 416-418.
140. Djossou, F., et al., Corynebacterium mucifaciens in an immunocompetent patient with cavitary pneumonia. BMC infectious diseases, 2010. **10**(1): p. 355.
141. Kaya, A., et al., An unusual etiological agent of implantable cardioverter device endocarditis: *Corynebacterium mucifaciens*. Indian heart journal, 2016. **68**(2): p. 190-191.
142. Bilgehan, H., Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, 2009. **5. Baskı**: p. 76-78.
143. Croxatto, A., G. Prod'hom, and G. Greub, Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS microbiology reviews, 2012. **36**(2): p. 380-407.
144. Yılmaz, S., et al., Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları. TAF Preventive Medicine Bulletin, 2014. **13**(5).
145. Morton, A.C., et al., Diversity of isolates of Rhodococcus equi from Australian thoroughbred horse farms. Antonie van Leeuwenhoek, 1998. **74**(1-3): p. 21-25.
146. Navas, J., et al., Susceptibility to aminoglycosides and distribution of aph and aac (3)-XI genes among *Corynebacterium striatum* clinical isolates. PloS one, 2016. **11**(12): p. e0167856.
147. Tenover, F.C., et al., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of clinical microbiology, 1995. **33**(9): p. 2233.
148. Gill, V., et al., Antibiotic-resistant group JK bacteria in hospitals. Journal of clinical microbiology, 1981. **13**(3): p. 472-477.
149. Hande, K.R., et al., Sepsis with a new species of *Corynebacterium*. Annals of Internal Medicine, 1976. **85**(4): p. 423-426.
150. Riley, P., et al., Characterization and identification of 95 diphtheroid (group JK) cultures isolated from clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology, 1979. **9**(3): p. 418-424.
151. Kaźmierczak, A.K., J.K. Szarapińska-Kwaszewska, and E.M. Szewczyk, Opportunistic coryneform organisms—residents of human skin. Pol J Microbiol, 2005. **54**(1): p. 27-35.

152. Kerry-Williams, S. and W. Noble, Plasmids in group JK coryneform bacteria isolated in a single hospital. Epidemiology & Infection, 1986. **97**(2): p. 255-263.
153. Pitcher, D., et al., An investigation of nosocomial infection with *Corynebacterium jeikeium* in surgical patients using a ribosomal RNA gene probe. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1990. **9**(9): p. 643-648.
154. Bizzini, A., et al., Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. Journal of clinical microbiology, 2011. **49**(2): p. 693-696.
155. Theel, E.S., 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. Journal of clinical microbiology, 2012. **50**(9): p. 3093-3095.
156. Wieser, A., et al., MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). Applied microbiology and biotechnology, 2012. **93**(3): p. 965-974.
157. Soto, A., J. Zapardiel, and F. Soriano, Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. Journal of clinical pathology, 1994. **47**(8): p. 756-759.
158. Kelly, M.C., et al., Rapid identification of antibiotic-resistant corynebacteria with the API 20S system. Journal of clinical microbiology, 1984. **19**(2): p. 245-247.
159. Hindmarch, J., et al., A pyrolysis-mass spectrometry study of *Corynebacterium* spp. Journal of medical microbiology, 1990. **31**(2): p. 137-149.
160. Rozdzinski, E., et al., *Corynebacterium jeikeium* bacteremia at a tertiary care center. Infection, 1991. **19**(4): p. 201-204.
161. Kalt, F., et al., *Corynebacterium* species rarely cause orthopedic infections. Journal of clinical microbiology, 2018. **56**(12): p. e01200-18.
162. Bao, R., et al., Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for identification of *Corynebacterium* species. Journal of thoracic disease, 2017. **9**(9): p. 3239.
163. Neemuchwala, A., et al., In vitro antibiotic susceptibility pattern of non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2018. **62**(4): p. e01776-17.
164. Tanrıverdi, Y., F. Korkmaz, and A. Birinci, Hastanemizde 2014-2017 yıllarında üreyen *Corynebacterium* izolatlarının değerlendirilmesi. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. **3**(2): p. 6-8.
165. Çelik, C., et al., Çeşitli Enfeksiyonlarda Patojen Rolü Yeniden Önem Kazanan Korinebakteri Türlerinde Antimikrobiyal Duyarlılık. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2016. **36**(3): p. 138-142.
166. TURGUT, H., Yoğun Bakım Hastalarının Trakeal Aspirasyon Örneklerinden izole Edilen *Corynebacterium striatum* Suşları.
167. Mumcuoğlu, İ., et al., Bir eğitim ve araştırma hastanesinde artan sıklıkta izole edilen *Corynebacterium striatum* izolatlarının değerlendirilmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2015. **72**(4): p. 281-288.
168. Weinstein, M., Contaminated or not? Guidelines for interpretation of positive blood cultures. WebM&M. January, 2008.

# ETİK KURUL KARARI

**Tarih ve Sayı: 08/11/2017-420353**

*BENDA0K1D*

**T.C.**
**CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI**
**Klinik Araştırmalar Etik Kurulu**

Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Yüksek Lisans Öğrencisi Mehtap Biçer'in A-57

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

İlgi : 20.10.2017 tarih, 64414572-903.99-393564 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Prof.Dr.Gökhan AYGÜN'ün** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Mehtap BİÇER'in** yürütücülüğünde **"Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen Corynebacterium Cinsi Bakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri, Antibiyotik Duyarlılığı ve Moleküler Özellikleri Yönünden Araştırılması"** başlıklı Yüksek Lisans Tezi (RETROSPEKTİF) hakkında ilgi yazınız ve ekleri **07 Kasım 2017** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK
Başkan V.

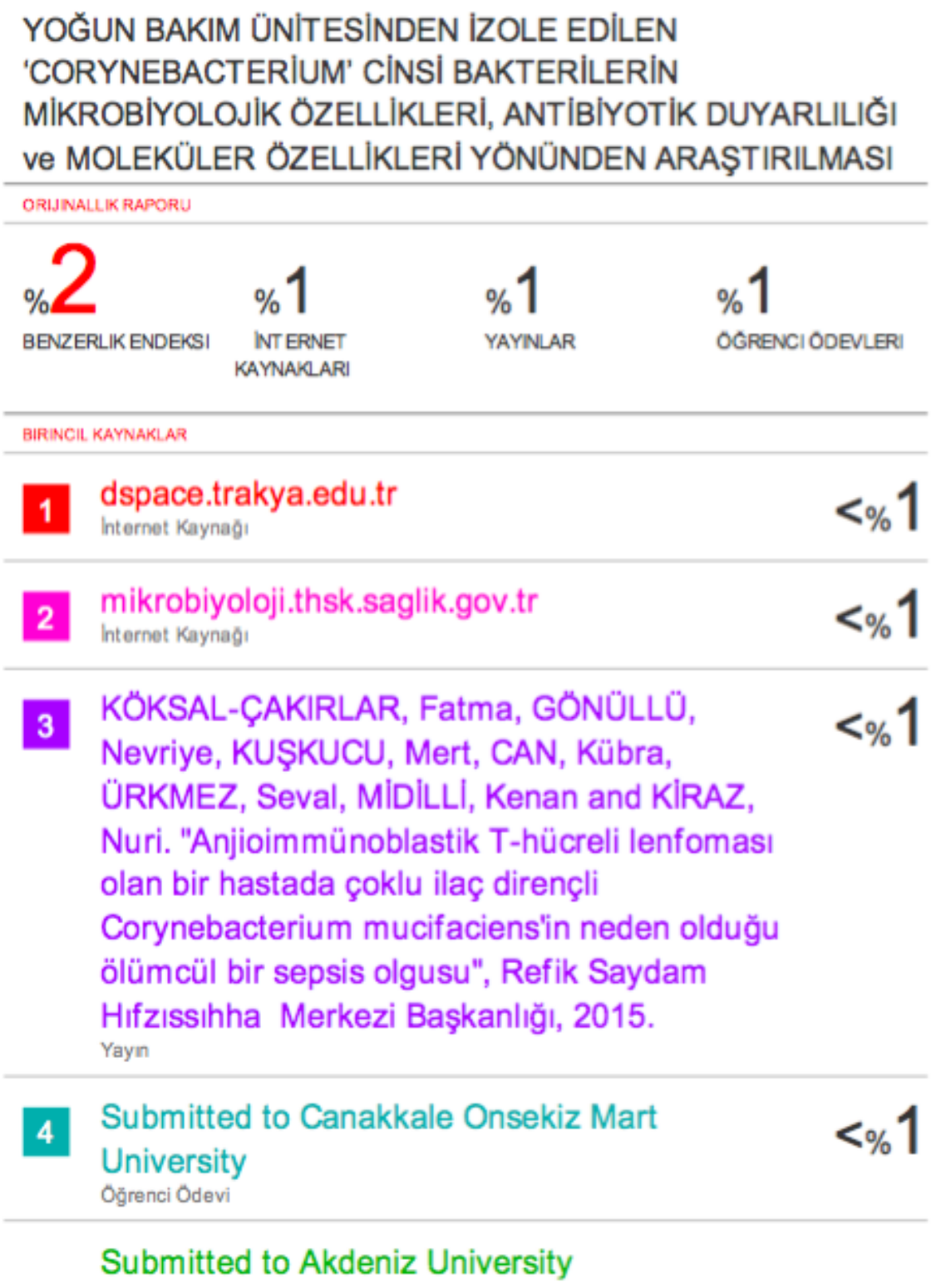
e-İmzalı
Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
Bölüm Başkanı

**NOT: Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.**

**EK :**
**1 dosya elden teslim edilecektir.**

Doğrulamak için:http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENDA0K1D
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

**İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**



YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDEN İZOLE EDİLEN 'CORYNEBACTERİUM' CİNSİ BAKTERİLERİN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ, ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI ve MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

| %2 | %1 | %1 | %1 |
|---|---|---|---|
| BENZERLIK ENDEKSI | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCI ÖDEVLERI |

BIRINCIL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | dspace.trakya.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 2 | mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 3 | KÖKSAL-ÇAKIRLAR, Fatma, GÖNÜLLÜ, Nevriye, KUŞKUCU, Mert, CAN, Kübra, ÜRKMEZ, Seval, MİDİLLİ, Kenan and KİRAZ, Nuri. "Anjioimmünoblastik T-hücreli lenfoması olan bir hastada çoklu ilaç dirençli Corynebacterium mucifaciens'in neden olduğu ölümcül bir sepsis olgusu", Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, 2015.<br>Yayın | <%1 |
| 4 | Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University<br>Öğrenci Ödevi | <%1 |

Submitted to Akdeniz University

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Adı** | Mehtap | **Soyadı** | Biçer |
| **Doğ.Yeri** | Özalp | **Doğ.Tar.** | 15.03.1987 |
| **Uyruğu** | TC | **TC Kim No** | 39203131440 |
| **Email** | mehtapbicerr@gmail.com | **Tel** | 0544 856 55 79 |

## Eğitim Düzeyi

| | **Mezun Olduğu Kurumun Adı** | **Mez. Yılı** |
|---|---|---|
| **Yük.Lis.** | İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul | 2019 |
| **Lisans** | Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü, Trabzon | 2009 |
| **Lise** | Kandilli Kız Lisesi, İstanbul | 2003 |

## İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| | **Görevi** | **Kurum** | **Süre (Yıl - Yıl)** |
|---|---|---|---|
| **1.** | Biyolog | Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, HLA Doku Tiplendirme Laboratuvarı, İstanbul | 2018-…. |
| **2.** | Biyolog | Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hast.ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, İstanbul | 2012-2018 |
| **3.** | Biyolog | T.C. Sağlık Bakanlığı, Mardin Halk Sağlığı Müdürlüğü, Mardin | 2012 |
| **4.** | Sınıf Öğretmeni | 20 Temmuz İlk Öğretim Okulu, Van | 2011-2012 |
| **5.** | Sınıf Öğretmeni | Atatürk İlk Öğretim Okulu, Van | 2010-2011 |
| **6.** | Biyoloji Öğretmeni | Ağabey Özbey Lisesi, Van | 2009-2010 |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* | YDS Puanı | Yökdil Puanı |
|---|---|---|---|---|---|
| İngilizce | İyi | Orta | Orta | 60 | 76,25 |

*****Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|---|---|---|---|
| **ALES Puanı** | 76,6 | 61,2 | 69,8 |
| **(Diğer) Puanı** | | | |

**Bilgisayar Bilgisi**

| Program | Kullanma becerisi |
|---|---|
| Microsoft Word | İyi |
| Microsoft Excel | İyi |
| Microsoft Powerpoint | İyi |

**Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri**

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Seyahat, Kitap Okuma, Spor Yapma, Fotoğraf Çekme, Yazı yazma