

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Corynebacterium*
SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

UZMANLIK TEZİ

DR. YAŞAR FAİK İSKEFYELİ

TRABZON-2021

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Corynebacterium*
SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Uzmanlık Tezi

DR. YAŞAR FAİK İSKEFYELİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. ALİ OSMAN KILIÇ

TRABZON-2021

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a, Prof. Dr. Faruk AYDIN, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Prof. Dr. İlknur TOSUN, Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK, Prof. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU, Doç. Dr. Irmak BARAN, Dr. Öğr. Üyesi Esra ÖZKAYA ve Prof. Dr. Ersan KALAY'a; birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tüm Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına; bilgi ve tecrübeleriyle her daim yanımda olan Arş. Gör. İnci DURUKAN ve Arş. Gör. Ümit UZUN'a teşekkür ederim. Maddi ve manevi desteklerini her an yanımda hissettiğim sevgili aileme ve Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KALKAN'a sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmamı Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ yönetiminde TTU-2020-8784 kodlu proje ile destekleyen KTÜ Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkür ederim.

Dr. Yaşar Faik İSKEFYELİ

TRABZON-2021

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına Ocak 2017- Şubat 2020 tarihlerinde değişik kliniklerden gönderilen çeşitli örneklerden klinik etken olarak izole edilmiş *Corynebacterium* cinsine ait 117 suşun antibiyotik dirençliliğinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Metod: Bakteri identifikasyonu MALDI-TOF MS ile gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik direnç genlerinin moleküler karakterizasyonu için tüm suşlarda EUCAST önerileri doğrultusunda KirbyBauer disk difüzyon yöntemiyle eritromisin, klindamisin, penisilin, siprofloksasin, gentamisin ile tetrasiklin, rifampisin, vankomisin ve linezolid dirençliliği fenotipik olarak gösterilmesini takiben bu antibiyotiklere dirençten sorumlu genlerin (*ermB*, *ermX*, *ermA*, *ampC*, *mefA/E*, *gyrA*, *tetM*, *acc(3)-XI*) varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve kinolon direncinden sorumlu *gyrA* geni mutasyonları DNA dizi analizi ile saptandı.

Sonuç: Şuşların 46'sı (%39,3) solunum yolu örneklerinden, 38'i (%32,4) yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiş ve 95'i (%81) *C. striatum* olarak tanımlanmıştır. Şuşların 114'ü (%97,4) penisilin ve siprofloksasin, 112'si (%95,7) klindamisin, 105'i (%90,5) tetrasiklin 89'u (%76) gentamisin, ve 68'i (%58,1) eritromisin dirençli olup vankomisin ve linezolide duyarlılık %100 saptanmıştır. Şuşların 116'sında (%99,1) *ermX*, 10'unda (%8,5) *ermB* ve 103'ünde (%88,1) *acc(3)-XI* gen varlığı gösterilmiş olup *ermA*, *tetM*, *ampC* ve *mefA/E* genleri saptanmamıştır. Şuşların 50'sinde (%42,7) *gyrA* genlerindeki mutasyonlar taranmış ve 17'sinde (%33,3) 87-fenilalanin ve 91-alanin mutasyonu; 22'sinde (%43,1) ise 87-fenilalanin ve 91-glisin mutasyonu tespit edilmiştir. Bir *C. striatum* ile beş *C. aurimucosum* suşunun *gyrA* genlerinin 99-prolin mutasyonu literatürde ilk kez bu çalışmada tespit edilmiş olup, bu mutasyonla beraber 87-izolösin mutasyonunun, tek başına 99-prolin mutasyonuna göre siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerini arttırdığı gözlenmiştir. Bu mutasyon 87-valin mutasyonu ile meydana geldiğinde ise tek başına 99-prolin mutasyonuna göre siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerini düşürdüğü saptanmıştır.

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to perform the molecular characterization of antibiotic resistance of 117 strains of the genus *Corynebacterium* isolated as clinical agents from various samples sent from different clinics to Karadeniz Technical University, Faculty of Medicine, Medical Microbiology laboratory between January 2017 and February 2020.

Method: Bacteria identification was performed with MALDI-TOF MS. For the molecular characterization of antibiotic resistance genes, in accordance with EUCAST recommendations, erythromycin, clindamycin, penicillin, ciprofloxacin, gentamicin and tetracycline, rifampicin, vancomycin and linezolid resistance were demonstrated phenotypically by KirbyBauer disk diffusion method and the genes responsible for resistance to these antibiotics (*ermB*, *ermA*, *ermX*, *ampC*, *mefA/E*, *gyrA*, *tetM*, *acc(3)-XI*), the presence of polymerase chain reaction (PCR) and the *gyrA* gene mutations responsible for quinolone resistance were determined by DNA sequence analysis.

Conclusion: Forty-six (39,3%) strains were isolated from respiratory tract samples, 38 (32,4%) were isolated from intensive care units, and 95 (81%) were identified as *C. striatum*. Of the strains, 114 (97,4%) were penicillin and ciprofloxacin, 112 (95,7%) clindamycin, 105 (90,5%) tetracycline 89 (76%) gentamicin, and 68 (58%) strains were resistant to erythromycin, and sensitivity to vancomycin and linezolid was 100%. The presence of *ermX* gene in 116 (99,1%) strains, *ermB* gene in 10 (8,5%) and *acc(3)-XI* gene in 103 (88,1%) strains were found to be *ermA*, *tetM*, *ampC* and *mefA/E* genes were not detected. Mutations in *gyrA* genes were screened in 50 (42,7%) of the strains, and 87-phenylalanine and 91-alanine mutations in 17 (33,3%) strains; In 22 (43,1%) 87-phenylalanine and 91-glycine mutations were detected. The 99-proline mutation of the *gyrA* genes of one *C. striatum* and five *C. aurimucosum* strains was detected for the first time in the literature in this study, and it was observed that the 87-isoleucine mutation together with this mutation increased the MIC of ciprofloxacin and moxifloxacin compared to the 99-proline mutation alone. It was determined that ciprofloxacin and moxifloxacin decreased the MIC value when this mutation occurred with the valine mutation in the 87th region.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İç Kapak Sayfası	
ONAY	
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Corynebacterium</i> tarihçesi	2
2.2. <i>Corynebacterium</i> 'ların sınıflandırılması	2
2.3. <i>Corynebacterium</i> 'ların mikrobiyolojik ve kültürel özellikleri	3
2.4. <i>Corynebacterium</i> 'ların identifikasyonu	4
2.4.1. Manuel biyokimyasal tanımlama sistemleri	4
2.4.2. Otomatik tanımlama sistemleri	5
2.5. <i>Corynebacterium</i> 'ların antimikrobiyal duyarlılık testleri	7
2.6. Bazı <i>Corynebacterium</i> türleri, özellikleri ve klinik hastalıklarla ilişkileri	7
2.6.1. <i>Corynebacterium striatum</i>	8
2.6.2. <i>Corynebacterium afermentans</i>	10
2.6.3. <i>Corynebacterium amycolatum</i>	11
2.6.4. <i>Corynebacterium aurimucosum</i>	12
2.6.5. <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	13
2.6.6. <i>Corynebacterium jeikeum</i>	13
2.6.7. <i>Corynebacterium singulare</i>	14
2.7. Antimikrobiyal direnç mekanizmaları	15
2.7.1. Beta-Laktam direnci	15
2.7.2. MLSB direnci (Makrolid, linkozamid ve streptogramin B)	16

2.7.3. Kinolon direnci	18
2.7.4. Aminoglikozid direnci	19
2.7.5. Tetrasiklin direnci	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. <i>Corynebacterium</i> 'ların izolasyonu ve identifikasyonu	21
3.2. <i>Corynebacterium</i> 'ların saflaştırılması ve saklanması	21
3.3. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması	21
3.3.1. Disk Difüzyon yöntemi ile duyarlılık belirleme	21
3.3.2. Gradient strip test (E test) yöntemi ile siprofloksasin ve moksifloksasin MİK Belirleme	22
3.3.3. Sıvı dilüsyon yöntemi ile siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerlerinin belirlenmesi	23
3.4. Kromozomal DNA izolasyonu	24
3.5. PZR ile direnç geni taranması	25
3.5.1. Primerlerin hazırlanışı	25
3.5.2. Gen bölgelerinin amplifikasyonu	26
3.5.3. Agaroz jel elektroforezi	27
3.5.4. Sekanslama yapılacak suşların PZR ürünlerinin temizlenmesi	27
3.5.5. Temizlenmiş PZR ürünlerinin DNA dizi analizi ile belirlenmesi	28
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	80
7. KAYNAKÇA	82
8. ÖZGEÇMİŞ	108

KISALTMALAR DİZİNİ

AAC	: Aminoglikozit Asetil Transferaz
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AcCoA	: Asetil Koenzim A
ANF-1	: Coryneform Absolute Nonfermenting Group 1 Bacteria
CIP	: Siprofloksasin
CFU	: Colony Forming Units
CLSI	: The Clinical and Laboratory Standards Institute
CAMP	: Christie, Atkins, Munch-Peterso
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GSBL	: Genişlemiş Spekturumlu Beta-Laktamaz
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
HMW PBP	: Yüksek Moleküler Ağırlıklı Penisilin Bağlayıcı Proteinler
ID	: Tanımlama
IU	: International Unit (internasyonal-uluslararası ünite)
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MALDI-TOF	: Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu
mesoDAP	: Meso-Diaminopimelik Asit
MBK	: Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MLSB	: Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B
MOXI	: Moksifloksasin
QRDR	: Kinolon Direnci Belirleme Bölgesi
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
RNA	: Ribonükleik Asit
RPP	: Ribozom Koruma Proteinleri
mRNA	: Messenger Ribonükleik Asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

TAE : Tris-Asetik Asit-EDTA
UK : Birleşik Krallık



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. <i>Corynebacterium</i> Türleri ve Özellikleri	8
Tablo 2. PZR Deneylerinde Kullanılan Oligonükleotid Primerler	26
Tablo 3. <i>Corynebacterium</i> Cinslerinin İzole Edildiği Örneklerin Alındığı Hastalarla İlgili Cinsiyet ve Yaş Oranları	30
Tablo 4. <i>C. striatum</i> İzole Edilen Örneklerin Servislere Göre Dağılımı	31
Tablo 5. <i>C. striatum</i> İzole Edilen Örneklerin Dağılımı	32
Tablo 6. <i>C. striatum</i> İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları	32
Tablo 7. <i>C. striatum</i> İzolatlarında <i>gyrA</i> ve Bazı Direnç Geni Varlığı Oranları	33
Tablo 8. <i>C. striatum</i> İzolatlarının Gen Varlığına Göre Antimikrobiyal Duyarlılık Durumları	35
Tablo 9. <i>C. striatum</i> Suşlarında <i>gyrA</i> Aminoasit Değişimi ve Siprofloksasin ve Moksifloksasin Gradient Strip Test ve Sıvı Dilüsyon Testi MİK Sonuçları	41
Tablo 10. İzole Edilen <i>C. afermetans</i> , <i>C. amycolatum</i> , <i>C. aurimucosum</i> , <i>C. pseudodiphtheriticum</i> , <i>C. jeikeum</i> ve <i>C. singulare</i> Örneklerin Servislere Göre Dağılımı	43
Tablo 11. <i>C. afermetans</i> , <i>C. amycolatum</i> , <i>C. aurimucosum</i> , <i>C. pseudodiphtheriticum</i> , <i>C. jeikeum</i> ve <i>C. singulare</i> İzole Edildiği Klinik Örneklerle Göre Dağılımı	44
Tablo 12. <i>C. afermetans</i> , <i>C. amycolatum</i> , <i>C. aurimucosum</i> , <i>C. pseudodiphtheriticum</i> , <i>C. jeikeum</i> ve <i>C. singulare</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	45
Tablo 13. <i>C. afermetans</i> , <i>C. amycolatum</i> , <i>C. aurimucosum</i> , <i>C. pseudodiphtheriticum</i> , <i>C. jeikeum</i> ve <i>C. singulare</i> İzolatlarının Direnç Geni Varlığı Durumları	46
Tablo 14. <i>Corynebacterium afermetans</i> izolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları	47

Tablo 15. <i>Corynebacterium amycolatum</i> İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları	49
Tablo 16. <i>Corynebacterium aurimucosum</i> İzolatlarının Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları	51
Tablo 17. <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları	53
Tablo 18. <i>Corynebacterium jeikeum</i> İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları	55
Tablo 19. <i>Corynebacterium singulare</i> İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları	57
Tablo 20. <i>C. afermetans</i> , <i>C. amycolatum</i> , <i>C. aurimucosum</i> , <i>C. pseudodiphtheriticum</i> , <i>C. jeikeum</i> ve <i>C. singulare</i> Suşlarında <i>gyrA</i> Aminoasit Değişimi ve Siprofloksasin ve Moksifloksasin Gradient Strip Test ve Sıvı Dilüsyon Testi MİK Sonuçları	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>ErmA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermX</i> , <i>aac(3)-XI</i> , ve <i>tetM</i> genlerinin pozitif kontrol suşları ve negatif kontrol için kullanılan şuşların agaroz jelde PZR görüntüsü	34
Şekil 2. Bazı <i>Corynebacterium</i> türlerinin <i>gyrA</i> genlerinin agaroz jelde PZR görüntüsü	36
Şekil 3. Kinolon duyarlı <i>C. striatum</i> ATCC 6940 suşunun <i>gyrA</i> geni ile <i>C. striatum</i> TCST 29 suşunun <i>gyrA</i> gen dizilimlerinin karşılaştırılması	37
Şekil 4. <i>C. striatum</i> TCST 29 suşunun siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip testi	38
Şekil 5. Bazı <i>Corynebacterium</i> türlerinin siprofloksasin sıvı mikrodilüsyon testi sonuçları	39
Şekil 6. Kinolon duyarlı <i>C. striatum</i> ATCC 6940 ve <i>C. striatum</i> TCST 77 suşunun <i>gyrA</i> gen dizilimlerinin karşılaştırılması	40
Şekil 7. Kinolon duyarlı <i>C. striatum</i> TCST 13 ve dirençli <i>C. striatum</i> TCST 14'ün <i>gyrA</i> gen sekansının kromatogramlarının karşılaştırılması	42
Şekil 8. Kinolon duyarlı <i>C. striatum</i> ATCC 6940, ve <i>C. aurimucosum</i> TCAU 4 suşlarının <i>gyrA</i> gen dizilimlerinin karşılaştırılması	59
Şekil 9. <i>C. striatum</i> TCST 13 ve <i>C. aurimucosum</i> TCAU 4'ün <i>gyrA</i> gen sekansının kromatografik karşılaştırılması	60
Şekil 10. TCAU 8 suşunun siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip testi	61
Şekil 11. <i>C. striatum</i> TCST 7 suşu <i>ermX</i> DNA dizisinin BLAST analizi	64
Şekil 12. <i>C. striatum</i> TCST 7 suşu <i>aac(3)-XI</i> DNA dizisinin BLAST analizi	65

1. GİRİŞ

Antibiyotiklerin aşırı ve kontrolsüz kullanımı antibiyotik dirençli bakterilerin yaygınlaşmasına neden olmuştur. Bunun sonucu insan ve hayvanlarda enfeksiyon etkeni olan pek çok patojene karşı terapötik seçenekler sınırlanmıştır. Cildin ve üst solunum yollarının normal flora elemanlarından biri olan *Corynebacterium* türleri son yıllarda giderek artan bir şekilde solunum yolu, endokardit, osteomyelit, cerrahi alan ve protez-eklem enfeksiyonları etkeni olarak rapor edilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu suşların glikopeptidler ve linezolid dışında başta beta-laktam antibiyotikler olmak üzere, aminoglikozid, kinolon, makrolid, linkozamid grubu ve tetrasiklinler gibi çeşitli antimikrobiyallere karşı yüksek oranda dirençli oldukları bildirilmiştir.

Bu çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına Ocak 2017-Şubat 2020 tarihlerinde değişik kliniklerden gönderilen balgam, trakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj, kan, idrar, yara, diğer steril vücut sıvıları ile kateter örneklerinden klinik etken olarak izole edilmiş *Corynebacterium* cinsine ait 117 suşun antibiyotik dirençliliğinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlandı. Antibiyotik direnç genlerinin moleküler karakterizasyonu için tüm suşlarda eritromisin, klindamisin ve streptogramin B (MLSB), penisilin, siprofloksasin, gentamisin ile tetrasiklin dirençliliği fenotipik olarak gösterilmesini takiben bu antibiyotiklere dirençten sorumlu genlerin (*ermB*, *ermX*, *ermA*, *ampC*, *mef(A/E)*, *gyrA*, *tetM*, *acc(3)-XI*) varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve DNA sekans analizi ile gerçekleştirildi. Kinolon direncinden sorumlu DNA giraz alt ünite A mutasyonları (*gyrA*) DNA dizi analizi ile belirlendi.

Bu çalışma ile, ülkemizde özellikle son yıllarda yoğun bakım hastalarında alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE) etkeni olarak sıklıkla izole edilen *Corynebacterium* suşlarının antibiyotik direnç genlerinin varlığının fenotipik direnç ile ilişkisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçların ulusal antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesine ve tedavide uygun antibiyotik seçimine katkı sağlanması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Corynebacterium* tarihçesi

Corynebacterium cinsine ait ilk veriler 1800'lü yıllara dayanmaktadır. *Corynebacterium* cinsi, Lehmann ve Neumann tarafından 1896'da difteri oluşumundan sorumlu Gram pozitif basilleri içeren taksonomik bir grup olarak tanımlanmıştır (1, 2). *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 kol oluşturarak taksonomideki yerini almıştır. Birçok biyotik ve abiyotik habitatlarda saprofit olarak bulunduklarından, *Corynebacterium*'lar klinik olarak önemsiz kabul edilmiş ve klinik mikrobiyologlardan çok az ilgi görmüştür (2). Klinik örneklerden izole edilen korineform bakteriler sistematik olarak ilk defa Hollis ve Weaver tarafından incelenmiştir (3). Hollis ve Weaver, gram pozitif basillerin tanımlanmasına ilişkin bir rehber oluşturmuş ve oluşturmuş oldukları rehber, klinik izolatları belirlemeyi amaçlayan klinik mikrobiyologlar için bir kaynak olmuş ve daha sonraki korineform bakteriler üzerine yapılan taksonomik araştırmaların temelini oluşturmuştur (3, 4).

2.2. *Corynebacterium*'ların sınıflandırılması

Lehmann ve Neumann tarafından (5), 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, taksonomiye 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. Son on yılda moleküler uygulamaların (16S rRNA gen 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 (6). Son verilere göre *Corynebacterium* cinsi 100'den fazla heterojen tür ve alt tür içermektedir (7). Bu türlerden yaklaşık 55 tanesi insanlarda enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir (8).

2.3. *Corynebacterium*'ların mikrobiyolojik ve kültürel özellikleri

Corynebacterium cinsi heterojen özellikte türlerden oluşan bir bakteri grubudur. Lehmann ve Neumann 1896 yılında *Corynebacterium* cinsini, uçları çoğunlukla şişkin olan basil morfolojisinde, agarda büyüeyebilen, yumuşak ve yapışmaz koloniler olarak tasvir etmişlerdir. 1918 yılında Kiskalt ve Berend (9) ise mikroskopik olarak yığın halinde kümeleşen, düzensiz boyanan, çit ya da V-formunda sıralanma eğiliminde olan organizmalar olarak tasvir etmişlerdir. Bu cinsin klasik mikroskopik görüntüsü, tek başlarına ya da çiftler halinde dizilim göstererek birbirine paralel olmayan, bazen uçları biraz daha geniş, "bahçe çiti" veya "Çin harfi" şeklini oluşturma eğiliminde olan tokmak benzeri basiller şeklinde tasvir edilmektedir (9, 10). *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 basillerden oluşmaktadır (11). *Corynebacterium bovis*, *C. aurimucosum*, *C. doosanense* ve *C. maris* dışındaki diğer türler oksidaz negatiftir (12). *Corynebacterium* türlerinin çoğu, hücre duvarlarında korinomikolik asit olarak adlandırılan kısa zincirli mikolik asitler (22-38 karbon atomu) ve arabinogalakattan olarak adlandırılan arabinoz ile galaktoz bulundurlar (10).

Corynebacterium türleri, 35-37°C'de CO₂'li veya CO₂'siz ortamda, çikolatamsı ve %5 koyun kanlı agarda genellikle 18-24 saatte belirgin S tipi koloniler oluştururlar (13). Klasik koloni morfolojisi ve hemoliz varlığı, bazı türlerde at kanı içeren besiyeri ortamından ziyade %5 koyun kanı içeren besiyeri ortamında daha iyi üreme gösterirler (8). 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 (14).

2.4. *Corynebacterium*'ların identifikasyonu

2.4.1. Manuel biyokimyasal tanımlama sistemleri

Corynebacterium enfeksiyonlarının laboratuvarında teşhisini kolaylaştırmak için API Coryne (BioMerieux, Lyon, Fransa), RapID CB Plus (Remel/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), BBL Crystal Gram Positive ID System (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), MICRONAUT-RPO (Merlin Diagnostics, Bomheim, Almanya) gibi biyokimyasal testlere dayalı çeşitli tanımlama sistemleri geliştirilmiştir. Genel olarak sistemler, biyokimyasal reaksiyonlar için substratlar içeren mikrotüplere ayrılmış plaklardan oluşmuştur (15).

API Coryne sistemi 11 enzimatik test ve 8 karbonhidrat fermentasyon testi olmak üzere 21 biyokimyasal testten oluşur. Toplamda 26 *Corynebacterium* türünün tanımlanmasını sağlar (16). RapID CB Plus sistemi 4 karbonhidrat kullanım testi ve 15 enzimatik testten oluşur. *Corynebacterium* türlerinin 23'ünü tanımlar (17). Bu iki sistemin değerlendirilmesi, suşların sırasıyla %97,6 ve %95'inin doğru şekilde tanımlandığını göstermiştir (16, 18).

BBL Crystal Gram Positive ID System ve BBL Crystal Rapid Gram Positive ID System, 20 enzimatik ve 9 karbonhidrat kullanım testi içerir. Testlerin sonuçları sırasıyla 18–24 ve 4 saat inkübasyondan sonra okunur. BBL Crystal Gram Positive ID System veritabanı 13 ve BBL Crystal Rapid Gram Positive ID System veritabanı 7 *Corynebacterium* türünü içerir (15).

API Coryne, RapID CB Plus ve BBL Crystal karşılaştırmasında, en hassas testin API Coryne sistemi olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, yine de tüm *Corynebacterium* izolatları sistem tarafından tanımlanmamıştır ve izolatların birçoğu yanlış tanımlanmıştır. Tanımlamadaki başarısızlık, çoğunlukla sistemin veritabanında bulunan sınırlı sayıda veri girişi ile ilgilidir (19).

DNA'ya bağımlı RNA polimeraz beta alt birimini kodlayan *rpoB* geninin sekanslanması, *Corynebacterium* türlerinin belirlenmesi için altın standart bir yaklaşım olarak kabul edilir. Ancak zaman alıcı ve pahalıdır (20).

Corynebacterium türlerinin 16S rRNA geninin düşük polimorfizm göstermesi nedeniyle, doğru moleküler tanımlama için tüm 16S rRNA geninin (1500 bp)

dizilenmesi gereklidir (21). Khamis ve ark.'nın (22) yaptığı çalışmada *Corynebacterium* türlerinin identifikasyonunda *rpoB* sekanslama (%91), 16S rRNA gen sekanslamasına (%81) kıyasla daha yüksek identifikasyon oranı göstermiştir. *RpoB* geni ve 16S rRNA geninin dizilenmesi, tanımlamada belirsiz durumları çözmek için yararlıdır. Bununla birlikte, genellikle rutin teşhis için kullanılmamaktadır (21).

2.4.2. Otomatik bakteri tanımlama sistemleri

Bakteriyel izolatların tanımlanması için otomatik sistemler, çoğu klinik laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Piyasada bulunan sistemler biyokimyasal reaksiyonlar, yağ asidi analizi, DNA dizi analizi gibi farklı yaklaşımlara dayanmaktadır.

VITEK 2 (BioMerieux, Hazelwood, MO, USA), büyümeye dayalı teknolojiyi kullanan otomatik bir mikrobiyoloji sistemidir. Sistem, otomatik olarak inkübe edilen ve yorumlanan kolorimetrik reaktif kartlarını içerir. Anaerop ve *Corynebacterium* türlerini tanımlamaya ayrılmış kart ANC kartıdır. ANC kartı, kromojenik substratlar içeren 64 kuyucuğa sahiptir. İnkübasyon sırasında, her bir test reaksiyonu, bulanıklık veya substrat metabolizmasının renkli ürünlerini ölçmek için her 15 dakikada bir okunur. Sistem veri kütüphanesinde sekiz *Corynebacterium* türü bulunmaktadır (23, 24).

BD Phoenix System (Becton Dickinson, Gurgaon, India), gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hızlı tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi için tam otomatik bir sistemdir. Sistem ayrıca kolorimetrik ve florometrik reaksiyonlara dayanmaktadır. İnkübasyon sırasında her test reaksiyonu tekrar tekrar okunur. Tanımlamanın sonuçları 3 saat içinde ve MIC sonuçlarının çoğu 6-10 saat içinde elde edilir. BD Phoenix Sisteminin ID veri tabanı 15 *Corynebacterium* türünü içerir. (25).

MicroSeq Mikrobiyal Tanımlama Sistemi (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 16S bölgesinin karşılaştırmalı rDNA sekanslamasına dayanan bir genotipik tanımlama sistemi olup, bakterileri 24 saat içinde tanımlar. Sistem, rDNA'nın ilk 527 bp'sini kullanarak rutin bakteriyel tanımlama veya tam 1500 bp bölgeye dayalı daha yüksek çözünürlüklü tanımlama seçeneği sunar. MicroSeq kütüphanesi 50 *Corynebacterium* türünü içerir (26). Tang ve ark. (27), 42 klinik *Corynebacterium* izolatını MicroSeq sistemi ile değerlendirdikleri çalışmada, tüm

izolatlarda cins seviyesinde tanımlama için uyumlu sonuçlar sağlamıştır. Ancak izolatların yalnızca %64,3'ü tür düzeyinde tanımlanmıştır. Woo ve ark. (28) tıbbi açıdan önemli *Corynebacterium* türlerinin yalnızca %29'unun 500-MicroSeq veritabanı kullanılarak güvenle tanımlandığını göstermiştir.

Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu-kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS), protein profillerine dayalı yüksek verimli bir teknolojidir. Test edilen organizmanın kütle spektrumu, en yakın eşleşmeyi bulmak için veri tabanlarındaki referans spektrumlarıyla karşılaştırılır (29). MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya), Vitek MS (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve Andromas sistemi (Andromas SAS, Paris, Fransa) dahil olmak üzere mikrobiyal tanımlama için farklı MALDI-TOF MS sistemleri geliştirilmiştir (30, 31).

MALDI-TOF MS tanımlama sistemleri temel olarak numune hazırlama prosedürlerinde, referans veri tabanının tür kapsamı ve yazılımın tanımlama algoritmasında farklılık gösterir (32, 33, 34, 35). Direkt koloni transferi, direkt koloni transferi-formik asit işlemi ve etanol-formik asit tüp ekstraksiyonu gibi farklı örnek hazırlama yöntemleri tanımlanmıştır (31).

MALDI-TOF MS analizi, mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Corynebacterium* tanımlaması için rutin olarak kullanılmaktadır. Birkaç çalışma, *Corynebacterium* türlerinin çoğunun cins ve tür düzeylerine göre doğru şekilde tanımlandığını göstermiştir. *Corynebacterium* türlerinin tür tanımlama oranları geleneksel fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında MALDI-TOF MS'de daha çok sayıda izolatın tanımlandığı belirtilmiştir (36, 37, 38, 39).

Biolog Mikrobiyal Tanımlama Sistemleri (Biolog Inc., Hayward, CA, ABD) piyasada manuel, yarı otomatik veya tam otomatik sistemler olarak mevcuttur. Biyolog Sistemleri, biyokimyasal tanımlamaya dayanmaktadır ve 56 *Corynebacterium* türü, sistemin kitaplığına dahil edilmiştir. Bununla birlikte, *Corynebacterium* türleri için Biolog Sisteminin yüzde doğruluğunun geleneksel biyokimyasal mikrobiyal tanımlama yöntemlerine kıyasla korelasyonu %70,1'dir (40).

2.5. *Corynebacterium*'ların antimikrobiyal duyarlılık testleri

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) (2006) nadir olarak izole edilmiş veya güç üreyen bakterilerin antimikrobiyal seyreltme ve disk duyarlılık testi

için ilgili yöntemleri bir kılavuz halinde bildirmiştir (41). Bu kılavuz, *Corynebacterium* türlerinin sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi için bilgi ve yorumlayıcı kriterler sağlamıştır. Bununla birlikte, disk difüzyon testi için yorumlayıcı bir kriter yoktur. Test koşulları, yeterli gelişim için liz edilmiş at kanı takviyeli Mueller-Hinton broth gerektirir. Ayrıca besiyeri, daptomisin testi için 50 µg/mL kalsiyum içermelidir. Kullanılan antimikrobiyal ajanlar penisilin, sefotaksim (sefepim, seftriakson), imipenem (meropenem), vankomisin, daptomisin, gentamisin, eritromisin, siprofloksasin, doksisiklin (tetrasiklin), klindamisin, klindamisin-trolidin şeklinde belirtilmiştir. Penisilin ve eritromisin için yorumlayıcı kriterler, *Corynebacterium* türlerinin minimum inhibitör konsantrasyonlarından (MİK) tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, sefalosporin, linezolid ve diğerleri için yorumlama kriterleri, CLSI dokümanı M100'de yayınlanan *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Staphylococcus* türleri için olanlardan uyarlanmıştır. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST), *Corynebacterium* türleri için MİK'lerin ve zon çaplarının yorumlanması için bir kırılma noktası tablosu oluşturmuştur. CLSI'dan farklı olarak, EUCAST disk difüzyon yöntemi için yorumlama kriterlerini içerir. Besiyerinde % 5 defibrine horse blood ve beta-NAD 20 mg/L bulunması gereklidir (42).

2.6. Bazı *Corynebacterium* türleri, özellikleri ve klinik hastalıklarla ilişkileri

Temel olarak nonlipofilik-nonfermentatif korinebakteriler, nonlipofilik-fermentatif korinebakteriler ve lipofilik korinebakteriler olarak üç başlık altında incelenebilirler.

Tablo 1. *Corynebacterium* Türleri ve Özellikleri

Nonlipofilik- Nonfermentatif	Nonlipofilik-Fermentatif	Lipofilik
<i>C. afermentans</i> subsp.	<i>C. argenteratense</i>	<i>C. accolens</i>
<i>afermentans</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. afermentans</i> subsp.
<i>C. auris</i>	<i>C. diphtheria</i>	<i>lipophilum</i>
<i>C. propinquum</i>	<i>C. glucuronolyticum</i>	<i>C. bovis</i>
<i>C. pseudodiphthericum</i>	<i>C. matruchotii</i>	<i>C. jeikeum</i>
	<i>C. minitissimum</i>	<i>C. macginleyi</i>
	<i>C. mucifaciens</i>	<i>C. urealyticum</i>
	<i>C. ulcerans</i>	CDC korineform grup F-1
	<i>C. pseudotuberculosis</i>	CDC korineform grup G
	<i>C. xerosis</i>	<i>C. genitalium</i>
	<i>C. striatum</i>	<i>C. pseudogenitalium</i>
		<i>C. tuberculostearicum</i>

2.6.1. *Corynebacterium striatum*

Corynebacterium striatum (*C. striatum*), insanlarda deri ve mukoza zarının normal florasının bir parçasıdır. Klinik örneklerden izole edildiğinde genellikle bir kontaminant olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte hem bağışıklığı baskılanmış hem de bağışıklığı yeterli konakçılarda patojeniteye sahip olabilir (43). *C. striatum* ilk kez 1980'de plöropulmoner enfeksiyona neden olan bir patojen olarak bildirildiğinden, çeşitli enfeksiyonlar ve nozokomiyal salgınlarla ilişkilendirilmiştir (44). Bu nedenle, organizmalar solunum yolu enfeksiyonu (45), enfeksiyöz endokardit (46, 47), artrit (48), selülit (49), kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (50, 51), menenjit (52), deri enfeksiyonu (53), osteomyelit (54), apse (55) ve yara enfeksiyonundan (56) sorumlu olmuştur. *C. striatum*'un neden olduğu enfeksiyöz endokardit, sepsis veya menenjit dahil olmak üzere bu enfeksiyonların birkaçının önemli bir yönü, tıbbi cihazlar gibi nozokomiyal bir risk faktörü ve altta yatan immünosupresif koşullar ile ilişkidir (57).

Ayrıca, birden fazla yerde klinik olarak önemli enfeksiyonlara neden olabilir (58, 59). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan ve yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda *C. striatum* nozokomiyal salgınlarına ilişkin raporlar alınmıştır (60, 61). Bu çalışmalar, enfekte hastalarda en sık görülen komorbiditenin KOAH olduğunu göstermiştir. Bu, uzun süreli solunum yolu ekipmanı kullanımı ile kronik akciğer hastalığının, *C. striatum*'un solunum enfeksiyonuna veya kolonizasyonuna katkıda bulunabileceği anlamına gelmektedir. Ayrıca, *C. striatum*, antibiyotiklere tekrar tekrar maruz kalma veya invazif prosedürler gibi spesifik koşullarda patojeniteye sahiptir. Ayrıca, birkaç çalışma, *C. striatum*'un tıbbi personelin elleri aracılığıyla hastadan hastaya bulaşabileceğini bildirmiştir (61, 62). Bu nedenle, el hijyeninin uygulanması ve kısa süreli terapötik cihazlar veya antibiyotiklerin uygulanması, nozokomiyal enfeksiyonu önleyici olarak kabul edilen önemli faktörlerdir. Bununla birlikte, bu suşlar genellikle ayakta tedavi ortamlarında izole edilmiştir (63).

C. striatum enfeksiyonu her yaşta ve çeşitli bölgelerde ortaya çıkabilir, ancak erkek hastalarda daha yaygındır. Erkeklerin cildindeki fazla sebum çıkışı *C. striatum* gibi lipofilik difteroidlerin hayatta kalmasını destekleyebilir (64). *C. striatum* ile ilişkili virülans faktörleri sınırlıdır. Bununla birlikte, cilt bariyeri hasarı, tıbbi bir cihaz, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, altta yatan hastalık ve zayıf bağışıklık durumu enfeksiyon oluşumunu etkileyebilir. *C. striatum*'un birçok antimikrobiyal tedaviye dirençli olduğu bilinmektedir. Bu tür enfeksiyonları önlemek için, mümkünse herhangi bir yapay cihazın çıkarılması ve uzun vadeli antimikrobiyal ajanların kullanılmaması önerilmektedir (65, 66).

C. striatum'un klinik laboratuvarında rutin antimikrobiyal duyarlılık testini yapmak kolay değildir. *C. striatum*'un genellikle penisilin, sefazolin, imipenem ve vankomisin gibi çeşitli antimikrobiyal ajanlara duyarlı olduğunu ortaya konulmuştur (67). Bununla birlikte, birçok çalışmada çoklu ilaç direncinde bir artış bulmuştur (61, 63, 68). Yoo ve ark. (69)'nın yaptığı çalışmada çoklu ilaca dirençli *C. striatum*'un neden olduğu bakteriyemi tanımlanmıştır.

Başka bir çalışmada, *C. striatum*'un %87'si vankomisin, linezolid ve tetrasiklin dışındaki çoğu antimikrobiyal ajana dirençli olduğu belirtilmiştir (70). Birkaç

çalışmada, *Corynebacterium* enfeksiyonlarının, MİK değeri düşük olan daptomisin ile tedavi edilebileceği bildirilmiştir (71, 72).

Van Hal ve ark. (73), daptomisin direncinin, *S. aureus*'ta vankomisin için yüksek MİK ile yüksek oranda korelasyonlu olduğunu bildirmişlerdir, çünkü hücre duvarı kalınlaşması, daptomisinin hücre membranından geçişini azaltan dış membranın yükünü değiştirebilir. Daptomisine duyarlı ve dirençli *Corynebacterium* suşları arasında yük değişimi bulunmamıştır (74, 75).

C. striatum enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan diğer ajan linezolid'tir. Çünkü *Corynebacterium* türleri için direnç bildirilmemiştir. Bununla birlikte, bu ilaç, uzun süreli kürler sırasında uygulamanın kesilmesine neden olan %34 ila %80 oranında yan etki taşımaktadır (76).

Seftarolin, *C. striatum* dahil, yaygın olmayan gram-pozitif patojenler için araştırılmıştır (77, 78). Etkinliğin *C. striatum* ve diğer *Corynebacterium* türleri için değişken olduğu belirtilmiştir. Öte yandan McMullen ve ark. (79), direnç derecesinin değişken olmasına rağmen, *C. striatum*'un seftaroline dirençli olduğunu bildirmiştir. Direncin penisilin bağlayıcı proteinin modifikasyonundan kaynaklanabileceğini varsaymışlardır.

2.6.2. *Corynebacterium afermentans*

Corynebacterium afermentans (*C. afermentans*) nonlipofilik-nonfermentatif türlerden biridir. Hollis ve Weaver tarafından 1981 yılında 'CDC Tıbbi Önemi Olan Gram Pozitif Mikroorganizmalar Rehberi' içerisinde tanımlanmış pek çok taksondan biri de grup ANF-1 (coryneform absolute nonfermenting group 1 bacteria) bakterilerdir (80). *Turicella otitidis* ve *C. auris*, *C. afermentans*'a benzerliklerinden dolayı 'Grup ANF-1 benzeri bakteri olarak adlandırılmışlardır (81). Grup ANF-1 bakteriler hiçbir şekerden asit üretmeyen, üreaz aktivitesi de olmayan pleomorfik gram pozitif basillerdir. CDC Özel Bakteri Referans Laboratuvarı ANF-1 izolatlarının çoğunun kulak ve kan kültürü örneklerinden izole edildiğini bildirmiştir (3). Riegel ve ark. (80) ise *C. afermentans* izolatlarını sadece kan kültürlerinden izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Kantitatif DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda *C. afermentans*'ın iki alt tipe sahip olduğu ortaya çıkmıştır. CDC korineform grup ANF-1 bakterileri arasında

nonlipofilik, kolay üreyen *C. afermentans* subsp. *afermentans*'ın yanında lipofilik özellikte *C. afermentans* subsp. *lipophilum* da yer almıştır (81). Her iki alt tür aynı koda sahip olduğundan API Coryne strip ile iki alt türün ayrımı mümkün değildir. *Brevibacterium* spp. ve *Rhodococcus* spp. bakterilerinin bazı türleri de API Coryne strip testinde benzer karşılığı verebilirler (82). Basitrasin (0,04 IU), kolistin (10 µg), furazolidin (50 µg), novobiyosin (5 µg), O/129 (2,4-diamino-6,7-diizopropilpteridin) (150 µg) diskleri etrafında herhangi bir çapta zon oluşumu değerlendirildiğinde *C. afermentans* subsp. *afermentans*' ın tüm izolatları basitrasin, kolistin ve novobiyosin etrafında zon oluştururken; furazolidin etrafında zon oluşturmazlar ve O/129 etrafında zon oluşumu ise değişkendir. Tüm *C. afermentans* subsp. *lipophilum* izolatlarında ise basitrasin ve novobiyosin etrafında zon oluşumu görülürken, kolistin, O/129 ve furazolidin etrafında zon oluşumu ise değişkendir (83).

C. afermentans vücutta normal flora elemanı bulunur ancak Kumari ve ark. (84), supraserebellar kitlesi olan bir hastada beyin cerrahi operasyonu sonrası beyin absesi etkeni olarak raporlanmıştır. Carvalho ve ark. (85) ise *C. afermentans* 'ın kateter enfeksiyona neden olduğunu belirtmişlerdir. *C. afermentans* subsp. *lipophilum* 'un ise HIV'li bir hastada nekrozitan plöropulmoner enfeksiyona neden olduğu raporlanmıştır (86).

2.6.3. *Corynebacterium amycolatum*

Corynebacterium amycolatum (*C. amycolatum*), palisades şeklinde dizilmiş gram pozitif bir basildir. Diğer patojenik olmayan korinebakteriler *C. amycolatum*'a benzediğinden, izolatu tanımlamak için özen gösterilmezse mikrobiyolojik tanı sıklıkla gözden kaçmaktadır. Esteban ve ark. (87), daha önce *C. xerosis* olarak tanımlanan izolatların %82'sinin yeniden test edildiğinde aslında *C. amycolatum* olduğunu bildirmişlerdir.

C. amycolatum sepsisemi, endokardit, menenjit, septik artrit ve idrar yolu enfeksiyonları ile ilişkilidir (88). *C. amycolatum* en yaygın olarak yara sürüntülerinden (%61,5), idrardan (%14,3), dren sürüntülerinden (%7,1) izole edilir (89). Aalbaek ve ark. (90) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. amycolatum*'un otitis eksterna ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Endokardite neden olan *C. amycolatum*'un birden fazla antibiyotiğe dirençli olduğu bulunmuştur (91). Geniş spektrumlu antibiyotik

kullanımının *C. jeikeium* ve *C. amycolatum* türlerine bağlı olarak sepsiste artışa neden olduğunu belirten raporlar vardır (92). Cerrahi alan enfeksiyonları üzerine yapılan bir çalışmada enfeksiyonların %11,2'sinin *C. amycolatum* kaynaklı olduğu görülmüştür. Korinebakterilerin tümü çoklu ilaca dirençli olup izolatların %51,8'i sadece gatifloksasin ve vankomisine karşı duyarlı bulunmuştur (93). Reddy ve ark. (88)'nın yaptığı çalışmada, bu organizmaların penisilin, eritromisin ve klindamisine dirençli, ancak vankomisin, linezolid ve tigesikline duyarlı olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada 12 vakada seftriaksona %66,7 ve imipeneme %33,3 oranında direnç bulunmuştur. Bu nedenle, bu organizmalarla enfeksiyon durumunda tedavi modalitesini belirlemek için her izolat üzerinde bir antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılması önemlidir (94).

2.6.4. *Corynebacterium aurimucosum*

Corynebacterium aurimucosum (*C. aurimucosum*) taksonomik olarak 2002 yılında *Corynebacterium* cinsi içinde yeni türler olarak tanımlandı (95). Bu patojenin neden olduğu hastalığın spektrumu tam olarak belirlenememiştir. Bu suş, birkaç klinik örnekte izole edilmiş ve cilt aşınmasına veya eritramaya neden olabileceği belirtilmiştir (96). Ayrıca vajinal yol kolonizasyonuna ikincil olarak spontan abortuslarla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (97, 98). *C. aurimucosum*'un neden olduğu eklem enfeksiyonları, doğru karakterizasyona izin veren moleküler yöntemlerin uygulanmasından sonra önem kazanmaktadır (99, 100).

Ürogenital bölgelerden bazı izolasyon vakaları tanımlanmıştır, ancak hiçbir bakteriemi ile ilişkili değildir. Üretra darlığına sekonder olarak *C. aurimucosum*'un neden olduğu idrar yolu enfeksiyonu vakası tanımlanmıştır (101). Farklı numunelerde izole edilen gram pozitif basillerin retrospektif bir incelemesi, idrar örneklerinde klinik olarak anlamlı 3 *C. aurimucosum* izolasyonu ortaya koymuştur (59). Başka bir retrospektif çalışma, 246 kan örneği incelenmiş ve bunlardan yalnızca 4'ünden *C. aurimucosum* tanımlanmıştır. Aynı çalışmada, izolatın değerlendirilen önemi ile pozitif kan kültürü setlerinin sayısı, kültür pozitifliğine kadar geçen süre ve enfeksiyon hastalıkları konsültasyonu değerlendirildiğinde *C. aurimucosum* kontaminant olarak da değerlendirilmiştir. (102).

2.6.5. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

C. hofmannii olarak bilinen *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (*C. pseudodiphtheriticum*), aerobik gram pozitif bir basildir. *C. pseudodiphtheriticum*, en sık olarak pnömoni/trakeobronşit (103, 104, 105), akciğer absesi (106), nekrotizan trakeit (107), farenjit (108) ve rinosinüzit (109) gibi solunum yolu enfeksiyonuna neden olan bir enfeksiyöz ajan olarak kabul edilmiştir. Ayrıca endokardit (110, 111), deri enfeksiyonu (112), idrar yolu enfeksiyonu (113), kemik ve eklem enfeksiyonları (99, 114), diskit (115) ve konjunktivit/keratit (116) gibi diğer bölgelerde klinik olarak ilgili enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir.

C. pseudodiphtheriticum enfeksiyonu en yaygın olarak insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu dahil olmak üzere immün sistemi baskılanmış hastalarda (99, 117, 114), kronik akciğer hastalığı (104), kalp hastalığı (118), malignite (103, 119), diyabet (103, 105), nörolojik progresif hastalık (103), otoimmün hastalık (103, 115), endotrakeal entübasyon (105, 107) gibi morbidite faktörlerine sahip bireylerde tanımlanır. Bununla birlikte, komorbid durumlarla anlamlı ilişki kanıtlanmamıştır (120).

Ayrıca, *C. pseudodiphtheriticum* tarafından enfeksiyonun yönetiminin zor olmasının iki nedeni bulunmaktadır. Birincisi, bu mikroorganizma bir komensal ajan olduğundan ve bir kontaminant olabileceğinden, klinik örneklerde bulunduğu bu patojenin klinik ilişkisini değerlendirmek sorunlu olabilir (121). İkincisi ise *C. pseudodiphtheriticum*'un izolatına göre büyük ölçüde değişiklik gösterse de eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, kinolonlar ve trimetoprim/sülfametoksazol'e karşı direnç tanımlanmıştır. Bu durum tedaviyi zorlaştırabilir (122, 123, 124, 125).

2.6.7. *Corynebacterium jeikeum*

Corynebacterium jeikeum (*C. jeikeium*), insan deri florasının bir parçasıdır ve hastanede yatan hastalardan izole edilen en yaygın bakteriler arasındadır (126). Özellikle kolonizasyonu aksillayı etkiler ve nemli ortam kötü kokulu substratların oluşumunu destekler (127, 128). *C. jeikeium* vücudun her yerinde bulunabilir ve büyük ölçüde zararsızdır. Patojenik rakiplere karşı koymak için kullanılan bakteriyosin benzeri bileşiklerin üretimi sayesinde önemli epidermal koruma sağlar (129). Bununla birlikte *C. jeikeium* deri yaraları ve implante edilmiş tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonların yanı sıra özellikle hastanede yatan hastalarda nozokomiyal enfeksiyonların etiyolojik ajanı haline gelmiştir (97). Bozulmuş bağışıklık sistemi nedeniyle, komensal floraya ait olan ve düzenli olarak konakçı içinde yaşayan “yardımcı” mikroorganizmalar, hastalık durumu ile enfeksiyonların ortaya çıkmasına yol açan fırsatçı patojenlere dönüşebilir (130, 131). Kemoterapi tedavilerinden ya da riskli bir savunma mekanizmasından iyileşen kişiler incelendiğinde, bu nozokomiyal enfeksiyonların sayısı (endokardit, pnömoni, peritonit ve enteriti kapsayan) aslında son derece endişe vericidir (132, 133).

Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları, bildirilen *C. jeikeium* izolatlarının büyük bir kısmının klinik olarak ilgili antibiyotiklere önemli ölçüde çok dirençli olduğunu ve yalnızca vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin bu türe karşı evrensel olarak aktif kaldığını ortaya koymuştur (134). Şimdiye kadar, *C. jeikeium*'un antimikrobiyal ajanlara karşı çoklu direncinin moleküler temeli açıklanamamıştır. Bununla birlikte, birkaç çalışma, *C. jeikeium*'da plazmidlerin varlığını araştırmış ve çoklu dirençli fenotipin, kromozom dışı DNA ile ilişkili olmaktan ziyade bakteri kromozomu tarafından kodlandığını raporlamıştır (135, 136).

2.6.8. *Corynebacterium singulare*

Corynebacterium singulare (*C. singulare*) DSM 44357, insan semeni ve kan kültüründen izole edilen üreaz pozitif bir mikroorganizmadır. İlk olarak *C. minutissimum*'a benzeyen kolonilerin yapılan incelemesinde biyokimyasal analiz, DNA-DNA hibridizasyon analizi ve ribozomal DNA (rDNA) sekans analizi ile *C. singulare* CCUG 37330 olarak tanımlanmıştır (97). *C. singulare* gram pozitif, hareketsiz spor oluşturmeyan ve tipik V-şekilli formlarda görülen bir

mikroorganizmadır. Katalaz pozitif, oksidaz negatif ve fakültatif anaerobiktirler. (137). Bu suşun elde edilen antibiyotik direnç modeli, makrolidler, linkozamidler, aminoglikozidler, kloramfenikol ve tetrasiklini içerir. *C. singularis* DSM 44357'nin antibiyotik dirençleri, muhtemelen makrolid ve linkozamid için direnç geni *ermX*, kloramfenikol için dışa aktarıcı gen *cmx*, aminoglikozid için *aphA1-IAB* ve *strA-strB*, tetrasiklin için ise *tetA/B* olarak belirlenmiştir (138).

2.7. Antimikrobiyal direnç mekanizmaları

2.7.1. Beta-laktam direnci

Beta-laktam antibiyotiklerin beta-laktamazlarla hidrolizi, klinik olarak önemli bakterilerde bu sınıf antibakteriyel ajanlar için en yaygın direnç mekanizmasıdır. Ambler'in moleküler sınıflamasında ise bu enzimler nükleotid ve amino asit dizilerine göre dört ayrı sınıfa ayrılır (139). Sınıf A beta laktamazlar aktif bölgelerinde bir serin amino asidi bulunur. Temel substratları penisilinlerdir. Çoğu plazmidlerle taşınırlar. Sınıf B beta laktamazlar aktif bölgelerinde çinko bağımlı bir “thiol” grubu bulunur. Metalloenzimler olup çoğu karbapenemaz aktivitesi gösterirler. Beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler. Sınıf C beta laktamazlar aktif bölgelerinde serin aminoasidi taşırlar. Esas olarak sefalosporinaz niteliğindedirler. Kromozomal *ampC* geni tarafından kodlanırlar ve *ampC* tipi enzimler olarak da adlandırılırlar. *Salmonella* spp. hariç tüm gram negatif bakterilerde bulunurlar. Bu sınıftaki beta laktamazlar yapı olarak PBP'lere benzerler ve bundan dolayı bunların PBP'lerden köken aldığı düşünülmektedir. Sınıf D beta laktamazlar serin proteaz olup oksasilini hızla hidrolize edebilirler.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL'ler) karbapenem hariç olmak üzere penisilin, oksiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç sağlamakta, ancak bu enzimlerin hidrolitik aktiviteleri genellikle klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *AmpC* beta-laktamazlar sınıf C beta-laktamaz üretimine neden olup, karbapenem hariç olmak üzere daha geniş spektrumdaki beta-laktam antibiyotiklere direnç sağlamakta ve bu enzimlerin hidrolitik aktivitesi klavulanik asitle inhibe olmamaktadır. *ampC* direnci kromozomal veya plazmid kaynaklı olabilir (140, 141).

C. diphtheriae'nin toksik ve toksik olmayan suşlarında penisiline karşı ortak duyarlılık, difteri tedavisinde en sık reçete edilen antibiyotiklerden birinin penisilin

olmasını sağlamıştır. Bu görüşe rağmen, hiçbir etkinlik göstermediği vakalar da gözlemlenmiştir. Fenotipik testler, *C. diphtheriae* biyotip *gravis*'in toksik olmayan suşunun penisilin duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon yöntemi tarafından belirlendiği temeli oluşturmuştur (142). İki yöntemle yapılan araştırma, sonuçlarda %98 tutarlılık göstermiştir. Penisilin için MİK değerleri 0,064 ile 0,250 mg/l aralığında belirtilmiştir. MBK (Minimal Bakterisidal Konsantrasyon)-MBK50 ve MBK90 penisilin için sırasıyla 2,0 ve 8,0 olarak belirtilmiştir. Çalışmanın sonuçları, penisiline karşı duyarsızlığı (tolerans) göstermiştir. Böyle bir etki, endokardit vakasından izole edilen *C. diphtheriae* suşunda amoksisiline tolerans durumunda da gözlemlenmiştir (143).

Beta-laktam antibiyotiklere direnç gösteren *Corynebacterium* cinsinin farklı türlerinin fenotipik çalışmalarında bu tür antibiyotiklere karşı oluşan dirençler geniş çapta değişim göstermektedir. *C. jeikeium* ve *C. urealyticum* suşlarında penisiline (MİK90 >4 µg/ml), ampisilin (MİK90 >8 µg/ml), sefazolin, sefotiam, sefmetazol, sefepim (MİK >64 µg/ml) ve imipenem (MİK >32 µg/ml) karşı direnç bulunmuştur (144). *C. striatum*'un suşlarında penisilin (MİK90 = 16 µg/ml), ampisilin (MİK90 > 16 µg/ml), sefazolin, sefotiam, sefotaksim, imipenem direnç varlığı bildirilmiştir (145). Bir başka yapılan çalışmada ise beta-laktamlar arasında yalnızca imipenem, *C. striatum* ve *C. amycolatum* suşlarının çoğuna ve *C. jeikeium* ve *C. urealyticum* izolatlarının yaklaşık yarısına karşı aktif bulunmuştur (146). Beta-laktam antibiyotiklere direnç gösteren *Corynebacterium* cinsinin farklı türlerinin fenotipik ve genotipik çalışmalarının sonuçlarının analizine dayanarak, bu mikroorganizmalarda, yani beta-laktamaz üretimi ve penisilin modifikasyonu gibi her iki direnç mekanizması organizmasının meydana geldiği sonucuna varılabilir. 2017'de yapılan çalışmada penisiline dirençli 52 enfeksiyon etkeni *C. striatum* suşlarından 42'sinde *ampC* genine rastlanmıştır (147).

2.7.2. MLSB direnci (makrolid, linkozamid ve streptogramin B)

Makrolid, linkozamid ve streptogramin türevi antibiyotikler makrosiklik lakton halkasından ibaret ortak bir yapıya ve benzer antibakteriyel etkilğe sahip olmaları nedeni ile büyük bir antibiyotik familyası (MLS familyası) oluştururlar. Başlıca makrolid antibiyotikler eritromisin, klaritromisin ve azitromisindir. Linkozamid antibiyotikler ise linkomisin ve klindamisindir. Makrolidler ile gruplandırılmasının

nedeni, antibakteriyel spektrumunun, etki mekanizmasının ve klinik kullanışlarının benzeridir. Atipik makrolidler olan streptograminlerin iki türü olan kinupristin ve dalbopristin birlikte dirençli pnömokok ve bazı gram pozitif kok enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (148). Makrolid antibiyotikler duyarlı bakterilerin ribozomlarının 50S alt birimindeki peptidil t-RNA'nın bağlanma bölgesine geri dönüşümlü bir şekilde bağlanırlar. Böylece yeni sentez edilen peptidil t-RNA molekülünün ribozomdaki akseptil bölgeden peptidil (donör) bölgeye kaymasını inhibe ederek peptidil zincirin uzamasını önleyip protein sentezini engellerler (148, 149).

Makrolidlerin bağlandığı yerin yakınına linkozamidlerde bağlanır. Makrolidlere karşı kazanılmış direnç geliştiğinde genellikle linkozamidlere ve benzer bir mekanizma ile antibakteriyel etki yapan streptogramin B'ye karşı da çapraz direnç gelişir. Buna makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLSB) tipi direnç denir (148).

Corynebacterium türlerinde makrolid, linkozamid ve streptogramin B'ye direnç özellikle klinik çoklu ilaca dirençli izolatlarda belirgindir (145, 150). MLSB direncinin ifadesi yapıcı veya indüklenmiş olabilir. Yapısal direnç türü durumunda, metilaz sentezine izin veren aktif mRNA, bir indükleyici olmadan oluşturulurken, indüklenen MLSB'de ise inaktif mRNA sentezlenir.

Corynebacterium cinsinin lipofilik suşlarındaki MLSB direncinin incelendiği çalışmada test edilen suşların %70'inden fazlası eritromisine ve klindamisine dirençli olduğu belirtilmiştir. Bunların tümü yapıcı bir MLSB direnç mekanizması göstermiştir. Suşlarda, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermX*, *linA*, *msrA* ve *mphC* araştırılmış ve makrolid, linkozamid ve streptogramin B'ye karşı farklı direnç türlerinden sorumlu olabilecek genler olabilecekleri belirtilmiştir. MLSB direnç fenotipine sahip tüm suşlarda *ermX* geni saptanmıştır. Test edilen diğer genlerin hiçbirisi suşlarda keşfedilmemiştir. *ermX* genini barındıran suşlar, çok sayıda biyolojik ve biyokimyasal teste dayanan fenotipik bir yöntem kullanılarak tanımlanmıştır (151). Tunus'da yapılan çalışmada 85 *C. striatum* suşun hepsinin bakteriyel DNA'sı, makrolid ve linkozamid antibiyotiklere direnç genleri için amplifiye edilmiş, 62 suшта *ermX* geni saptanmıştır. *ermB* geni 21 *C. striatum* suşunda tespit edilmiş ve 12 suшта hem *ermX* hem de *ermB* amplikonları tespit edilmiştir (147).

1996 yılında yapılan araştırmalarda *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus pneumoniae*'nin klinik izolatları arasında bir akış sistemine bağlı olarak makrolidlere karşı yeni bir direnç mekanizması ortaya çıkmıştır (152, 153). Makrolidlere karşı direnç ve linkozamidlere ve streptogramin B antibiyotiklerine duyarlılık ile karakterize edilen M fenotipini sağlayan makrolid akış *mef* genlerinin varlığından kaynaklanmaktadır (153). İlk olarak *S. pneumoniae*'de tarif edilen *mefA* ve ilk olarak *S. pyogenes*'de keşfedilen *mefE*, %90 aynı olup makrolid direncinin belirlenmesinde aynı *mefA/E* sınıfına atanmıştır. Bunlar, antibiyotik veya antibiyotik hedefini değiştirmez, fakat bunun yerine antibiyotiği hücre veya hücresel membrandan dışarı pompalayarak hücre içi konsantrasyonları düşük tutar ve ribozomları antibiyotik içermez (154). *MefA* genleri, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* ve *Streptococcus* gibi farklı gram-pozitif cinslerde bulunmuş olup, ekstrakromozomal plazmid DNA ile ilişkili bulunmadığı ve bazı durumlarda konjugasyon ile aktarıldığı gösterilmiş (155). ABD'de yapılan bir çalışmada 17 *Corynebacterium* türünden 1 *C. jeikeum* ve 3 *Corynebacterium* spp. türlerinde *mefE* geni bulunmuş olup *ermA* ve *ermC* genleri saptanmamıştır (156).

2.7.3. Kinolon direnci

Bakterilerde DNA giraz enzimi *gyrA* geni tarafından kodlanan iki A alt birimi ile *gyrB* geni tarafından kodlanan iki B alt biriminden oluşmaktadır. DNA giraz, DNA replikasyonu ve onarımında, topoizomera IV ise replikasyon sırasında oluşan yavru DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılarak yavru hücrelere geçmelerinde görev alır. Topoizomera-DNA kompleksine bağlanan kinolonlar, DNA sentezini hızla inhibe ederler. Enzim-DNA kompleksinin kritik bölgelerindeki amino asit değişiklikleri kinolonların bu hedeflere afinitesini düşürür. Topimeraz II'deki GyrA alt ünitesi ile topimeraz IV'deki GyrA alt ünitesi direnç mutasyonunun en sık görüldüğü bölgelerdir (157).

Corynebacterium cinsinin türlerinde, florokinolonlara da direnç gözlenmiştir. Kinolonlara (QRDR-kinolon direnci belirleme bölgesi) direnci belirleyen bölge olarak tanımlanan giraz alt birimi A'nın yapısal gen bölgesi içindeki nokta mutasyonları ile ilişkilidir. Mutasyonlar, kendiliğinden doğarak belirli florokinolonlara direnç aralığına bağlı olan amino asit dizilerinde değişikliklere yol açar. Ortaya çıkan direnç seviyesi,

amino asidin türüne bağlıdır. Bazıları küçük bir afinite kaybına ve hassasiyette hafif bir azalmaya neden olurken, diğerleri florokinolonların afinitesini ve aktivitesini potansiyel olarak azaltır. Konjonktival sürüntü örneğinden üreyen 16 *C. macginleyi* suşu üzerinde yapılan çalışmada siprofloksasin, levofloksasin ve norfloksasin direnci koşullandıran QRDR'deki 83 ve 87 pozisyonlarında amino asit değişikliklerine yol açan bir çift mutasyon da bildirilmiştir (158).

gyrA geni dizisi çalışmaları, *C. striatum* ve *C. amycolatum* suşlarında da gerçekleştirilmiştir. *C. amycolatum*'daki kinolonlara karşı yüksek direnç, 87 ve 97 veya 87 ve 88 pozisyonlarındaki çift mutasyon ve amino asit değişikliklerinden kaynaklanmıştır. *C. striatum*'da meydana gelen 87 ve 91 pozisyonundaki amino asitlerin siprofloksasin ve levofloksasin için çok yüksek MİK değerleri ile karakterize edilen dirence karşılık gelirken, moksifloksasin için sadece orta derecede artmış MİK değerleri bildirilmiştir (159). *C. striatum* suşlarında 2017'de yapılan bir çalışmada suşlardaki *gyrA* nın QRDR bölgesinde çift mutasyon (Ser87Phe, Asp91Gly) olduğu saptanmış olup siprofloksasin ve moksifloksasinine karşı suşların MİK değerlerinin farklı olduğunu gösterilmiştir (160). Bu çalışmalar, mutasyonların sayısına ve değişen amino asitlerin türüne bağlı olarak incelenen *Corynebacterium* türlerinde kinolonlara karşı çeşitli karmaşık direnç mekanizmaları göstermiştir (159).

2.7.4. Aminoglikozid direnci

Bakteri ribozomlarına bağlanıp, mRNA'nın yanlış okunmasına neden olarak protein sentezini inhibe eden aminoglikozidlere direnç başlıca üç mekanizma ile gerçekleşir. Bu mekanizmalar ribozomal hedef değişikliği, enzimatik inaktivasyon ve ilacın sitoplazmaya geçişinin engellenmesidir. Gram pozitif bakterilerde aminoglikozid direnci çoğunlukla permeabilite azalması ya da salgılanan bir enzim ile ilgilidir (161). Kromozomal mutasyon sonucu bakterilerin 30S ribozomal alt birimlerinde aminoglikozidlerin bağlandığı noktada değişiklik meydana gelir. Enzimatik inaktivasyon aminoglikozid direncinde en yaygın olarak görülen mekanizmadır. Aminoglikozidleri modifiye eden enzim genleri plazmid ve transpozonlar ile yayılabilmektedir. Plazmidin bakteri hücrelerine girişi ile belirli aminoglikozid türlerini inaktive eden enzimler periplazmik aralığa ve sitoplazmaya salgılanır. Salgılanan enzimler aminoglikozidleri adenillemek, asetillemek veya

fosforile etmek suretiyle inaktive ederler (148, 162). Ayrıca, sitoplazma membranında aminoglikozidin hücre içine taşınmasını sağlayan özel aktif transport mekanizmasının bozulması ile antibakteriyel etki azalır veya kaybolur (148).

Aminoglikozit asetil transferazlar (AAC), amino gruplarının AcCoA'ya bağımlı N-asetilasyonunu aminoglikozit molekülleri üzerinde katalize eder. AAC(3) ailesi, deoksistreptamin halkasının 3-amino grubunu regioselektif olarak modifiye eder ve sağladıkları aminoglikosid direnci modeline dayanarak alt tiplere ayrılmıştır. AAC(3)-I ve II izoenzimleri tercihli olarak aminoglikozidlerin gentamisin grubunu değiştirir. Aac(3)-III enzimleri, gentamisin, tobramisin ve neomisin dahil olmak üzere çok çeşitli aminoglikozitlerin kovalent asetilasyonunu katalize eder (161, 163). AAC(3)-IV sınıfı N-asetiltransferazlar, bugüne kadar tanımlanmış tüm AAC(3) enzimlerinin en geniş substrat spesifikliğine sahiptir (164). Fransa'da 2015'te yapılan bir çalışmada *C. striatum*'da gentamisin ve tobramisine karşı direnç oluşturan aminoglikosid 3-N asetil transferazı kodlayan *aac(3)-XI* geni bulunmuştur (165). Bir başka çalışmada ise 64 *C. striatum* izolatından 44'ünde *aac(3)-XI* gösterilmiş olup, hepsinin gentamisin ve tobramisin'e karşı dirençli olduğu saptanmıştır (166).

2.7.5. Tetrasiklin direnci

Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki oluşturan tetrasiklinlere direnç gelişimi aktif eflüks pompa sistemi, enzimatik inaktivasyon, taşıyıcı proteinlerin bozulması ve ribozom koruyan proteinlerin oluşmasıdır. Hücre membranında enerji bağımlı eflüks pompa sisteminin oluşması sonucunda tetrasiklinlerin bakteri hücresi içine girmesi engellenir ve bakteri hücresi içine girmiş olan tetrasiklinler dışarı pompalanır. Bu mekanizma tetrasiklin direncindeki en önemli mekanizmadır (148).

C. striatum durumunda, test edilen suşların %97'sinde tetrasiklin'e karşı fenotipik direnç bulunmuştur (168). Bu gözlemler, protein ribozomu üzerindeki koruyucu etkiden dolayı tetrasiklinlerin ribozoma bağlanma bölgesine bağlanıp tüm tetrasiklinlere dirençten sorumlu proteini kodlayan *tetM* geninin saptanmasıyla doğrulanmıştır (169). Ayrıca *Corynebacterium* suşlarında tetrasikline karşı direnç plazmid aracılı olarak tetrasiklin türevlerini hücreden dışarı pompalanmasına neden olan *tetAB* genlerinin katılımıyla ilişkilidir. (170, 171).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. *Corynebacterium* 'ların izolasyonu ve identifikasyonu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ocak 2017-Şubat 2020 tarihlerinde çeşitli klinik birimlerden steril şekilde gönderilen balgam, trakeoaspirat, bronkoalveoler lavaj, kan kültürü, doku, idrar, yara, apse ve steril vücut sıvı örneklerinden izole edilen 117 adet *Corynebacterium* cinsine ait mikroorganizma çalışmaya dahil edilmiştir. Bir hastanın birden çok örneğinde üreme oldu ise sadece ilk üretilen izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Örnekler laboratuvarımıza ulaştıktan sonra kültürü yapılmak üzere çalışmaya alınmıştır. %5 koyun kanlı agara (Salubris Biyoteknoloji Ürünleri, İstanbul, Türkiye) ekimi yapılan hasta örnekleri 35-37°C'lik Memmert BM 600 etüve (Labexchange, Burladingen, Almanya) 24 saatlik inkübasyona kaldırılmıştır. Üreyen mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanması MALDI-TOF MS ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. *Corynebacterium* 'ların saflaştırılması ve saklanması

MALDI-TOF MS sonucunda *Corynebacterium* spp. tanımlanması yapılan kolonilerden saf kültür olarak saklamak için tek koloni pasajı alınmış, daha sonra %1 gliserollü (Merck, Almanya) Tryptic Soy Broth içeren saklama besiyeri (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) 1,5 ml'lik ependorflara aktarılmış, kolonilerin saklama besiyeri ile homojen karışmasına özen gösterilmiş ve -80°C soğutucuya (New Brunswick Scientific Mod U570 premium, Thermo, ABD) kaldırılmıştır.

3.3. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması

3.3.1. Disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık belirleme

Yüzde beş koyun kanlı agarda üremiş olan izolatların her birinden tek koloni alınarak, %0,9 NaCl izotonik solüsyon içeren ayrı ayrı tüplere $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (0,5 McFarland) standardına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı. EUCAST önerileri doğrultusunda KirbyBauer disk difüzyon yöntemiyle (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β -NAD içeren Mueller-Hinton Fastidious agara (Becton-Dickinson, Heidelberg, Almanya) Penisilin (1 ünite), siprofloksasin (5 μ g),

gentamisin (10 µg), Klindamisin (2 µg), tetrasiklin (30 µg), rifampisin (5 µg), vankomisin (5 µg) ve linezolid (10 µg) antimikrobiyal diskler yerleştirildi. İnokülüm yapılan tüm plaklar 16-20 saat $35\pm1^{\circ}\text{C}$ 'deki etüvde inkübasyona bırakılmış olup süre sonunda inhibisyon bölgeleri milimetrik olarak ölçülüp kaydedildi. Antimikrobiyal disk zon çap değerleri rehberin belirttiği referans değerler baz alınarak değerlendirildi. Ayrıca, MLSB direncinin bakılmasında 15 µg eritromisin KirbyBauer disk difüzyon yöntemiyle %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β -NAD içeren Mueller-Hinton Fastidious agara (MH-F) yerleştirildi ve zon çapına bakıldı. Eritromisin için EUCAST'de *Corynebacterium* türleri için belirlenmiş kriterler olmamasından dolayı eritromisin duyarlılık testi önerileri EUCAST *Staphylococcus* spp. kriterlerine göre çalışıldı (150).

İndüklenebilir MLSB direncinin belirlenmesinde (D test) klindamisin duyarlı, eritromisin dirençli suşlarda eritromisin (15 µg) ve klindamisin (2 µg) antibiyotik diskleri %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β -NAD içeren Mueller-Hinton Fastidious agarda ile birbirinden 12-20 mm uzağa yerleştirilip ve 0,5 McFarland standardına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlanıp plaklara ekim yapıldı. Plaklar, 24 saat boyunca 35°C 'de inkübe edildi. Klindamisin etrafındaki yassılaşma bölgesinin ortaya çıkması değerlendirildi. İndüklenebilir MLSB direncinin saptanmasında *Corynebacterium* spp.'ler ile ilgili bir kriter olmadığından EUCAST *Staphylococcus* spp. için MLSB antibiyotik kriterleri kullanıldı (150).

3.3.2. Gradient strip test (E test) yöntemi ile siprofloksasin ve moksifloksasin MİK Belirleme

Bu testin amacı bazı suşlardaki *gyrA* geninde bulunan mutasyonlar ile onların siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerleri arasındaki ilişkiyi belirlemektir. Bu sebeple disk difüzyon yöntemi ile siprofloksasin dirençli bulunan randomize seçilmiş 11 *C. striatum*, 5 *C. afermentans* ve tüm *C. jeikeum*, *C. afermentans*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum* ve *C. amycolatum* suşlarının EUCAST doğrultusunda %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β -NAD içeren Mueller-Hinton Fastidious agarda siprofloksasin ve moksifloksasin gradient stripleri (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, İtalya) yerleştirilerek MİK değerleri tespit edilmiştir.

3.3.3. Sıvı dilüsyon yöntemi ile siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerlerinin belirlenmesi

Gradient test stripleri ile siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerleri belirlenmiş 30 suşun ve disk difüzyon yöntemi ile siprofloksasin duyarlı çıkan 2 *C. striatum* suşunun MİK değerlerinin doğrulanması amacıyla CLSI (172) doğrultusunda, toplam 32 suşa sıvı dilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi uygulanmıştır.

On bin µg/mL’lik siprofloksasin ve moksifloksasin toz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) stok solüsyonundan 819,2 µL alınıp 180,8 µL siteril saf su ile karıştırılarak antibiyotik konsantrasyonları 8192 µg/mL yapıp kullanım için -20°C’de saklandı.

Koloni süspansiyonunun hazırlanmasında %5 koyun kanlı agarda canlandırılan izolatların her birinden 3-5 koloni öze ile alınarak, %0,9 NaCl izotonik solüsyon içeren ayrı ayrı tüplere 0,5 McFarland standardına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı. 0,5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonundan 100 µL alınıp 900 µL steril su içine konularak 1×10^7 CFU/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonu elde edildi. Antibiyotik duyarlılık testi 96 kuyucuktan oluşan platede çalışılmış olup, önce tüm kuyucuklara 50 µL katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri konuldu. Elde edilen bakteri süspansiyonundan 50 µL alınıp 12 serili plate’in 11. kuyucuğuna kadar konuldu. 12. kuyucuk negatif kontrol amaçlı boş bırakıldı. 8192 µg/mL konsantrasyonundaki siprofloksasin veya moksifloksasin içeren stoklardan 50 µL alınıp ayrı platelerde 1. kuyucuklara seri pipetleme yapılarak aktarıldı. Daha sonra 1. kuyucuktan 50 µL sıvı alınıp 2. kuyucuğa oradan 3. kuyucuğa katarılıp, bu şekilde seri dilüsyon 10. kuyucuğa kadar devam ettirilmekle beraber 11. ve 12. kuyucuklara antibiyotik aktarımı yapılmadı. Plate’ler 37°C’lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Her iki antibiyotik sıvı dilüsyon testinde negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25299 suşu, pozitif kontrol olarak *C. striatum* TCST 1 suşu kullanıldı. Gradient strip test sonucu negatif kontrol suş için ve MİK değeri 4 µg/mL’den küçük olan suşlar için sıvı antibiyotik dilüsyonları bir alt satırdan devam ettirilerek daha düşük konsantrasyonlara ulaşılması sağlandı. EUCAST doğrultusunda siprofloksasin için duyarlılık değeri ≤ 1 mg/L, moksifloksasin için $\leq 0,5$ mg/L değerleri göz önüne alınarak duyarlılıklar belirlendi.

3.4.Kromozomal DNA izolasyonu

Tür düzeyinde tanımlanıp -80°C’de saklanmış olan bakteriler çıkartılıp %5 koyun kanlı agar besiyerine inokule edilip 35-37°C’lik etüvde 18-24 saatlik inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrası saflığından emin olunan kolonilerden tek koloni alınıp 3-5 mL Beyin Kalp İnfüzyon broth (BD, Heilderberg, Germany) sıvı besiyerinde 37°C’de 220 rpm çalkalamalı inkübatörde 12-18 saat inkübe edildi. İki adet 2 mL kapasiteli saklama viallerinde 150-200 µL steril gliserol ile 850 µL bakteri kültürü vortekslenip -80°C’ye kaldırıldı. Ayrıca çalkalamalı inkübasyon sonrası sıvı besiyeri kültüründen 1,5 mL alınıp steril eppendorf (1,5 mL) tüplere transfer edilerek mikrosantrifüjde (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK) 10000 rpm’de 1 dak santrifüj işlemi yapıp, süpernatant kısmı dökülecek ve geriye kalan pellet DNA izolasyonu için kullanılacak veya daha sonra kullanılmak üzere -20°C’deki dolapta (Arçelik, İstanbul, Türkiye) saklandı.

DNA izolasyonu Macherey Nagel DNA profikasyon kiti (Dueren, Almanya) kullanılıp kit protokolü izlenerek yapıldı. Donmuş bakteri peletlerini 30 saniye 10,000 rpm’de santrifüj edip, üst tarafta kalan sıvı dökülerek peletler hazır hale getirildi. Her bir pelet için Buffer PL2’den 280 µL alıp 5 mg/mL’lik lizozimden 20 µL ekledikten sonra, bu solüsyon peletin bulunduğu eppendorf tüplere aktarıldı ve 37°C’de 30 dak bekletildi. Bu süre sonunda her bir eppendorf tüpüne 10 mg/mL’ lik RNAaz’dan 3 µL ve 10 mg/mL’lik Proteaz K’dan 3 µL eklenip tüpler 65°C’de, 15 dak bekletildi. Sonrasında sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonundan 30 µL tüplere koyup 65°C’de, 15 dak bekletildi. Fenol kloroform izoamil alkol (25:24:1)’den 400 µL tüplere konulup, tüpler 14,000 rpm’de 5 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta kalan tortunun üzerinde kalan sıvı bileşimini çekerek yeni eppendorflara koyup, üzerine 400 µL kloroform izoamil alkol (24:1) ekleyerek kloroform ekstraksiyonu yapıldı. Tüpler 14,000 rpm’de 10 dak santrifüj edilip üstte kalan sıvı bileşimini alınıp filtreli kolon tüpünün içine aktarıldıktan sonra, kolon tüpleri 11,000 rpm’de 2 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtrenin altında kalan sıvı boşaltılıp kitte bulunan wash buffer’dan 700 µL alınarak filtreli kolon tüpünün içine aktarıldı. Tüpler 11,000 rpm’de 1 dak santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atılıp santrifüj işlemi tekrar edildi. Elusion buffer’dan 700 µL alınıp kolon tüpüne eklendikten sonra tüpler 65°C’de, 10 dak bekletildi. Ardından kolon tüpleri 12,000 rpm’de 1 dak santrifüj edildikten sonra filtre kolon

tüpten çıkarılıp allta kalan DNA ekstraksiyonu eppendorf tüplere aktarılarak PZR işlemi için -20°C'de saklandı.

3.5. PZR ile direnç geni taranması

3.5.1. Kullanılan primerler

Suşılarıdaki *ermA*, *ermB*, *ermX*, *mefA/E*, *aac(3)-XI*, *ampC*, *tetM* direnç genlerinin varlığının araştırılması ve *gyrA* genindeki mutasyonlara bağlı direnç mekanizmasının saptanmasında farklı sekiz primer seti kullanılmıştır. *Corynebacterium striatum* suşlarının 30'unda *ampC* geni bakılmış, diğer direnç genleri tüm suşlarda taranmıştır. Liyofilize halde bulunan primerlerin sulandırma işlemi üretici firma talimatları doğrultusunda protokole uygun olarak yapılmış ve 100 pmol/μl konsantrasyonda stok primerler elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılacak primerlerin konsantrasyonu 10 pmol/μl olarak planlanmıştır. Bunun için 100 pmol/μl konsantrasyonda stok primerden 10 μl alınarak 90 μl distile su ile toplam hacim 100 μl olacak şekilde tekrar sulandırılmış, eppendorflara ayrılıp -20°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler Alibi ve ark. (160), Sutcliffe ve ark. (173) ve Aminov ve ark. (174)'nın çalışmalarına uygun olarak belirlenmiştir. MLSB, beta-laktam, kinolon, tetrasiklin ve aminoglikozidlere direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerlerin dizilimleri Tablo 2'de verilmiştir

Tablo 2. PZR Deneylerinde Kullanılan Oligonükleotid Primerler

Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'→ 3')	Boyut Baz çifti (bp)	Referans
ermX-F1	AAC CAT GAT TGT GTT TCT GAA CG		
ermX-R1	ACC AGG AAG CGG TGC CCT	560	160
ermA-F1	TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA		
ermA-R1	CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT	645	173
ermB-F1	GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA		
ermB-R1	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	639	173
mefA/E-F1	AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC		
mefA/E-R1	TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG	348	173
gyr A-F1	GCG GCT ACG TAA AGT CC		
gyrA-R1	CCG CCG GAG CCG TTC AT	337	160
aac(3)-XI-F1	ATG ACT ACA ACC AAC GAG ATC		
aac(3)-XI-R1	CTA AAG CTC CCG GAT GTA GAG	452	160
ampC-F1	CAA TCG GAT TCC TGG TCG CT		
ampC-R1	TGG TTC GCG TGA TGT TTT CG	965	160
tetM-F1	ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC		
tetM-R1	TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC	171	174

3.5.2. Gen bölgelerinin amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı ve döngü koşulları Alibi ve ark (160), Sutcliffe ve ark. (173) ve Aminov ve ark. (174) çalışmalarından modifiye edilerek tek bir amplifikasyon metodu kullanılmıştır. *S. aureus* ADU44 *tetM* ve *ermA* genleri için, *S. aureus* RN4220 ise *ermB* geni (suşlar Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'dan temin edilmiştir) için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *ErmX* ve *aac(3)-XI* genleri için kontrol suşlar, PZR taramasında pozitif çıkan suşlardan alınıp yapılmış; *ampC* ve *mefA/E* genleri için pozitif kontrol kullanılmamıştır. PZR karışımı için Taq PZR Master Mix Kit (Solis Biodyne 5X FIREPol, Tartu, Estonya) kullanılmıştır. Karışım, termositabil taq polimeraz, MgCl₂, dNTP'ler ve deterjanlı PZR tamponu içermektedir. PZR işleminde toplamda 20 µL'lik bir karışım elde etmek için 4 µL'lik bir PZR Master Mix solüsyonu, 0,6 µL forward ve reverse primerler ile karıştırıldı. Daha sonra, test edilecek izolatin DNA'sını içeren stoktan 1 µL ve 13,8 µL distile su karışıma eklendi. PZR programı, 94°C'de 5 dak süreyle bir ilk denatürasyon adımı, ardından 94°C'de 45 saniye boyunca 35 döngü denatürasyon, 55°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 60 saniye uzama ve 72°C'de 10 dak son bir uzatma olarak belirlendi. Amplifikasyon

işlemi Applied Biosystems 9700 Thermocycler (ThermoFisher Scientific, Paisley, İngiltere) cihazı kullanılarak yapıldı.

3.5.3. Agaroz jel elektroforezi

Amplifikasyon işlemi sonucu elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak incelendi. Bunun için %1,5'lik agaroz jel kullanıldı. Jeli hazırlamak için TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) çözeltisinden 100 ml alınarak içerisine 1,50 gr agaroz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) eklendi. Hazırlanan çözelti 2-3 dak mikrodalga fırında kaynatılarak agarozun tam olarak çözülmesi sağlandı. Daha sonra içerisine 3 µL etidyum bromür (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) eklendi. Yatay jel elektroforez tablasının içine yükleme kuyucuklarının oluşması için taraklar yerleştirildikten sonra sıvı haldeki jel karışımı tablanın içerisine yavaşça, kabarcık oluşturmayacak şekilde döküldü. Jel katılaşması için oda sıcaklığında 30 dak bekletildi. Katılaştıran jel içerisinden taraklar çıkarılmış ve jel elektroforez tankının içerisine yerleştirildi. Jel yerleştirildikten sonra elektroforez tankı jel yüzeyini örtecek şekilde TAE tamponu ile dolduruldu. Hazırlanan PZR ürünleri kuyucuklara 5'er µl yüklendi. Moleküler belirteç ve örneklerin jele yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez tankının kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlandı. Örnekler 75-80 V elektrik akımında 45-50 dak yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel transillüminatör cihazına (UVP BioSpectrum Multispectral Imaging System, Cambridge, UK) yerleştirilerek ultraviyole ışık altında değerlendirildi. Sonrasında ise VersaDoc Imaging System (BIO-RAD, California, USA) ile dijital olarak görüntülendi. PZR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin değerlendirilmesinde moleküler belirteç olarak 50 bp DNA ladder (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK) ve 200 bp Hyperladder (Meridian Bioscience, Tennessee, USA) kullanıldı.

3.5.4. Sekanslama yapılacak suşların PZR ürünlerinin temizlenmesi

Elli suşun *gyrA* genindeki nokta mutasyonların belirlenmesi ve PZR'de *aac(3)-XI* ve *ermX* pozitif çıkan birer suşun DNA dizi analizinin doğrulanması amacıyla PZR'de ortaya çıkan ürünler temizlenip sekans işlemi için hazır hale getirildi.

Bu işlem için PZR clean up gel extraction (Macherey- Nagel, Almanya) kit protokolü takip edildi. Sekans yapılacak suşların izole edilmiş DNA'ları -20°C'den

ıkarılıp *gyrA*, *aac(3)-XI* ve *ermX* genlerinin amplifikasyonu için PZR karışımı hazırlandı. PZR karışımı için Taq PZR Master Mix Kit (Solis Biodyne 5X FIREPol, Tartu, Estonya) kullanılmıştır. Karışım, termositabil taq polimeraz, MgCl₂, dNTP'ler ve deterjanlı PZR tamponu içermektedir. PZR işleminde toplamda 40 µL'lik bir karışım elde etmek için 8 µL'lik bir PZR Master Mix solüsyonu, 1,2 µL forward ve reverse primerler ile karıştırıldı. Daha sonra, test edilecek izolatın DNA'sını içeren stoktan 1 µL ve 28,6 µL distile su karışıma eklendi. PZR programı, 94°C'de 5 dak süreyle bir ilk denatürasyon adımını, ardından 94°C'de 45 saniye boyunca 35 döngü denatürasyon, 55°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 60 saniye uzama ve 72°C'de 10 dak son bir uzatma olarak belirlendi.

Amplifikasyon işlemi sonucu elde edilen PZR ürünleri 50 bp DNA molekül ağırlık standartı ile %1,5'lik agaroz jelde yürütölerek elde edilen amplifikasyon ürünleri transillüminatör cihazına yerleştirilerek ultraviyole ışık altında değeriendirildi. Elde edilen ürünler bistüri ile jelden alınarak ependorflara yerleştirildi. Her bir kesilen jel parçasının ağırlığı tartılarak not edildi.

Koleksiyon tüpleri sıralanıp üstüne DNA prufikasyon kolonu yerleştirildi. Kit'de bulunan binding buffer NTI'dan kesilen jel ağırlığının iki katı kadar solüsyonu jel ile dolu ependorflara koyup 50°C'de 10 dak bekletildi. Sıvı hale dönüşmüş jeller koleksiyon tüplerine aktarıldı. Tüpler 12,000 rpm'de 1 dak santrifüj edilip prufikasyon kolonu altında kalan sıvı boşaltıldı. Yedi yüz µL yıkama solüsyonu ile tüpler iki defa yıkandıktan sonra altta kalan sıvı boşaltılıp tüpler 12,000 rpm'de 1 dak santrifüj edildi. Koleksiyon tüpleri 1,5 mL hacimli yeni ependorflara aktararak 15 µL DNA elüsyon solüsyonu kolonunun ortasına aktarıldı. Ependorflar 50°C'de 3 dak bekletildikten sonra 1200 rpm'de 1 dak santrifüj edilip altta kalan temizlenmiş PZR ürünü -20°C'ye kaldırıldı.

3.5.5. Temizlenmiş PZR ürünlerinin DNA dizi analizi ile belirlenmesi

Döngüsel dizileme reaksiyonu BrilliantDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kiti (Nijmegen, Hollanda) kullanılarak yapıldı. Bir reaksiyonluk karışım 40 µL olup karışım elde etmek için 0,75 µL'lik BrilliantDye solüsyonu, 1,625 µL 5X Buffer ve 0,5 µL forward ve reverse primerler ile karıştırıldı. Daha sonra, Temizlenmiş PZR ürününden 2 µL ve 2,25 µL distile su karışıma eklendi. Döngüsel dizileme reaksiyonu

94°C'de 45 saniye süreyle bir ilk denatürasyon adımı, sonrasında 94°C'de 10 saniye boyunca 28 döngü denatürasyon, 50°C'de 5 saniye bağlanma, 60°C'de 2 dak uzama şeklinde Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazında gerçekleştirildi.

Döngüsel dizileme reaksiyonu sonucunda elde edilen PZR ürünleri Sephadex®G-50 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) ile aşağıdaki temizleme protokolü kullanılarak saflaştırıldı;

1. 1 g Sephadex®G-50 tartılarak 13 mL distile su içerisinde çözüldü ve çalışmaya başlamadan önce en az 30 dak 4°C'de bekletildi.
2. Kolon tüpler 2 mL'lik toplama tüpleri üzerine alındı.
3. Kolon tüplere 600 µL Sephadex®G-50 eklendi ve 800 g'de 2 dak santrifüj edildi.
4. Toplama tüpleri temizlenmek üzere 0,1 N HCl solüsyonuna atıldı ve kolon tüpler 1,5 mL'lik mikro hacimli kapaklı tüplerin üzerine alındı.
5. Döngüsel dizileme reaksiyonu ile çoğaltılan PZR ürünleri kolon tüpteki Sephadex®G-50 üzerine dikkatlice eklenerek 750 g'de 5 dak santrifüj edildi.
6. Saflaştırılan PZR ürünleri 96 kuyulu platelere transfer edilerek ABI 3130 genetik analiz cihazına (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK) yüklendi ve dizileme işlemi gerçekleştirildi.
7. Elde edilen verilerin disk halinde çıktısı alınıp Chromas Technelysium DNA sequencing yazılım programında (South Brisbane, Avustralya) analiz edilerek sonuçlar kinolon duyarlı *C. striatum* ATCC 6940 (GenBank accession number AY559038)' ın *gyrA* gen dizilimi ile kıyaslandı.

4. BULGULAR

Araştırmada hasta numunelerinden izole edilen *Corynebacterium* cinsleri ile ilgili bilgiler aşağıdaki tablolarda verilmektedir.

Corynebacterium cinslerinin izole edildiği örneklerin alındığı hastalarla ilgili cinsiyet ve yaş oranları Tablo 3'te verilmiştir. *C. striatum* izole edilen 95 örneğin 35'i kadın ve 60'ı erkek hastalardan alınmıştır. *C. afermetans* izole edilen 7 örneğin 5'i kadın ve 2'si erkek hastalardan alınmıştır. Hastaların yaş gruplarına göre değerlendirme yapıldığında *C. pseudodiphtheriticum* cinsinin sadece 18 ve altı yaş grubundan izole edildiği bulunmuştur. *C. striatum*'un 16 suşu ve *C. aurimucosum*'un üç suşu 19-40 yaş arası hastalarda izole edilmiştir. Kırk yaş ve üstü yaş grubundaki hastalarda 72 *C. striatum*, 5 *C. aurimucosum* ve tüm *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* suşları izole edilmiştir.

Tablo 3. *Corynebacterium* Cinslerinin İzole Edildiği Örneklerin Alındığı Hastalarla İlgili Cinsiyet ve Yaş Oranları

		<i>C. striatum</i>		<i>C. afermetans</i>		<i>C. amycolatum</i>		<i>C. aurimucosum</i>		<i>C. pseudodiphtheriticum</i>		<i>C. jeikeum</i>		<i>C. singulare</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Cinsiyet	Kadın	35	36,8	5	71,4			6	75	2	100	1	50	1	100
	Erkek	60	63,2	2	28,6	2	100	2	25			1	50		
	Toplam	95	100,0	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
Yaş	18 ve altı	7	7,4							2	100				
	19-40	16	16,8					3	37,5						
	41 ve üstü	72	75,8	7	100	2	100	5	62,5			2	100	1	100
	Toplam	95	100,0	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100

Tablo 4’te *C. striatum* izole edilen örneklerin servislere göre dağılım oranları verilmektedir. *C. striatum* izole edilen örneklerin 23’ü (%24,2) dâhiliye, 9’u (%9,5) ortopedi, 36’sı (%38) pediatri ve erişkin yoğun bakım servislerinden elde edilmiş olup Yoğun bakım ünitelerinde daha fazla ürediği saptanmıştır.

Tablo 4. *C. striatum* İzole Edilen Örneklerin Servislere Göre Dağılımı

	n	%
Beyin cerrahisi	1	1,1
Cildiye	2	2,1
Dâhiliye	23	24,2
Dâhiliye yoğun bakım	1	1,1
Enfeksiyon	2	2,1
Genel cerrahi	4	4,2
Kadın doğum	2	2,1
KBB	2	2,1
Koroner	1	1,1
KVC	5	5,3
Ortopedi	9	9,5
Pediatri	3	3,2
Pediatri YB	2	2,1
Üroloji	1	1,1
Yoğun bakım 1	9	9,5
Yoğun bakım 2	13	13,7
Yoğun bakım 3	11	11,6
Toplam	95	100,0

KBB: Kulak Burun Boğaz; KVC: Kalp ve Damar Cerrahisi; YB: Yoğun Bakım

Tablo 5’te *C. striatum* izole edilen örneklerin dağılım oranları verilmektedir. *C. striatum* izole edilen örneklerin 13’ü (%13,7) balgam, 28’i (%29,5) trakeal aspirat (TAK) ve ikisi (%2,1) bronkoalveolar lavajdan üremiş olup izolatların çoğunluğu solunum yollarından izole edilmiştir.

Tablo 5. *C. striatum* İzole Edilen Örneklerin Dağılımı

		N	%
Örnek	Apse	2	2,1
	Balgam	13	13,7
	Doku	6	6,3
	İdrar	9	9,5
	Kan	13	13,7
	Plevral mayi	1	1,1
	Periton mayi	2	2,1
	TAK	28	29,5
	Yara	19	20,0
	BAL	2	2,1
	Total	95	100,0

TAK: Trakeal Aspirat; BAL: Bronkoalveolar Lavaj

Tablo 6’da *C. striatum* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları verilmiştir. Suşların 94’ünün (%98,9) penisillin, 92’sinin (%96,8) klindamisin ve siprofloksasin, 80’inin (%84,2) gentamisin ve rifampisin ve 90’ının (%94,7) tetrasiklin’e dirençli olduğu; izolatlarının tamamının ise vankomisin ve linezolid’e karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. *C. striatum* izolatlarının 50’si (%52,6) eritromisin’e dirençli iken, 45’i (%47,4) duyarlı olarak bulunmuştur. Ayrıca hiçbir *C. striatum* suşunda klindamisin duyarlı eritromisin dirençli suş saptanmadığı için indüklenebilir MLSB direnci (D test) bakılmamıştır.

Tablo 6. *C. striatum* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları

	R (Dirençli)		S (Duyarlı)	
	n	%	n	%
Penisilin	94	98,9	1	1,1
Klindamisin	92	96,8	3	3,2
Siprofloksasin	92	96,8	3	3,2
Gentamisin	80	84,2	15	15,8
Rifampisin	80	84,2	15	15,8
Tetrasiklin	90	94,7	5	5,3
Vankomisin	-	-	95	100,0
Linezolid	-	-	95	100,0
Eritromisin	50	52,6	45	47,4

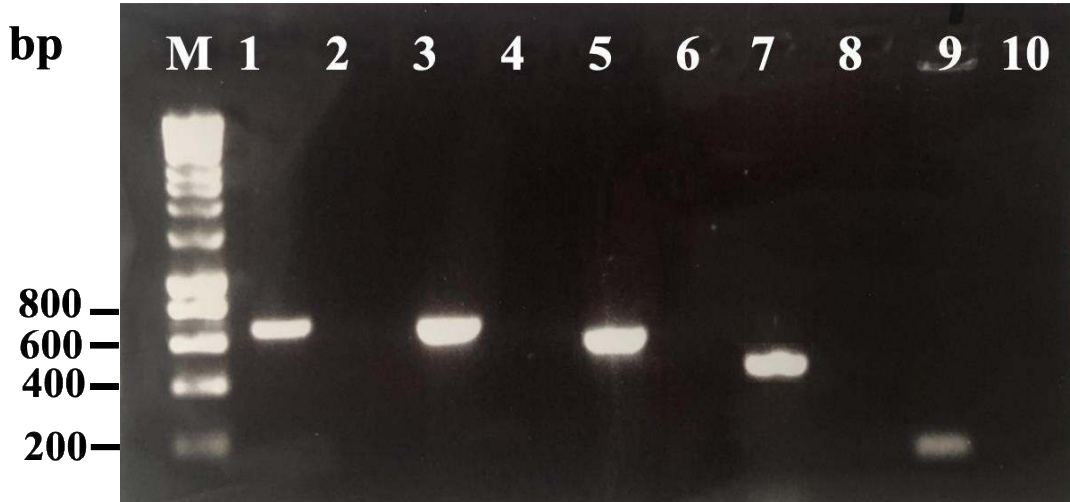
Tablo 7’de *C. striatum* izolatlarındaki gen varlığı oranları verilmiştir. Bakteri DNA giraz’ı oluşturan *gyrA* alt ünitesini kodlayan *gyrA* geni tüm suşlarda amplifiye edilmiştir. *ermX* geni suşların 94’ünde (%98,9), *ermB* geni suşların 10’unda (%10,5) ve *aac(3)-XI* geni suşların 84’ünde (%88,4) pozitif olarak bulunmuştur. Ayrıca suşların hiçbirinde *tetM*, *ermA*, *mefA/E* ve *ampC* geni saptanmamıştır.

Tablo 7. *C. striatum* İzolatlarında *gyrA* ve Bazı Direnç Geni Varlığı Oranları

Direnç geni	Negatif		Pozitif	
	n	%	n	%
<i>gyrA</i>			95	100,0
<i>tetM</i>	95	100,0		
<i>ermA</i>	95	100,0		
<i>ermB</i>	85	89,5	10	10,5
<i>ermX</i>	1	1,1	94	98,9
<i>mefA/E</i>	95	100,0		
<i>aac(3)-XI</i>	11	11,6	84	88,4
<i>ampC</i> *	30	100		

* *ampC* gen varlığı 30 örnek üzerinden değerlendirilmiştir.

Şekil 1’de *ermA*, *ermB*, *ermX*, *aac(3)-XI*, ve *tetM* genlerinin pozitif kontrol suşları ve negatif kontrol için kullanılan şuşların PZR görüntüsü gösterilmiştir.

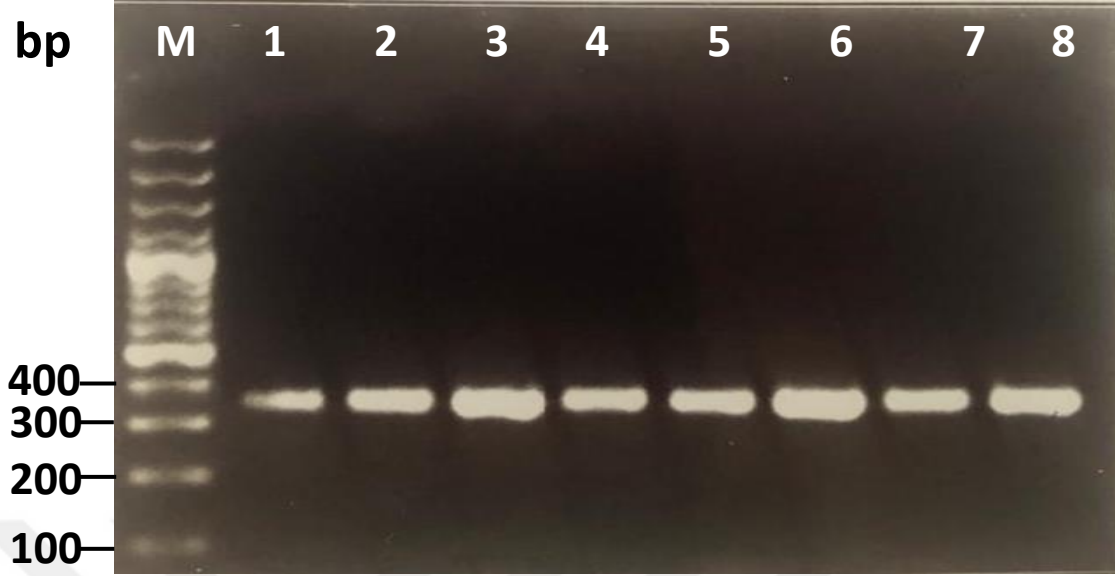


Şekil 1. *ermA*, *ermB*, *ermX*, *aac(3)-XI*, ve *tetM* genlerinin pozitif kontrol suşları ve negatif kontrol için kullanılan şusların agaroz jelde PZR görüntüsü. M; molekül ağırlık standardı, 1; *S. aureus* ADU 44 *ermA* pozitif kontrol, 2; *C. striatum* TCST 1 *ermA* negatif kontrol, 3; *S. aureus* RN4220 *ermB* pozitif kontrol, 4; *C. striatum* TCST 1 *ermB* negatif kontrol, 5; *C. striatum* TCST 7 *ermX* pozitif kontrol, 6; *C. striatum* TCST 2 *ermX* negatif kontrol, 7; *C. striatum* TCST7 *aac(3)-XI* pozitif kontrol, 8; *C. striatum* TCST 4 *aac(3)-XI* negatif kontrol, 9; *S.aureus* ADU44 *tetM* pozitif kontrol, 10; *C. striatum* TCST 2 *tetM* negatif kontrol.

Tablo 8’de *C. striatum* izolatlarının gen varlığına göre antimikrobiyal duyarlılık durumları ile ilgili değerlendirmeler verilmiştir. Suşların 92’si (%96,8) siprofloksasine ve 90’ı (%94,8) tetrasiklin dirençlidir. *ermB* pozitif olan 10 *C. striatum* suşunun hepsinin klindamisine ve dördünün (%40) eritromisine dirençli olduğu bulunmuştur. *ermX* pozitif olan 94 suşun 91’inin (%96,9) klindamisine dirençli; 50’sinin (%53,1) eritromisine dirençli olduğu bulunmuştur. *aac(3)-XI* geni pozitif olan 84 suşun ise 76’sının (%92.9) gentamisin dirençli, sekizinin (%7,1) gentamisin duyarlı olduğu saptanmıştır. *ampC* geni taranan 30 şusun 29’unun (%96,7) ise penisilin dirençli olduğu bulunmuştur. Ek olarak *C. striatum* TCST 2 suşunun *ermX*, *ermB*, *ermA* ve *mefA/E* genleri negatif olmasına rağmen klindamisin dirençli bulunmuştur. Şekil 2’de bazı *Corynebacterium* türlerinin *gyrA* genlerinin PZR görüntüsü gösterilmiştir.

Tablo 8. *C. striatum* İzolatlarının Gen Varlığına Göre Antimikrobiyal Duyarlılık Oranları

		Penisilin				Klindamisin				Siprofloksasin				Gentamisin				Tetrasiklin				Eritromisin			
		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S	
N: 7		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>tetM</i>	Neg															90	94,8	5	5,2						
	Poz																								
<i>ermA</i>	Neg					92	96,8	3	3,2													50	52,6	45	47,4
	Poz																								
<i>ermB</i>	Neg					82	86,3	3	3,2													46	48,4	39	41,1
	Poz					10	10,5															4	4,2	6	6,3
<i>ermX</i>	Neg					1	1,1																	1	1,1
	Poz					91	95,8	3	3,2													50	52,6	44	46,3
<i>mefA-E</i>	Neg					92	96,8	3	3,2													50	52,6	45	47,4
	Poz																								
<i>aac(3)-XI</i>	Neg													4	4,2	7	7,4								
	Poz													76	80	8	8,4								
<i>ampC</i>	Neg	29	96,7	1	3,3																				
	Poz																								



Şekil 2. Bazı *Corynebacterium* türlerinin *gyrA* genlerinin agaroz jelde PZR görüntüsü. M; molekül ağırlık standardı, 1; *C. striatum* TCST 1 *gyrA* geni, 2; *C. striatum* TCST 90 *gyrA* geni, 3; *C. aurimucosum* TCAU 1 *gyrA* geni, 4; *C. afermentans* TCAF 1 *gyrA* geni, 5; *C. jeikeum* TCJK 1 *gyrA* geni, 6; *C. pseudodiphtheriticum* TCPD 1 *gyrA* geni, 7; *C. amycolatum* TCAY 1 *gyrA* geni, 8; *C. singulare* TCSU 1 *gyrA* geni.

Tablo 9’da siprofloksasin disk diffüzyon testinde dirençli çıkan, randomize seçilen 26 *C. striatum* suşunda *gyrA* nın QRDR bölgesindeki mutasyonu tespit etme amaçlı yapılan sekans işleminin sonuçları ve bu suşlardan 11’ine uygulanan siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test ve sıvı mikrodilüsyon testleri sonuçları gösterilmiştir. Ayrıca siprofloksasin disk diffüzyon testi duyarlı çıkan *C. striatum* TCST 13 ve *C. striatum* TCST 77 suşları ise duyarlı kontrol suşlar olarak sekans işlemine tabi tutulup her ikisine siprofloksasin ve moksifloksasin sıvı mikrodilüsyon testleri uygulanmıştır.

gyrA geni sekanslanan bu suşların 13’ünde QRDR bölgesindeki 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin’e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise alanin’e (D91A) dönüşmüştür. Bu tür mutasyon barındıran dört suşa (*C. striatum* TCST 9, *C. striatum* TCST 14, *C. striatum* TCST 76 ve *C. striatum* TCST 90) siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test uygulanmış olup dört suşun hepsinde MİK değerleri her iki antibiyotik için 32 µg/ml’den yüksek bulunmuştur. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde ise bu dört suşun ikisinde (*C. striatum* TCST 9, *C. striatum*

TCST 14) siprofloksasin MİK değeri 32 µg/ml, diğer ikisinde (*C. striatum* TCST 76, *C. striatum* TCST 90) ise MİK değeri 64 µg/ml olarak bulunmuş; moksifloksasin MİK değeri ise dört suşta 32 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Şekil 3'te kinolon duyarlı *C. striatum* TCST 6 ve dirençli *C. striatum* TCST 14 in *gyrA* gen sekansının kromatografik karşılaştırılması yapılmıştır.

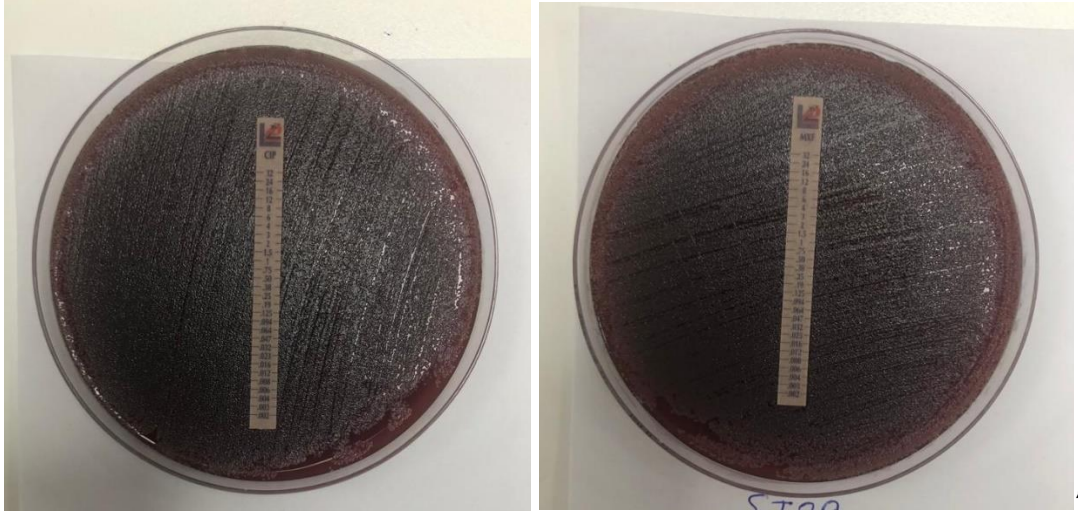
İncelenen suşların 11'inde QRDR bölgesindeki 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise glisin'e (D91G) dönüşmüştür. Şekil 3'te *C. striatum* TCST 29'un QRDR bölgesindeki mutasyonlu bölgeleri belirten dizilim gösterilmiştir. Bu tür mutasyon barındıran beş suşun (*C. striatum* TCST 23, *C. striatum* TCST 29, *C. striatum* TCST 56, *C. striatum* TCST 64 ve *C. striatum* TCST69) siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test değerleri 32 µg/ml'den yüksek bulunmuştur.

atg	ggt	cag	ttc	cac	ccg	cac	ggt	gac	tcc	gca	att	tat	gac	acg	ttg	gtg	cgt	ctg	gcg
M	G	Q	F	H	P	H	G	D	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A
cag	tcc	tgg	aac	atg	cgc	tac	ccg	ctg	gtt	gac	ggc	cag	ggt	aac	ttc	ggg	tcc	cgc	ggc
Q	S	W	N	M	R	Y	P	L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	R	G

atg	ggt	cag	ttc	cac	ccg	cac	ggt	gac	ttc	gca	att	tat	ggc	acg	ttg	gtg	cgt	ctg	gcg
M	G	Q	F	H	P	H	G	D	F	A	I	Y	G	T	L	V	R	L	A
cag	tcc	tgg	aac	atg	cgc	tac	ccg	ctg	gtt	gac	ggc	cag	ggt	aac	ttc	ggg	tcc	cgc	ggc
Q	S	W	N	M	R	Y	P	L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	R	G

Şekil 3. Kinolon duyarlı *C. striatum* ATCC 6940 suşunun *gyrA* geni ile *C. striatum* TCST 29 suşunun *gyrA* gen dizilimlerinin karşılaştırılması

Sıvı mikrodilüsyon yönteminde ise bu suşların üçünde (TCST 29, *C. striatum* TCST 56, *C. striatum* TCST 69) siprofloksasin MİK değeri 64 µg/ml, ikisinde (TCST 23, *C. striatum* TCST 64) ise MİK değeri 32 µg/ml olarak bulunmuş; moksifloksasin MİK değeri ise hepsinde 32 µg/ml olarak tayin edilmiştir. Şekil 4'te ise *C. striatum* TCST 29'un siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4. *C. striatum* TCST 29 suşunun siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip testi

gyrA geni sekanslanan iki suşun (*C. striatum* TCST 21, *C. striatum* TCST 58) QRDR bölgesindeki mutasyon ise 87. pozisyonda bulunan serin, valin'e (S87V); 91. pozisyonundaki aspartik asit ise glisin'e (D91G) dönüşmüştür. Bu suşların hepsinde siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test değerleri 32 µg/ml' den yüksek bulunmuş, sıvı mikrodilüsyon yönteminde moksifloksasin MİK değeri ise hepsinde 32 µg/ml olarak tayin edilmiştir. Siprofloksasin MİK değeri ise bir suşta (*C. striatum* TCST 21) 32 µg/ml, diğer suşta ise 64 µg/ml olarak bulunmuştur. Şekil 5'te bazı *Corynebacterium* suşlarının siprofloksasin sıvı dilüsyon yöntemi ile MİK değerleri gösterilmiştir.

2048 1024 512 256 128 64 32 16 8 4 PK NK
µg/ml



E.coli
25299
E.coli
25299
TCST 1
TCST 76
TCAU 5
TCAU 4
TCAF 6
TCPD 1

Şekil 5. Bazı *Corynebacterium* türlerinin siprofloksasin sıvı mikrodilüsyon testi sonuçları. *C. striatum* TCST 1, *C. striatum* TCST 76, *C. aurimucosum* TCAU 5, *C. aurimucosum* TCAU 4, *C. afermentans* TCAF 6, *C. pseudodiphtheriticum* TCPD 1, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol.

Duyarlı kontrol suş olarak kullanılan *C. striatum* TCST 13 suşunda QRDR bölgesinde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde ise siprofloksasin MİK değeri 0,0312 µg/ml, moksifloksasin MİK değeri 0,0312 µg/ml bulunmuştur. Bir diğer duyarlı kontrol suş olan *C. striatum* TCST 77' de ise 99. pozisyondaki serin prolin'e (S99P) dönüşmüştür. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde moksifloksasin ve siprofloksasin MİK değeri ise 0,125 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Şekil 4'te kinolon duyarlı *C. striatum* ATCC 6940 ve *C. striatum* TCST 77 suşunun *gyrA* gen dizilimlerinin karşılaştırılması gösterilmiştir. Şekil 5'te ise kinolon duyarlı *C. striatum* TCST 13 ve dirençli *C. striatum* TCST 14 in *gyrA* gen sekansının kromatografik karşılaştırılması gösterilmiştir.

atg	ggt	cag	ttc	cac	ccg	cac	ggt	gac	tcc	gca	att	tat	gac	acg	ttg	gtg	cgt	ctg	gcg
M	G	Q	F	H	P	H	G	D	<u>S</u>	A	I	Y	<u>D</u>	T	L	V	R	L	A
cag	tcc	tgg	aac	atg	cgc	tac	ccg	ctg	gtt	gac	ggc	cag	ggt	aac	ttc	ggt	tcc	cgc	ggc
Q	S	W	N	M	R	Y	P	L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	R	G

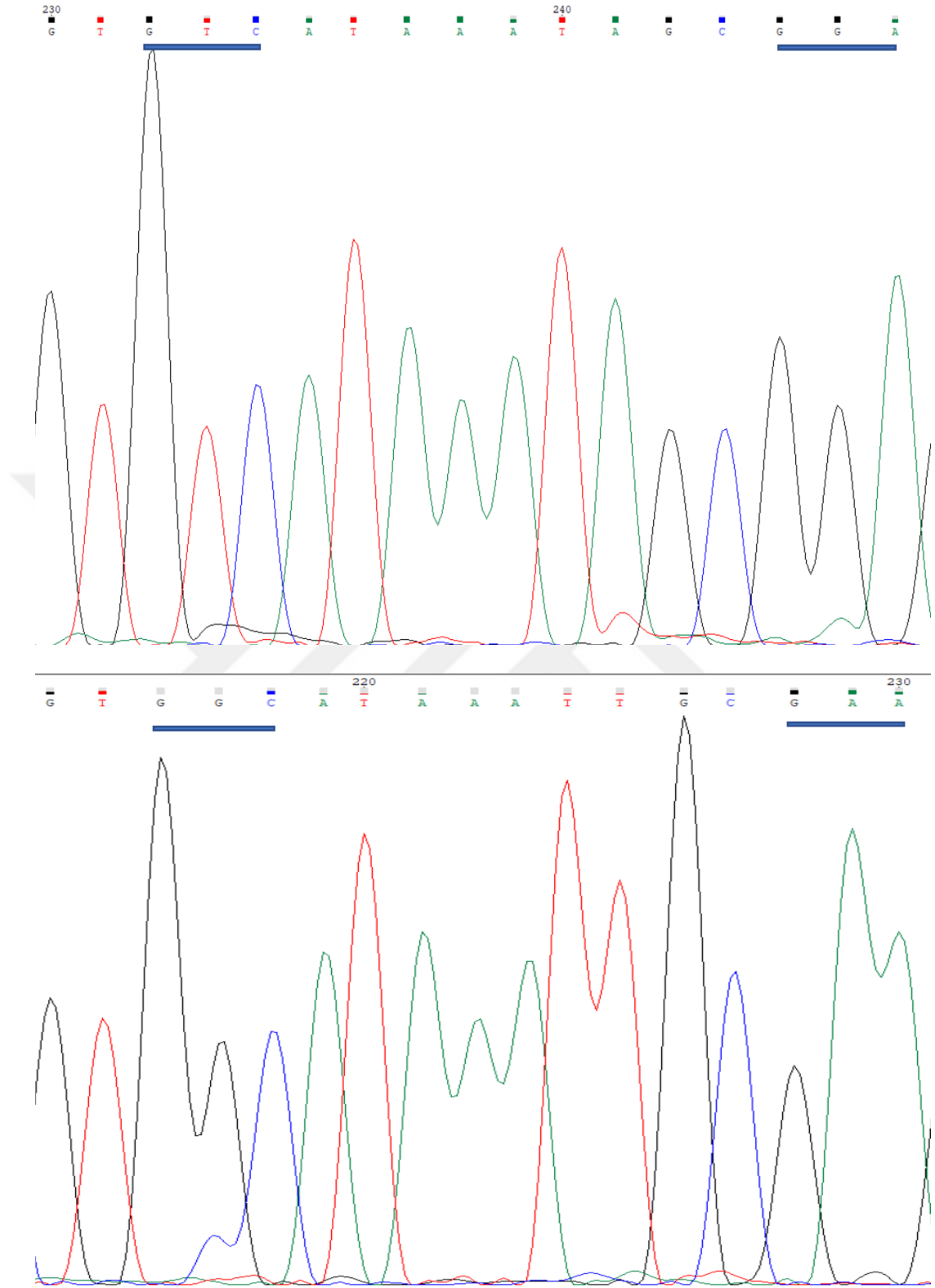
atg	ggt	cag	ttc	cac	ccg	cac	ggt	gac	tcc	gca	att	tat	gac	acg	ttg	gtg	cgt	ctg	gcg
M	G	Q	F	H	P	H	G	D	<u>S</u>	A	I	Y	<u>D</u>	T	L	V	R	L	A
cag	ccg	tgg	aac	atg	cgc	tac	ccg	ctg	gtt	gac	ggc	cag	ggt	aac	ttc	ggt	tcc	cgc	ggc
Q	P	W	N	M	R	Y	P	L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	R	G

Şekil 6. Kinolon duyarlı *C. striatum* ATCC 6940 ve *C. striatum* TCST 77 suşunun *gyrA* gen dizilimlerinin karşılaştırılması



Tablo 9. *C. striatum* Suşlarında *gyrA* Aminoasit Değişimi ve Siprofloksasin ve Moksifloksasin Gradient Strip Test ve Sıvı Dilüsyon Testi MİK Sonuçları (µg/mL)

Suşlar	CIP	GyrA Sekans Değişimi			Antibiyotik Duyarlılık Testleri			
		Poz 87 (Serin)	Poz 91 (Aspartik asit)	Poz 99 (Serin)	CIP strip test	CIP sıvı dilüsyon	MOXI strip test	MOXI sıvı dilüsyon
TCST 13	S	Serin (S)	Aspartik asit (D)	-		0,0312		0,0312
TCST 77	S	Serin (S)	Aspartik asit (D)	Prolin (P)		0,125		0,125
TCST 9	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-	>32	32	>32	32
TCST 14	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-	>32	32	>32	32
TCST 15	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 20	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 21	R	Valin (V)	Glisin (G)	-	>32	32	>32	32
TCST 22	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 23	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	>32	32	>32	32
TCST 24	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 26	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 29	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	>32	64	>32	32
TCST 30	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 32	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-				
TCST 41	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-				
TCST 42	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-				
TCST 44	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-				
TCST 48	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 52	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-				
TCST 57	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 58	R	Valin (V)	Glisin (G)	-	>32	64	>32	32
TCST 56	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	>32	64	>32	32
TCST 64	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	>32	32	>32	32
TCST 69	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	>32	64	>32	32
TCST 76	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-	>32	64	>32	32
TCST 90	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-	>32	64	>32	32
TCST 92	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCST 93	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-				



Şekil 7. Kinolon duyarlı *C. striatum* TCST 13 ve dirençli *C. striatum* TCST 14'ün *gyrA* gen sekansının kromatogramlarının karşılaştırılması

Tablo 10’da *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* izole edilen örneklerin servislere göre dağılım oranları verilmektedir. *C. afermetans* izole edilen örneklerin beşi (%71,4) dâhiliye, biri (%14,3) ortopedi ve biri (%14,3) genel cerrahi servisinde elde edilmiştir. *C. amycolatum* izolatlarının tamamı yoğun bakım servislerinden elde edilmiştir. *C. pseudodiphtheriticum* örnekleri ise pediatri servisinde alınmıştır.

Tablo 10. İzole Edilen *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* Türlerinin Servislere Göre Dağılımı

Ünite	<i>C. afermetans</i>		<i>C. amycolatum</i>		<i>C. aurimucosum</i>		<i>C. pseudodiphtheriticum</i>		<i>C. jeikeum</i>		<i>C. singulare</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Dâhiliye	5	71,4			2	25			1	50	1	50
Enfeksiyon					1	12,5						
G. cerrahi	1	14,3										
Kadın doğum					2	25						
Ortopedi	1	14,3			1	12,5			1	50		
Pediyatri							2	100				
Üroloji					1	12,5						
Fizik tedavi					1	12,5						
Yoğun bakım 1			1	50								
Yoğun bakım 2			1	50								
Yoğun bakım 3												
Toplam	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100

Tablo 11’de *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* izole edilen örneklerin dağılım oranları verilmektedir. *C. afermetans* izole edilen örneklerin 4’ü (%57,1) kan, 1’i (%14,3) periton mayi, 1’i (% 14,3) plevral mayi ve 1’i (%14,3) yara olarak bulunmuştur. *C. amycolatum* izolatları kan ve TAK örneklerinde saptanmıştır. *C.*

aurimucosum izole edilen örneklerin 6'sı (%75) idrar, 1'i (%12,5) yara ve 1'i (%12,5) eklem sıvısı olarak bulunmuştur. *C. pseudodiphtheriticum* izolatlarının tamamı TAK ve *C. singulare* izolatlarının tamamı kan örneğinde saptanmıştır.

Tablo 11. *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* İzole Edildiği Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Klinik örnek	<i>C. afermetans</i>		<i>C. amycolatum</i>		<i>C. aurimucosum</i>		<i>C. pseudodiphtheriticum</i>		<i>C. jeikeum</i>		<i>C. singulare</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Apse												
Balgam												
Doku												
İdrar					6	75						
Kan	4	57,1	1	50					1	50	1	100
Mayi												
Periton mayi	1	14,3										
Plevral mayi	1	14,3										
TAK			1	50			2	100				
Yara	1	14,3			1	12,5			1	50		
BAL												
Eklem sıvısı					1	12,5						
Toplam	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100

Tablo 12'de *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları verilmiştir. *C. afermetans* izolatlarının tamamı penisilin, klindamisin ve eritromisine dirençli iken, vankomisin ve linezolide duyarlıdır. Yedi *C. afermetans* izolatının beşi (TCAF 1, TCAF 2, TCAF 4, TCAF 6, TCAF 7) rifampisin ve tetrasikline dirençli iken, ikisi (TCAF 3, TCAF 5) duyarlı bulunmuştur. Ayrıca *C. afermetans* izolatlarının dördü (TCAF 2, TCAF 4, TCAF 6, TCAF 7) gentamisine dirençli ve üçü gentamisine duyarlıdır. *C. amycolatum* izolatlarının tamamı penisilin, klindamisin, siprofloksasin ve tetrasikline dirençli bulunurken; gentamisine, vankomisin ve linezolide duyarlı bulunmuştur. Sekiz *C. aurimucosum* izolatının tümü ise penisilin ve siprofloksasine dirençli bulunmuştur. Ayrıca izolatlarının altısı

klindamisin ve yedisi tetrasikline dirençli olarak saptanmıştır. *C. pseudodiphtheriticum* izolatlarının tamamı klindamisin ve siprofloksasine dirençli iken; penisilin, gentamisin, rifampisin, tetrasiklin, vankomisin, linezolid ve eritromisine duyarlıdır. *C. jeikeum* ve *C. singulare* izolatlarının tamamı penisilin, klindamisin, siprofloksasin ve eritromisine dirençli iken; vankomisin ve linezolide duyarlıdır. Ayrıca hiçbir suşta klindamisin duyarlı eritromisin dirençli suş saptanmadığı için indüklenebilir MLSB direnç testi (D test) gerçekleştirilmemiştir.

Tablo 12. *C. afermetans*, *C. amycolatium*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Antibiyotik		<i>C. afermetans</i>		<i>C. amycolatium</i>		<i>C. aurimucosum</i>		<i>C. pseudodiphtheriticum</i>		<i>C. jeikeum</i>		<i>C. singulare</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Penisilin	R	7	100	2	100	8	100			2	100	1	100
	S							2	100				
Klindamisin	R	7	100	2	100	6	75	2	100	2	100	1	100
	S					2	25						
Siprofloksasin	R	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
	S												
Gentamisin	R	4	57,1			4	50			1	50	1	100
	S	3	42,9	2	100	4	50	2	100	1	50		
Rifampisin	R	5	71,4	1	50	5	62,5			1	50		
	S	2	28,6	1	50	3	37,5	2	100	1	50	1	100
Tetrasiklin	R	5	71,4	2	100	7	87,5			1	50	1	100
	S	2	28,6			1	12,5	2	100	1	50		
Vankomisin	R												
	S	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
Linezolid	R												
	S	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
Eritromisin	R	7	100	1	50	5	62,5			2	100	1	100
	S			1	50	3	37,5	2	100				

C. afermetans, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* izolatlarının tamamında *gyrA* geni amplifiye edilmiş ve *ermX* geni pozitif bulunurken; *tetM*, *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* genleri negatif bulunmuştur. *aac(3)-XI* geni *C. afermetans* izolatlarının beşinde (TCAF 1, TCAF 4, TCAF 5, TCAF 6, TCAF 7) pozitif bulunmuştur. *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum* ve *C. jeikeum* izolatlarının tamamında *aac(3)-XI* geni pozitif bulunurken, *C. singulare* izolatında *aac(3)-XI* geni negatif bulunmuştur (Tablo 13).

Tablo 13. *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* İzolatlarının Direnç Geni Varlığı Durumları

Direnç geni		<i>C. afermetans</i>		<i>C. amycolatum</i>		<i>C. aurimucosum</i>		<i>C. pseudodiphtheriticum</i>		<i>C. jeikeum</i>		<i>C. singulare</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>tetM</i>	Neg	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
	Poz												
<i>ermA</i>	Neg	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
	Poz												
<i>ermB</i>	Neg	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
	Poz												
<i>ermX</i>	Neg												
	Poz	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
<i>mefA-E</i>	Neg	7	100	2	100	8	100	2	100	2	100	1	100
	Poz												
<i>aac(3)-XI</i>	Neg	2	28,6									1	100
	Poz	5	71,4	2	100	8	100	2	100	2	100		

Tablo 14'te *C. afermetans* izolatlarının gen varlığına göre antimikrobiyal duyarlılık durumları ile ilgili değerlendirmeler verilmiştir. İzolatlarının hepsi siprofloksasin ve penisilin dirençlidir. *tetM* geni tüm suşlarda negatif olup suşların beşi tetrasikline dirençlidir. Şuşların hepsi *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* negatif, *ermX* ise pozitif saptanmıştır. Ayrıca tüm *C. afermetans* suşlarının klindamisin ve eritromisine dirençli olduğu bulunmuştur. *aac(3)-XI* geninin pozitif olduğu beş *C. afermetans* suşunun üçünün gentamisin dirençli ve ikisinin gentamisin duyarlı olduğu saptanmıştır.

Tablo 14. *C. afermetans* İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları

Direnç geni		Penisilin				Klindamisin				Siprofloksasin				Gentamisin				Tetrasiklin				Eritromisin			
		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S	
n: 7		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>tetM</i>	Neg															5	71,4	2	28,6						
	Poz																								
<i>ermA</i>	Neg					7	100															7	100		
	Poz																								
<i>ermB</i>	Neg					7	100															7	100		
	Poz																								
<i>ermX</i>	Neg																								
	Poz					7	100															7	100		
<i>mefA-E</i>	Neg					7	100															7	100		
	Poz																								
<i>aac(3)-XI</i>	Neg													1	14,3	1	14,3								
	Poz													3		2	28,6								
																	42,8								

Tablo 15'te *C. amycolatum* izolatlarının gen varlığına göre antimikrobiyal duyarlılık durumları ile ilgili değerlendirmeler verilmiştir. İzolatlarının hepsi siprofloksasin ve penisiline dirençli bulunmuştur. *tetM* geni tüm suşlarda negatif olup suşların hepsi tetrasiklin dirençlidir. *ermB*, *ermA* ve *mefA/E* genleri tüm suşlarda negatif, *ermX* geni tüm suşlarda pozitif bulunmuş olup suşlarının hepsi klindamisine dirençli, yarısı eritromisine dirençlidir. *aac(3)-XI* geni tüm suşlarda pozitif olup, *C. amycolatum* suşlarının hepsinde gentamisine duyarlılığı saptanmıştır.



Tablo 15. *C. amycolatum* İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları

Direnç geni		Penisilin		Klindamisin		Siprofloksasin		Gentamisin		Tetrasiklin		Eritromisin	
		R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
n: 2		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>tetM</i>	Neg									2	100		
	Poz												
<i>ermA</i>	Neg			2	100							1	50
	Poz												
<i>ermB</i>	Neg			2	100							1	50
	Poz												
<i>ermX</i>	Neg												
	Poz			2	100							1	50
<i>mefA-E</i>	Neg			2	100							1	50
	Poz												
<i>aac(3)-XI</i>	Neg												
	Poz							2	100				

Tablo 16’da *C. aurimucosum* izolatlarının gen varlığına göre antimikrobiyal duyarlılık durumları ile ilgili değerlendirmeler verilmiştir. İzolatlarının hepsi siprofloksasin ve penisilin dirençlidir. *tetM* geninin negatif olduğu suşların yedisi tetrasiklin dirençli iken biri tetrasiklin duyarlıdır. *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* tüm şuşlarda negatif; *ermX* ise tüm şuşlarda pozitif bulunmuş ve suşların altısı klindamisin, beşi eritromisine dirençli bulunmuştur. *aac(3)-XI* geninin tüm şuşlarda amplifiye olduğu *C. aurimucosum* izolatlarının dördünün gentamisine dirençli, dördünün duyarlı olduğu saptanmıştır.



Tablo 16. *C. aurimucosum* İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları

Direnç geni		Penisilin				Klindamisin				Siprofloksasin				Gentamisin				Tetrasiklin				Eritromisin			
		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S	
n: 8		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>tetM</i>	Neg															7	87,5	1	12,5						
	Poz																								
<i>ermA</i>	Neg					6	75	2	25													5	67,5	3	37,5
	Poz																								
<i>ermB</i>	Neg					6	75	2	25													5	67,5	3	37,5
	Poz																								
<i>ermX</i>	Neg																								
	Poz					6	75	2	25													5	67,5	3	37,5
<i>mefA-E</i>	Neg					6	75	2	25													5	67,5	3	37,5
	Poz																								
<i>aac(3)-XI</i>	Neg																								
	Poz													4	50	4	50								

Tablo 17’de *C. pseudodiphtheriticum* izolatlarının gen varlığına göre antimikrobiyal duyarlılık durumları ile ilgili değerlendirmeler verilmiştir. İzolatlarının hepsi siprofloksasin dirençli, penisilin duyarlıdır. *tetM* geni hepsinde negatif olup suşların hepsi tetrasiklin duyarlıdır. Suşların hepsinde *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* negatif, *ermX* pozitif bulunmuş ve suşlarının hepsi klindamisine ve eritromisine dirençli saptanmıştır. *aac(3)-XI* geni tüm suşlarda pozitif olup suşlarının hepsi gentamisine duyarlıdır.



Tablo 17. *C. pseudodiphtheriticum* İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları

Direnç geni		Penisilin		Klindamisin		Siprofloksasin		Gentamisin		Tetrasiklin		Eritromisin	
		R		S		R		S		R		S	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
n: 2													
<i>tetM</i>	Neg									2	100		
	Poz												
<i>ermA</i>	Neg					2	100					2	100
	Poz												
<i>ermB</i>	Neg					2	100					2	100
	Poz												
<i>ermX</i>	Neg												
	Poz					2	100					2	100
<i>mefA-E</i>	Neg					2	100					2	100
	Poz												
<i>aac(3)-XI</i>	Neg												
	Poz							2	100				

Tablo 18’de *C. jeikeum* izolatlarının gen varlığına göre antimikrobiyalduyarlılık durumları ile ilgili değerlendirmeler verilmiştir. İzolatlarının hepsi siprofloksasin ve penisilin dirençlidir. *tetM* geni hepsinde negatif olup yarısı tetrasikline dirençlidir. Suşlarda *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* negatif, *ermX* pozitif bulunup suşların hepsi klindamisin ve eritromisine dirençlidir. *aac(3)-XI* geni hepsinde pozitif bulunan *C. jeikeum* suşlarında gentamisine direnç oranı %50 saptanmıştır.



Tablo 18. *C. jeikeum* İzolatlarının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranları

Direnç geni		Penisilin				Klindamisin				Siprofloksasin				Gentamisin				Tetrasiklin				Eritromisin			
		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S	
N: 2		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>tetM</i>	Neg															1	50	1	50						
	Poz																								
<i>ermA</i>	Neg					2	100															2	100		
	Poz																								
<i>ermB</i>	Neg					2	100															2	100		
	Poz																								
<i>ermX</i>	Neg																								
	Poz					2	100															2	100		
<i>mefA-E</i>	Neg					2	100															2	100		
	Poz																								
<i>aac(3)-XI</i>	Neg																								
	Poz													1	50	1	50								

Tablo 19’da *Corynebacterium singulare* izolatının gen varlığına göre antimikrobiyal duyarlılık durumları ile ilgili değerlendirmeler verilmiştir. *Corynebacterium. singulare* izolatı siprofloksasin ve penisilin dirençlidir. Suşta *tetM* geninin negatif olup tetrasikline dirençlidir. *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* negatif, *ermX* pozitif olan suş klindamisin ve eritromisine dirençlidir. *C. singulare* izolatında *aac(3)-XI* geni ise pozitif bulunmuş ve gentamisine dirençli saptanmıştır.



Tablo 19. *C. singulare* İzolatının Direnç Geni Varlığına Göre Antibiyotik Duyarlılık Oranı

Direnç geni		Penisilin				Klindamisin				Siprofloksasin				Gentamisin				Tetrasiklin				Eritromisin			
		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S		R		S	
N: 1		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>tetM</i>	Neg															1	100								
	Poz																								
<i>ermA</i>	Neg					1	100															1	100		
	Poz																								
<i>ermB</i>	Neg					1	100															1	100		
	Poz																								
<i>ermX</i>	Neg																								
	Poz					1	100															1	100		
<i>mefA-E</i>	Neg					1	100															1	100		
	Poz																								
<i>aac(3)-XI</i>	Neg																								
	Poz													1	100										

Tablo 20’de siprofloksasin disk diffüzyon testinde dirençli çıkan, tüm *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* suşlarında *gyrA*’nın QRDR bölgesindeki mutasyonu tespit etme amaçlı yapılan sekans işleminin sonuçları ve bu suşlara uygulanan siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test ve sıvı mikrodilüsyon testlerinin MİK sonuçları gösterilmiştir.

İncelenen iki *C.jeikeum* suşunun birinde (TCJK 1) QRDR bölgesindeki 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin’e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise glisin’e (D91G) dönüşmüştür. Diğer *C. jeikeum* suşunda ise (TCJK 2) 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin’e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise alanin’e (D91A) dönüşmüştür. Tüm suşlarda siprofloksasin gradient strip test değerleri 32 µg/ml’den yüksek bulunmuş olup sıvı mikrodilüsyon yönteminde ise bu suşların siprofloksasin MİK değeri 32 µg/ml saptanmıştır. Moksifloksasin MİK değeri ise tüm *C. jeikeum* suşlarında gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon testlerinde 4 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

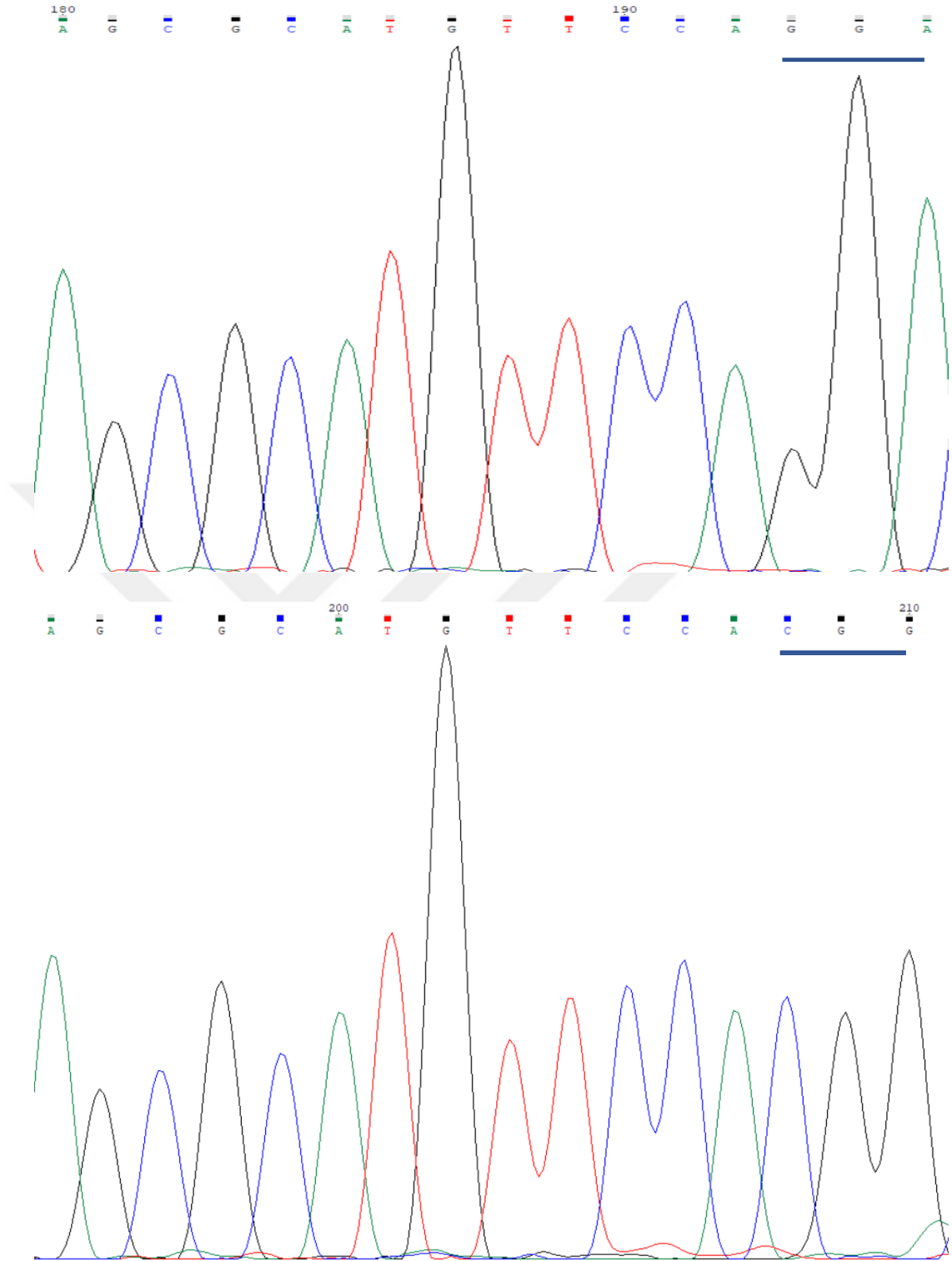
Sekiz *C. aurimucosum* suşları incelendiğinde, bir izolatta (TCAU 1) QRDR bölgesindeki 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin’e (S87F) dönüşmüş olup başka pozisyonlarda mutasyon saptanmamıştır. Siprofloksasin gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri 2 µg/ml, moksifloksasin gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri sırasıyla 1,5 µg/ml ve 2 µg/ml olarak bulundu. İki suшта (TCAU 2, TCAU 4) 99. pozisyonda bulunan serin, prolin’e (S99P) dönüşmüş olup başka pozisyonlarda mutasyon saptanmamıştır. Şekil 8’de bu tür mutasyon barındıran *C. aurimucosum* TCAU 4 suşunun kinolon duyarlı *C. striatum* ATCC 6940 suşu ile *gyrA* gen dizilimlerinin karşılaştırılması gösterilmiştir.

atg	ggt	cag	ttc	cac	ccg	cac	ggt	gac	tcc	gca	att	tat	gac	acg	ttg	gtg	cgt	ctg	gcg
M	G	Q	F	H	P	H	G	D	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A
cag	tcc	tgg	aac	atg	cgc	tac	ccg	ctg	gtt	gac	ggc	cag	ggt	aac	ttc	ggt	tcc	cgc	ggc
Q	S	W	N	M	R	Y	P	L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	R	G

atg	ggt	cag	ttc	cac	ccg	cac	ggt	gac	tcc	gca	att	tat	gac	acg	ttg	gtg	cgt	ctg	gcg
M	G	Q	F	H	P	H	G	D	S	A	I	Y	D	T	L	V	R	L	A
cag	tcc	tgg	aac	atg	cgc	tac	ccg	ctg	gtt	gac	ggc	cag	ggt	aac	ttc	ggt	tcc	cgc	ggc
Q	P	W	N	M	R	Y	P	L	V	D	G	Q	G	N	F	G	S	R	G

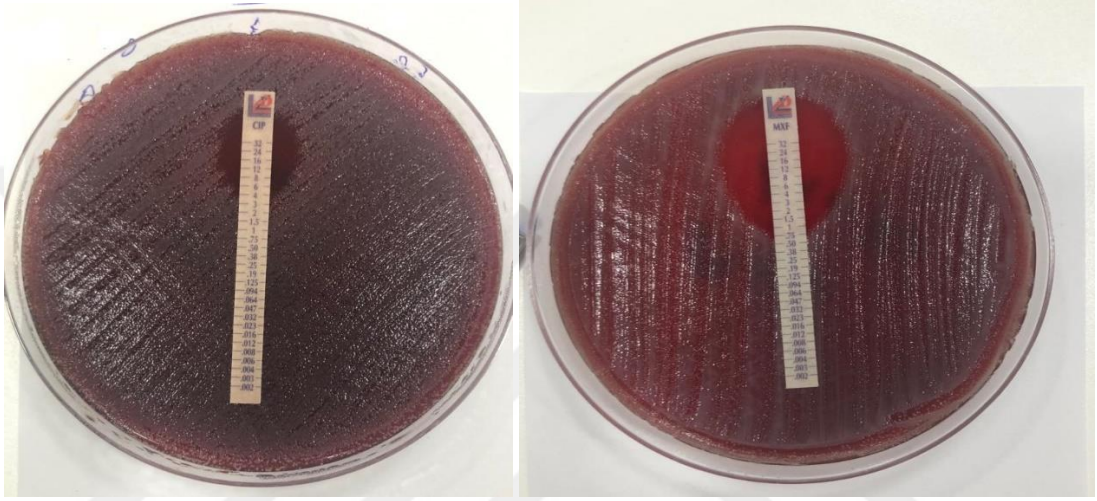
Şekil 8. Kinolon duyarlı *C. striatum* ATCC 6940, ve *C. aurimucosum* TCAU 4 suşlarının *gyrA* gen dizilimlerinin karşılaştırılması

Şekil 9’da ise *C. aurimucosum* TCAU 4 suşundaki prolin mutasyonu kromotografik olarak kinolon duyarlı suş olan *C. striatum* TCST 13 ile karşılaştırılarak gösterilmiştir. Her iki suшта da siprofloksasin gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri sırasıyla 12 µg/mL ve 16 µg/mL, moksifloksasin gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri ise 1 µg/mL saptandı. Bir suшта ise (TCAU 3) 87. pozisyonda bulunan serin, izolösin’e (S87I); 99. pozisyonda bulunan serin, prolin’e (S99P) dönüşmüştür. Bu suştaki siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test MİK değeri >32 µg/mL, siprofloksasin sıvı mikrodilüsyon MİK değeri 64 µg/mL, moksifloksasin sıvı mikrodilüsyon MİK değeri 32 µg/mL saptandı. İki suшта (TCAU 6, TCAU 8) 87. pozisyonda bulunan serin, valin’e (S87V); 99. pozisyonda bulunan serin, prolin’e (S99P) dönüşmüştür. Her iki suшта da siprofloksasin gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri 4 µg/mL, moksifloksasin gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri ise 1 µg/mL olarak bulundu. *C. singulare* suşunun (TCSU 1) *gyrA* geni mutasyonu incelemesinde S87F-S91G mutasyonu saptanmış olup gradient stirp test eksikliğinden dolayı MİK değeri çalışılamamıştır.



Şekil 9. *C. striatum* TCST 13 ve *C. aurimucosum* TCAU 4'ün *gyrA* gen sekansının kromatogramlarının karşılaştırılması

Şekil 10'da bu tür mutasyon bulunan *C. aurimucosum* TCAU 8 suşunun siprofloksasin ve moksifloksasin Gradient strip test sonuçları gösterilmiştir. Geriye kalan iki *C. aurimucosum* suşunda (TCAU 5, TCAU 7) ise 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise glisin'e (D91G) dönüşmüştür. Bu suşlarda siprofloksasin gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri 8 µg/mL, moksifloksasin gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri ise 4 µg/mL olarak bulundu.



Şekil 10. *C. aurimucosum* TCAU 8 suşunun siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip testi

İki *C. amycolatum* izolatlarının hepsinde (TCAY 1, TCAY 2) 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise glisin'e (D91G) dönüşmüş olup bu suşlardaki siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test ve sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri her iki antibiyotik için sırasıyla >32 µg/mL ve 32 µg/mL olarak bulundu.

İki *C. pseudodiphtheriticum* izolatlarının hepsinde (TCPD 1, TCPD 2) 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise glisin'e (D91G) dönüşmüştür. Her iki suşta siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test MİK değeri >32 µg/mL olarak bulunmuş; siprofloksasin sıvı mikrodilüsyon MİK değeri bir suşta 64 µg/mL, diğer suşta ise 32 µg/mL saptanmıştır. *C. singulare* izolatında ise 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyondaki

aspartik asit ise glisin'e (D91G) dönüşmüştür. Yeterli sayıda gradient strip test elimizde bulunmadığından MİK değeri *C. singulare* için çalışılmadı.

Üç *C. afermentans* suşunun, (TCAF 2, TCAF 4, TCAF 6) 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise alanin'e (D91A), diğer üç *C. afermentans* suşunda ise (TCAF 3, TCAF 5, TCAF 7) 87. pozisyonda bulunan serin, fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyondaki aspartik asit ise glisin'e (D91G) dönüşmüştür. Geri kalan bir suşda (TCAF 1) ise 87. pozisyonda bulunan serin, valin'e (S87V); 91. pozisyondaki aspartik asit ise glisin'e (D91G) dönüşmüştür. Suşların beşine gradient strip ve sıvı mikrodilüsyon testleri çalışılmış, çalışılan suşların siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test MİK değerleri >32 µg/mL, sıvı mikrodilüsyon MİK değerleri dört suşta 32 µg/mL, bir suşta ise 64 µg/mL olarak bulunmuştur.

Tablo 20. *C. afermetans*, *C. amycolatium*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* Suşlarında *gyrA* Aminoasit Değişimi ve Siprofloksasin ve Moksifloksasin Gradient Strip Test ve Sıvı Dilüsyon Testi MİK Sonuçları (µg/mL)

Suş	CIP	GyrA aminoasit değişimi			Antibiyotik Duyarlılık Testi			
		Poz 87 (Serin)	Poz 91 (Aspartik asit)	Poz 99 (Serin)	CIP strip test	CIP sıvı dilüsyon	MOXI strip test	MOXI sıvı dilüsyon
TCJK 1	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	>32	32	4	4
TCJK 2	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-	>32	32	4	4
TCAU 1	R	Fenilalanin (F)	-	-	2	2	1.5	2
TCAU 2	R	-	-	Prolin (P)	12	16	1	1
TCAU 3	R	İzolösin (I)	-	Prolin (P)	> 32	64	>32	32
TCAU 4	R	-	-	Prolin (P)	12	16	1	1
TCAU 5	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	8	8	4	4
TCAU 6	R	Valin (V)	-	Prolin (P)	4	4	1	1
TCAU 7	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	8	8	4	4
TCAU 8	R	Valin (V)	-	Prolin (P)	4	4	1	1
TCAY 1	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	> 32	32	> 32	32
TCAY 2	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	> 32	32	> 32	32
TCPD 1	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	> 32	64	> 32	64
TCPD 2	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	> 32	32	> 32	32
TCSU 1	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)					
TCAF 1	R	Valin (V)	Glisin (G)	-	> 32	32	> 32	32
TCAF 2	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-				
TCAF 3	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	> 32	32	> 32	32
TCAF 4	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-	> 32	64	> 32	64
TCAF 5	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-	> 32	32	> 32	32
TCAF 6	R	Fenilalanin (F)	Alanin (A)	-	> 32	32	> 32	32
TCAF 7	R	Fenilalanin (F)	Glisin (G)	-				

ermX ve *aac(3)-XI* pozitif çıkan bir suşun DNA dizi analizinin doğrulanması amacıyla *C. striatum* TCST 7 suşu sekans işlemine tabi tutulmuş, çıkan veriler BLAST programı (URL– 1, 2005) kullanılarak program veri tabanındaki tanımlanmış genlerle eşleştirilmiştir. Çıkan sonuçta *C. striatum* TCST 7 suşu *ermX* sekansının 23S rRNA adenine (2058)-N(6))-methyltransferase *ermX* (*C. striatum*) Sequence ID: WP_011116967.1 numaralı protein sekansı ile benzerliği %99,37 olup şekil 8’de gösterilmiştir, *Aac(3)-XI* sekansının aminoglycoside N-acetyltransferase *aac(3)-XI* (*Corynebacterium striatum*) Sequence ID: HAT1277430.1 numaralı protein sekansı ile benzerliği %97,58 bulunmuş ve şekil 9’da gösterilmiştir.

23S rRNA (adenine(2058)-N(6))-methyltransferase Erm(X) [*Corynebacterium striatum*]

Sequence ID: [WP_011116967.1](#) Length: 253 Number of Matches: 2

[See 2 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 43 to 201 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
321 bits(823)	5e-109	Compositional matrix adjust.	158/159(99%)	158/159(99%)	0/159(0%)	-3
Query 526	SGALTHPMAHLGRAITAVEVD	AKLAAKITQETSSAAVEVHDDFLNFR	LDPATPCVIVGNI	347		
Sbjct 43	SGALTHPMAHLGRAITAVEVD	AKLAAKITQETSSAAVEVHDDFLNFR	LDPATPCVIVGNI	102		
Query 346	PFHLTTAILRKLLHAPAWTDAVLLMQWEVARRRAGVGASTM	MTAQWSPWFTFHLGSRVPR	167			
Sbjct 103	PFHLTTAILRKLLHAPAWTDAVLLMQWEVARRRAGVGASTM	MTAQWSPWFTFHLGSRVPR	162			
Query 166	TAFRPQPNVDGGILVIRRVGDPKIP	IEQRKAFQAMVHTV	50			
Sbjct 163	PAFRPQPNVDGGILVIRRVGDPKIP	IEQRKAFQAMVHTV	201			

Şekil 11. *C. striatum* TCST 7 suşu *ermX* DNA dizisinin BLAST analizi

aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(3)-XI [Corynebacterium striatum]

Sequence ID: [HAT1277430.1](#) Length: 148 Number of Matches: 1

[See 4 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 25 to 148 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
249 bits(635)	1e-82	Compositional matrix adjust.	121/124(98%)	122/124(98%)	0/124(0%)	+2
Query	41	FHTEFDTVPVPEGLEERFAQIIAHDDAFVLLAGDIGFAYVTLRPSYYDGPVAMLDLYVA			220	
Sbjct	25	F+TEFDTVPVPEGLEERFAQIIAHDDAFVLLAGDIGFAYVTLRPSYYDGPVAMLDLYVA			84	
Query	221	PAHRNRGVGTALLQRVFEEIRKHSAGELQINVDEVDTDARRFYERHGLTNIEQGSRMILLY			400	
Sbjct	85	PAHRNRGVGTALLQRVFEEIRKHSAGELQINVDEVDTDARRFYERHGLTNIEQGSRMILLY			144	
Query	401	IRXL 412				
Sbjct	145	IR L 148				

Şekil 12. *C. striatum* TCST 7 suşu *aac(3)-XI* DNA dizisinin BLAST analizi

5. TARTIŞMA

Corynebacterium türleri, çevrede ve insan ve hayvanların mikrobiyotalarında geniş çapta dağılmıştır. Tıbbi önemi olan *Corynebacterium* türleri, başlıca difteri etkeni *Corynebacterium diphtheriae*'yi ve deri ve mukozal yüzeylerin normal floralarının bir parçası olan difteri olmayan korinebakterileri içerir. Difteri olmayan korinebakteriler, klinik materyallerden izole edildiklerinde sıklıkla kontaminant olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, son yıllarda bu bakterilerin hastalıklardaki rolü daha açık bir şekilde belirlenmiştir.

C. striatum, steril vücut bölgelerinden, kalıcı tıbbi cihazlardan veya çeşitli numunelerde izole edildiğinde gerçek bir patojen olarak kabul edilmektedir (175). Bir izolatın enfeksiyonu, kolonizasyonu veya kontaminasyonu temsil edip etmediği klinik değerlendirmeye dayanır. Klinik olarak *C. striatum* mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha sık izole edilmiş tür olup hem immün sistemi baskılanmış hem de immün sistemi uyumlu konaklarda potansiyel bir patojen olarak rol oynadığı rapor edilmiştir (176). Bu bakteri ile bakteremi, endokardit, kapak hasarı, menenjit, vajinit ve idrar yolu enfeksiyonları, solunum yolu, yaralar, deri ve göz olmak üzere çeşitli enfeksiyonlar ilişkilendirilmiştir (46, 176). Birkaç vaka raporu, *C. striatum*'u pnömoni, vertebral osteomyelit, sepsis ve endokardit gibi enfeksiyonların bir nedeni olarak tanımlamıştır (46). *C. striatum*'un antibiyotik duyarlılık profili spesifik bir tedavi oluşturmak için gereklidir. İlk çalışmalar, *C. striatum* klinik izolatlarının çok çeşitli antibiyotiklere duyarlı olduğunu göstermesine rağmen, son raporlar çoklu ilaç direncinde artış olduğunu göstermiştir (69). Altta yatan hastalıkları olan ve birden fazla antibiyotik tedavisi alan hastalar ve ilaca dirençli *C. striatum* suşları nazokomiyal büyük salgınların kökeninde olabilir. Ayrıca klonal çoklu ilaca dirençli birkaç *C. striatum* salgını bildirilmiştir (61, 70).

C. striatum'un genellikle penisilin, sefazolin, imipenem ve vankomisin gibi çeşitli antimikrobiyal ajanlara duyarlı olduğunu ortaya konulmuştur (67). Bununla birlikte, birçok çalışmada çoklu ilaç direncinde bir artış bulmuştur (61, 63, 68). Yoo ve ark. (69)'nın yaptığı çalışmada çoklu ilaca dirençli *C. striatum*'un neden olduğu bakteriyemi tanımlanmıştır. Başka bir çalışmada, *C. striatum*'un %87'si vankomisin, linezolid ve tetrasiklin dışındaki çoğu antimikrobiyal ajana dirençli olduğu belirtilmiştir (70). Birkaç çalışmada, *Corynebacterium* enfeksiyonlarının, MİK'i

düşük olan daptomisin ile tedavi edilebileceği bildirilmiştir (71, 72). Rolston ve ark. (177, 178), küçük bir *Corynebacterium* tür koleksiyonunda levofloksasin, moksifloksasin veya trovafloksasin gibi birkaç yeni florokinolonun aktivitesini siprofloksasin aktivitesi ile karşılaştırmıştır. Moksifloksasin'in en iyi aktiviteye sahip kinolon olduğunu (test edilen izolatların %90'ının 2 g/mL inhibe edildiği bir MİK bildirilmiştir. Martinez-Martinez ve ark. (179), *C. amycolatum*'un *C. striatum*'dan kinolonlar içinde daha yüksek direnç oranlarına sahip olduğunu göstermiştir.

C. striatum'un neden olduğu enfeksiyonların tedavisi ile ilgili en ciddi sorunlardan biri, çoklu ilaca dirençli suşların klinik materyalden izole edilmesi ve belirli bir enfeksiyon tipi için uygun antibiyotik tedavisinin seçilmesidir. *C. striatum* enfeksiyonları, duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre tedavi edilmelidir. Çoklu ilaç direnci, dış direnç belirleyicilerinin veya kendiliğinden oluşan mutasyonların edinilmesi yoluyla ortaya çıkan çoklu direnç mekanizmalarının karşılıklı etkileşiminden kaynaklanır (180). Martinez-Martinez ve ark. (168) klinik örneklerden izole edilen 31 *C. striatum*'un vankomisine duyarlı olduğunu gösterdi. Gomila ve ark. (181), KOAH olan hastalardan izole edilen 52 *C. striatum* suşunun da vankomisine duyarlı olduğunu bildirdi. *C. striatum*'un neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisi için vankomisin uygun bir seçeneğini temsil etmektedir. Linezolid ayrıca MİK değeri rutin olarak 0,5 mg/L'in altında olan mükemmel bir aktivite göstermiştir (182). Gómez-Garcés ve ark. (183), vankomisin ve linezolid'in, 30 klinik *C. striatum*'a karşı eşit derecede aktif olduğunu gösterdi (her iki bileşiğin MIC 90'ı = 0,5 mg/L). Linezolid, *C. striatum*'a karşı vankomisine bir alternatif olarak düşünülebilir, ancak donanım veya cihazla ilişkili enfeksiyonlar için gereken uzun tedavi süreçleri sırasında yan etkileri düşünülmelidir (68, 72).

Bu araştırmada klinik etken olarak kabul edilen 117 *Corynebacterium* türlerinin 95'i (%81,1) *C. striatum* olarak izole edilmiştir. İzole edilen örneklerin 13'ü (%13,7) balgam, 13'ü (%13,7) kan, 28'i (%29,5) TAK ve 19'u (%20) yara olarak bulunmuştur. Bulgulara göre *C. striatum* izole edilen örneklerin çoğunluğu (%38,1) yoğun bakım servisinde ve %45,3'ünün solunum yolu örneklerinden alınmıştır. *C. striatum* izolatlarının 94'ünün (%98,9) penisilin, 92'sinin (%96,8) klindamisin ve siprofloksasin, 80'inin (%84,2) gentamisin ve rifampisin ve 90'ının (%94,7) tetrasiklin'e dirençli olduğu bulunmuştur. İzolatlarının tamamı vankomisin ve

linezolid'e karşı duyarlı bulunmuştur. *C. striatum* izolatlarının 50'si (%52,6) eritromisin'e dirençli iken, 45'i (%47,4) duyarlı olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda tüm dünyada olduğu gibi bizim hastanemizde de *C. striatum*' un diğer *Corynebacterium* türlerine nazaran daha sık klinik etken olduğu ve *C. striatum*'a karşı çoklu direnç sorunun giderek arttığı görülmüştür.

C. amycolatum son yıllarda bir patojen olarak tanımlanmış olup sepsisemi, endokardit, menenjit, septik artrit ve idrar yolu enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (63, 88, 176). Bir çalışmada *C. amycolatum* en yaygın olarak yara sürüntülerinden (%61,5), idrardan (%14,3), diren sürüntülerinden (% 7,1) izole edilmiştir (89). *C. amycolatum*'da ampicilin, aminoglikozidler, ofloksasin ve doksisisiklin gibi antibiyotiklere yüksek oranda direnç gösteren ve sadece glikopeptidlere duyarlılık gösteren çoklu ilaç direnci fenotipi göstermiştir (184). Esteban ve ark. (87), 18 *C. amycolatum* suşunun neredeyse tamamının eritromisin, klindamisin ve siprofloksasine dirençli olduğunu, bütün suşların vankomisin ve tetrasikline duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada *C. amycolatum* izolatları kan (%50) ve TAK (%50) örneklerinde saptanmış olup *C. amycolatum* izolatlarının tamamı penisilin, klindamisin, siprofloksasin ve tetrasikline dirençli bulunurken; gentamisine, vankomisin ve linezolide duyarlı bulunmuş olup literatürdeki gibi çoklu ilaç direncine sahip olduğu gözlenmiştir. Kısıtlı sayıda örnekte üremesinin nedeni ise üreyen *C. amycolatum* izolatlarının kontaminasyon kabul edilmesi ve buna bağlı olarak az sayıda klinik izolat üzerinde çalışmış olması olarak düşünülebilir.

C. aurimucosum'un idrarda varlığı idrar yolu enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (59). Çalışmalarda *C. aurimucosum* izole edilen örneklerin genel olarak idrar örneklerinden elde edildiği belirtilmiştir (96, 101, 185). Bu çalışmada ise 8 *C. aurimucosum* izole edilmiş ve bunların 6'sı idrar örneklerinden elde edilmiştir. *C. aurimucosum*'un antimikrobiyal duyarlılık profilininin değerlendirildiği bir çalışmada idrar (%28), kan kültürü (%28) ve kemik / sinoviyal sıvı (%19) olmak üzere 57 hastada *C. aurimucosum* klinik izolatu toplanmıştır. *C. aurimucosum*, vakaların %36'sında (idrara yolu enfeksiyonu ve bakteremi) saf kültürde izole edilirken, diğer enfeksiyonlar için karışık kültürler gözlendi. Elli iki klinik izolata yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre izolatların linezolid ve vankomisine tamamen duyarlı olduğu görülürken; izolatların çoğu (>%80) amoksisilin (MİK90, 2 µg/mL), gentamisin,

tetrasiklin ve rifampisine duyarlı bulunmuştur. Hem sefotaksim hem de siprofloksasinin sınırlı bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (suşların yaklaşık %50'si duyarlı). Siprofloksasin için MİK değerleri çoğunlukla $>2 \mu\text{g/mL}$ olan oldukça dirençli suşlardan oluşan bir popülasyon gösterilmiştir. İzolatların çoğu ($>90\%$) penisilin G ve klindamisine dirençli olarak kategorize edilmiştir (186). Bu çalışmada *C. aurimucosum* izolatlarının tamamı penisilin ve siprofloksasine dirençli bulundu. *C. aurimucosum* izolatlarının %75'i klindamisin ve %87,5'i tetrasikline dirençli olarak saptanmış ve izolatlarının tamamı vankomisine ve linezolide duyarlı bulunmuş olup suşların literatürdeki gibi çoklu direnç profilinde olduğu tespit edildi.

C. pseudodiphtheriticum, üst solunum yolunun normal mikrobiyotasının bir üyesi olarak bulunan gram-pozitif bir bakteridir. *C. pseudodiphtheriticum*'un potansiyel olarak nazal uygulama için yeni nesil bir probiyotik olarak da kullanılabileceği belirtilmiştir (187). Bu çalışmada da izole edilen *C. pseudodiphtheriticum* izolatlarının tamamı TAK örneklerinden elde edilmiştir. *C. pseudodiphtheriticum*, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin ve kinolonlara dirençli, beta-laktamlara, vankomisine ve aminoglikozitlere genellikle duyarlıdır (188). Neemuchwala ve ark. (125)'nin araştırmasında, *C. pseudodiphtheriticum* izolatları penisiline ve siprofloksasine yüksek oranda duyarlılığı gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca eritromisin duyarlılığı %21,1 olarak belirtilmiştir. Araştırmada *C. pseudodiphtheriticum*'un beta-laktamlara (%95) çoğunlukla duyarlı olduğu bildirilmiştir. Dragomirescu ve ark. (188)'nin izole ettikleri bir *C. pseudodiphtheriticum* izolatının penisilin, sefuroksim, seftriakson, eritromisin, gentamisin, kloramfenikol, siprofloksasin, rifampin, tetrasiklin, vankomisin, teikoplanin ve klindamisine karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada *C. pseudodiphtheriticum* izolatlarının tamamı klindamisin ve siprofloksasine dirençli iken; penisilin, gentamisin, rifampisin, tetrasiklin, vankomisin, linezolid ve eritromisine duyarlı olarak bulunmuş olup, sonuçlar genel olarak literatür ile uyum sağlamaktadır.

Neemuchwala ve ark. (125)'nin araştırmasında izole edilen *C. afermentans* izolatlarının %19,2'si kan örneklerinden izole edilmiştir. Mevcut çalışmadaki 7 *C. afermentans* suşunun 4'ü kan, biri periton mayi, biri plevral mayi ve biri yaradan izole edilmiştir. *C. afermentans* HIV ile enfekte olmuş bir hastada plöropulmoner

nekrotizan enfeksiyon vakası tanımlanmıştır. *C. afermentans* bir endokardit vakasında izole edilmiş ve ampisilin, sefazolin, seftriakson, gentamisin, eritromisin, siprofloksasin ve imipeneme duyarlı, klindamisin ve trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulunmuştur (86). Neemuchwala ve ark. (125)'nin araştırmasında *C. afermentans* izolatlarının penisilin ve eritromisin duyarlı tetrasiklin ve siprofloksasine dirençli olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada da *C. afermentans* izolatlarının tamamı penisilin, klindamisin, siprofloksasin ve eritromisine ve %28'i tetrasikline dirençli iken, vankomisin ve linezolidde duyarlı olarak bulunmuş olup antibiyotik profili literatür ile uyumludur.

Corynebacterium jeikeum'un genel olarak yara örneklerinden izole dildiği belirtilmiştir (189,190,191). Denise ve ark. (192) yaptığı çalışmada 135 *C. jeikeum* suşunun hepsinin penisiline dirençli olduğunu saptamış, seftriakson, sefoksitin ve eritromisine duyarlılığı ise %18'in altında ve tüm suşlar vankomisine duyarlı bulunmuştur. Neemuchwala ve ark. (125)'nin araştırmasında 76 *C. jeikeum* suşunun hepsi penisilin, eritromisin ve klindamisine dirençli bulunmuş tetrasikline duyarlılık oranı ise %19,1 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada ise, 2 *C. jeikeum* suşunun biri yaradan izole edilmiş olup, izolatlarının tamamı penisilin, klindamisin, siprofloksasin ve eritromisine dirençli iken tetrasiklin duyarlılığı %50 olarak bulunmuş olup; tüm suşlar vankomisin ve linezolidde duyarlı olarak belirlenmiştir. Sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

C. singulare DSM 44357, insan semenden ve kan kültüründen izole edilen üreaz pozitif bir mikroorganizmadır. Klinik çalışmalarda genelde kontaminant olarak kabul edildiği görülmüştür (6). Bu çalışmadaki bir *C. singulare* suşu kan kültüründen izole edilmiştir. Bu suşun elde edilen antibiyotik direnç profili, makrolidler, linkozamidler, aminoglikozidler, kloramfenikol ve tetrasiklini içermektedir. *C. singulare* DSM 44357'nin antibiyotik dirençleri, makrolid ve linkozamid için direnç geni *ermX*, kloramfenikol için dışa aktarıcı gen *cmx*, aminoglikozid için *aphA1-IAB* ve *strA-strB*, tetrasiklin için ise *tetA/B* olarak belirlenmiştir (138). Bu çalışmada ise *C. singulare* suşunun penisilin, eritromisin, klindamisin, siprofloksasin ve gentamisine dirençli olduğu saptanmıştır. Literatüre bakıldığında *C. singulare* ile ilgili antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına dair çalışmalar, muhtemel olarak kontaminant kabul edildiğinden dolayı, çok az olup mevcut çalışmadaki direnç profilini kıyaslayacak

araştırmalara yeteri kadar rastlanmamıştır. Buna rağmen bu çalışmadaki suşun direnç profili genel olarak klinik olarak anlamlı olan korineform bakterilerin artan çoklu antibiyotik direnç trendine uygun bulunmuştur.

Tetrasiklinler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki oluşturan tetrasiklinlere direnç gelişiminde dört mekanizma sorumludur. Bunlar aktif efluks pompa sistemi, enzimatik inaktivasyon, taşıyıcı proteinlerin bozulması ve ribozom koruyan proteinlerin oluşmasıdır (148). Robert ve ark. (169) 1992’de 17 *C. striatum* suşunun sekizinde ribozom koruma proteinleri üzerinden tetrasiklin direncine neden olan *tetM* genini raporlamışlardır. Ayrıca *C. striatum* M82B suşlarında, tetrasikline karşı direnç, 50-kb R plasmid pTP10 ile ilişkili bulunmuş, nükleotid dizi analizi ile *tetA* ve *tetB* işlevsel genlerini ortaya çıkarmıştır. Bu genler sitoplazmik zara yerleştirilmiş spesifik taşıma proteini yoluyla hücreden ilaçların dışarı pompalanmasına neden olan güçlü bir aktif taşıma mekanizmasını (eflux) aktive ederek direnç geliştirmektedir (171). Bu çalışmada ise, hiçbir *Corynebacterium* suşunda *tetM* geni saptanmadı. Yukarıda belirtildiği gibi, çalışmada saptanan tetrasikline karşı direnç gelişiminde *tetA/B* gibi farklı genlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

Penisilinin *C. diphtheriae*'nin toksik ve toksik olmayan suşlarına karşı sahip olduğu ortak duyarlılık konu difteri tedavisinde en sık kullanılan antibiyotiklerden biri haline getirmiştir (195). Bu görüşe rağmen, Von Hunostein ve ark. (142) yaptığı çalışmada *C. diphtheriae* biyotip gravis'in 24 toksik olmayan suşu üzerinde yapılan çalışmada penisilin duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve Etests tarafından belirlenmiş ve MİK değerleri 0,064 – 0,250 mg/L olmasına rağmen vakalarda iyileşme izlenmemiştir. Beta-laktamlara karşı böyle bir etki, endokardit vakasından izole edilen *C. diphtheriae* suşunda amoksisiline tolerans durumunda da gözlenmiştir (143). Bu görüşe rağmen, hiçbir etkinlik göstermediği vakalar gözlemlenmiştir. Diğer *Corynebacterium* suşlarında da düşük MİK değerleriyle oksasiline duyarsızlık yaratılması gibi benzer bir durum bulunmuştur. Bu etki, beta-laktam antibiyotiklere karşı mevcut direnç mekanizmasıyla ilişkili olmayıp tetrasikline direnci belirleyen *Tn3598*-transpozon sınıf II – 12 kb’de bulunan bir çift gen, *tetA* ve *tetB*'nin, çok yüksek fenotipik ekspresyonu ve güçlü aktif pompalamadan oluşan bu genlerin aktivitesi ile yapısal olarak farklı bir antibiyotik olan oksasilin de ortadan kaldırılmasıyla beraber

olmuş olabileceği ileri sürülmüştür. (196). Beta-laktam antibiyotiklere direnç gösteren *Corynebacterium* cinsinin farklı türlerinin fenotipik ve genotipik çalışmalarının sonuçlarının analizine dayanarak, bu mikroorganizmalarda her iki direnç mekanizmasının da meydana geldiği, yani beta-laktamaz üretimi ve penisilin bağlayıcı proteinler modifikasyonu sonucuna varılabilir. *C. jeikeium* ve *C. urealyticum* suşlarında penisiline (MİK₉₀ >4 µg/mL) ve ampisiline (MİK₉₀ >8 µg/mL) karşı direnç ile doğrulanmıştır (146). PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b gibi yüksek moleküler ağırlıklı penisilin bağlayıcı proteinlerdeki (HMW PBP) modifikasyona neden olan dört genin varlığı *C. glutamicum* genom dizisinin bir analizi ile de doğrulanabilmiştir (197). Alibi ve ark. (160), penisiline direnç gösteren 52 *C. striatum* izolatında ilk kez A sınıfı β-laktamaz serin hidrolazı kodlayan *bla* genini pozitif bulmuşlardır. Ayrıca 63 *C. striatum*’dan 46’sı, bir sınıf C-laktamaz kodlayan *ampC* geni için pozitif bulunmuş olup 46 *ampC* pozitif izolatın 42’si penisiline dirençli iken 4 izolat duyarlı saptanmış, sefotaksim dirençli 28 *C. striatum*’un 22’sinde *ampC* geni tespit edilmiştir.

Bu çalışmada 30 *C. striatum* suşunda *ampC* geni tarandı. Bu şulardan sadece biri penisilin duyarlı bulundu ve hiçbir şusta *ampC* geni saptanmadı. Literatüre bakıldığında penisilin gibi beta laktam direncini farklı çeşit antibiyotikleri etkileyen efflux pompa sisteminin de etkileyebileceği (196), bununla birlikte diğer sınıf β-laktamaz kodlayan genlerin ve penisilin bağlayıcı proteinlerdeki modifikasyonların’da (197) bu dirençte etkili olabileceği bilinmektedir.

Aminoglikozitler, difteroidlerin neden olduğu ciddi enfeksiyonları tedavi etmek için tamamlayıcı antibiyotikler olarak kullanılmaktadır. Aminoglikozit direnci, aynı hücrede aynı anda var olabilen birkaç mekanizma yoluyla oluşur. Antibiyotik molekülünün enzimatik inaktivasyonu klinik ortamda en yaygın olanıdır. *C. striatum*’da gentamisin ve tobramisine direnç kazandıran bir aminoglikozid 3-N asetil transferazı kodlayan *aac(3)-XI* geni varlığı ilk kez Galimand ve ark. (165) tarafından rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada 63 *C. striatum* üzerinde *aac(3)-XI* geni taranmış ve 7 izolatta bulunmuştur. Bunlardan ikisi hem gentamisine hem de tobramisine duyarlı olup (MİK <0,06 mg/L), diğer beş izolat ise gentamisin ve tobramisin’e dirençli olup MİK değerleri sırasıyla 8 ve 16 mg/L olarak gösterilmiştir. (160). Bir başka çalışmada ise 64 *C. striatum* izolatından 44’ünde *aac(3)-XI* gösterilmiş olup, hepsinin gentamisin ve tobramisin’e karşı dirençli olduğu

saptanmıştır (166). Chapartegui-González ve ark. (198) yaptığı çalışmada 40 *C. urealyticum*'un 33'ünde düşük seviyede gentamisin direnci olduğunu göstermişlerdir. Bir aminoglikozid 3-N asetiltransferazı kodlayan *aac(3)-XI* geninin varlığı, *C. striatum aac(3)-XI* genine dayanan primerler kullanılarak PZR ile değerlendirildi ve tüm suşlarda negatif sonuçlar elde edildi. Bununla birlikte, 5 *C. urealyticum* dizili genomunun analizi, dört suşta *C. striatum aac(3)-XI* geni ile %79 özdeşlik gösteren 447 bp open reading frame varlığını ortaya çıkarmıştır.

Bu araştırmada *aac(3)-XI* geni 95 *C. striatum* suşunun 84'ünde (%88,4) pozitif bulundu ve bu suşların 77'sinin (%91,6) gentamisin dirençli ve 7'sinin (%8,4) gentamisin duyarlı olduğu saptandı. *aac(3)-XI* geni 7 *C. afermetans* suşunun beşinde pozitif olduğu saptanmış ve bu suşların üçünün (%60) gentamisin dirençli ve ikisinin (%40) gentamisin duyarlı olduğu görüldü. Sekiz *C. aurimucosum* suşunun hepsinde *aac(3)-XI* pozitif bulunmuş, %50'sinin gentamisine dirençli ve %50'sinin duyarlı olduğu saptandı. Aynı şekilde *aac(3)-XI* genin hepsinde pozitif tanımlandığı *C. amycolatum*, *C. pseudodiphtheriticum* suşlarında gentamisin duyarlılığı %100 olarak saptandı. *C. jeikeum* suşlarının hepsinde *aac(3)-XI* geni pozitif bulunmuş, birinde gentamisin hassas saptandı. Literatüre *aac(3)-XI* pozitif olup gentamisin duyarlı suşlar bulunmakla birlikte, bunun nedeni olarak *aac(3)-XI* genindeki *Corynebacterium* türlerine özgü farklı dizilimler (198) ve bu farklılığa bağlı olarak üretilen asetil transferaz enziminin işlevinde bir azalma olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada gentamisin dirençli olup *aac(3)-XI* geni amplifiye edilmemiş altı *Corynebacterium* türünde, daha önce *Corynebacterium* suşlarında bulunmuş *aph(3)-Ib* ve *aph(6)-Id* gibi aminoglikozitleri modifiye enzimleri üreten farklı genlerin olmasından dolayı aminoglikozit direnci gelişmiş olabileceği ileri sürülmüştür (166).

MLSB olarak bilinen üç grup antibiyotik: makrolidler, linkozamidler ve streptogramin B'ye eş zamanlı direncin ortaya çıkması, esasında stafilokok ve streptokok'ların karakteristiği söz konusu olup üç farklı mekanizmasının ortaya çıkması dirence neden olur: metilasyon veya mutasyonla ilişkili ribozom bağlanma bölgesinin modifikasyonu, hücreden aktif antibiyotiği dışarı atma mekanizması (membran efux pompası) ve daha az sıklıkta görülen antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonudur. (199, 200). *Corynebacterium* türlerinde MLSB direnci en çok iki mekanizma tarafından aracılık edilir: Bunlardan birincisi *erm* genleri tarafından

kodlanan ribozomal RNA metilazlarının aracılık ettiği hedef bölge modifikasyonu ve diğeri ise *mefA/E* geni tarafından kodlanan bir membran efux pompasının aracılık ettiği aktif mekanizmadır. *Corynebacterium* türleri (n=254) üzerinde yapılan *ermX*, *ermB*, *ermA* ve *mefA/E* taranan bir çalışmada makrolide dirençli suşlar arasından 186'sı, makrolidlere ve klindamisine karşı yüksek düzeyde dirençli bir MLSB fenotipi göstermiştir. Çalışmada *ermX* geni 171, *ermB* geni 2 MLSB direnci gösteren şusta amplifiye edilmiş fakat *ermX* geni saptanan bir *C. striatum* ve bir *C. aurimucosum* suşunun çalışılan tüm MLSB tipi antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca makrolid ve klindamisine direnç göstermelerine rağmen 14 sušta amplifikasyon ürünü tespit edilmemiştir. (150). Başka bir çalışmada (160) eritromisine dirençli 24 *C. striatum*' dan 20'sinin *ermX* genini taşıdığı, bu şuslardan 10'unun ise *ermX* ve *ermB* genini taşıdığı saptanmıştır. Yirmi dört klindamisine dirençli izolattan 22'sinde *ermX* geni amplifiye edilmiş olup bu 22 suştan 10'unda *ermB* pozitifliği görülmüştür. *mefA/E* geni test edilen hiçbir sušta bulunamamıştır. Buna ek olarak suşlarda klindamisin eritromisine göre sekiz kat daha fazla MİK90 değeri ile dirençli olduğu bildirilmiştir. Guirao ve ark. (201) yaptığı çalışmada 36 *C. jeikeium* ve 57 *C. amycolatum* izolatında eritromisin ve diğer makrolidlerin yanı sıra klindamisin MİK90 değerinin >256 µg/mL olduğunu göstermiş ve bu antibiyotiklere direnç sıklığı yüksek olduğunu belirtmiştir. *ermX* geni tüm eritromisine dirençli suşlarda mevcut bulunmuştur. Bakteri hücresinden makrolidlerin aktif akışına neden olan *mef* geni, *Corynebacterium* grup A, *C. jeikeium* ve *Corynebacterium* spp. suşlarında da bulunmuştur (156). Alibi ve ark. (147) yaptığı çalışmada 85 *C. striatum* izolatının 62'sinde *ermX* geni, 21 sušta *ermB* geni, 12 sušta hem *ermX* hem de *ermB* amplikonları tespit etmişlerdir. Eritromisin ve klindamisine direnç ile *ermX* geninin varlığı arasında sırasıyla %85,50 ve %89,65 arasında yüksek bir korelasyon izlenip, *ermB* geni sırasıyla eritromisine ve klindamisine dirençli suşların %26,68 ve %20,68'inde saptanmıştır. Makrolid ve klindamisine direnç göstermelerine rağmen, 3 sušta amplifikasyon ürünü tespit edilememiştir. Bu durumun nedeni olarak 23S rRNA geninin değişken (V) bölgesindeki mutasyonlar ve protein L4 ve L22'deki değişikliklerin bir MLSB direnç fenotipi oluşturduğu diğer direnç mekanizmalarının varlığından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır.

Mevcut araştırmada *ermX* pozitiflik oranı *C. striatum* TCST 2 suşu hariç geri kalan 116 *Corynebacterium* spp. suşunda pozitif bulundu (%99,1). *C. striatum* TCST 2 suşunda taranan *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* genleri de amplifiye edilememiş ve klindamisine dirençli, eritromisine duyarlı saptandı. Bu direncin diğer direnç mekanizmalarının varlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmaya dahil edilen hiçbir *Corynebacterium* izolatında *ermA* ve *mefA/E* amplifiye edilmedi. *ermX* pozitif olan 94 suşun 91'inin (%96,9) klindamisine dirençli; 50'sinin (%53,1) eritromisine dirençli olduğu bulunmuştur. *ermB* geni sadece 10 *C. striatum* suşunda amplifiye edilip diğer *Corynebacterium* izolatlarında negatif bulundu. *ermB* pozitif bulunan suşların hepsinin klindamisine dirençli olduğu, %40'ının eritromisine dirençli ve %60'ının eritromisine duyarlı olduğu saptandı. *C. afermetans*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* suşlarının hepsinin klindamisin ve eritromisin dirençli olduğu saptandı. *C. aurimucosum* suşlarının 6'sı (%75) klindamisine dirençli ve 2'si (%25) klindamisine duyarlı, 5'i (%62,5) eritromisine dirençli ve 3'ü (%37,5) eritromisine duyarlı olduğu tespit edildi. *C. amycolatum*'un hepsi klindamisine ve yarısı eritromisine dirençli bulundu. Literatürde benzer şekilde bu çalışmada da *ermA* hiçbir suшта amplifiye edilmedi. *mefA/E* geni daha önce *Corynebacterium* türlerinde saptanmasına rağmen bu çalışmada negatif bulundu. *ermX* ve *ermB* genleri *Corynebacterium*'larda MLSB direncine en sık neden olan genlerden olup, bu çalışmada da literatüre benzer sonuçlar elde edildi. *ermX*, ve/veya *ermB* genlerinin pozitif çıkmasına rağmen eritromisin ve/veya klindamisinin duyarlı bulunan suşlarda gentamisin direncinde ortaya çıkan *Corynebacterium* türlerine özgü farklı *aac(3)-XI* dizilimleri gibi (198) bu suşlarda da türlere özgü *ermX* genindeki farklı dizilimlere bağlı 23S bölgesine özgü adenin spesifik N-metiltransferaz'ların aktivitesinde azalma veya RNA 23S deki mutasyonlara bağlı olarak N-metiltransferaz enziminin etkisinin azalma olabileceği düşünülmektedir (147). Ayrıca, EUCAST'da *Corynebacterium* türleri için eritromisin duyarlılık testi bulunmaması nedeniyle sonuçların yanıltıcı olabilmesi söz konusudur.

Corynebacterium türlerinde fulorokinolonlara direnç geni *gyrA*'nın QRDR'sindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Literatürde *C. striatumun* ve *C. amycolatum*'un klinik izolatlarında siprofloksasin ve moksifloksasine orta veya yüksek düzeyde direnç gösterdiği belirtilmiştir (159). Yirmi bir *C. striatum* suşu üzerinde

yapılan çalışmada *gyrA* geninin 87. pozisyonundaki veya 91. pozisyonundaki tek amino asit değişikliği siprofloksasin ve moksifloksasin direnci oluşturmuş, bununla beraber *gyrA* geninde 87 ve 91 pozisyonlarında değişikliklere yol açan çift mutasyonlar, siprofloksasin ve moksifloksasine karşı daha yüksek düzeyde direnç için gerekli olduğu belirtilmiştir (160). Çift mutasyonların sekizinde (%38) 87. pozisyonundaki serin'in fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyonundaki aspartik asit'in glisin'e (D91G); üçünde (%14,2) 87. pozisyonundaki serin'in fenilalanin'e (S87F); 91. pozisyonundaki aspartik asit'in alanin'e (D91A) dönüştüğü raporlanmıştır. Bu suşların siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerleri >16 mg/L olarak saptanmıştır. Şuşların yedisinde (%33,3) ise tek aminoasit değişikliği saptanmış olup bu suşlarda siprofloksasin MİK değerleri 2-8 mg/L, moksifloksasin MİK değeri ise 1 mg/L saptanmıştır (160). Sierra ve ark. (159) tarafından tarif edilen 91. pozisyonundaki aspartik asit'in değişimine bağlı tekli mutasyonlarda siprofloksasin MİK değerleri 1-6 mg/L'ye yükselirken, moksifloksasin duyarlı kalmıştır. Suşlarda siprofloksasinin direncinin daha yüksek olması, *gyrA*'daki mutasyonlara ek bir direnç mekanizmasının varlığını düşündürmektedir. Ramos ve ark. (202) yaptığı çalışmada 22 *C. striatum*'un siprofloksasine direçli olduğunu bulmuş ve gradient strip test ile siprofloksasin MİK değerlerini ölçmüştür. Suşlardan 21'inin MİK değeri >32 mg/L olarak tespit edilmiş, bu izolatların 15'inde (%68) sadece 87. pozisyonundaki serin'in valine (S87V) dönüştüğünü; üç (%13) izolatta ise 87. pozisyonda fenilalanin (S87F) ve 91.pozisyonda alanin (D91A) mutasyonu olduğunu belirlemiştir. Konjonktival sürüntü örneğinden üreyen 16 *C. macginleyi* suşu üzerinde yapılan bir çalışmada siprofloksasin, levofloksasin ve norfloksasin direnci koşullandıran 83. pozisyonundaki serinin lösin ve alanin'e; 87 pozisyonundaki fenilalanin'in ise aspartat, histidin, asparajin, tirozin ve glisine dönüştüğü, amino asit değişikliklerine yol açan bir çift mutasyon da bildirilmiştir (158). Fakat bu mutasyonları barındıran suşların %91'inde siprofloksasin MİK değerleri >32 mg/L olarak belirlenmiş olup mutasyonlar ile MİK değeri arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Yoon ve ark. (203) *C. amycolatum* üzerine yaptığı çalışmada, bakteriyemiye neden olan bir *C. amycolatum* izolatta 87. pozisyonundaki serin'in izolösin'e (S87I); 91. pozisyonundaki aspartik asit'in glisin'e (D91G) dönüştüğünü siprofloksasin MİK değerinin ise >32 mg/L olduğunu raporlamıştır. Ramos ve ark. (202) yaptığı çalışmada tüm *C. striatum* izolatları (n: 7),

87. pozisyonda mutasyonlar göstermiş, sadece iki izolatın 87 ve 91. amino asitlerinde çift mutasyon göstermişlerdir. Bu çift mutasyonlarda S87F-D91A mutasyonu görülmüş, siprofloksasin ve moksifloksasin için MİK değerleri >32 µg/mL olarak bulunmuştur. Dört *C. jeikeium* izolatının ikisinde sadece 87. pozisyonadaki serin izolösine (S87I) dönmüş MİK değerleri siprofloksasin için, >32 µg/mL moksifloksasin için 4 µg/mL olarak raporlanmıştır. Diğer iki *C. jeikeium* suşunda ise test edilen siprofloksasin ve moksifloksasin için MİK değeri >32 µg/mL gösterilmiş, 87. pozisyonadaki serin izolösine ve 91.pozisyonadaki aspartik asit tirozin'e (D91Y) dönüşmüştür (202).

Bu çalışmada *C. striatum* izolatlarının %96,8'i siprofloksasin dirençli ve %3,2'si siprofloksasin duyarlı olarak saptanmıştır. Ayrıca, *C. afermetans*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. jeikeum* ve *C. singulare* suşlarının hepsi siprofloksasin dirençli olduğu saptandı. *gyrA* mutasyonu çalışılan 50 *Corynebacterium* suşunun gradient strip testi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemindeki MİK değerleri kıyaslandığında iki değer arasındaki değer farkı iki kata kadar normal kabul edildiği için testler birbirlerini doğrular nitelikte sonuçlandı (172). Maddi kısıtlamadan dolayı EUCAST'ın *Corynebacterium* türleri için önerdiği %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β-NAD içeren Mueller-Hinton Fastidious sıvı mikrodilüsyon testi için gerekli malzemeler alınamadığından dolayı sıvı mikrodilüsyon testi Mueller Hinton sıvı besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Mevcut çalışmada kinolon dirençli 26 *C. striatum* suşunun 13'ünde (%50) S87F-D91A mutasyonu, 11'inde (%42,3) S87F-D91G mutasyonu bulunmuş olup literatüre benzer şekilde bu tip aminoasit değişimlerin daha fazla olduğu saptandı. Bu çalışmada *gyrA* geninin QRDR bölgesinde 87. ve 91. pozisyonlarda bulunan üç farklı mutasyon tipine rağmen (S87F-D91A, S87F-D91G, S87V-D91G) bu mutasyonların siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerlerine olan etkisi benzer olarak saptanmış (32-64 µg/mL), MİK ile mutasyon farkları arasında bir korelasyon saptanmamış olup literatürdeki çalışmalara benzer sonuç alındı. Ayrıca kinolonlara karşı hassas olan *C. striatum* TCST 77 suşundaki QRDR bölgesindeki 99. pozisyonda bulunan serin'in prolin'e (S99P) dönüşmesi; bu suşun kinolonlara karşı MİK değerini kinolonlara duyarlı diğer *C. striatum* suşunun (TCST 13) MİK değerine göre yükselttiği tespit edilmiştir. Mevcut çalışmadaki *C. amycolatum* izolatının hepsinde S87F-D91G mutasyonu olup bu

suşlardaki siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerleri her iki antibiyotik için >32 µg/mL olarak bulundu. Çalışmadaki suş sayısı az olduğundan dolayı literatürdeki diğer çalışmalarda elde edilen farklı mutasyonların MİK değerlerine yansımaları net olarak değerlendirme fırsatı bulunamamıştır. İncelenen iki *C. jeikeum* suşunun birinde (TCJK 1) S87F-D91G mutasyonu, diğer *C. jeikeum* suşunda ise (TCJK 2) S87F-S91A mutasyonu bulundu. Tüm suşlarda siprofloksasin gradient strip test değerleri >32 µg/mL, moksifloksasin MİK değeri ise 4 µg/mL olarak tespit edildi. Bu çalışmada ise *C. jeikeum* suşları için sadece çift mutasyon bulunmuş olunmasına rağmen bu mutasyonların siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerlerine etkisi literatürle benzer bulundu (203).

Bu çalışmada incelenen sekiz *C. aurimucosum* suşundan birinde (TCAU 1) QRDR bölgesinde S87F dışında mutasyon saptanmadı. Siprofloksasin gradient strip MİK değerleri 2 µg/mL, moksifloksasin için 1,5 µg/mL bulundu. İki *C. aurimucosum* suşunda (TCAU 2, TCAU 4) sadece S99P mutasyonu saptandı. Her iki suşta da siprofloksasin gradient strip MİK değerleri sırasıyla 12 µg/mL, moksifloksasin MİK değerleri ise 1 µg/mL tespit edildi. Bir izolatta (TCAU 3) ise S87I-S99P mutasyonu saptanmış olup bu suştaki siprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test MİK değeri >32 µg/mL saptandı. İki *C. aurimucosum* suşunda (TCAU 6, TCAU 8) S87V-S99P mutasyonu olup her iki suşta da siprofloksasin gradient strip MİK değeri 4 µg/mL, moksifloksasin için MİK değeri ise 1 µg/mL olarak bulundu. Geriye kalan iki (%25) *C. aurimucosum* suşunda (TCAU 5, TCAU 7) ise S87F-D91G mutasyonu gösterilmiş suşlarda siprofloksasin gradient strip MİK değerleri 8 µg/mL, moksifloksasin için MİK değerleri ise 4 µg/mL olarak bulundu. Mutasyon MİK ilişkisine bakıldığında S99P mutasyonunun S87V-S99P mutasyonuna kıyasla siprofloksasin MİK değerinde üç kat artışa neden olduğu, moksifloksasin MİK değerinin aynı kaldığı görüldü. Bu sonuca göre kinolon direnci için *gyrA* geni mutasyonu dışında başka mekanizmalarla gelişmiş bir direncin olabileceği akılda tutulmalıdır (159). Ayrıca S87F-D91G mutasyonu S99P ile kıyaslandığında çift mutasyondaki siprofloksasin MİK değeri tek mutasyona göre 1,5 kat azalmış olup, buna karşın moksifloksasin MİK değeri dört kat arttığı saptandı. En fazla kinolon direnci oluşturan mutasyon ise S87I-S99P olarak bulundu. Literatürde *C. aurimucosum* *gyrA* genindeki mutasyonlar için bir çalışma bulunamamıştır. Ayrıca

S99P mutasyonu literatürdeki tüm *Corynebacterium*'lardaki mutasyonlara bakıldığında bir ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Çalışmadaki üç *C. afermentans* suşunda (TCAF 2, TCAF 4, TCAF 6) üçünde S87F-D91A, diğer üç suşta (TCAF 3, TCAF 5, TCAF 7) S87F-S91G, geri kalan bir suşta (TCAF 1) ise S87V-S91G mutasyonu saptanmıştır. Sipprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test MİK değerleri tüm suşlarda >32 µg/mL bulunmuştur. Aynı şekilde iki *C. pseudodiphtheriticum* (TCPD 1, TCPD 2) ve bir *C. singulare* suşunun (TCSU 1) *gyrA* geni mutasyonu incelemesinde S87F-S91G mutasyonu saptanmış, sipprofloksasin ve moksifloksasin gradient strip test MİK değerleri iki *C. pseudodiphtheriticum* suşunda >32 µg/mL bulunmuştur. Literatüre bakıldığında *C. afermentans*, *C. pseudodiphtheriticum* ve *C. singulare* *gyrA* genindeki mutasyonlar için bir çalışma bulunamamıştır. Bu çalışmada *C. striatum*'a benzer 3 farklı mutasyon tipi bulunmasına rağmen her üç mutasyon türünde MİK ile korelasyonu saptanamamış olup farklı tip mutasyonların bulunabilmesi için suş sayılarının daha fazla olduğu geniş çaplı bir çalışmaya gerek olduğu kanaatine varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu çalışmaya dahil edilen 117 *Corynebacterium* suşun tanımlanması MALDI-TOF MS ile yapılmış olup suşların 95'i (%81,1) *C. striatum*, sekizi (%6,8) *C. aurimucosum*, yedisi (%5,9) *C. afermentans*, ikisi (%1,7) *C. amycolatum*, ikisi (%1,7) *C. pseudodiphtheriticum* ikisi (%1,7) *C. jeikeum* biri (%1,1) *C. singulare* olarak tespit edildi.
- Suşların 46'sı (%39,3) solunum yolu örneklerinden (TAK, balgam, BAL), 22'si (%18,8) yara ve 20'si (%17) kan örneklerinden izole edilmiştir.
- Şuşların 38'i (%32,4) yoğun bakım ünitelerinden 28'i (%23,9) dahiliye, 10'u (%8,5) ortopediden izole edildi.
- Çalışmaya dahil edilen 117 suşa EUCAST önerileri doğrultusunda KirbyBauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık testi çalışıldı. Şuşların 114'ü (%97,4) penisilin ve siprofloksasin, 112'si (%95,7) klindamisin, 105'i (%90,5) tetrasiklin 89'u (%76) gentamisin, ve 68'i (%58,1) eritromisin dirençli olup vankomisin ve linezolid duyarlılık %100 saptandı.
- Tüm suşların 116'sında (%99,1) *ermX* (eritromisin, klindamisin), 10'unda (%8,5) *ermB* (eritromisin, klindamisin) ve 103'ünde (%88,1) *acc(3)-XI* (gentamisin) gen varlığı gösterilmiş olup *ermA* (eritromisin, klindamisin), *tetM* (tetrasiklin), *ampC* (penisilin) ve *mefA/E* (eritromisin, klindamisin), genleri saptanmadı.
- Şuşlardaki penisilin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin ve gentamisin gibi antibiyotiklere karşı neden olan geniş çaptaki direncin PZR işleminde amplifikasyonunu görülen direnç genleri dışında farklı direnç genleri ve mekanizmalarından kaynaklanabileceği kanaatine varıldı.
- *Corynebacterium* türlerinde *gryA* genindeki aminoasit değişimleri ülkemizde ilk defa bu çalışmada yapıldı. Şuşların 50'sinde (%42,7) *gryA* genlerindeki mutasyonlar taranmış olup 17'sinde (%33,3) S87F-D91A mutasyonu; 22'sinde (%43,1) ise S87F-D91G mutasyonu tespit edildi. Bu iki Mutasyon türünün MİK ile korelasyonuna bakıldığında literatüre benzer

şekilde siprofloksasin ve moksifloksasin direncinde MİK değerlerinde yüksek miktarda artış olduğu tespit edildi.

- Bir *C. striatum* (TCST 77) ile beş *C. aurimucosum* suşunun (TCAU 2, TCAU 3, TCAU 4, TCAU 6, TCAU 8) *gyrA* genlerindeki S99P mutasyonu literatürde ilk kez bu çalışmada tespit edilmiş olup, bu mutasyonla beraber olan S87I mutasyonunun, tek başına S99P mutasyonuna göre siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerini arttırdığı gözlenmiştir. Bu mutasyon S87V mutasyonu ile meydana geldiğinde ise siprofloksasin ve moksifloksasin MİK değerini düşürdüğü saptanmıştır. Bu sonuca göre kinolon direncinde *gyrA* genindeki mutasyonlar dışında başka direnç mekanizmalarının da rol oynayabileceği düşünüldü.
- *Corynebacterium* türlerinin çoklu antibiyotik direnç oranlarını düşürebilmek için;
 - Potansiyel dirence neden olabilecek diğer genler ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde genlerin aktarılma biçimi (konjugasyon, plazmid aracılı) araştırılmalı
 - Uygun antibiyotik politikaları geliştirilmeli,
 - Gerekli enfeksiyon kontrol politikaları uygulanmalı,
 - Hasta ve sağlık personeline hastane enfeksiyonlarını önlemeye yönelik eğitimler verilmeli,
 - Ampirik tedavide başarıyı belirleyen bakteri-ilaç ilişkisinin bilinmesi için sık aralıklarla direnç araştırmaları yapılmalıdır.

7. KAYNAKÇA

1. Conn H, Dimmick I. Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. *Journal of bacteriology*. 1947; 54(3): 291.
2. Clark FE. The generic classification of the soil corynebacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1952; 2(1): 45-56.
3. Hollis DG, Weaver RE. Gram-positive organisms: a guide to identification. 1981: Special Bacteriology Section, Centers for Disease Control.
4. Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10(1): 125-159.
5. Liebl W. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. In: Eggeling L, editor. *Corynebacterium* taxonomy. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 9-34.
6. Koneman EW et al. Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology. 7th ed. 2017, Philadelphia: Lippincott.
7. Murray RP, Rosenthal SK, Pfaller AN, Tibbi Mikrobiyoloji. 7.baskı ed. 2016, Ankara: Pelikan Kitabevi. 222-228.
8. Public Health England (PHE) and National Health Service (NHS). UK Standards for Microbiology Investigations. 2014.
9. Somerville DA. A taxonomic scheme for aerobic diphtheroids from human skin. *Journal of medical microbiology*. 1973; 6(2): 215-224
10. Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods, in *Manual of Clinical Microbiology*. American Society of Microbiology. 2011; 10(2): 413-442.

11. Barksdale L. *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. Bacteriological Reviews. 1970; 34(4): 378.
12. Bernard KA, Funke G. *Corynebacterium*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015; 25(2): 1-70.
13. Bernard KA, Bellefeuille M, Ewan EP. Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. Journal of clinical microbiology, 1991; 29(1): 83-89.
14. VenkataSarada C, Rao R. Non diphtheritic *corynebacteria* (NDC) and their clinical significance: clinical microbiologist's perspective. Am J Epidemiol. 2014; 22(2): 83-87
15. Zasada AA, EMosiej E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. Lett Appl Microbiol 2018; 66(6): 472-483.
16. Freney J et al. Evaluation of API coryne comparison with conventional methods for identifying Coryneform bacteria. J Clin Microbiol. 1991; 29(2): 38-41.
17. Funke G, Peters K, Aravena-Roman M. Evaluation of the RapID CB plus system for identification of coryneform bacteria and *Listeria* spp. J Clin Microbiol. 1998; 36(3): 2439–2442.
18. Hudspeth MK, Gerardo SH, Citron DM, Goldstein EJC. Evaluation of the RapID CB Plus System for identification of *Corynebacterium* species and other grampositive rods. J Clin Microbiol. 1998; 36(2): 543-547.
19. Adderson EE et al. Identification of clinical coryneform bacterial isolates: comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes. J Clin Microbiol. 2008; 46(3): 921-927.

20. Alatoon AA, Cazanave CJ, Cunningham SA, Ihde SM, Patel R. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012; 50(1): 160-163.
21. Khamis A, Raoult D, La Scola B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. J Clin Microbiol. 2005; 43(4): 1934-1936.
22. Suwantararat N, Weik C, Romagnoli M, Ellis BC, Kwiatkowski N, Carroll KC. Practical utility and accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Corynebacterium* species and other medically relevant coryneform-like bacteria. Am J Clin Pathol. 2016; 45(1): 22-28.
23. Pincus DH. Microbial Identification Using the BioMerieux VITEK 2 System. (Internet). 2005(10 Temmuz 2021 tarihinde erişildi) Erişim adresi: https://store.pda.org/tableofcontents/ ermm_v2_ch01.pdf
24. Rennie RP et al. Multicenter evaluation of the Vitek 2 Anaerobe and *Corynebacterium* identification card. J Clin Microbiol. 2008; 46(8): 2646-2651.
25. Duggal S, Gaiind R, Tandor N, Deb M, Chugh TD. Comparison of an automated system with conventional identification and antimicrobial susceptibility testing. ISRN Microbiology. 2012: 107203.
26. Van den Velde S, Lagrou K, Desmet K, Wauters G, Verhaegen J. Species identification of corynebacteria by cellular fatty acid analysis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006; 54(2), 99–104.
27. Tang YW et al. Identification of Coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. J Clin Microbiol. 2000; 38(2): 1676-1678.

28. Woo PCY et al. Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Grampositive bacteria. *J Med Microbiol.* 2009; 58(8): 1030-1036
29. Chean R et al. Comparing the identification of *Clostridium* spp. by two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to 16S rRNA PZR sequencing as a reference standard: a detailed analysis of age of culture and sample. *Anaerobe.* 2014; 30(2): 85-89.
30. Farfour E et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram positive bacilli. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(8): 2702-2707.
31. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Bottger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods– development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(4): 1089-1097.
32. Bille E et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(11): 1117-1125.
33. Carbonnelle et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J Microbiol Methods.* 2012; 89(2): 133-136.
34. Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald, E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(8): 2568-2576.

35. Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(2): 1313-1325.
36. Theel ES et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(9): 3093-3095.
37. Vila J et al. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5): 1745-747.
38. Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O, Ramirez MS, Famiglietti A, Vay C. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *Plos one.* 2014; 9(9): e106303.
39. Alibi S, Ferjani A, Gaillot O, Marzouk M, Courcol R, Boukadida J. Identification of clinically relevant *Corynebacterium* strains by Api Coryne, MALDI-TOF-mass spectrometry and molecular approaches. *Pathol Biol.* 2015; 63(4): 153-157.
40. Morgan MC, Boyette M, Goforth C, Sperry KV, Greene SR. Comparison of the Biolog OmniLog identification system and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin. *J Microbiol Methods.* 2009; 79(3): 336-343.
41. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard 7th ed. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

42. Qin L, Sakai Y, Bao R, Xie H, Masunaga K, Miura M. Characteristics of Multidrug-Resistant *Corynebacterium* spp. Isolated from Blood Cultures of Hospitalized Patients in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2017; 70(2):152-157.
43. Severo CB, Guazzelli LS, Barra MB, Hochhegger B, Severo LC. Multiple pulmonary nodules caused by *Corynebacterium striatum* in an immunocompetent patient. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56(1): 89-91.
44. Bowstead TT, Santiago SM. Pleuropulmonary infection due to *Corynebacterium striatum*. *Br J Dis Chest.* 1980; 74(2): 198-200.
45. Renom F, Gomila M, Garau M, Gallegos MD, Guerrero D, Lalucat J. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants. *New Microbes New Infect.* 2014; 2(4): 106-114.
46. Hong HL, Koh HI, Lee AJ. Native Valve Endocarditis due to *Corynebacterium striatum* confirmed by 16S Ribosomal RNA Sequencing: A Case Report and Literature Review. *Infect Chemother.* 2016; 48(3): 239-245.
47. Xu J, Yang Q, Li J, Zheng X. The left atrial bacterial vegetative mass due to *Corynebacterium striatum* as a presentation of myxoma: a case report. *BMC Infect Dis* 2017; 17(2): 368.
48. Molina Collada J, Rico Nieto A, Diaz de Bustamante Ussia M, Balsa Criado A. Septic arthritis in a native knee due to *Corynebacterium striatum*. *Reumatol Clin.* 2018; 14(5): 301-302
49. Saito S, Kawamura I, Tsukahara M, Uemura K, Ohkusu K, Kurai H. Cellulitis and Bacteremia due to *Corynebacterium striatum* Identified by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Intern Med.* 2016; 55(9): 1203-1205.

50. Daisuke U, Oishi T, Yamane K, Terada K. *Corynebacterium striatum* Bacteremia Associated with a Catheter-Related Blood Stream Infection. Case Rep Infect Dis. 2017; e: 2682149.
51. Sholhui-Park HSC, Eui KS, Yeung CM, Miae L. Two cases of medical device-related *Corynebacterium striatum* infection: a meningitis and a sepsis. Ann Clin Microbiol. 2016; 19(1): 28.
52. Weiss K, Labbe AC, Laverdiere M. *Corynebacterium striatum* meningitis: case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. Clin Infect Dis. 1996; 23(6): 1246-48
53. Kolios AGA, Cozzio A, Zinkernagel AS, French LE, Kundig TM. Cutaneous *Corynebacterium* Infection Presenting with Disseminated Skin Nodules and Ulceration. Case Rep Dermatol. 2017; 9(2): 8-12.
54. Fernandez-Ayala M, Nan DN, Farinas MC. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*. Am J Med. 2001; 111(2): 167.
55. Yamamoto T, Kenzaka T, Mizuki S, Nakashima Y, Kou H, Maruo M. An extremely rare case of tubo-ovarian abscesses involving *Corynebacterium striatum* as causative agent. BMC Infect Dis. 2016; 16(1): 527.
56. Biswal I, Mohapatra S, Deb M, Dawar R, Gaind R. *Corynebacterium striatum*: an emerging nosocomial pathogen in a case of laryngeal carcinoma. Indian J Med Microbiol. 2014; 32(2): 323-4.
57. Belmares J, Detterline S, Pak JB, Parada JP. *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. BMC Infect Dis. 2007; 7(2): 4.
58. Wong KY, Chan YC, Wong CY. *Corynebacterium striatum* as an emerging pathogen. J Hosp Infect. 2010; 76(4): 371-2.

59. Leal SM, Jr-Jones M, Gilligan PH. Clinical Significance of Commensal Gram-Positive Rods Routinely Isolated from Patient Samples. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(12): 2928-36.
60. Renom F, Garau M, Rubi M, Ramis F, Galmes A, Soriano JB. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(6): 2064-7.
61. Verroken A, Bauraing C, Deplano A, Bogaerts P, Huang D, Wauters G. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(1): 44-50.
62. Brandenburg AH, van Belkum A, van Pelt C, Bruining HA, Mouton JW, Verbrugh HA. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(9): 2089-94.
63. Hahn WO, Werth BJ, Butler-Wu SM, Rakita RM. Multidrug-Resistant *Corynebacterium striatum* Associated with Increased Use of Parenteral Antimicrobial Drugs. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(11): 1908-1914.
64. Watkins DA, Chahine A, Creger RJ, Jacobs MR, Lazarus HM. *Corynebacterium striatum*: a diphtheroid with pathogenic potential. *Clin Infect Dis.* 1993; 17(1): 21-5.
65. Oliva A, Belvisi V, Iannetta M, Andreoni C, Mascellino MT, Lichtner M, et al. Pacemaker lead endocarditis due to multidrugresistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(12): 4669-71.
66. Boltin D, Katzir M, Bugoslavsky V, Yalashvili I, Brosh-Nissimov T, Fried M, *Corynebacterium striatum*, a classic pathogen eluding diagnosis. *Eur J Intern Med.* 2009;20(3): 49-52.

67. Martinez-Martinez L, Pascual A, Bernard K, Suarez AI. Antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium striatum*. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(2): 2671-2.
68. Werth BJ, Hahn WO, Butler-Wu SM, Rakita RM. Emergence of High-Level Daptomycin Resistance in *Corynebacterium striatum* in Two Patients with Left Ventricular Assist Device Infections. Microb Drug Resist. 2016; 22(3): 233-7.
69. Yoo G, Kim J, Uh Y, Lee HG, Hwang GY, Yoon KJ. Multidrug-Resistant *Corynebacterium striatum* Bacteremia: First Case in Korea. Ann Lab Med. 2015; 35(4): 472-3.
70. Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(1): 23-9.
71. Fernandez-Guerrero ML, Molins A, Rey M, Romero J, Gadea I. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* endocarditis successfully treated with daptomycin. Int J Antimicrob Agents. 2012; 40(4): 373-4.
72. McElvania TeKippe E, Thomas BS, Ewald GA, Lawrence SJ, Burnham CA. Rapid emergence of daptomycin resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* a cautionary tale. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33(12): 2199-205.
73. Van Hal SJ, Paterson DL, Gosbell IB. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a daptomycin-naïve patient, a review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(5): 603-10.

74. Tran TT, Jaijakul S, Lewis CT, Diaz L, Panesso D, Kaplan HB. Native valve endocarditis caused by *Corynebacterium striatum* with heterogeneous high-level daptomycin resistance: collateral damage from daptomycin therapy? *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(6): 3461-4.
75. Montero CI, Stock F, Murray PR. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(3): 1167-7.
76. Tang S, Yao L, Hao X, Zhang X, Liu G, Liu X, et al. Efficacy, safety and tolerability of linezolid for the treatment of XDR-TB: a study in China. *Eur Respir J*. 2015; 45(1): 161-70.
77. Sader HS, Jones RN, Stilwell MG, Flamm RK. Ceftaroline activity tested against uncommonly isolated Gram-positive pathogens: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 2011). *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 43(3): 284-6.
78. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Tyrrell KL. Comparative in vitro activity of ceftaroline, ceftaroline-avibactam, and other antimicrobial agents against aerobic and anaerobic bacteria cultured from infected diabetic foot wounds. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(3): 347-51.
79. McMullen AR, Anderson N, Wallace MA, Shupe A, Burnham CA. When Good Bugs Go Bad: Epidemiology and Antimicrobial Resistance Profiles of *Corynebacterium striatum*, an Emerging Multidrug-Resistant, Opportunistic Pathogen. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(11): 1111-17.
80. Riegel P, De Briel D, Prévost G, Jehl F. 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): 287-292.

81. Funke G, Lawson PA, Collins MD. Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1995; 45(4): 735-739.
82. Sewell DL, Coyle MB ve Funke G. Prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium afermentans* subsp. lipophilum (CDC coryneform group ANF-1). Journal of clinical microbiology. 1995; 33(3): 759-761.
83. Früh M, Von Graevenitz A, Funke G. Use of second-line biochemical and susceptibility tests for the differential identification of coryneform bacteria. Clinical microbiology and infection. 198; 4(6): 332-338.
84. Kumari P, Tyagi A, Marks P, Kerr K. *Corynebacterium afermentans* spp. afermentans sepsis in a neurosurgical patient. Journal of Infection. 1997; 35(2): 201-202.
85. Carvalho RV, Siva-Lima FF, Santos CS, Souza MC, Silva RS, Mattos-Guaraldi AL. Central venous catheter-related infections caused by *Corynebacterium amycolatum* and other multiresistant non-diphtherial corynebacteria in paediatric oncology patients. The Brazilian journal of infectious disease. 2018; 22(4): 347-351.
86. Minkin R, Shapiro JM. *Corynebacterium afermentans* lung abscess and empyema in a patient with human immunodeficiency virus infection. South Medicine Journal. 2004; 97(2): 395–7.
87. Esteban J, Nieto E, Calvo R, Fernández-Robals R, Valero-Guillén PL, Soriano F. Microbiological characterization and clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains. Eur J ClinMicrobiol Infect Dis. 1999; 18(7): 518–21.

88. Reddy BS, Chaudhury A, Kalawat U, Jayaprada R, Reddy G, Ramana BV. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). Indian J Med Microbiol. 2012; 30(1): 52-57.
89. Zalas P, Mikucka A, Gospodarek E. Occurrence of *Corynebacterium amycolatum* strains in clinical specimens. Med Dośw Mikrobiol. 2004; 56(2): 139-45.
90. Aalbæk B, Bemis DA, Schjærff M, Kania SA, Frank LA, Guardabassi L. Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. Vet Microbiol. 2010; 145(34): 292-98.
91. Knox KL, Holmes AH. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae corynebacteria. Emerg Infect Dis. 2002; 8(1): 97-99.
92. Riegel P. Bacteriological and clinical aspects of corynebacterium. Ann Biol Clin (Paris). 1998; 56(3): 285–96.
93. Rizvi M, Rizvi MW, Shaheen N, Sultan A, Khan F, Shukla I. Emergence of coryneform bacteria as pathogens in nosocomial surgical site infections in a tertiary care hospital of North India. J Infect Public Health. 2013; 6(4): 283-88.
94. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Patel R. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2012; 50(5): 1518-23.
95. Yassin AF, Steiner U, Ludwig W. *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52(3): 1001-5.
96. Yasuma A, Ochiai T, Azuma M. Exogenous coproporphyrin III production by *Corynebacterium aurimucosum* and *Microbacterium oxydans* in erythrasma lesions. J Med Microbiol. 2011; 60(7): 1038-42.

97. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J Clin Microbiol. 2012; 50(10): 3152-8.
98. Trost E, Götker S, Schneider J. 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(2): 91-7.
99. Roux V, Drancourt M, Stein A, Riegel P, Raoult D, La Scola B. *Corynebacterium* species isolated from bone and joint infections identified by 16S rRNA gene sequence analysis. J Clin Microbiol. 2004; 42(5): 2231-3.
100. Drancourt M, Berger P, Raoult D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. J Clin Microbiol. 2004; 42(5): 2197-202.
101. Lo S, Thiam I, Fall B. Urinary tract infection with *Corynebacterium aurimucosum* after urethroplasty stricture of the urethra: A case report. J Med Case Rep. 2015; 14(9): 156.
102. Mushtaq A, Chen DJ, Strand GJ. Clinical significance of coryneform Gram-positive rods from blood identified by MALDI-TOF mass spectrometry and their susceptibility profiles-a retrospective chart review. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016; 85(3): 372-6.
103. Manzella JP, Kellogg JA, Parsey KS. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen in adults. Clin Infect Dis. 1995; 20(1): 37-40.
104. Bittar F, Cassagne C, Bosdure E, Stremler N, Dubus JC, Sarles J. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* infection in cystic fibrosis patients, France. Emerg Infect Dis. 2010; 16(8): 1231-1236.

- 105.** Furiasse D, Gasparotto AM, Monterisi A, Castellano G, Rocchi M. Pneumonia caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Rev Argent Microbiol. 2016; 48(4): 290-292.
- 106.** Andavolu RH, Jagadha V, Lue Y, McLean T. Lung abscess involving *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in a patient with AIDS-related complex. N Y State J Med. 1986; 86(11): 594-596.
- 107.** Colt HG, Morris JF, Marston BJ, Sewell DL. Necrotizing tracheitis caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: unique case and review. Rev Infect Dis. 1991; 13(1): 73-76.
- 108.** Indumathi VA, Shikha R, Suryaprakash DR. Diphtheria-like illness in a fully immunised child caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Indian J Med Microbiol. 2014; 32(4): 443-445.
- 109.** Voiriot P, Charlin B, Marcoux JA, Guirgis H. Subacute rhinosinusitis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Cmaj. 1986; 134(9): 1034-1035.
- 110.** Johnson JN, Miller SG, Lodge AJ. Corynebacterium endocarditis of a percutaneously placed transcatheter pulmonary valve. Cardiol Young. 2014; 24(5): 932-934.
- 111.** Perez-Parra S, Pena A, Blanca E, Garcia F. Letal endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Rev Chil Infectol. 2016; 33(2): 229-231.
- 112.** Cantarelli VV, Brodt TC, Secchi C, Inamine E, Pereira FS. Cutaneous infection caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a microbiological report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008; 50(1): 51-52.
- 113.** Nathan AW, Turner DR, Aubrey C, Cameron JS, Williams DG, Ogg CS. *Corynebacterium hofmannii* infection after renal transplantation. Clin Nephrol. 1982; 17(6): 315-318.

- 114.** Erturan G, Holme H, Iyer S. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* septic arthritis secondary to intra-articular injection—a case report and literature review. J Med Microbiol. 2012; 61(6): 860-863.
- 115.** Ahmed K, Kawakami K, Watanabe K, Mitsushima H, Nagatake T, Matsumoto K. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a respiratory tract pathogen. Clin Infect Dis. 1995; 20(1): 41-46.
- 116.** Roy S, Sushma M, Praneetha DC. Recognition of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* by toll-like receptors and up-regulation of antimicrobial peptides in human corneal epithelial cells. Virulence. 2015; 6(7): 716-721.
- 117.** Kemp M, Holtz K, Andresen K, Christensen JJ. Demonstration by PZR and DNA sequencing of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a cause of joint infection and isolation of the same organism from a surface swab specimen from the patient. J Med Microbiol. 2005; 54(7): 689-691.
- 118.** Rivero M, Quereda C, Martin-Davila P, Moya JL, Navas E, Moreno S. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21(2): 117-119.
- 119.** Diez-Aguilar M, Ruiz-Garbajosa P, Fernandez-Olmos A, Guisado P, Del Campo R, Quereda C. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32(6): 769-772.
- 120.** Nhan TX, Parienti JJ, Badiou G, Leclercq R, Cattoir V. Microbiological investigation and clinical significance of *Corynebacterium* spp. in respiratory specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 74(3): 236-241.
- 121.** Van Roeden SE, Thijsen SF, Sankatsing SU, Limonard GJ. Clinical relevance of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in lower respiratory tract specimens. Infect Dis (Lond). 2015; 47(12): 862-868.

- 122.** Dragomirescu CC et al. Antimicrobial susceptibility testing for *corynebacterium* species isolated from clinical samples in Romania. *Antibiotics*. 2020; 9(1): 31.
- 123.** Olender A, Niemcewicz M. Macrolide, lincosamide, and streptogramin B-constitutive-type resistance in *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from upper respiratory tract specimens. *Microb Drug Resist*. 2010; 16(2): 119-122.
- 124.** Chandran R, Puthukkichal DR, Suman E, Mangalore SK Diphtheroids-important nosocomial pathogens. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(12): 28-31.
- 125.** Neemuchwala A, Soares D, Ravirajan V, Marchand-Austin A, Kus JV, Patel SN. In vitro antibiotic susceptibility pattern of nondiphtheriae *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(4): 1776-1717.
- 126.** Altonsy MO et al. *Corynebacterium tuberculostearicum*, a human skin colonizer, induces the canonical nuclear factor-kappaB inflammatory signaling pathway in human skin cells. *Immun Inflamm Dis*. 2020; 8(1): 62-79.
- 127.** Barzantny H, Brune I, Tauch A. Molecular basis of human body odour formation: insights deduced from corynebacterial genome sequences. *Int J Cosmet Sci*. 2012; 34(2): 2-11.
- 128.** James AG, Austin CJ, Cox DS, Taylor D, Calvert R. Microbiological and biochemical origins of human axillary odour. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013; 83(3): 527–540.
- 129.** Noble WC. Short Communications: Activity of *Corynebacterium jeikeium* Bacteriocin in Vivo. *Microb Ecol Health Disease*. 1988; 1(3): 201-203.

- 130.** Proenca JT, Barral DC, Gordo I. Commensal-to-pathogen transition: One-single transposon insertion results in two pathoadaptive traits in *Escherichia coli* -macrophage interaction. *Sci Rep.* 2017; 7(2): 45-4
- 131.** Rat S, Rud T, Karc A, Pieper DH, Vital M. Pathogenic functions of host microbiota. *Microbiome.* 2018; 6(1): 174
- 132.** Pardo SM, Patel RH, Ramsakal A, Greene J. Disseminated *Corynebacterium jeikeium* Infection in Cancer Patients. *Cureus.* 2020; 12(6): 764
- 133.** Yang K, Kruse RL, Lin WJV, Musher DM. Corynebacteria as a cause of pulmonary infection: a case series and literature review. *Pneumonia.* 2018; 10(10): 54-55.
- 134.** Tauch A, Kaiser O, Hain T, Goesmann A. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J Bacteriol.* 2005; 187(13): 4671-4682
- 135.** Pitcher DA, Johnson F, Allerberger N, Woodford R. An investigation of nosocomial infection with *Corynebacterium jeikeium* in surgical patients using a ribosomal RNA gene probe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990; 9(2): 643-648
- 136.** Tauch A, Bischoff N, Pühler A, Kalinowski J. Comparative genomics identified two conserved DNA modules in a corynebacterial plasmid family present in clinical isolates of the opportunistic human pathogen *Corynebacterium jeikeium*. *Plasmid.* 2004; 52(3): 102-118.
- 137.** Riegel PR, François FJ, Prévost G, Jehl F, Christen R, Monteil H. *Corynebacterium singulare* sp. nov., a New Species for Urease-Positive Strains Related to *Corynebacterium minutissimum*. *International journal of systematic bacteriology.* 1997; 47(4): 1092-6.

- 138.** Merten M, Brinkrolf K, Albersmeier A, Kutter Y, Rückert C, Tauch A. Complete Genome Sequence and Annotation of *Corynebacterium singulare* DSM 44357, Isolated from a Human Semen Specimen. *Genome announcements*. *Genome Announc*. 2015; 3(2): 183-15
- 139.** Ambler R. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980; 289(1036): 321-331.
- 140.** Eriksson-Grennberg K, Boman H, Jansson J, Thorén S. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. I. Genetic study of some ampicillin-resistant mutants. *J Bacteriol*. 1965; 90(1): 54-62.
- 141.** Jacoby G. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1): 161-182
- 142.** Von Hunolstein C, Scopetti F, Efstratiou A, Engler K. Penicillin tolerance amongst non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from cases of pharyngitis. *J. Antimicrob Chemother*. 2002; 50(1): 125-8.
- 143.** Dupon C, Turner L, Rouveix E, Nicolas MH, Dorra M. Endocardite à *Corynebacterium diphtheriae* tolerant à l'amoxicillin. *Presse Med*. 1995; 24(24): 1135.
- 144.** Otsuka Y, Kawamura Y, Koyama T, Iihara H, Ohkusu K, Azeki T. *Corynebacterium resistens* sp.nov., a new multi-resistant coryneform bacterium isolated from human infection. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(8): 3713-17.
- 145.** Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S, Azeki T, Kiura S. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in longterm hospitalized patients with underlying diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54 (2): 109-14.

- 146.** Gomez-Garces, JL, Alos JJ, Tamayo J. In vitro activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria. *Int J Antimicro Agents*. 2007; 29(6): 688-692.
- 147.** Alibi, S., Ferjani, A., Boukadida, J., Navas, J. (2019) Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides and Lincosamides in *Corynebacterium striatum* clinical strains isolated from Tunisia. *Clin Med Invest*. 4:1-4.
- 148.** Akova M, Kayaalp OS. Amfenikoller. İçinde: Kayaalp O, ed. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 12.baskı, Ankara, Pelikan yayıncılık 2009, s: 214-215.
- 149.** Rice LB, Bonomo RA. Antibakteriyal İlaçlara Direnç Mekanizmaları. Çeviren: Gür.D. Klinik Mikrobiyoloji. 9.basım, Atlas Kitapçılık Tic Ltd Şti. Ankara; 2009, s1030-1033.
- 150.** Ortiz-Perez A, Martin-de-Hijas NZ, Esteban J, FernandezNatal MI, Garcia-Cia JJ, Fernandez-Roblas R. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb Drug Resist*. 2010; 16(3): 273-277.
- 151.** Szemraj M, Kwaszewska A, Pawlak, Szewczyk REM. Macrolide, lincosamide, and streptogramin B resistance in lipophilic corynebacteria inhabiting healthy human skin. *Microb Drug Resist*. 2014; 20(5): 404-409.
- 152.** Shortridge V, Flamm R, Ramer N, Beyer J, Tanaka SK. Novel mechanism of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbio Infect Dis*. 1996; 26(2): 73-78.
- 153.** Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1996; 40(8): 1817-1824.

154. Roberts C, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen B, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(12): 2823-2830.
155. Santagati M, Iannelli F, Marco O, Stefani S, Pozzi G. Characterization of a Genetic Element Carrying the Macrolide Efflux Gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(9): 2585-2587
156. Luna VA, Coates P, Eady EA, Cove JH, Nguyen TT, Roberts MC. A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J Antimicrob Chem.* 1999; 44(2):19-25
157. Ünal S. Staphylococcus aureus: Direnç mekanizmaları. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S, editor. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. 2.baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004, s:23-38.
158. Eguchi, H., Kuwahara, T., Miyamoto, T., Nakayama-Imahiji, H., Ichimura, M., Hayashi, T. & Shiota, H. (2008). High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol.* 46(2): 527-32.
159. Sierra JM, Martinez-Martinez L, Vazquez F, Giral E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5): 1714-9.
160. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano M, Fernández-Martínez M, Martínez-Martínez L, Navas J. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 9704.

- 161.** Magnet S, Blanchard J. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* 2005; 105(4): 477-498.
- 162.** Ertek M, Yazgı H, Özkurt Z, Uyanık MH, Aktaş O. Hastane İzolatlarında aminoglikozid direnci. *ANKEM Derg.* 2003; 17(4): 400-404.
- 163.** Biddlecome S, Haas M, Davies J, Miller G, Rane D, Daniels P. Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: a new 3-N-acetylating enzyme from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976; 9(6): 951-955.
- 164.** Davies J, O'Connor S. Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: 3-N-acetyltransferase with broad specificity that determines resistance to the novel aminoglycoside apramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978; 14(1): 69-72.
- 165.** Galimand M et al. AAC (3)-XI, a new aminoglycoside 3-N-acetyltransferase from *Corynebacterium striatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(9): 5647-5653.
- 166.** Navas J, Fernández-Martínez M, Salas C, Cano M, Martínez-Martínez L. Susceptibility to Aminoglycosides and Distribution of *aph* and *aac(3)-XI* Genes among *Corynebacterium striatum* Clinical Isolates. *Plos One.* 2016; 11(12): 1-10.
- 167.** Taşova Y. Tetrasiklinden Tigesikline. *ANKEM Derg.* 2010; 24(2): 36-44
- 168.** Martinez-Martinez L, Suarez AI, Winstanley J, Ortega MC, Bernard K. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical sample. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(9): 2458-2461.

169. Roberts MC, Leonard RB, Briselden A, Schoenknecht FD, Coyle MB. Characterization of antibiotic-resistant *Corynebacterium striatum* strains. J Antimicrob Chemother. 1992; 30(4): 463-474.
170. Tauch A, Krieft S, Pühler A, Kalinowski J. (1999). The *tetAB* of the *Corynebacterium striatum* R-plasmid pTP10 encode an ABC transporter and confer tetracycline, oxytetracycline and oxacillin resistance in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol Lett. 173 (1): 203-9.
171. Tauch A, Kassing, F, Kalinowski J, Pühler A. The erythromycin resistance gene of the *Corynebacterium xerosis* R-plasmid pTP10 also carrying chloramphenicol, kanamycin and tetracycline resistance is capable of transposition in *Corynebacterium glutamicum*. Plasmid. 1995; 33(3): 168-179.
172. Wayne P. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 6th ed. Approved Standard M7-A6. NCCLS, CLSI 2003.
173. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PZR. Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40(2): 2562-2566
174. Aminov R, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R. Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(1): 22-32.
175. Boltin D et al. *Corynebacterium striatum*-A classic pathogen eluding diagnosis. Eur J Intern Med. 2009; 20(3): 49-52.
176. Ishiwada N et al. Clinical and bacteriological analyses of bacteremia due to *Corynebacterium striatum*. J Infect Chemother. 2016; 22(4): 790-793.

- 177.** Rolston KV, Frisbee-Hume S, LeBlanc BM, Streeter H, Ho DH. Antimicrobial activity of a novel des-fluoro(6)quinolone, garenoxacin (BMS-284756), compared to other quinolones, against clinical isolates from cancer patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44(4): 187-194.
- 178.** Rolston KV, Frisbee-Hume S, LeBlanc BM, Streeter H, Ho DH. In vitro antimicrobial activity of moxifloxacin compared to other quinolones against recent clinical bacterial isolates from hospitalized and community-based cancer patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(4): 441-449.
- 179.** Martinez-Martinez L, Joyanes P, Suarez AI, Perea EJ. Activities of gemifloxacin and five other antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* and coryneform bacteria isolated from clinical samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45(8): 2390-2392.
- 180.** Funke G, Punter V, Von Graevenitz A. Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(12): 2874-2878.
- 181.** Gomila M et al. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach. *BMC Microbiol.* 2012; 4(12): 52.
- 182.** Jones RN, Stilwell MG, Hogan PA, Sheehan DJ. Activity of linezolid against 3,251 strains of uncommonly isolated grampositive organisms: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(5): 1491-1493.
- 183.** Gómez-Garcés JL, Alos JJ, Tamayo J. In vitro activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria. *Int J Antimicrob. Agents.* 2007; 29(6): 688-692.

- 184.** Lagrou K, Verhaegen J, Janssens M, Wauters G, Verbist L. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30(1): 7-15.
- 185.** Eskandar S, Miller-Ensminger T, Voukadinova A, WolfemAJ Putonti C. Draft genome sequence of *Corynebacterium aurimucosum* UMB7769, isolated from the female urinary tract. *Microbiology Resource Announcements*. 2020; 9(22): 391-20.
- 186.** Lefèvre CR, Pelletier R, Le Monnier A, Corvec S, Bille E. Clinical relevance and antimicrobial susceptibility profile of the unknown human pathogen *Corynebacterium aurimucosum*. *Journal of Medical Microbiology*. 2021; 70(3): 133-135.
- 187.** Kanmani P et al. Respiratory commensal bacteria *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* improves resistance of infant mice to respiratory syncytial virus and *Streptococcus pneumoniae* superinfection. *Frontiers in microbiology*. 2017; 23(8): 161-163.
- 188.** Dragomirescu CC et al. Comparative analysis of different phenotypic and molecular methods used for the taxonomic identification of *Corynebacterium* spp. isolated from clinical samples in Romania. *Rom Biotechnol Lett*. 2017; 22(5): 12926-12933.
- 189.** Ross JI, Snelling AM, Carnegie E, Coates P, Cunliffe WJ, Bettoli V. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol*. 2003; 148(3): 467-78.
- 190.** Dreno B, Reynaud A, Moyse D, Habert H, Richet H. Erythromycin-resistance of cutaneous bacterial flora in acne. *Europ J Dermatol*. 2001; 11(4): 549-53.

- 191.** Ross JI, Snelling AM, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Leyden JJ. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia. *Br J Dermatol.* 2001; 144(6): 339-46.
- 192.** Denise YW, Sally TS, Vee JG. Identification of clinical isolates of nondiphtherial *Corynebacterium* species and their antibiotic susceptibility patterns. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 1993; 17(1): 23-28
- 193.** Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol.* 1996; 165(6): 359-369.
- 194.** Speer B, Shoemaker N, Salyers A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev.* 1992; 5(4): 387-399.
- 195.** Wilson R. Treatment of infections caused by toxigenic and non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 35(6): 717-20.
- 196.** Tauch A, Krieft S, Kalinowski J, Pühler A. The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. *Mol Gen Genet.* 2000; 263(1): 1-11.
- 197.** Valbuena N et al. Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomecete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. *Mol Microbiol.* 2007; 66(3): 643-57.

- 198.** Chapartegui-González I, Fernández-Martínez M, Rodríguez-Fernández A. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Resistance Mechanisms of *Corynebacterium urealyticum* Clinical Isolates. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(7): 404.
- 199.** Olender A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium* Chemotherapy. 2013; 59(4): 294-306.
- 200.** Van Hoek AH et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*. 2011; 28(2): 203.
- 201.** Yagüe-Guirao G et al. Implication of *ermX* genes in macrolide and telithromycin resistance in *Corynebacterium jeikeium* and *Corynebacterium amycolatum*. *Rev Esp Quimioter*. 2005; 18(3): 236-242.
- 202.** Ramos JN, Valadão TB, Baio PVP, Mattos-Guaraldi AL, Vieira VV. Novel mutations in the QRDR region *gyrA* gene in multidrug-resistance *Corynebacterium* spp. isolates from intravenous sites. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020; 113(4): 589-592.
- 203.** Yoon S, Kim H, Lee Y, Kim S. Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. *Korean J Lab Med*. 2011; 31(1):47-8.

