

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN VE KATETER KÜLTÜRÜ ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
CORYNEBACTERIUM AFERMENTANS VE *CORYNEBACTERIUM*
MUCIFACIENS BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASINDA
KONVANSİYONEL YÖNTEMLER, OTOMATİZE SİSTEMLER VE
DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Serpil ÖLMEZ
Uzmanlık Tezi

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU

YRD. TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Banu SANCAK

VAN – 2017

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN VE KATETER KÜLTÜRÜ ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
CORYNEBACTERIUM AFERMENTANS* VE *CORYNEBACTERIUM
***MUCIFACIENS* BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASINDA**
KONVANSİYONEL YÖNTEMLER, OTOMATİZE SİSTEMLER VE
DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Serpil ÖLMEZ
Uzmanlık Tezi

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU

YRD. TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Banu SANCAK

VAN – 2017

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı Araştırma Fonu tarafından TTU-2017-5729 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 08.12.2016 tarih 2016/09-35 (KA-16081) nolu kararı ile çalışmaya başlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
KISALTMALAR	IV
RESİMLER DİZİNİ	V
TABLOLAR DİZİNİ	VI
ÖZET	I
SUMMARY	III
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Taksonomi	3
2.3. Tanımlamada Kullanılmış Yöntemler	4
2.4. Korineform Bakteriler ve Sınıflandırma.....	5
2.4.1. Nonlipofilik - Nonfermentatif Korinebakteriler	11
2.4.2. Nonlipofilik - Fermentatif Korinebakteriler	12
2.4.3. Lipofilik Korinebakteriler	14
2.5. <i>Corynebacterium</i> Türlerini Tanımlamada Kullanılan Yöntemler	19
2.5.1. Gram Boyama	19
2.5.2. Biyokimyasal Testler (Katalaz, CAMP, DNaz Testleri).....	20
2.5.3. Otomatize Sistemler	25
2.5.4. Moleküler Yöntemler; 16S rRNA Gen Dizi Analizi	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Örneklerin Toplanması	30
3.2. Kan Kültürü Örneklerinin Alınması	30
3.3. Kan Kültürü Şişelerinin İşlenmesi	30
3.4. Kan ve Katater Kültürlerinin Değerlendirilmesi	31
3.4.1. Pozitif Sinyal Veren Şişelerden Gram Boyama.....	31
3.4.2. Kan Kültürü Şişelerinin Ekimi ve Değerlendirilmesi	31
3.5. MALDI-TOF MS ile Tanımlama	32
3.6. VITEK 2 Compact ile Tanımlama.....	32
3.7. İzolatlar İçin Yapılan Konvansiyonel Ek Testler	33

3.7.1 CAMP Testi	33
3.7.2. DNaz Testi	33
3.8.1. İzolatların Moleküler Olarak Tanımlanması	35
3.8.1. DNA İzolasyonu (Ekstraksiyon).....	35
3.8.2. 16S rDNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	35
3.8.2. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	36
3.8.4. DNA Dizi Analizi İçin Sekans Reaksiyonu (Cycle Sequencing)	36
3.8.5. Sekans Reaksiyonu Ürünlerinin Presipitasyonu	37
3.8.6. Dizileme	37
3.8.7. Sonuçların Analizi.....	38
3.9. Antibiyotik Duyarlılık Testi	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. Örnek Türleri ve İzolatların Özellikleri	40
4.2. İzolatların Tanımlanması	42
4.3. MALDI-TOF MS ve VITEK 2 Compact ile Tanımlama Sonuçları.....	42
4.4. Konvansiyonel Test Sonuçları (Katalaz, CAMP, DNaz Testleri)	42
4.5. DNA Dizi Analizi Sonuçları.....	45
4.6. Olguların Aynı Gün ve Bir Haftalık Kan ve Kateter Kültürü Üremelerinin Değerlendirilmesi.....	48
4.7. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	50
5. TARTIŞMA.....	52
6. KAYNAKLAR	64
7. ÖZGEÇMİŞ	77

TEŞEKKÜR

Öncelikle, uzmanlık eğitim sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle bize yol gösteren hoşgörüsü ve yeni fikirleriyle bizleri geleceğe hazırlayan bölüm başkanımız ve tez danışman hocam sayın Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU'na,

Tezimin gerçekleşmesinde çok büyük emeği, katkıları ve desteği olan; asistanlığım döneminde birlikte çalıştığım zamanlardaki her türlü işte değerli zamanından ödün vermekten çekinmeyen; kendisinden çok şey öğrendiğim ve her zaman bilgi ve tecrübesinden yararlanmış olduğum fedakar yardımcı danışman hocam sayın Prof. Dr. Banu SANCAK'a,

Uzmanlık eğitimim sırasında her türlü destek, bilgi, tecrübe ve yardımlarını bizden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Mehmet PARLAK'a,

Bu tezin moleküler analizlerinin her aşamasında destek ve yardımlarından faydalandığım İnönü Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Barış OTLU ve Uzm. Dr. Nafia Canan GÜRSOY'a,

Ayrıca asistanlık eğitimimin üç yılını geçirdiğim Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimim boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim, en doğru ve güncel bilgileri aktaran değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmamda yardımlarını eksik etmeyen Hacettepe Mikrobiyoloji'den çok değerli arkadaşlarım Asiye BIÇAKÇIGİL, Özlem TUNCER, Ümran LİSTE'ye ve Yüzüncü Yıl Mikrobiyoloji'den başta Sümeyye AKYÜZ olmak üzere diğer tüm asistan ve teknisyen arkadaşlarıma,

Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına,

Çalışmamın mali ayağında destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığına,

Yetişmemde ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan çok kıymetli aileme; desteği ve fedakarlıklarıyla hep yanıbaşımdayken olan sevgili eşim Ali ÖLMEZ'e ve varlıklarıyla hayatıma anlam katan biricik kızlarım Sibel ÖLMEZ ile Betül ÖLMEZ'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

KISALTMALAR

ANF	: Absolute Nonfermenter
ATCC	: American Type Culture Collection
BLAST	: Basic Local Alignment Tool
BPD	: Bronkopulmoner Displazi
CAMP	: Christie, Atkins, Munch-Petersen
CFA	: Cellular Fatty Acid
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CHCA	: α -Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DHB	: Dihidroksibenzoik Asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
ICD	: Implantable Cardioverter Defibrillator
KNS	: Koagülaz Negatif Safilokok
MALDI-TOF MS	: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of flight Mass Spectrometry
MHA	: Mueller Hinton Agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLSB	: Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B
NaAc	: Sodyum asetat
Na₂-EDTA	: EDTA disodium salt
NCBI	: National Centre for Biotechnology Information
POP-6	: Performance Optimized Polymer-6
PYR	: Pyrrolidonyl Arylamidase
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
CFU/ML	: Mililitre başına koloni oluşturan birim sayısı
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TBSA	: Tüberkülostearik Asit
TMP-SMX	: Trimetoprim Sulfometoksazol

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Katalaz testi pozitif ve negatif reaksiyon örnekleri.....	21
Resim 2. CAMP testi pozitif ve negatif reaksiyon örnekleri	23
Resim 3. DNaz testi pozitif ve negatif reaksiyon örnekleri	25
Resim 4. <i>C. mucifaciens</i> (27 numaralı izolat) ve <i>C. afermentans</i> (24, 25, 26 numaralı izolatlar) izolatları CAMP testi reaksiyon görüntüleri	43
Resim 5. <i>C. mucifaciens</i> izolatının makroskopik görünümü.....	43
Resim 6. <i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i> izolatının makroskopik görünümü.....	44
Resim 7. <i>C. mucifaciens</i> / <i>C. afermentans</i> spp. 16S rDNA PZR sonucu	45
Resim 8. <i>C. afermentans</i> izolatlarından 38 nolu örneğin, FinchTV v1.3.1 yazılımı ile elde edilen 16S rDNA Dizi analizi kromotogram görüntüsü	46
Resim 9. <i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i> izolatlarından birinin E-test antibiyotik duyarlılık görüntüsü.....	51

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Korinebakterilerin Sınıflandırılması	6
Tablo 2. <i>Corynebacterium</i> spp.'nin Biyokimyasal Özellikleri	18
Tablo 3. <i>T. otitidis</i> , <i>C. mucifaciens</i> , <i>C. afermentans</i> bakterilerinin tür düzeyinde ayrımı için uygulanan testler ve fenotipik özellikleri.....	34
Tablo 4. TopTaq (Qiagen) PZR reaksiyon karışımının hazırlanması.....	36
Tablo 5. Sekans (cycle sequencing) reaksiyon karışımının hazırlanması.....	37
Tablo 6. <i>Corynebacterium</i> spp. CLSI kılavuzunda belirtilen direnç sınır değerleri.....	39
Tablo 7. Olgulara ait klinik bulgular	41
Tablo 8. Olgulara ait konvansiyonel tanımlama ve dizi analizi sonuçları	47
Tablo 9. Olguların bir haftalık kan kültürü üremelerinin değerlendirilmesi.....	48
Tablo 10. Olguların diğer kan kültürlerinin değerlendirilmesi	50
Tablo 11. İzolatların antibiyotik duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi.....	51

ÖZET

Corynebacterium, korineform bakteriler içinde en fazla türe sahip olan cinstir ve elliden fazla türünün hastalık yapma potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Cilt ve muköz membranlarda normal flora elemanı olarak bulunan bu Gram pozitif basiller insanlarda bakteriyemi, endokardit ve pnömoni gibi çeşitli enfeksiyonlarda etken olarak bildirilmişlerdir. *Corynebacterium* türlerinde gelişmekte olan antibiyotik direnci, korineform bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasını ve antimikrobiyal direnç paternlerinin izlenmesini gerekli kılmıştır. Bu çalışma ile kan ve kateter kültürlerinde üreyen korineform bakterilerin farklı yöntemlerle tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin çalışılması amaçlanmıştır.

Ağustos 2015 – Ocak 2017 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli servislerinden gönderilmiş kan ve kateter kültürü örnekleri incelenmiştir. *Turicella otitidis* veya *Corynebacterium mucifaciens* olarak tanımlanan 46 izolat çalışmaya dâhil edilmiştir. Üreme saptanan kan ve kateter kültürü örnekleri MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of flight Mass Spectrometry, bioMérieux, Fransa) ve VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemleriyle çalışılmıştır. İzolatlara ek olarak katalaz, DNaz ve CAMP testleri yapılmış, ayrıca tüm izolatlar 16S rRNA gen dizi analizi yöntemiyle tanımlanmıştır. Çalışma kapsamındaki izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla CLSI önerileri doğrultusunda gradyan şerit yöntemi (E-test, bioMérieux, Fransa) kullanılmıştır.

Çalışma kapsamındaki 46 izolattan biri MALDI-TOF MS ile *C. mucifaciens* olarak tanımlanmış ancak 45 izolat bu sistemle tanımlanamamıştır. MALDI-TOF MS ile *C. mucifaciens* olarak tanımlanan izolat VITEK 2 Compact otomatize sistemiyle tanımlanamamış, MALDI-TOF MS ile tanımlanamayan 45 izolat ise VITEK 2 Compact ile *T. otitidis* olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS tanımlama sonucu *C. mucifaciens* olan izolat, dizi analizi sonucunda *C. mucifaciens* olarak adlandırılmıştır. VITEK 2 Compact sistemle *T. otitidis* olarak tanımlanmış 45 izolat ise 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda *C. mucifaciens/C. afermentans* spp. olarak tanımlanmıştır. Bu iki bakterinin DNA dizi analizi sonuçları %98.5 oranında benzerlik gösterdiğinden ayırım sağlamak

için konvansiyonel testler yapılmıştır. Sonuç olarak 45 izolatın tamamı *C. afermentans* subsp. *afermentans* olarak tanımlanmıştır.

Antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre *C. mucifaciens* olarak tanımlanan izolatın penisilin, vankomisin, daptomisin ve trimetoprim/sulfometoksazol (TMP-SMX) antibiyotiklerine duyarlı olduğu, eritromisin ve klindamisin antibiyotiklerine ise dirençli olduğu belirlenmiştir. *C. afermentans* subsp. *afermentans* olarak tanımlanan 45 izolatın ise tamamı penisilin, eritromisin ve klindamisine dirençli, vankomisin ve daptomisine ise duyarlı bulunmuş; TMP-SMX duyarlılığı ise izolatlar arasında değişkenlik göstermiştir.

Tez çalışmamızda difteroid basil enfeksiyonlarına bağlı mortalite ve morbiditenin engellenmesi amacıyla çeşitli tanımlama yöntemlerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Günümüzde hızlı tanı amacıyla mikrobiyoloji laboratuvarlarında otomatize sistemlerin kullanımı oldukça yaygınlaşmış ve pek çok merkezde konvansiyonel yöntemlerin yerini almıştır. Ancak çalışmamızda da görüldüğü üzere hızlı ve doğru tanımlama için otomatize sistemlerle konvansiyonel yöntemlerin birlikte kullanılması gereklidir. Ayrıca izole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık profilleri çalışılarak türlere özgü antibiyotik duyarlılık profillerine katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *C. afermentans*, *C. mucifaciens*, *T. otitidis*, VITEK 2 Compact

SUMMARY

Corynebacterium, has the most type of species among coryneform bacteria and it is believed that more than fifty species has a potential to cause disease. These Gram positive bacilli, which are normal flora elements in skin and mucous membranes, have been reported as causative agents in various infections such as bacteriemia, endocarditis and pneumonia in humans. Furthermore the developing antibiotic resistance in *Corynebacterium* spp. has been required coryneform bacteria to be defined to the species level and to monitor the antimicrobial resistance patterns. In this study, it was aimed to identify coryneform bacteria isolated from blood cultures with different methods and investigate antibiotic susceptibility tests.

Between August 2015 - January 2017, blood and catheter culture samples sent to the Clinical Microbiology Laboratory of Hacettepe University Faculty of Medicine Hospital from various services were examined. 46 isolates identified as *Turicella otitidis* or *Corynebacterium mucifaciens* were included in the study. The growth detected blood and catheter culture samples were analyzed in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and Time Of flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS, bioMérieux, France) and VITEK 2 Compact (bioMérieux, France) automated systems. In addition to isolates, catalase, DNase and CAMP tests were performed, and all isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing. The gradient strip method (E-test, bioMérieux, France) was used to determine the antibiotic susceptibilities of the isolates in the study in line with the CLSI recommendations.

One isolate of 46 isolates was identified as *C. mucifaciens* with MALDI-TOF MS, but 45 isolates were not identified with this system. The isolate identified as *C. mucifaciens* with MALDI-TOF MS was not identified with the VITEK 2 Compact automated system and 45 isolates not identified with MALDI-TOF MS were identified as *T. otitidis* with VITEK 2 Compact. The isolate identified by MALDI-TOF MS as *C. mucifaciens* was identified as *C. mucifaciens* by sequence analysing. 45 isolates identified as *T. otitidis* by the VITEK 2 Compact system were identified as *C. mucifaciens*/*C. afermentans* spp. by sequence analyse. Since DNA sequencing results of these two bacteria showed 98.5% similarity, conventional tests were performed to

differentiate. As a result, all 45 isolates were identified as *C. afermentans* subsp. *afermentans*.

According to the results of antibiotic susceptibility tests the isolate identified as *C. mucifaciens* were found to be sensitive to penicillin, vancomycin, daptomycin and trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMX) antibiotics, while resistant to erythromycin and clindamycin antibiotics. 45 isolates identified as *C. afermentans* subsp. *afermentans* were all resistant to penicillin, erythromycin and clindamycin, susceptible to vancomycin and daptomycin; sensitivity to TMP-SMX varied between isolates.

In our thesis study various methods have been compared to prevent mortality and morbidity due to diphtheroid bacillary infections. Today, the use of automated systems in microbiology laboratories has become widespread for the purpose of rapid diagnosis and has been replaced by conventional methods in many centers. However, as seen in our study, it is necessary to use conventional methods together with automated systems for fast and accurate identification. In addition, antimicrobial susceptibility profiles of isolated bacteria have been studied to contribute to species specific antibiotic susceptibility profiles.

Key Words: *C. afermentans*, *C. mucifaciens*, *T. otitidis*, VITEK 2 Compact

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Corynebacterium, korineform grup bakterilerdendir ve ilk olarak Lehmann & Neumann tarafından 1896 yılında tanımlanmıştır (1). Korineform bakteriler tanımı, *Corynebacterium* ve diğer düzensiz şekilli, sporsuz, hareketsiz, Gram pozitif basilleri tanımlamak için kullanılır. Korineform bakteriler denildiğinde *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Brevibacterium* ve *Oerskovia* akla gelen bakteri gruplarıdır (2). *Corynebacterium*, korineform bakteriler içerisinde en fazla türe sahip olan cinstir ve kendi içinde alt gruplara ayrılmıştır. Günümüzde tanımlanmış yüz on iki tür, on bir alt türü bulunmaktadır ve bu türlerin yarısından fazlasının hastalık yapıcı potansiyeli olduğu ileri sürülmektedir (3). *Corynebacterium* nonfermenter grubu 1 (ANF-1), ilk kez 1981 yılında CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından tanımlanmıştır. Bu gruptaki bakteriler hiçbir şekerden asit üretmeyen ve üreaz aktiviteleri de olmayan pleomorfik Gram pozitif basillerdir (4). ANF-1 grubu bakteriler başta kan, kulak ve deri olmak üzere çeşitli klinik örneklerden izole edilmiştir. *Corynebacterium afermentans* subsp. *afermentans* ve *C. afermentans* subsp. *lipophilum* ANF-1 grubundaki bakterilerdir (5). *Turicella otitidis* ise bu bakterilere biyokimyasal açıdan çok benzediğinden ‘‘ANF-1 benzeri bakteri’’ olarak adlandırılmıştır ve sıklıkla kulak örneklerinden izole edilmiştir (6). *C. mucifaciens* ise kan, yara, eklem sıvılarından izole edilmiştir ve ANF-1 grubuna dahil değildir. Ayrıca *C. mucifaciens*, *C. afermentans* ile %98.5 oranında filogenetik benzerlik göstermektedir (7). *Corynebacterium* türleri genellikle deri ve müköz membranlarda normal flora elemanı olarak bulunurlar (8).

Günümüzde hızlı tanı amacıyla mikrobiyoloji laboratuvarlarında otomatize sistemlerin kullanımı oldukça yaygınlaşmış ve pek çok merkezde konvansiyonel yöntemlerin yerini almıştır. Kültürlerde üreyen bakterilerin hızlı ve doğru tanısının yapılması, hastaya uygulanacak olan tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Korineform bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması hastane ve hasta popülasyonuna göre veri tabanı oluşturulması açısından son derece önemlidir. Ayrıca *Corynebacterium* türlerinde gelişmekte olan antibiyotik direnci, korineform bakterilerin tür düzeyinde

tanımlanmasını ve antimikrobiyal direnç paternlerinin sürekli izlenmesini gerekli kılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan ve kateter kültürü örneklerinden izole edilen *C. afermentans* ve *C. mucifaciens* bakterilerinin erken ve doğru tanımlanmasında MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of flight Mass Spectrometry, bioMérieux, Fransa) ve VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemleri ile konvansiyonel yöntemleri karşılaştırmak ve türlere özgü antibiyotik duyarlılık paternleri gradyan şerit (E-test) yöntemi ile saptamaktır. Tür tanımlamasında elde edilen sonuçların doğruluğunu teyit etmek amacıyla 16S rRNA gen dizi analizi yapılmıştır.

Cilt florasında bulunması nedeniyle bu bakterilerin hastalara ait klinik örneklerden izole edilmeleri sıklıkla kontaminasyon olarak düşünülmektedir. Ancak difteroid basillerin patojen olarak raporlandığı pek çok vaka bulunduğundan, bu bakteriler potansiyel patojen olarak akılda tutulmalıdır. Bu çalışma ile hastalarda enfeksiyon etkeni olup morbidite ve mortaliteye neden olabilen korineform bakterilere dikkat çekilmek istenmiştir. Hızlı ve doğru tanımlama için farklı yöntemlerin karşılaştırılması yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Korineform bakteriler düzensiz şekilli, sporsuz, hareketsiz, aerobik veya fakültatif anaerobik, Gram pozitif basillerdir. Bu bakteriler kemotaksonomik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. 16S rRNA gen dizi analizleriyle yapılmış olan filogenetik çalışmalar da, bu sınıflandırmayı doğrulamaktadır (2). Basiller tekli, birbirine paralel çizgiler şeklinde veya ‘V’ şeklinde çiftler halinde bulunabilir. Bu organizmalar grubu mikroskopik görünümünden dolayı Çin harflerine benzetilmişlerdir (9). Doğada yaygın olarak bulunan bu bakteriler, cilt ve müköz membranların baskın flora elemanları arasında yer alırlar (10).

2.1.Tarihçe

Corynebacterium türlerinden ilk olarak keşfedilen *Corynebacterium diphtheria*'dır. 1821 yılında Fransa'da görülen bir epidemi sonrası Pierre Bretonneau tarafından klinik özellikleriyle tariflenmiştir. 1826'da ise difteri hastalığı etkeni olarak adlandırılıp, tıp literatürüne girmiştir. 1883 yılında Klebs difteri basilini keşfetmiş, 1884'te Loeffler basili saf kültür olarak izole etmiştir. 1896 yılına gelindiğinde Lehmann ve Neumann, *Corynebacterium* cinsini tanımlayarak, morfolojik açıdan difteri basiline benzeyen bakterileri bu cins içine dahil etmişlerdir (1). ‘Coryne’ kelimesi eski yunanca kökenli bir kelime olup topuz şeklinde bakteriler demektir. Ancak bu görünüm sadece *Corynebacterium* türlerinin özelliği olup, tüm korineform bakteriler için geçerli değildir (2). Korineform bakteriler arasında en fazla türe sahip olan *Corynebacterium* cinsidir (7). Günümüzde tanımlanmış yüz on iki tür, on bir alt türü bulunmaktadır ve bu türlerin yarısından fazlasının hastalık yapıcı potansiyeli olduğu ileri sürülmektedir (3).

2.2. Taksonomi

Klinik örneklerden izole edilen difteroid bakterilerin doğru tanımlanması, bu bakterilerin taksonomisinin doğru şekilde yapılmış olmasına bağlıdır. Taksonomistler arasında ‘korineform’ terimi, ‘difteroid’ teriminden daha yaygın kullanılmaktadır. Korineform bakteriler terimi aerobik veya anaerobik, aside dirençli

boyanmayan, dallanmayan ve spor içermeyen pleomorfik Gram pozitif basiller için kullanılır (8). Kapsülsüz ve hareketsiz bakterilerdir. Korineform bakterilerin taksonomisinde aminoasitler, şekerler, yağ asitleri ve mikolik asitler gibi hücre duvar bileşenleri yanında izoprenoid kinonlar, sitokromlar ve nükleik asitlerden de faydalanılmıştır. Nükleik asit hibridizasyonu farklı mikroorganizmalar arasındaki akrabalığı saptamak amacıyla kullanılmıştır. DNA-DNA hibridizasyonundan sonra DNA-rRNA hibridizasyonu, birbirleriyle benzerliği fazla olan mikroorganizmaları ayırmada daha başarılı bulunmuştur (11). Taksonomide kullanılan son yaklaşım ise binden fazla nükleotidin dizilenmesine olanak sağlayan 16S rRNA dizi analizidir (12). *Corynebacterium* cinsinin hücre duvarı mezo-diaminopimerik asit ve arabinogalaktan yanında kısa zincirli mikolik asit, dihidrojene menokinonlar (8-9 izopren ünitesi) ve yaklaşık %51-%63 G+C (guanin+sitozin) aralığında DNA baz bileşimi ile karakterizedir. Hücre duvar bileşimi ve lipit kompozisyonuna göre *Corynebacterium* cinsi, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Caseobacter* cinsleri ile yakından ilişkilidir (6).

2.3. Tanımlamada Kullanılmış Yöntemler

Klinik örneklerden izole edilen korineform bakteriler ilk kez 1981 yılında, Hollis ve Weaver tarafından, CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Özel Bakterioloji Laboratuvarlarında (Atlanta, Georgia, ABD) sistematik olarak incelenmiş ve rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek pratik ve güvenilir bir sistem olan ‘‘Gram Pozitif Basilleri Tanımlama Algoritması’’ geliştirilmiştir. Bu tanımlama rehberi, klinik izolatları tanımlamak isteyen mikrobiyologlar için çok değerli bir kaynak olarak kullanılmış, aynı zamanda korineform bakterilerin sonraki taksonomik araştırmaları için de temel niteliği oluşturmuştur. Geliştirilen algoritmaya göre katalaz; üreaz; eskülin hidrolizi; glikoz, maltoz, sükroz, mannitol fermentasyonu; jelatin hidrolizi; nitrat redüksiyonu; hareket; pigment oluşumu; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) β-hemolizin üreten suşu ile CAMP reaksiyonu vermesi gibi özelliklerin tanımlamada kullanılması anahtar role sahiptir (4). Bu sistem modifiye edilerek 1990’ların başlarında API (RAPID) Corynестrip (API bioMe’rieux, La-Balme-les-Grottes, Fransa) geliştirilmiştir. Çalışma prensibi olarak karbonhidrat

fermentasyon reaksiyonlarını ölçen enzimatik testler içeren bu sistem 37°C'de 24 saat (bazı durumlarda 48 saat) inkübasyon sonrası değerlendirilmekteydi. Daha sonra geliştirilen Biolog sistem (Biolog, Hazelwood, Kaliforniya), tanımlamada API Coryne sisteminden farklı metotla karbon kaynakları tüketim reaksiyonlarını test etme prensibiyle çalışmaktaydı ve 4 saatlik inkübasyon sonrası pek çok takson için güvenilir sonuçlar vermekteydi (13, 14). Kämpfer tarafından geliştirilen florojenik substratların kullanıldığı glikozidaz testleri tanımlama için yüzlerce fenotipik testin yapılmasını gerektirdiğinden rutin klinik laboratuvarlarda pek kullanılamamıştır (15). Aslında tanımlama için en güvenilir parametrenin hücre duvarındaki peptidoglikan türünün tayini olduğu, en yaygın kabul edilen görüştü (16). Bu nedenle tanımlamada hücre duvar analizi yapabilecek yöntemler de araştırılmıştır. 1991 yılında hücresel yağ asitleri (CFA-Cellular Fatty Acid) paternlerini gaz kromatografisi ile analiz etmeye yönelik bir test olan Sherlock sistemi (MIDI-Microbial Identification, Newark, Delaware, ABD) geliştirilmiştir (17). Hücre duvarındaki mikolik asitlerin, yüksek performans sıvı kromatografisi yöntemiyle saptanması ve buna göre tür tanımlaması yapılması yöntemi oldukça başarılı sonuçlar vermiştir (18). 1994 yılında ise von Graevenitz ve arkadaşları tarafından korineform bakteri tanımlamasında biyokimyasal özellikler, CFA paternleri ve hücre duvar analizlerini içeren polifazik bir yaklaşım ortaya koyulmuş ve pek çok mikrobiyolog için önemli bir algoritma geliştirilmiştir (19). Moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle çoğaltılmış 16S rDNA'nın restriksiyon analizi yapılarak *Corynebacterium* izolatlarının genetik tekniklerle tür düzeyinde tanımlanması gerçekleştirilmiştir (20).

2.4. Korineform Bakteriler ve Sınıflandırma

Corynebacterium türlerinin ortak özellikleri şu şekildedir; düzensiz şekilli, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, aerobik veya fakültatif anaerobik, katalaz enizimi taşıyan, oksidaz enzimine sahip olmayan, sıklıkla hücre duvarında mikolik asit bulunan Gram pozitif basillerdir (21). *Corynebacterium* türleri mikroskop altında düz veya hafif kıvrık morfolojideki konik uçlu basiller, bazen bir ucu kalın sopa görünümündeki formlar, bölünürken kırılmalar sonucu oluşan açılı veya çit şeklinde dizilimler şeklinde görülebilirler. Bazı türlerinde ise metakromatik granül oluşumu

görülür, bazı hücreler ise Gram boyasıyla homojen olarak boyanmayabilir (22). Temel olarak nonlipofilik-nonfermentatif korinebakteriler, nonlipofilik-fermentatif korinebakteriler ve lipofilik korinebakteriler olarak üç başlık altında incelenebilirler.

Tablo 1. Korinebakterilerin Sınıflandırılması

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

***C. afermentans* subsp. *afermentans*:** Nonlipofilik-nonfermentatif korinebakterilerdendir. 1981 yılında Hollis ve Weaver tarafından ‘‘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 (5). *Turicella otitidis* ve *C. auris*, *C. afermentans*’a benzerliklerinden dolayı ‘‘Grup ANF-1 benzeri bakteri’’ olarak adlandırılmışlardır (23). 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 (4). Riegel ve ark. ise *C. afermentans* izolatlarını sadece kan kültürlerinden izole ettiklerini belirtmişlerdir (5). Bu farklılığın nedeni olarak, CDC koleksiyonunun büyük ihtimalle, *C. afermentans* yanında *T. otitidis* ve *C. auris* izolatlarını da içermiş olması düşünülmüştür (13).

Kantitatif DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda *C. afermentans*'ın iki alt tipe sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Böylece 1993 yılında, CDC korineform grup ANF-1 bakterileri arasında nonlipofilik, kolay üreyen *C. afermentans* subsp. *afermentans*'ın yanında lipofilik *C. afermentans* subsp. *lipophilum* da yer almıştır (23). Fenotipik olarak her iki alt tip kolaylıkla ayrılabilir. *C. afermentans* subsp. *afermentans* kolonileri gama hemolitik, düz, opak, beyaz-krem rengi morfolojide görülürler. %5 koyun kanlı agarda 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası, *C. afermentans* subsp. *afermentans* koloni büyüklüğü 1-2 mm çapında olurken, *C. afermentans* subsp. *lipophilum* kolonileri grimsi, camsı ve 0.5 mm'den daha küçük çapta görülürler. *C. afermentans* subsp. *lipophilum* %1 Tween 80 içeren koyun kanlı agarda üretilirse koloniler 24 saat inkübasyonun ardından 2-3 mm çapa ulaşırlar, *C. afermentans* subsp. *afermentans* koloni büyüklüğü ise Tween 80 varlığından pek etkilenmez ancak koloniler daha parlak ve bej renkli görülürler. Gram boyamada her iki alt tür de; tipik korineform basillerde olduğu gibi tekli, birbirine paralel çizgiler şeklinde veya "V" şeklinde çiftler halinde (Çin harfleri gibi) görülürler. 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. Ancak büyük kolonileri (2mm) ve sıklıkla peynire benzeyen kokuya sahip *Brevibacterium* spp. ve mukoid, sarı-pembe pigmentli *Rhodococcus* spp.'den kolaylıkla ayrılabilirler (5, 24).

C. afermentans aerobik veya mikroaerofilik ortamda ürerken, anaerobik ortamda üremesi güçleşir. *C. afermentans*'ın DNA baz bileşiminde, *C. urealyticum* ve *C. mycetoides*'e benzer şekilde %66-68 mol G+C içeriği bulunmaktadır ve *Corynebacterium* spp. (%51-63) için tanımlanmış aralığın üzerindedir. Pek çok *Corynebacterium* türü gibi hücre duvarında kısa zincirli mikolik asitler bulunur. Aynı zamanda hücre duvarı mezo-diaminopimerik asit, arabinoz ve galaktoz içermektedir. Düz zincirli doymuş yağ asitleri esas olarak palmitik ve stearik asitten oluşurken, doymamış yağ asitleri yoğunlukla oleik ve linoleik asitten oluşur (5). Basitrasin (0.04 IU), kolistin (10 µg), furazolidin (50 µg), novobiyosin (5 µg), O/129 (150 µg) diskleri etrafında herhangi bir çapta zon oluşumu değerlendirildiğinde *C. afermentans* subsp. *afermentans* tüm izolatları basitrasin, kolistin ve novobiyosin etrafında zon oluştururken; furazolidin etrafında zon oluşturmazlar; O/129 etrafında zon oluşumu

ise değişkindir (25). *C. afermentans* subsp. *afermentans* suşlarının %60'ında pozitif CAMP reaksiyonu görölmesi önemli bir özelliştir (2). Korineform grup ANF-3'ten, grup ANF-3'ün nitratı nitrite indirgeyebilmesiyle ayrılır. Katalaz pozitif, oksidaz negatif, pirazinamidaz pozitif, DNaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmayan, bazen metakromatik granüller içeren ve aside dirençli boyanmayan korineform basillerdir (21). Tirozin, jelatin, eskülin, nişasta ve üreyi hidroliz edemezler. Metil kırmızısı ve indol testleri negatiftir; üç şekerli demirli besiyerinde H₂S (hidrojen sülfür) üretimi yoktur; hippürat hidrolizi ise değişkindir. %6.5 NaCl'de gözle görölür şekilde ürerler. İzolatlar sıklıkla β-laktam antibiyotiklere duyarlı olarak bildirilmiştir. Vücutta normal flora elemanı bulunur ancak Kumari ve ark. tarafından 1996 yılında supraserebellar kitlesi olan bir hastada beyin cerrahi operasyonu sonrası beyin absesi etkeni olarak raporlanmıştır (26).

***C. afermentans* subsp. *lipophilum*:** Lipofilik korinebakteriler arasında yer alır. 1981 yılında CDC tarafından tanımlanmış bir takson olan ANF-1 grubu; *C. afermentans* subsp. *afermentans* bakterisini içermekteyken, moleküler çalışmalar sonucu yeni bir alt tür olarak *C. afermentans* subsp. *lipophilum* bakterisi de grup içine dahil edilmiştir (23). *C. afermentans* subsp. *lipophilum* Riegel ve ark. tarafından 1993 yılında lipit eklenmemiş koyun kanlı agarda 48 saat inkübasyon sonrası zayıf üreyen, kan kültürlerinden izole edilmiş korineformlar olarak tanımlanmıştır. *C. afermentans* subsp. *afermentans* ile koloni morfolojisi dışında aynı özelliklere sahiptir. %5 koyun kanlı agarda 24 saat 36°C'de inkübe edildiğinde *C. afermentans* subsp. *afermentans* kolonileri gama hemolitik, düzgün kenarlı, opak, beyaz-krem rengi morfolojide ve 1-2 mm büyüklüğünde iken, *C. afermentans* subsp. *lipophilum* kolonileri parlak, gri, camsı ve 0.5 mm'den küçük görölürler. Koyun kanlı agara %1 Tween eklendiği zaman *C. afermentans* subsp. *lipophilum* kolonileri 2-3 mm büyüklüğe ulaşırlar (5). Katalaz pozitif, oksidaz negatif, pirazinamidaz pozitif, DNaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmayan korineform basillerdir. Bazı suşlarında pozitif CAMP reaksiyonu görölür (21). DNA baz bileşiminde % 66-68 mol G+C bulunur. Hücre duvarında kısa zincirli mikolik asitler, mezo-diaminopimerik asit, arabinoz ve galaktoz bulunur (13). Sıklıkla β-laktam antibiyotiklere duyarlıdır. Bazı izolatlarda klindamisin ve sülfometoksazole direnç

bildirilmiştir (24). Beyin, karaciğer, akciğer absesi; prostetik kapak endokarditi ve ampiyem gibi enfeksiyonlarda etken olarak bildirilmiştir (24, 27, 28).

C. mucifaciens: Nonlipofilik-fermentatif korinebakterilerdendir. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen bu mukoid korineform mikroorganizmalar 1997 yılında Funke ve ark. tarafından fenotipik ve moleküler metotlarla çalışılmıştır. Bu bakterilerin yeni bir *Corynebacterium* türüne ait olduğu belirlenmiş ve bu tür *C. mucifaciens* olarak adlandırılmıştır. Gram boyalı yaymalarda sıklıkla çomak şeklinde, tipik difteroid olarak görülür. Bakteri izolatları, %5 koyun kanlı agarda 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübe edildiğinde 1-1.5 mm çapında koloniler oluşturur. Kolonileri yuvarlak, konveks, parlak, açık sarımsı renkte ve oldukça mukoiddir (7). *C. mucifaciens*, *Corynebacterium* türleri içinde mukoid kolonilere sahip olan tek türdür. Bu mukoid koloni görünümü ile *Rhodococcus equi* kolonilerine benzemektedir (2). Gliserol, glikoz, fruktoz ve mannozdan asit oluşturur ancak eritritol, arabinoz, ksiloz, galaktoz, maltoz, laktoz ve glikojenden asit oluşturmaz. Riboz ve sükrozdan asit üretimi ise değişkendir (7). *R. equi* gliserol, fruktoz ve mannozdan asit üretemez ve bu şekilde *C. mucifaciens*'ten ayrılabilir. Ayrıca *R. equi* α ve β -glukronidaz aktivitesine sahipken, *C. mucifaciens* bu testler için negatif sonuç verir (2). Nonlipofilik, katalaz pozitif, oksidaz ve CAMP reaksiyonları negatif olan fermentatif korineformlardır. Pirazinamidaz ve alkalin fosfataz üretirler ancak nitratı indirgeyemez, üre ve eskülünü hidroliz edemezler (7). TBSA lipofilik olmayan *Corynebacterium* türlerinde çok nadir bulunmasına rağmen, *C. mucifaciens* suşlarında hücresel yağ asitlerinin %1-2'sini TBSA oluşturur (17, 29). *R. equi* suşları ise toplam hücresel yağ asitlerinin %22'si gibi büyük bir oranda TBSA içerirler (29). DNA baz kompozisyonu %63-65 mol oranında G+C içerir. Mukoid koloni yapısı elektron mikroskopuyla incelendiğinde, hücreler arasında konnektif filamentler oluşumuna neden olan hücre dışı bir maddenin varlığı gösterilmiştir. Polisakkarit yapıdaki bu filamanların, *R. equi*'de olduğu gibi bir virülans faktörü de olabileceği belirtilmiştir (7). 16S rRNA gen dizi analizi ile *C. mucifaciens*'in, *C. afermentans*'ın her iki alt türüyle de çok yakın (yaklaşık %1.5 16S rRNA gen farklılığı) ve istatistiksel olarak anlamlı (bootstrap değeri: 90) filogenetik benzerliği bulunmaktadır; *C. coyleae* ise ikinci en yakın akrabasıdır. Yani *C.*

mucifaciens; *C. afermentans* ile yaklaşık %98.5, *C. coyleae* ile yaklaşık %97.7 16S rRNA gen benzerliğine sahiptir (7). Hücre duvarı mezo-diaminopimerik asit ve mikolik asit içerir. Esas düz zincirli doymuş yağ asitleri palmitik ve stearik asittir; baskın olan doymamış yağ asiti ise oleik asittir (17). Bakteri genellikle β -laktam antibiyotikler ve aminoglikozitlere duyarlıdır (2). Kavitasyonlu pnömoni ve bakteriyemi vakalarında etken olarak bildirilmiştir (30, 31).

***Turicella otitidis*:** 1993 yılında, birbirinden bağımsız iki grup araştırmacı hastaların kulak örneklerinde bu korineform bakteriyi saptamışlardır. Funke ve ark. otitis mediası olan üç hastadan, Simonet ve ark. ise otitis media enfeksiyonlu on altı hastadan timpanosentez ile alınmış örneklerde bakteriyi izole etmişlerdir (32, 33). Nonfermentatif özellikteki bu yeni mikroorganizma fenotipik ve biyokimyasal olarak *Corynebacterium* türlerine çok benzemekte ancak hücre duvarında mikolik asit bulunmaması ve az miktarda TBASA (%3-8) içermesiyle farklılık göstermekteydi. Mikolik asit içermediğinden dolayı *Corynebacterium* cinsi içinde sınıflandırılması uygun görülmemiştir (33). 1994 yılında ise Funke ve ark. farklı kemotaksonomik özellikleri ve 16S rRNA dizi analizi sonucunda bu korineform bakteriyi yeni bir cins; *T. otitidis* olarak tanımlamışlardır (34). Bu cins içerisinde sadece tek tür bakteri bulunur ve grup ANF-1 ile benzerliklerinden dolayı “ANF-1 benzeri bakteri” olarak adlandırılmıştır (33). Fenotipik olarak *T. otitidis*, Gram boyamada daha uzun hücrelere sahip olmasıyla *Corynebacterium* spp.’den ayrılabilir. Hücreler hareketsiz ve sporsuzdur; tekli hücreler, ‘V’ şeklinde formlar veya kümeler şeklinde görülebilir. Makroskopik olarak incelendiğinde yuvarlak, düzgün kenarlı, konveks, krem rengi koloniler görülmektedir (21). Koloniler zamanla açık sarı renge döner ve koyun kanlı agar da, 37°C’de 48 saat inkübasyon sonrası 1-2 mm büyüklükte izlenirler (34). Tüm *T. otitidis* suşları kuvvetli pozitif CAMP reaksiyonuna sahiplerdir. %6.5 NaCl varlığında gözle görülür şekilde üreyebilirler. Nonlipofilik; katalaz ve pirazinamidaz pozitif; oksidaz, nitrat, üreaz, indol ve eskülin negatif olan; hiçbir şekerden asit üretmeyen bakterilerdir (6). Hücre duvarında mikolik asit bulunmazken; mezo-aminodipimerik asit, arabinoz ve galaktoz bulunur. DNA baz bileşiminde %65-72 mol arasında, yüksek oranda G+C içeriğine sahiptir (13). *C. afermentans*’tan, *T. otitidis*’in farklı koloni morfolojisine sahip olması, DNaz pozitifliği ve tripsin aktivitesinin olması ile

ayrılabilir. ANF-1 benzeri bakteri olarak adlandırılan bir diğer bakteri *C. auris*'ten de ayırım yapılmalıdır. *C. auris* kolonileri daha kuru ve agara yapışık olduğundan *T. otitidis* kolonilerinden farklıdır. Her ikisi de CAMP pozitif iken, *C. auris* DNaz negatif olmasıyla *T. otitidis*'ten ayrılır. (6). Üçü arasındaki en temel fark ise *T. otitidis*'in hücre duvarında mikolik asit bulunmamasıdır (21). İzolatlar ampisilin, sefalosporinler, siprofloksasin, gentamisin, ve tetrasikline duyarlı iken, bazı suşlarda klindamisin ve eritromisin direnci görülmektedir (35, 36). Bakterinin otitis media dışında kulak arkası absesi, mastoidit ve bakteriyemi gibi enfeksiyonlarda etken olduğu bildirilmiştir (37, 38) (39).

2.4.1. Nonlipofilik - Nonfermentatif Korinebakteriler

***C. auris*:** Funke ve ark. tarafından 1995 yılında otitis media'sı olan pediatrik hastaların örneklerinden izole edilip tanımlanmıştır. ANF-1 grubu bakterilere olan benzerliğinden dolayı, *T. otitidis* gibi "ANF-1 benzeri bakteri" olarak adlandırılmıştır. Biyokimyasal tarama reaksiyonları *C. afermentans* subsp. *afermentans* ve *T. otitidis*'le benzerdir. Tüm *C. auris* ve *T. otitidis* suşları güçlü pozitif CAMP reaksiyonu verirler (23). *C. auris* suşları siprofloksasin, gentamisin, rifampin, tatrasiklin ve vankomisine duyarlı; penisiline dirençli iken; klindamisin ve eritromisin duyarlılığının değişken olduğu bildirilmiştir (35). Sağlıklı kişilerin kulaklarından izole edildiği gibi kulak enfeksiyonu olan hastalardan da izole edilmiştir (13).

***C. propinquum*:** 1993 yılında CDC tarafından tanımlanmış korineform grup ANF-3 bakterilerdendir (40). Esas olarak solunum yolu örneklerinden izole edilir. Düzgün kenarlı, beyaz, gama hemolitik kolonileri keçeleşmiş yüzeye sahiptir (21). Filogenetik olarak *C. pseudodiphtheriticum* ile yakın ilişkili bulunmuştur (41). *C. propinquum* ile hastalık arasında ilişki olduğunu bildiren tek vaka Petit ve ark. tarafından raporlanan yapay kapak endokardit vakasıdır (42).

***C. pseudodiphtheriticum*:** Kolonileri düzgün kenarlı, beyaz, hafif kuru ve 37°C'de 48 saat inkübasyon sonrası 1-2 mm çapında görülürler. Karbonhidratları

okside veya fermente edemez (21). *C. pseudodiphtheriticum* orofarengial bakteriyel flora elemanıdır ve esas olarak solunum yolu hastalıkları ile ilişkilidir. Daha nadir olarak endokardit, protez ve yara enfeksiyonları ile ilişkili bulunmuştur (43). Bazen difteriyi taklit eder şekilde solunum yolu hastalıklarına neden olabilir (44).

2.4.2. Nonlipofilik - Fermentatif Korinebakteriler

***C. amycolatum*:** İlk olarak 1988 yılında, Collins ve arkadaşları tarafından, sağlıklı insanların ciltlerinden alınan sürüntü örneklerinden izole edilmiştir (45). Hücre duvarında mikolik asit bulunmaması dışında *Corynebacterium* cinsine ait karakteristik özellikleri taşımaktadır. *C. asperum*, CDC korineform gruplar F-2 ve I-2 de mikolik asit taşımayan nadir korinebakterilerdir (46). *C. xerosis* ile her ikisinin de sahip olduğu kuru koloniler ve benzer biyokimyasal özellikler nedeniyle karıştırılabilir (47). Bu bakterinin doğru tanımlanması önemlidir çünkü β -laktamlar, makrolidler, klindamisin, aminoglikozitler, siprofloksasin ve rifampin dahil pek çok antibiyotiğe dirençlidir (35).

***C. argentoratense*:** Riegel ve ark. tarafından 1995 yılında dört hastanın boğaz örneklerinden izole edilerek tanımlanmıştır. 37°C'de 48 saat inkübasyon sonrası 2 mm çapında, krem renkli, gama hemolitik koloniler oluşturur. Filogenetik olarak *C. diphtheriae* ile yakından ilişkilidir ancak difteri toksinini kodlayan *tox* geni bu bakteride bulunmaz. Tonsillit şikayeti olan hastalardan izole edilmiş olsa da klinik anlamı belirgin değildir (21, 48).

***C. diphtheria*:** Difteri hastalığı etkeni olan bakteri koloni morfolojisi ve biyokimyasal özellik bakımından birbirlerinden farklı özellikler göstermeleri nedeniyle dört biyotipe ayrılmıştır; *gravis*, *mitis*, *belfanti*, *intermedius*. Hastalık şiddeti ile biyotip arasında ilişki gösterilemediğinden biyotiplendirmenin klinik önemi yoktur, ancak epidemiyolojik olarak önemlidir (13). Bakteri Tinsdale agarda (potasyum tellürit içeren besiyeri) sistinaz aktivitesine bağlı olarak, kahverengi halosu olan gri-siyah koloniler oluşturur. *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis* türlerinin hepsi faj kaynaklı difteri toksini taşıyabilme, sistinaz

pozitifliği ve pirazinamidaz negatifliği gibi pek çok biyokimyasal özellik açısından benzerlerdir. *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis* üreaz pozitif olmaları ve ters CAMP reaksiyonu vermeleriyle *C. diphtheriae*'dan ayrılabilirler (13, 41).

***C. glucuronolyticum*:** Bakteri ilk olarak 1995 yılında Funke ve ark. tarafından erkek hastalarda, genitoüriner sistem enfeksiyonlarında izole edilip tanımlanmıştır (49). Aynı dönemde bu bakteri Riegel ve ark. tarafından *C. seminale* olarak adlandırılmıştır (50). Kolonileri beyaz-sarımsak, hemoliz yapmayan, konveks ve kremi görünümündedir. Bakteri üreaz aktivitesine sahipse, oda ısısında 5 dakika inkübe edildiğinde testin pozitifleştiği görülür. Eskülünü hidroliz edebilen nadir insan patojenlerindedir. CAMP testinde pozitif reaksiyon verirler (35). *C. glucuronolyticum* genellikle tetrasiklinlere dirençlidir, makrolid ve linkozamid direnci de görülebilir (35).

***C. matruchotii*:** 1919 yılında Mendel tarafından *Bacterionema matruchotii* olarak tanımlanmış olup, filogenetik çalışmalar sonucu 1983'te Collins tarafından *Corynebacterium* cinsine ait bir tür olarak sınıflandırılmıştır (51). Gram boyamada filamentöz bakterinin filamentinin ucunda bulunan kısa bir basil nedeniyle "kırbaç sapı (whip handle)" görüntüsüne sahip olup, bu görüntü bakteri için karakteristiktir. (8). Kolonileri ise diğer korineformlara göre daha küçük ve düz yapıdadır. Bakteri oral kavite normal flora elemanları arasında bulunur ancak endoftalmit ve korneal ülserasyon gibi oküler enfeksiyonlarda nadiren etken olarak bildirilmiştir (52, 53).

***C. minutissimum*:** 1983 yılında Collins ve Jones tarafından tanımlanmış olan bu bakteri normal florada bulunmaktadır ancak eritrazma etkeni olarak ta bildirilmiştir (8, 54). Kolonileri konveks, parlak yüzeyli, nemli görünümündedir (55). Zengin besiyeri ortamında üretilirse, kolonileri Wood's lambası (365 nm) altında mercan kırmızısı-turuncu renkte floresans verir (13). CDC tarafından iki biyotip belirlenmiştir ve temel farklılık biyotip 1 sükrozu fermente ederken, biyotip 2 sükrozu fermente edemez (4).

***C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis*:** *C. ulcerans* kolonileri kuru, balmumu gibi, gri-beyaz iken *C. pseudotuberculosis* kolonileri opak, konveks ve sarımsı beyaz renktedir (2). *C. diphteria*, *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis* beraber ‘‘*Corynebacterium diphteria* grubu’’ adı altında incelenmişlerdir (56). 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda filogenetik olarak yakın ilişkili bulunmalarının yanı sıra; biyokimyasal reaksiyonlar açısından da benzerlerdir (13, 17). *C. ulcerans* nazofarengeal hastalık, nekrotik granüloma ve pulmoner nodül etkeni olarak gösterilmiştir (57, 58). *C. pseudotuberculosis* ise insanlarda nadiren enfeksiyon etkeni olmuştur ancak koyun, keçi ve atlarda önemli bir morbidite nedenidir (13).

***C. xerosis* ve *C. striatum*:** Vücutta konjonktiva, nazofarenks ve deride normal flora elemanı olarak bulunabilen *C. xerosis* nadiren enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir. *C. striatum* ise cilt flora elemanları arasında yer almakla birlikte maligniteli hastalarda sepsis, endokardit, peritonit gibi enfeksiyonlarda etken olarak bildirilmiştir (1). Birbirlerine çok benzer özelliklere sahip bu iki korineform bakterinin birbirlerinden ayrımı maltoz fermentasyonu yoluyla yapılabilir. *C. xerosis* maltoz fermentasyonu yapar ancak *C. striatum* maltozu fermente etmez. Ayrıca koloni morfolojileri birbirlerinden farklıdır. *C. xerosis* kolonileri sarımsı, kuru ve granüler iken *C. striatum* daha beyaz, nemli, parlak ve düzgün kenarlı koloniler oluşturur (2). Ayrıca *C. striatum*’un bazı suşları CAMP pozitifdir (21).

2.4.3. Lipofilik Korinebakteriler

Bu bakterilerin belirli bir miktar lipit (%0.1-1 Tween 80) eklenmemiş rutin laboratuvar besiyerlerinde küçük koloniler oluşturmaları, besiyerine lipit eklenince koloni büyüklüklerinin artması nedeniyle ‘‘lipofilik’’ terimi kullanılmaktadır. Lipofilik *Corynebacterium* türleri *C. accolens*, *C. afermentans* subsp. *lipophilum*, *C. bovis*, *C. jeikeium*, *C. macginleyi*, *C. urealyticum* ve CDC grup F-1 ile grup G’yi kapsamaktadır. Lipofilik korinebakteriler genellikle lipofilik olmayan türlere göre daha yavaş büyürler ve genellikle koyun kanlı agarda hemoliz yapmayan koloniler oluştururlar. Ayrıca *C. afermentans* subsp. *lipophilum*’un bazı suşları hariç tüm lipofilik türler CAMP negatif özelliğe sahiplerdir (13, 19).

C. accolens: Neubauer ve ark. tarafından ilk olarak 1991 yılında balgam, boğaz, yara ve endoservikal örneklerden izole edilmiştir (59). *C. accolens* suşlarının kanlı agara ekim yapılmış *S. aureus* kolonileri etrafında ‘‘satellit fenomeni’’ göstererek ürediği görülmüştür. Bu üremenin ‘X’ ve ‘V’ faktörlerinden kaynaklanmadığı gösterilmiş olup, stafilokokların eritrositler üzerindeki etkisine bağlı lipit gereksiniminin karşılanması muhtemel neden olarak görülmüştür (21). Penisilin, aminoglikozitler, sefalosporinler gibi pek çok antibiyotiğe duyarlı iken, sulfometoksazole dirençli olduğu bildirilmiştir (59). Predispozan faktörleri olmayan bir hastada yapay olmayan mitral ve aortik kapak endokardit etkeni olarak bildirilmiştir (60).

C. bovis: İlk olarak sığırlardan izole edilmiştir ve insanlarda nadir hastalık yapan bir patojendir (61, 62). Alışılmışın dışında bir mikolik asit yapısına sahip olsa da filogenetik analizler sonucu *Corynebacterium* cinsi içerisinde yer aldığı görülmüştür (63). Fenotipik olarak lipofilik taksonlardan *C. jeikeium* ve CDC korineform grup G bakterilerden ayrımı zordur (64).

C. jeikeium: Önceleri CDC grup JK olarak adlandırılmış olan *C. jeikeium* ilk olarak, kardiyak cerrahi sonrası gelişen bakteriyel endokarditlerle ilişkili difteroid olarak tanımlanmıştır (65). Sıklıkla β -laktamlar ve aminoglikozitlere dirençli, glikopeptitlere duyarlıdır. (66, 67). Bu bakterideki çoklu antibiyotik direncinin plazmid kökenliden çok kromozomal kaynaklı olduğu düşünülmektedir. İndüklenebilir, transpozon aracılı makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLSB) direnci de *C. jeikeium* bakterisinde gösterilmiştir (68). *C. jeikeium* ciltte normal flora elemanı olarak bulunsa da en sık izole edilen klinik olarak anlamlı *Corynebacterium* türüdür (69, 70). Nazokomiyal septisemi, bakteriyemi, pulmoner enfeksiyonlar, cilt döküntüleri, septik kutanöz emboli, menenjit, yumuşak doku enfeksiyonu gibi hastalıklarda etken olarak bildirilmiştir (8, 71).

C. macginleyi: *C. macginleyi* farklı biyokimyasal özelliklere sahip lipofilik korineform bakterilerin genetik incelemesi yapılırken keşfedilmiştir (72). Pek çok izolatu daha önceden, *C. accolens* ile beraber CDC korineform grup G-1 içinde

sınıflandırılmıştır (36). *C. macginleyi* izolatlarının çoğu geniş spektrumlu antibiyotiklere duyarlıdır (21). Sağlıklı kişilerin göz örneklerinden edilebilir ancak korneal ülser ve konjunktivitlerde etken olarak ta bildirilmiştir (73, 74).

***C. urealyticum*:** 1986'da CDC korineform grup D-2 olarak tanımlanmış ancak 1992'de *C. urealyticum* adı verilmiştir (75). Asakkarolitiktir ve hızlı üreaz aktivitesi vardır; ekim yapılmaya başladığı anda üre besiyerinin yüzeyi pembe renge dönmeye başlar (21). β -laktam, aminoglikozit ve makrolidlere genellikle dirençlidir; nadiren β -laktam duyarlı suşlar görülebilir (76). İdrardan izole edilmesi her zaman enfeksiyon lehine olmayıp, *C. jeikeium* gibi *C. urealyticum* da hastanede yatan hastaların ciltlerinde sıklıkla kolonize olmaktadır (77). Üriner sistem enfeksiyonlarıyla birlikteliği sık gösterilmiş olup, idrarda izolasyonu sıklıkla alkali pH ve strüvit taşlarıyla beraberdir (2). Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış veya renal transplantasyon sonrası cerrahi komplikasyon oluşmuş hastalarda pyelonefrit, pyeloüretit gibi üst üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur (78, 79). Nadiren endokardit (80), bakteriyemi (81, 82), osteomyelit (83), yumuşak doku enfeksiyonu (84) ve yara enfeksiyonu (82) etkeni olarak bildirilmiştir.

CDC korineform grup F-1: Hollis ve Weaver tarafından, ilk olarak 1981 yılında tanımlanmıştır (4). CDC grup F-1 ve F-2 literatürde genellikle beraber adlandırılır. Her iki takson genellikle glikoz, riboz ve maltozu fermente ederken, CDC grup F-1 sükrozu da fermente edebilir. Grup F-2, *C. amycolatum*'un sinonimidir (13). Genellikle penisilinlere duyarlı, makrolidlere dirençli bir korinebakteridir (2). Bu bakteriler sıklıkla üriner sistemden izole edilmişlerdir. CDC grup F-1 ile ilişkili üriner sistemde strüvit taşı oluşumu bulunan bir vaka raporlanmıştır (85).

CDC korineform grup G: CDC grup G bakteriler 1981'de CDC tarafından tanımlanmış olup, gerçek korinebakterilerin tüm kemotaksonomik özelliklerine sahip olmalarına rağmen tür adı verilmemiştir. CDC grup G-1 ve G-2 taksonları glikoz, sükroz ve sıklıkla maltozu fermente eden üreaz negatif lipofilik bakterilerdir. Grup G-1 nitratı indirgeyebilmesi ile nitrat negatif olan grup G-2'den ayrılır (4). *C.*

jeikeium ve *C. urealyticum* gibi pek çok antibiyotiğe dirençlidir (86). Bakteri suşları vitreus sıvısı, beyin omurilik sıvısı, kan ve genitoüriner sistem örneklerinden izole edilmiştir (72, 87, 88).

Diğer lipofilik korineform bakteriler: “*C. genitalium*” (89), “*C. pseudogenitalium*” (90) ve “*C. tuberculostearicum*” (91) yapılan taksonomik çalışmalarda lipofilik *Corynebacterium* türleri olarak bulunmuştur. *C. tuberculostearicum*; CDC grup G ve *C. accolens* korinebakterilerinden, hücre duvarında TBSA bulunması ile ayrılabilir (2).



Tablo 2. *Corynebacterium* spp.'nin Biyokimyasal Özellikleri (13)

Tür Adı	Fermentasyon/ Oksidasyon(O/F)	Lipofilit	Nitrat İndirgenmesi	Üre Hidrolizi	Eskülin Hidrolizi	Pirazinamidaz	Alkalen Fosfataz	CAMP testi	Asit Üretimi		
									Glikoz	Maltoz	Sükroz
<i>C. accolens</i>	F	+	+	-	-	D	-	-	+	-	D
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>	O	-	-	-	-	+	+	D	-	-	-
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>lipophilum</i>	O	+	-	-	-	+	+	D	-	-	-
<i>C. amycolatum</i>	F	-	D	D	-	+	+	-	+	D	D
<i>C. argentoratense</i>	F	-	-	-	-	+	D	-	+	-	+
<i>C. auris</i>	O	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>C. diphtheria gravis</i>	F	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. diphtheria intermedius</i>	F	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. diphtheria mitis</i>	F	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. diphtheria belfanti</i>	F	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. glucuronolyticum</i>	F	-	D	D	D	+	D	+	+	D	+
<i>C. jeikeum</i>	O	+	-	-	-	+	+	-	+	D	-
<i>C. macginleyi</i>	F	+	+	-	-		+	-	+	-	+
<i>C. matruchotii</i>	F	-	+	D	D	+	-	-	+	D	+
<i>C. minutissimum</i>	F	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>C. mucifaciens</i>		-	-	-	-	+	+	-	+	-	D
<i>C. propinquum</i>	O	-	D	-	-	D	D	-	-	-	-
<i>C. pseudodiphthericum</i>	O	-	+	+	-	+	D	-	-	-	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	F	-	D	+	-	-	D	T(+)	+	+	D
<i>C. striatum</i>	F	-	+	-	-	+	+	D	+	-	D
<i>C. ulcerans</i>	F	-	-	+	-	-	+	T(+)	+	+	-
<i>C. urealyticum</i>	O	+	-	+	-	+	D	-	-	-	-
<i>C. xerosis</i>	F	-	D	-	-	+	+	-	+	+	+
CDC Grup F-1	F	+	D	+	-	+	-	-	+	+	+
CDC Grup G	F	+	D	-	-	+	+	-	+	D	D

D: Değişken T: Ters CAMP testi

2.5. *Corynebacterium* Türlerini Tanımlamada Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Gram Boyama

Korineform bakterilerin tanımlanmasında Gram boyası önemli bir yere sahiptir. Gram boyanmış görüntüsünde çomak şekilli basiller *Corynebacterium* cinsinin gerçek üyeleri olarak değerlendirilir (2).

Bakteri hücre duvarının boyanmadan, laboratuvarlarda kullanılan ışık mikroskoplarıyla görüntülenmesi zordur. Mikroorganizmalar boyanınca mikroskobik olarak kolay incelenebilmelerinin yanı sıra büyüklük, şekil (kok, çomak, kıvrık vb.), spor, kapsül, bir arada bulunma görüntüleri (küme, zincir, Çin harfleri görünümü vb.) gibi özellikleriyle ilgili de bilgiler edinilebilir. Hatta boyanma özelliklerine göre bazı mikroorganizmalar (örn. mikobakteriler) tanımlanabilir. Ayrıca klinik örneklerin boyanarak direk mikroskobik incelenmesi hastalıkla ilgili bilgiler vermesi açısından oldukça önemlidir. Bakteri ve klinik örneklerin boyanabilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiş olsa da, rutinde en sık kullanılan Gram boyama yöntemidir (92). Bu metodu bulan kişi, Danimarkalı bilim adamı Hans Christian Gram'dır. 1884 yılında pnömoni nedeniyle ölmüş bir kişinin akciğer dokusunu incelerken *Streptococcus pneumoniae* ile *Klebsiella pneumoniae* bakterilerini birbirinden ayırt etmek için Gram boyama yöntemini geliştirmiştir. Birkaç yıl sonra ise Alman patolog Carl Weigert son basamak olan safranin ile zıt boyamayı Gram'ın geliştirdiği prosedüre eklemiştir (93). Günümüze kadar farklı morfolojideki bakterilerde daha başarılı sonuçlar elde etmek için, Hucker modifikasyonu, Karbol fuksin modifikasyonu, Kopeloff modifikasyonu gibi çeşitli modifikasyonlar geliştirilmiştir. Hucker modifikasyonu rutin uygulamada en sık kullanılan yöntemdir. Karbol fuksin modifikasyonu, Hucker modifikasyonundan zıt boya olarak safranin yerine karbol fuksin veya bazik fuksin kullanılmasıyla ayrılır. *Legionella* spp., *Campylobacter* spp., *Brucella* spp. gibi hücre duvarı zayıf boyanabilen bazı bakteriler için kullanımı uygundur. Kopeloff modifikasyonu ise anaerob bakterilerin boyanmasında daha iyi sonuç vermektedir. Gram boyanma özellikleri kültürün tazeliği, kullanılan besiyeri

çeşidi, inkübasyon atmosferi, bakterilerin antibiyotik veya farklı inhibitör maddelere maruziyeti, boyama tekniği gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir (94).

Boyalardan ilk olarak kristal viyole kullanılır ve hücre duvarının mor renge boyanmasını sağlar. İkinci basamakta uygulanan iyodin (lügol) solüsyonu, ilk boyanın hücre duvarına sabitlenmesine yardımcıdır. Üçüncü basamakta %96 etil alkol veya aseton/alkol ile dekolorizasyon sağlanır ve son basamakta safranin veya bazik fuksin/karbol fuksin kullanılarak boyama işlemi tamamlanır (92). Gram pozitif bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka kalın ve ağsı yapısıyla kristal viyole/iyot kompleksini tutma özelliğindedir. Gram negatif bakterilerde ise hücre duvarının ince peptidoglikan tabakası ve lipit yapıdaki dış zarı nedeniyle, Gram pozitif bakteriler gibi boyaları tutamaz. Üçüncü basamakta uygulanan alkol, Gram pozitif bakteri hücre duvarının su kaybedip büzüşmesine neden olur, böylece boya tanecikleri hücre duvar molekülleri arasında sıkışıp kalır. Gram negatif bakterilerde ise alkol dış zardaki lipitleri eritir ve boya partikülleri tutulamaz, böylece hücrenin rengi açılır. Dördüncü basamakta uygulanan safranin veya fuksin boyası ile rengi açılmış hücreler boyanarak görünür hale gelir. Gram pozitifler ilk uygulanan boya ile mor renge boyandıklarından dördüncü basamaktaki boya onların rengini etkilemez, ancak Gram negatif olanlar pembe renge boyanmış olurlar (93).

2.5.2. Biyokimyasal Testler (Katalaz, CAMP, DNaz Testleri)

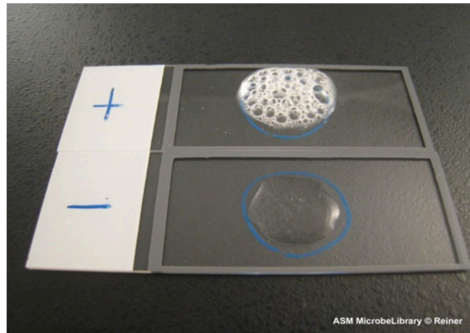
Bakteriler biyokimyasal özellikleri bakımından birbirlerinden çok farklıdırlar. Aynı cins içinde bulunan türler arasında farklılıklar olduğu gibi aynı türe ait bakteriler arasında da farklılıklar görülebilir. Tanımlamada kullanılacak biyokimyasal testlerin doğru sonuç vermesi için öncelikle test edilecek bakteriye ait saf ve taze kültürler hazırlanmalıdır (92).

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlama için pek çok test bulunmaktadır. Bu bölümde laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan katalaz testi, CAMP testi ve DNaz testi olarak üç biyokimyasal test incelenmiştir.

2.5.2.1. Katalaz Testi

Aerob veya fakültatif anaerob bakterilerin çoğunda aerobik solunumun son ürünü olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir. H_2O_2 'nin bakterilerin bulunduğu ortamda birikmesi bakteriler üzerine toksik etki gösterir. Bazı bakteriler bu toksik etkiden korunmak için H_2O_2 'yi oksijen ve suya indirgeyen ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) katalaz enzimi üretirler (95). Test sıklıkla streptokok (katalaz-negatif) ve stafilokokların (katalaz-pozitif) ayrımı için kullanılmaktadır. Ayrıca tüm *Corynebacteriaceae* ailesi ve tüm *Enterobacteriaceae* üyeleri de katalaz pozitiflerdir (96). Bazı anaerob bakterilerde de katalaz enzimi bulunur, ancak normal katalaz testinden farklı olarak H_2O_2 'nin %15'lik çözeltisi kullanılır ve test edilecek bakteri 30 dakika kadar oksijenli ortamda bırakılır. *Neisseria* türlerinde katalaz testi yapılacaksa %30'luk H_2O_2 kullanılmalıdır. Esasında %30'luk reaktif tüm testlerde kullanılabilir ancak laboratuvar güvenliği nedeniyle önerilmez ve test rutin laboratuvarlarda %3'lük H_2O_2 ile yapılır. Test yapılırken dikkat edilmesi gereken noktalardan biri eritrositler de katalaz enzimine sahip olduklarından test edilecek bakteri kolonisi alınırken kanlı agar ile temas ettirmemek gerekliliğidir. Yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceğinden kan içermeyen bir besiyeri kullanımı gerekir. Platin öze hariç diğer özeler H_2O_2 reaksiyona girip yanlış pozitif sonuç verebileceğinden platin öze kullanılmalıdır. Enzim canlı bakteride bulunduğundan test için taze kültürler (18-24 saatlik) tercih edilmelidir. Son önemli nokta ise H_2O_2 kararsız bir madde olup çabuk yıkılabildiğinden, ışığa maruz bırakılmamalı, koyu renkli şişede ve serin yerde muhafaza edilmelidir. Aksi takdirde özelliğini kaybedip yanlış test sonuçlarına neden olabilir (97).

Resim 1. Katalaz testi pozitif ve negatif reaksiyon örnekleri (98)



2.5.2.2. CAMP Testi

1944 yılında Avustralya’da görülen Kızıl salgınında enfeksiyon kaynağı araştırılırken test keşfedilmiştir. Kaynak olarak süttten şüphelenilmiş, bölgede kullanılan sütlerden örnek alınmış ve bu sütlerde hemolitik streptokokların bulunup bulunmadığı incelenmişti. Alınan örneklerin bir kısmında belirgin hemolizleri olan streptokoklar üremiş ancak ana plaklardan yapılan alt pasajlarda hemoliz kaybolmuştu. Dikkatle incelendiğinde örneklerin ekildiği ilk plaklarda *Staphylococcus aureus* kolonileri etrafında streptokok kolonilerinin hemoliz yaptığı görülmüştü. Bu durum Christie, Atkins ve Munch-Petersen adlı bilim adamları tarafından keşfedilmiş olduğundan, test isimlerinin baş harfleri ile ‘‘CAMP testi’’ olarak adlandırılmıştır. Test ilk olarak Grup B streptokokların tanımlanmasında kullanılmıştır (99). Grup B streptokoklar hücre dışı, hemolitik, ısıya dayanıklı protein olan, ‘‘CAMP faktör’’ veya ‘‘protein B’’ olarak adlandırılan, bir protein üretirler (100). CAMP faktörü, *S. aureus* tarafından üretilen β -hemolizin ile etkileşerek besiyeri içeriğindeki koyun eritrositlerinin *S. aureus* tarafından hemolizini artırır ve kan hücrelerinin parçalanması ile gözle görülür şeffaflık oluşur. β -hemolizin (β -toksin, β -lizin veya β -stafilolizin olarak ta adlandırılır) CAMP faktörü varlığında sinerjik etki gösterir ve besiyerinde iki bakterinin birbirlerine yaklaştıkları yerde ok başı şeklinde artmış hemoliz alanı görülür. Hemolitik veya hemolitik olmayan tüm Grup B streptokoklarda bu reaksiyon görülür (101). Ters CAMP testinde stafilokok β -hemolizini tarafından oluşturulan hemoliz bazı mikroorganizmalar (örn. *C. pseudotuberculosis*) tarafından fosfolipaz C veya D üretilmesiyle engellenir. Test edilen mikroorganizmanın stafilokok ile birleştiği yerde hemoliz olmayan bir ok başı görünümü meydana gelir (102). Ters CAMP testi aynı zamanda *Clostridium perfringens*’i diğer *Clostridium* türlerinden ayırmak için kullanılır ve testte *S. aureus* yerine Grup B Streptokok kullanılır. *C. perfringens* tarafından üretilen α -toksin ile Grup B Streptokokların ürettiği CAMP faktörü arasında etkileşim olur ve ters ok başı görüntüsü meydana gelir (103). CAMP (+) olan önemli bir patojen *Listeria monocytogenes* ve *L. seeligeri*’dir. *L. ivanovii* ise *S. aureus* yerine *R. equi* kullanıldığında pozitif CAMP reaksiyonu verir (104). *Bartonella henselae* bakterisinde de CAMP benzeri bir faktör varlığı gösterilmiştir (105).

Testin yapılması için önerilen ideal süre 18-24 saat 37°C’de inkübasyon yapılmasıdır. Uzamış veya kısa inkübasyon süreleri veya artmış inkübasyon sıcaklıkları yanlış pozitif sonuç verebilir. Grup A streptokokların küçük bir kısmı özellikle anaerob koşullarda inkübe edildiklerinde pozitif CAMP reaksiyonu verebildiklerinden test aerobik koşullarda yapılmalıdır (106). Bir diğer önemli nokta *S.aureus* sadece koyun ve sığır eritrositlerini besin olarak kullanıp parçalayabildiğinden test için sadece koyun veya sığır kanlı besiyeri kullanılması uygundur. İnsan, at, tavşan veya farklı hayvan kanları ile hazırlanmış besiyerleri test için uygun değildir (99).

Resim 2. CAMP testi pozitif ve negatif reaksiyon örnekleri (107)



2.5.2.3. Deoksiribonükleaz (DNaz) Testi

DNaz testi, 1956 yılında Weckman ve Catlin tarafından, *S. aureus*'un artan DNaz aktivitesi ile pozitif koagülaz aktivitesi arasında bir korelasyon olduğunu göstermek için kullanılmış ve DNaz aktivitesinin potansiyel olarak patojen stafilokokların tanımlanmasında kullanılabileceği bildirilmiştir (108). Jeffries, Holtman ve Guse bakteriler ve mantarlar tarafından DNaz üretiminin incelenmesi için DNA'yı bir agar besiyeri ile birleştirmişlerdir (109).

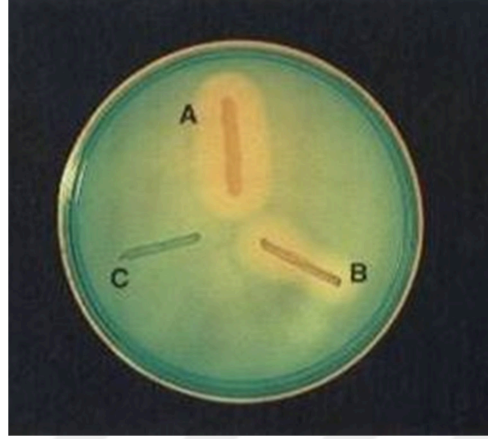
Nükleaz, nükleik asitleri kısmen veya tamamen parçalayan bir enzimdir. Deoksiribonükleaz (DNaz) enzimi, DNA omurgasında fosfat ile şeker molekülleri arasında bulunan fosfodiester bağlarını hidroliz ederek nükleozit ve fosfat açığa çıkarır ve böylece DNA parçalanmış olur. Bakterinin DNaz enzimi varsa, karbon ve enerji

kaynağı olarak kullanmak üzere DNA molekülünü parçalar. DNaz besiyeri mikroorganizmanın DNaz üretme özelliğini saptamak için kullanılan ayırt edici bir besiyeridir. Bu besiyeri DNA dışında, bakteri üremesini kolaylaştıracak besin maddeleri ve bazı besiyerlerinde indikatör bir madde de içermektedir(110).

Günümüzde kullanılan üç çeşit test besiyeri bulunmaktadır. Bunlardan ilki Jeffries tarafından geliştirilen, herhangi bir indikatör içermeyen besiyeridir. Test sonucunun pozitifliğini görmek amacıyla, bakteri ekimi yapılmış DNaz agar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilir, sonra besiyeri yüzeyini kapatacak kadar hidroklorik asit (1N HCl) dökülür ve HCl'nin besiyerinde emilmesi için 5 dakika beklenir. Bakterinin DNaz aktivitesi varsa buna bağlı olarak ekim çizgisi etrafında serbest nükleotitler açığa çıkar ve HCl ile muamele edildiğinde oligonükleotitler asitte çözülür, bakteri kolonileri etrafında berrak bir görüntü oluşur. DNaz aktivitesinin olmadığı besiyerinin bakteri ekilmemiş kısımlarında ise, DNA çözülmez ve polimerize olarak çöker. Bu çökme sonucu besiyeri opak renge dönüşür (109). Bir diğer DNaz besiyeri, 1969'da Smith ve ark. tarafından geliştirilmiş olan, içine indikatör olarak metil yeşili (methyl green) eklenmiş besiyeridir. Besiyerindeki metil yeşili aynı zamanda katyon olarak görev yapar ve negatif yüklü DNA'yı bağlar. Metil yeşili-DNA kompleksi besiyerinin nane yeşili renginde olmasını sağlar. Bakteri DNaz enzimine sahipse, bakteri üremesinin olduğu yerde DNA'nın parçalanmasına bağlı serbest nükleotitler açığa çıkar. Bu nükleotitler metil yeşili ile bağlanamadığından yeşil renk solar, koloni şeffaf renksiz bir zon ile çevrilir (111). Bir diğer kullanılabilir besiyeri, 1969 yılında *Serratia marcescens* bakterisinin DNaz aktivitesini daha kolay saptamak amacıyla, Schreier tarafından geliştirilmiş olan ve indikatör olarak toludin mavisi O'nun kullanıldığı modifikasyondur. Besiyeri rengi DNA-toludin mavisi bileşiminden dolayı berrak mavi renktedir. Test edilecek bakteri besiyerine ekilip 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra, bakteri DNaz enzimi üretiyorsa üreme çevresinde DNA hidrolizi sonucu, toludin mavisinin metakromatik özelliğine bağlı olarak, parlak pembe renk gözlenir. Toludin mavisi O boyası, Gram pozitif bakterilerin üremesini engellediğinden, bu besiyeri Gram pozitiflerin DNaz aktivitesini test etmede kullanılmaz (112). DNaz enzimi düşük sıcaklıklarda daha iyi aktivite gösterir ve test edilecek mikroorganizma düşük sıcaklıklarda üreyebiliyorsa (örn. *Vibrionaceae* ailesi) besiyeri oda sıcaklığında (22°-25°C) inkübe edilmelidir. *S. aureus* ve *S. marcescens* dışında *Streptococcus pyogenes*,

Moraxella catarrhalis, *Bacillus* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio cholerae* ve *T. otitidis* DNaz enzimi taşıyan bakterilere örnektir (110).

Resim 3. DNaz testi pozitif ve negatif reaksiyon örnekleri (113)



A: *S.aureus* (pozitif reaksiyon) B: *S. marcescens*
(pozitif reaksiyon) C: *S. epidermidis* (negatif reaksiyon)

2.5.3. Otomatize Sistemler

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of flight Mass Spectrometry) ve VITEK-2 Compact olarak iki başlık altında incelenmiştir.

2.5.3.1. MALDI-TOF MS

Kütle spektrometresi, birbirinden farklı bileşiklerin kütle/yük oranını analiz etmek için kullanılan analitik bir tekniktir. Çeşitli iyonizasyon ve saptama sistemlerine dayanan farklı teknikler geliştirilmiştir. Biyomoleküllerin analizinde en yaygın kullanılan yöntem Matriks Aracılı Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) olmuştur (114). Esasında kütle spektrometresi mikrobiyoloji alanında kullanıma girmesinden uzun yıllar önce, kimya alanında kullanılmaya başlanmıştır. 1975 yılında, Anhalt ve Fenselau farklı cins ve türlerin bakteri özütlerinin birbirlerinden farklı ve eşsiz kütle spektrumları oluşturduklarını gözlemlediklerinde bu yöntemi bakteri tanımlamada kullanmayı

denemişlerdir (115). İlk kez 1996 yılında, Holland ve ark. tarafından bakteri hücrelerine ait hayali parmak izleri MALDI-TOF ile elde edilmeye başlanmış ve böylece sistem bakteri türlerini tanımlamada kullanıma girmiştir (116).

Çalışma prensibi olarak, örnek materyalinin spesifik bir dalga boyundaki kısa lazer atışlarıyla matriks içinde çözülüp iyonlaşması temeline dayanır (117). Aslında bu sistem, bütünlüğü bozulmamış proteinler gibi uçucu olmayan büyük biyomoleküllerin iyonlaşmasına ve buharlaşmasına izin veren yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir (118). Analitin kütle-yük oranı (m/z), kütle değerine tekabül edecek şekilde çoğunlukla tek yüklü iyonlar ($z=1$) üretir. Her MALDI-TOF kütle spektrometresi üç temel birimden oluşur. İlki, iyonlaşmayı mümkün kılan ve örnek molekül iyonlarını bir gaz fazına aktaran iyon kaynağıdır. İkinci birim, m/z 'ye göre iyon ayrılmasına izin veren kütle analiz edicidir. Son birim, ayrılmış iyonları izlemek için bir algılama aygıtıdır. Numuneler analitin, lazer cihazı tarafından kullanılan dalga boyu aralığında kuvvetli bir optik absorpsiyona sahip küçük asit moleküllerinden yapılmış bir matrikste karıştırılmasıyla hazırlanır; 2.5 dihidroksibenzoik asit (DHB) ve α -siyano-4 hidroksisinnamik asit (CHCA), düşük kütle iyonlarının saptanması için en uygun matrikslerdir. Numunenin ve matriksin birlikte kristalleşmesinden sonra, numune-matriks karışımı lazerden gelen enerjiyi absorbe eder ve gaz fazındaki analitlerin dezorpsiyon ve iyonlaşmasına yol açar. Daha sonra iyonlar, dedektöre ulaşana kadar yüksek vakum uçuşu tüpüne bir elektrostatik alan (yaklaşık 20 kV potansiyel tarafından yaratılan) vasıtasıyla hızlandırılır; küçük iyonlar büyük olanlardan daha hızlı ilerler. Bu nedenle, dedektöre ulaşmak için gereken uçuş zamanı biyoanalitin kütesine ve yüküne bağlı olarak belirli bir türe özgü spektral bir profilden, genelde 2 ila 20 kDa arasında değişen zirvelerden (peak) oluşur (119). MALDI işlemi sırasında iyonize edilen proteinler arasında yapısal proteinler, DNA veya RNA bağlayıcı proteinler, ribozom modülasyon faktörleri, karbon depolama düzenleyicileri ve soğuk şok proteinleri bulunur. Bu biyolojik belirteçler mikroorganizmalar arasında değişen ve cins, tür ve alt türe özgü zirvelere sahip spektral parmak izleri üretir. Mikroorganizmaların tanımlanması için protein kütle paternleri, bakteri ve maya izolatlarının türlere özgü parmak izlerini içeren referans veri tabanları ile birkaç dakika içinde karşılaştırılır. Bir model uydurma prosedürü aracılığıyla deneysel spektrumdaki yığın zirveleri, veri

tabanında bulunan referans spektrumlarla eşleştirilir. Bu kıyaslamaya göre elde edilen skor değerleri cihaz imalatçısı tarafından tanımlanan eşik değer aralığında olduğunda, mikroorganizmaların tür seviyesinde doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanmasına izin veren sayısal bir değer üretilir (119). Tanımlama süreci, numune spektrometre ile analiz edilir edilmez gerçek zamanlı olarak gerçekleştirilir (120). Uzun yıllardır kullanılmakta olan konvansiyonel yöntemler ve yüksek maliyetli moleküler tanımlama metotları yanında MALDI-TOF MS kolay uygulanabilen, hızlı, güvenilir ve maliyet etkin bir tanımlama yöntemi olarak rutin laboratuvarlarda oldukça yaygın kullanılan bir sistem haline gelmiştir (121).

2.5.3.2. VITEK 2 Compact

VITEK 2, Vitek Sistem'in geliştirilmesiyle oluşturulmuş, üreme bazı teknolojiyle çalışan tam otomatize bir mikrobiyolojik tanımlama sistemidir. Genişletilmiş kapasite ve otomasyon olarak birbirinden farklı üç formatta bulunur; VITEK 2 Compact, VITEK 2 ve VITEK 2 XL. Her üç sistem de aynı kalorimetrik kartları kullanacak şekilde tasarlanmıştır (122). Bu sistem çeşitli mikrobiyal tanımlama kartlarında bulunan biyokimyasal reaksiyonlar sonucu üretilen optik bir sinyali değerlendirme üzerine kurulmuştur. Bilinmeyen mikroorganizmanın standart süspansiyonu cihaz içine yüklendikten sonra, cihaz içinde kart inkübe edilir ve cihazın içindeki optik okuyucu tarafından okunur. VITEK 2 veri tabanındaki sonuçların bilinen türlere özgü reaksiyonlarla karşılaştırılması ile de mikroorganizma tanımlanır (123). VITEK 2 Compact tanımlama sisteminde, Gram negatif bakteriler (VITEK 2 GN ID Kart), Gram pozitif bakteriler (VITEK 2 GP ID Kart), mayalar (VITEK 2 YST ID Kart), *Bacillus/Brucella* (VITEK 2 BCL ID Kart), *Neisseria/Heamophilus* (VITEK 2 NH ID Kart) ve anaerop/*Corynebacterium* (VITEK 2 ANC ID Kart) için olmak üzere altı farklı tanımlama kartı bulunmaktadır. Antibiyogram kartı olarak ise Gram negatif bakteriler (enterik–enterik olmayan), Gram pozitif bakteriler (stafilokok, streptokok&enterokok, pnömokok) ve mayalar için farklı kartlar kullanılmaktadır (124). Reaktif kartları, her biri ayrı test substratı içeren altmış dört kuyucuğa sahiptir. Substratlar asidifikasyon, alkalinizasyon, enzim

hidrolizi ve inhibitör maddeler varlığında üreme gibi çeşitli metabolik aktiviteleri ölçerler. Kartın her iki yanında bulunan şeffaf optik bir film, organizma substrat karışımı ile teması önleyen sızdırmaz kapillerleri içerirken uygun seviyedeki oksijenin geçişine izin verir. Kartlar üzerinde ürün tipi, lot numarası ve son kullanma tarihini içeren bilgiler yer alır. Kart içinde test edilen biyokimyasal reaksiyonlar gliserol, D-galaktoz, D-maltoz, D-rafinoz, D-mannoz, D-sorbitol gibi yirmi adet karbonhidrat testi ile; nitrojen kaynağı kullanımı ve enzimatik testler; N-asetil-glukozamin, lösin-arilamidaz, gama-glutamyl-transferaz, α -glukozidaz, üreaz şeklinde enzimatik testleri de içermektedir (122). Cihaz hazırlanmış kültür süspansiyonunu otomatik olarak tüp içinden alır ve inkübe eder. 35.5°C'de 18 saat inkübe edilen kartlar, her 15 dakikada bir optik olarak okunur (125). Bu okumalara dayanarak, bir tanımlama profili oluşturulur ve belirli bir algoritmaya göre yorumlanır. Nihai profil sonuçları veri tabanı ile karşılaştırılarak bilinmeyen organizmanın tanımlanması sağlanır. Tanımlama profili oluşturulması ve yorumlanması ise şu şekilde gerçekleşir; kartın optik olarak okunduğu ilk an ile sonraki okumalardaki ışık yansımaları oranlanır ve yüzde değişimi elde edilir. Her kuyucuk, yani her test için bu değişim oranı, o test için belirlenmiş eşik değeri ile karşılaştırılarak test pozitif veya negatif olarak değerlendirilir. Yüzde değişim oranı; eşik değerden küçük ise test negatif, eşik değere eşit veya eşik değerden büyükse test pozitif olarak okunur. Pozitif veya negatif sonuçlar biyolojik bir sayıya çevrilir. Mikroorganizmanın adlandırılması ise, test edilen kimyasal maddelerin cihaz veri tabanında bulunan biyolojik sayıya yaklaşıma olasılığına çevrilmesi ile gerçekleşir (124). Tanımlanan mikroorganizma türü ve antibiyotik duyarlılık paternine göre 4-18 saat içerisinde cihaz tarafından sonuç verilmektedir(124).

Vitek cihazındaki antimikrobiyal duyarlılık testleri sıvı dilüsyon temeline dayanmaktadır ve seri dilüsyonların oluşturulması işlemi de cihaz tarafından otomatik olarak yapılmaktadır. Hazırlanmış olan bakteri süspansiyonu, kapillerler yoluyla kuyucuklara geçer ve kuyucuklardaki antimikrobiyal ajanlar ile birleşir. Kuyucuklarda üreyen bakterilerin bulanıklık oluşturması, türbidometrik şekilde ölçülür. Üremenin normalleştirilmiş lineer regresyon analizi, doğrudan veya niteliksel olarak yorumlanabilen bilgisayar algoritması ile MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değeri belirlenir (125). Bu sistemle ilaç kuyucuklarındaki çeşitli

konsantrasyonlarda olan üreme, kontrol kuyucuğundaki üreme ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Sonuçlar duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olarak raporlanır (123).

2.5.4. Moleküler Yöntemler; 16S rRNA Gen Dizi Analizi

1970'li yıllarda Carl R. Woese ve ark. prokaryot canlıların filogenetik yapılarını, 16S rRNA geni kullanarak araştırmışlardır (126). Bu yöntem ortamlardan veya klinik örneklerden izole edilen bakterileri tanımlamak ve bakteriler arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (127).

rRNA ribozomlarda protein sentezinde görev yapan bir RNA tipidir ve toplam hücre RNA'nın %70'ini oluşturur. Ribozomlar prokaryot ve ökaryot canlılarda 50S (büyük alt birim) ve 30S (küçük alt birim) olarak iki alt birimden oluşur. 5S ve 23S rRNA'lar ribozomun 50S alt biriminde, 16S rRNA ise ribozomun küçük alt biriminde bulunur. Buradaki 'S' kavramı, molekülün büyüklüğüne göre yüksek devirli santrifüjdeki çökme hızını ifade eden 'Svedberg' birimini temsil etmektedir. 16S rRNA, 1500-1800 nükleotit uzunluğundadır ve bakteri hücresinden kolayca izole edilebilir. Aynı zamanda tüm bakteri hücrelerinde aynı yapısal ve fonksiyonel görevlere sahiptir. Evrim sürecinde ribozomal RNA'nın küçük alt birimi yüksek oranda korunmuştur çünkü bu bölgede meydana gelen mutasyonlar genellikle ölümcül olup, mutasyon görülen mikroorganizmaların hayatta kalamamıştır (128). 16S rRNA gen bölgesinin korunaklı gen bölgeleri yanında, tür için spesifik olan gen bölgelerini de barındırması bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmalarına imkan sağlamaktadır (129). Ayrıca nükleotit sayısı çok fazla olmadığından 16S rRNA hızlı ve ekonomik şekilde kopyalanabilmekte; dizi analizi yapılabilmektedir (130). Aynı türe ait izolatlarda sıklıkla %97'nin üzerinde 16S rRNA dizi benzerliği görülmektedir (131). Ancak 16S rRNA, yavaş evrimleşme süreci nedeniyle yakın türler arasındaki ilişkiyi belirlemede yetersiz kalmaktadır. Örneğin %99 seviyelerinde dizi benzerliği bulunan türler arasında, uzak akrabalara göre daha sık dizi hatalarına rastlanmaktadır. DNA-DNA hibridizasyon teknikleri bu durumlarda daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Özetle 16S rRNA gen dizi analizi yöntemiyle yapılan sınıflandırma, fenotipik sınıflandırmadan daha objektif ve güvenilir bir sınıflandırma olsa da, tek başına %100 kesin sonuç elde ettirmemektedir (132).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışma Ağustos 2015 – Ocak 2017 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Belirtilen tarihler arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş kan ve kateter kültürü örnekleri incelenmiştir. Bu örneklerden korineform bakteri üremesi tespit edilen örneklerin tanımlama işlemleri MALDI-TOF MS ve VITEK 2 Compact otomatize sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sistemlerle *T. otitidis* veya *C. mucifaciens* olarak belirlenen 46 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Daha sonra tür ayrımı için konvansiyonel yöntemlerle ek testler yapılmış ve 16S rRNA gen dizi analizi ile tür tanımlamaları doğrulanmıştır. Bunlara ek olarak tüm izolatların antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır.

3.2. Kan Kültürü Örneklerinin Alınması

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde kan kültürü alınırken kan alınacak bölge %70'lik etil veya isopropil alkol ile temizlenmekte ve kuruduktan sonra %1-2 iyodin solüsyonu ile silinmektedir. Silme işlemi 5 cm'lik bir alanda merkezden periferine doğru daireler çizilerek yapılmaktadır. Kan kültür şişelerinin üzerindeki lastik tıpa steril olmadığından, örnek şişeye aktarılmadan önce tıpa üzerindeki plastik kapak açılıp %70'lik alkol ile temizlenmektedir. Örnek şişeye aktarıldıktan sonra lastik tıpa tekrar %70'lik alkol ile silinmekte ve şişe birkaç kez alt üst edildikten sonra laboratuvara iki saat içerisinde ulaştırılmaktadır.

3.3. Kan Kültürü Şişelerinin İşlenmesi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan ve kateter kültürü örnekleri, BacT/Alert 3D otomatize kan kültür cihazına yüklenmiştir. Kan kültürü şişeleri pozitif sinyal verene kadar 7 günlük süre

boyunca cihaz içinde inkübe edilmiştir. Pozitif sinyal vermeyen şişeler 7 gün sonunda cihazdan çıkarılmıştır. İnkübasyon süresi içinde pozitif sinyal veren kan kültür şişeleri işleme alınmıştır. Örnekten Gram boyama yapıldıktan sonra %5 koyun kanlı agar (Salubris, İstanbul), çikolata agar (Salubris, İstanbul) ve MacConkey agara (Salubris, İstanbul) ekim yapılmıştır. 18-24 saat inkübasyon süresinin ardından üreyen koloniler Gram boyası ile değerlendirildikten sonra otomatize sistemlerle (MALDI-TOF MS ve VITEK 2 Compact; bioMérieux, Fransa) tanımlanmıştır. Ek olarak katalaz testi, DNaz testi, CAMP testi olmak üzere konvansiyonel yöntemler de uygulanmıştır.

3.4. Kan ve Katater Kültürlerinin Değerlendirilmesi

3.4.1. Pozitif Sinyal Veren Şişelerden Gram Boyama

Pozitif sinyal veren kan kültür şişesinden, temiz bir lam üzerine 1-2 damla materyal damlatıldı. Damla düzgün ve ince bir tabaka elde edilecek şekilde yayıldı ve havada kurumaya bırakıldı. Preparat kuruduktan sonra bir pens yardımıyla bir ucundan tutulup, bek alevinden 3 kez geçirilerek tespit edildikten sonra boya standına yerleştirildi. İlk önce üzerine kristal viyole damlatılarak 1-2 dakika beklenildi. Su ile hafifçe yıkanarak boyanın fazlası akıtıldı. Lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletildi ve su ile yıkama işlemi yapıldı. Sonraki aşamada preparat üzerine %95'lik etil alkol damlatılarak 15-20 saniye bekletildi. Lam tekrar sudan geçirildikten sonra sulu fuksin çözeltisi ile 30 saniye boyandı. Su ile iyice yıkanıp, kurutma kağıdı ile hafifçe suyu alınarak kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektif altında ışık mikroskobunda incelendi.

3.4.2. Kan Kültürü Şişelerinin Ekimi ve Değerlendirilmesi

Pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden, %5 koyun kanlı agar, çikolata agar ve MacConkey besiyerlerine birkaç damla örnek damlatıldıktan sonra tek koloni ekim yöntemi gerçekleştirildi. Ekim yapılan besiyeri plakları %5 CO₂'li etüvde (HERAcell 240 CO₂ Incubator, Kendro, Almanya), 37°C 'de 18-24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda üreme saptanan plaklarda, farklı morfoloji gösteren her koloniden Gram boyama gerçekleştirildi.

Üreme saptanan plaklardaki bakterilerin Gram boyanarak incelenmesi sonucunda dallanmayan ve sporsuz Gram pozitif basiller görülmesi üzerine ilk olarak katalaz testi yapıldı. Bakterinin taze kültüründen alınan bir koloni temiz bir lam üzerine koyuldu. Üzerine bir damla katalaz solüsyonu aktarıldı. Hava kabarcıklarının görülmesi üzerine katalaz testi pozitif olarak yorumlandı. Gram boyalı görüntüleri ve katalaz pozitifliği ile *Corynebacterium* cinsine ait olduğu düşünülen bakteriler, rutin laboratuvarında tanımlama amaçlı kullanılan otomatize sistemler ile çalışıldı.

3.5. MALDI-TOF MS ile Tanımlama

Bakterinin 18-24 saatlik koyun kanlı besiyerinde üremiş taze kültürü MALDI-TOF MS (Vitek MS, bioMérieux, Fransa) cihazında tanımlanmak için işleme alındı. 1 µL'lik steril plastik öze (Ansa/Microloop, Biosigma) ile tek koloni bakteriden alınarak her kuyucuğa bir bakteri izolatu denkle gelecek şekilde tek kullanımlık metal slaytlara ince bir tabaka halinde sürüldü. Sürülen bakteri üzerine 1 µL CHCA (α -siyano-4-hidroksisinnamik asit) matriksinden damlatıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra metal slaytlar MALDI-TOF MS cihazına yüklendi. Yaklaşık 40 dakika içinde tanımlama sonuçları cihaza ait bilgisayar ekranından görüntülendi.

3.6. VITEK 2 Compact ile Tanımlama

18-24 saatlik, %5 koyun kanlı agardaki saf kültürden steril eküvyonla birkaç koloni alınarak, içinde 3.0 mL steril salin (%0.45 NaCl, pH:5.0-7.2) bulunan 12x75 mm'lik şeffaf polistren test tüpleri içine konuldu. Vorteks (Vortex V-1 plus, BioSan, Letonya) yardımıyla homojen bir karışım oluşturuldu. Spektrofotometrik olarak 0.50-0.63 McFarland olacak şekilde, Vitek McFarland cihazında (DensiChek plus, bioMérieux, Fransa) bulanıklık ayarı yapıldı. Mikroorganizma süspansiyonunu içeren test tüpü cihazın özel kaseti içine konuldu. Tanımlama kartı olan Vitek 2 ANC kartın transfer tüpü süspansiyon tüpü içine koyularak ve kart, test tüpüne komşu olacak şekilde kaset içindeki yerine yerleştirildi. Doldurulan kaset, barkotları okutulduktan sonra Vitek

2 Compact (bioMérieux, Fransa) cihazı içine yerleştirildi. 18 saat inkübasyon sonrası sonuçlar cihaz bilgisayarından kontrol edildi.

3.7. İzolatlar İçin Yapılan Konvansiyonel Ek Testler

3.7.1 CAMP Testi

İzolatların Vitek 2 Compact tanımlama sonuçları alındıktan sonra ek olarak CAMP ve DNaz testleri yapıldı. *S. aureus* β -lizin üreten suşu (*S. aureus* 25923) %5 koyun kanlı agar besiyerinin ortasına kalın bir çizgi şeklinde boydan boya sürüldü. Bu ekim çizgisine dik doğrultuda ancak stafilokok ekim çizgisine dokundurmadan (yaklaşık 2 mm kala) test edilecek bakteri 2-3 cm uzunluğunda besiyeri plağına sürüldü. Pozitif kontrol için *S. agalactia* (ATCC 13813) test edilecek bakteri gibi stafilokok ekim çizgisine değdirilmeden besiyerine sürüldü. 18-24 saat, 37°C’de inkübasyon sonrası, *S. aureus* ile kontrol bakterisi veya test edilen bakteri arasında ok başı şeklinde artmış hemoliz alanı görülmesi testin pozitif olduğu şeklinde yorumlandı. Bu ok başı görüntüsünün olmaması durumunda ise test negatif olarak değerlendirildi.

3.7.2. DNaz Testi

- Deoksiribonükleaz (DNaz) test agar (Difco, BD, ABD) tozu kullanıldı.

Besiyerinin bir litre saf suda yaklaşık içeriği:

- Pankreatik kazein dijesti..... 10 g
- Proteoz pepton no 3..... 10 g
- Deoksiribonükleik asit..... 2.0 g
- Sodyum klorit..... 5.0 g
- Agar 15 g
- Metil Yeşili..... 0.05 g

(pH 7.3 \pm 0.2)

Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 42 g tartılıp 1000 ml distile su içinde karıştırıldı. Isıtıldı ve tozun tamamen çözülmesi için 1 dakika kaynatıldı. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 45-50°C’ye kadar

soğutulduktan sonra, 60 mm çapındaki petrilere yaklaşık 4 mm kalınlığında döküldü. Besiyeri donduktan sonra mikroorganizmaların test edilmesi amacıyla kullanıldı.

Steril öze yardımıyla, 18-24 saatlik kültürden birkaç koloni alınarak DNaz besiyerine 2-2.5 cm uzunlukta kalın bir çizgi şeklinde sürüldü. Arada 1-2 cm boşluk bırakarak, test edilen bakteriye paralel şekilde DNaz pozitif olduğu bilinen kontrol izolatu (*S. aureus* ATCC 25923 suşu) kalın çizgi şeklinde sürüldü. 24-48 saat, 37°C’de inkübasyon sonrası değerlendirildi. Besiyerinin yeşil renginin bakteri kolonisi etrafında şeffaf renge dönüşmesi durumunda test pozitif, koloni etrafında yeşil rengin solmamış olması durumunda test negatif olarak değerlendirildi. Çalışma izolatlarının tür düzeyinde ayrımı için uygulanan konvansiyonel testler ve bakterilerin fenotipik özellikler Tablo 3’te özetlenmiştir.

Tablo 3. *T. otitidis*, *C. mucifaciens*, *C. afermentans* bakterilerinin tür düzeyinde ayrımı için uygulanan testler ve fenotipik özellikleri

Bakteri Adı	DNaz Testi	CAMP Testi	Katalaz Testi	Lipoflite	Gikozdan Asit Üretimi	Koloni Yapısı	Gram Boyanma Özelliği
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>	-	D*	+	-	-	Opak, gri-beyaz, büyük (1-2 mm) koloniler	Kısa, ‘V’ şeklinde görünen Gram pozitif basiller
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>lipophilum</i>	-	D*	+	+ **	-	Camsı, gri, küçük (<0.5 mm) koloniler	Kısa, ‘V’ şeklinde görünen Gram pozitif basiller
<i>C. mucifaciens</i>	-	-	+	-	+	Parlak, açık sarı, mukoid koloniler	Kokoid veya çomak şekilli Gram pozitif basiller
<i>T. otitidis</i>	+	+	+	-	-	Konveks, yuvarlak, krem rengi koloniler	Uzun, dallanmayan, düzensiz Görünümlü Gram pozitif basiller

*D: Değişken, **: %5 Koyun kanlı agar, %1’lik Tween 80 eklendiğinde koloniler beyaz renge dönmekte ve koloni büyüklüğü artmaktadır.

3.8.1. İzolatların Moleküler Olarak Tanımlanması

3.8.1. DNA İzolasyonu (Ekstraksiyon)

Besiyerinde saf kültür halinde üreyen izolatlar steril öze ile alınarak, 1 ml steril distile su içerisinde 4 Mcfarland bulanıklığında süspanse edildi. Her bir örnek en az 5 dakika vorteksenerek homojen hale getirildi. Daha sonra Qiasymphony (Qiagen, Almanya) total nükleik asit izolasyon kiti ile bakteriyel DNA ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen DNA örnekleri -20°C'de PCR işlemine kadar saklandı.

3.8.2. 16S rDNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

16S rRNA'yı kodlayan gen bölgesi 16S rDNA'dır. 16S rDNA bölgesinin sekansı için öncelikle yaklaşık 800 baz çiftlik 16S rDNA bölgesi her iki yönde; GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems/ ABD) thermal cycler cihazı kullanılarak çoğaltıldı. Bu amaçla spesifik p8FPL 5' AGT TTG ATC ATG GCT CAG-3' ve p806R 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3' primerleri kullanıldı.

Amplifikasyon koşulları;

- I. 94°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyonu takiben,
 - II. 94°C/30sn denatürasyon
 - III. 60°C/30sn bağlanma ve
 - IV. 72°C/1 dk uzama ve
 - V. final uzama olarak 72°C'de 10 dakika olacak şekilde uygulandı.
- } 35 siklus olarak

PZR için kullanılan solüsyonlar ve amplifikasyon şartları aşağıda belirtilmiştir:

Tablo 4. TopTaq (Qiagen) PZR reaksiyon karışımının hazırlanması

Karışım	Miktar
2X TopTaq Master Mix karışımı	12.5 µl
10X CoralLoad Concentrate	2.5 µl
p8FPL	1 µl
p806R	1 µl
DNAaz RNAaz free saf su	7 µl
DNA	1 µl
Toplam hacim	25 µl

3.8.2. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde, TAE (Tris-asetat-EDTA [Etilendiamin tetraasetik asit]) tampon kullanılarak elektroforezi yapıldı. Elektroforez işlemi sonrası jel üzerindeki DNA bantları UV transilluminator ile görüntülendi. DNA moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 800 baz çifti büyüklüğündeki bantlar, jel üzerinden QIAquick Gel Extraction Kiti (Hilden, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırıldı. Jelden saflaştırılan PZR ürünleri sekans reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmak üzere çalışılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.8.4. DNA Dizi Analizi İçin Sekans Reaksiyonu (Cycle Sequencing)

ABI Prism BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, ABD) kiti kullanılarak, her iki yönde 96°C/10sn, 50°C/5sn ve 60°C/6dk olarak toplam 35 siklus dideoksinükleotit dizileme işlemi gerçekleştirildi (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD).

Tablo 5. Sekans (cycle sequencing) reaksiyon karışımının hazırlanması

Karışım	Miktar
ABI Prism BigDye	4 µl
5X Tampon	2 µl
Primer (p8FPL ve p806R)	0.32 µl (3,2 pmol)
DNAaz RNAaz free saf su	11.68 µl
DNA	2 µl
Toplam hacim	20 µl

3.8.5. Sekans Reaksiyonu Ürünlerinin Presipitasyonu

Floresan boyalı dideoksi terminatör nükleotidler ile işaretlenmiş ampikonlar, dizileme işleminden önce 5M NaAc (Sodyum asetat) ve etanol kullanılarak presipite edildi. Bu amaçla 20 µl'lik sekans reaksiyonu ürünlerinin üzerine 2,12 µl 3M NaAc (pH 4.6), 2,12 µl 0,1M Na₂EDTA (EDTA disodium salt) ve 4,77 µl su karışımı ve son olarak da 61 µl %100 soğuk etanol eklendi ve buz üzerinde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Karışım -20°C'de 13.000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı pipet ile çekildi. Tüm sıvı dışarı atıldıktan sonra, 200µl %70'lik taze hazırlanan soğuk etanol ile 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi iki kez tekrar edildi. Daha sonra tüm alkol dökülerek tüpler kurumaya bırakıldı. Tüpler tamamen kuruduktan sonra, DNA pelletleri üzerine 30 µl formamid (Applied Biosystems, ABD) eklendi. Formamid içinde çözülmüş durumdaki DNA'nın dizileme öncesi sekonder yapılarının açılması ve denatüre olmalarının sağlanması için tüpler 95°C'de 5 dakika kuru ısı bloğunda tutuldu ve daha sonra buz üstüne alınan tüpler -20°C'de 1-2 dakika bekletildi.

3.8.6. Dizileme

Denatürasyon işleminin ardından örnekler ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, ABD) cihazına yüklendi. Elektroforez için 47 cm'lik kapiller ve her örnek için 1–2 µl POP-6 (Performance Optimized Polymer–6, Applied Biosystems, ABD) kullanıldı. Denatüre edilen örnekler 30 saniye boyunca, 1,5 kV potansiyel farkı

altında 1 μ A akım ile kapillere yüklendi. Elektroforez koşulları 40 dakika boyunca 15 kV potansiyel farkı ve 7 μ A akım olacak şekilde uygulandı. Dizi analizleri için ABI Prism 310 Data Collection Software yazılımı tarafından oluşturulan kromatogram dosyaları kullanıldı.

3.8.7. Sonuçların Analizi

Dizileme sonuçlarını içeren kromatogram dosyaları FinchTV v1.3.1 yazılımına (GeoSpiza Inc., ABD) aktarılarak, diziler üzerinde gerekli görülen düzeltmeler yapıldı. Elde edilen DNA dizileri NCBI’da (National Centre for Biotechnology Information) yer alan Gen Bankası ve BLAST (Basic Local Alignment Tool) sunucusu kullanılarak veri bankasında kayıtlı diğer izolatlar ile karşılaştırıldı. Dizilerin tür düzeyinde identifikasyonlarında yüksek oranda doğruluğundan emin olmak için; E-değeri 0.0 ve maksimum benzerlik oranları %99’un üzerinde olan veriler identifikasyonda kullanıldı. Toplamda yaklaşık 1200 nükleotidin analizi yapıldı ve elde edilen sonuçlar kaydedildi.

3.9. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Çalışma kapsamındaki izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla gradyan şerit yöntemi (E-test, bioMérieux, Fransa) kullanıldı. E-test; MİK (minimum inhibitör konsantrasyon; bir mikroorganizmanın üremesini engelleyen en düşük ilaç konsantrasyonu) yöntemine bağlı olarak antibiyotiklerin duyarlılık testini yapabilen, bir tarafında antibiyotiğin μ g/mL olarak düzenlenmiş 15 ve katları olarak artan dilüsyonları bulunan, 5x57 mm boyutunda striplerdir. Gradyan şerit yöntemi katı besiyerinde difüzyon yoluyla kantitatif sonuç verir. Elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği nokta MİK değeridir. Otomatize sistemlerdeki gibi fazla teknik alt yapıya ve özel yetiştirilmiş personele ihtiyaç duymadan kolay uygulanabilen ve güvenilir sonuçlar elde ettiren bir yöntemdir. Çalışmada CLSI’nın (Clinical and Laboratory Standards Institute) *Corynebacterium* türleri için test edilmesini önerdiği antibiyotiklerden klindamisin, eritromisin, vankomisin, daptomisin, penisilin, trimetoprim sulfometoksazol (TMP-SMX) antibiyotiklerinin duyarlılık profilleri incelendi. CLSI M45-A2 (Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility

testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-second edition) kılavuzunda yer alan, çalışmamızda test edilen antibiyotikler için önerilen direnç sınır değerleri Tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6. *Corynebacterium* spp. CLSI kılavuzunda belirtilen direnç sınır değerleri (133)

Antibiyotik	MİK (µg/mL)		
	Duyarlı (S)	Orta Duyarlı (I)	Dirençli (R)
Penisilin	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Vankomisin	≤ 2	– *	– *
Daptomisin	≤ 1	– *	– *
Eritromisin	≤ 0.5	1	≥ 2
Klindamisin	≤ 0.5	1-2	≥ 4
TMP-SMX	≤ 2/38	–	≥ 4/76

*: ‘‘Duyarlı’’ dışındaki sonuçlar beklenen dışı profildir, tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri tekrar edilmelidir. Sonuç aynıysa izolat referans bir laboratuvara gönderilmelidir.

‘‘bioMérieux E-test uygulama rehberi’’nde *Corynebacterium* türleriyle ilgili bölümdeki öneriler dikkate alınarak duyarlılık testleri yapıldı. E-test gradyent şeritleri -20°C derin dondurucudan (Vestel, Türkiye) çıkarılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklendi. Test edilecek bakteri, 18-24 saat inkübe edilmiş koyun kanlı agar plağından steril eküvyonla birkaç koloni alınarak, Mueller Hinton broth içinde vorteks yardımıyla homojenize edildikten sonra densitometre cihazıyla (Den-1 McFarland Dansitometer, BioSan, Letonya) 1 McFarland yoğunluğa getirildi. %5 koyun kanlı Mueller Hinton agar (MHA) (Salubris, İstanbul) yüzeyine başka bir steril eküvyon kullanılarak yayıldı. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra besiyeri üzerine E-test şeritleri yerleştirildi. Plaklar 18-24 saat süreyle 37°C’de, %5 CO₂’li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elips şeklindeki inhibisyon bölgesiyle E-test şeridinin kesiştiği bölgedeki değer, MİK değeri olarak kabul edildi. MİK değerleri CLSI kılavuzunda belirtilen direnç sınır değerlerine göre duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olarak değerlendirilip; izolatların duyarlılık profilleri belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Örnek Türleri ve İzolatların Özellikleri

Ağustos 2015 – Ocak 2017 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına hastanenin çeşitli servislerinden gönderilen kan ve kateter kültürü örnekleri değerlendirilmiştir.

20'si erkek, 26'sı kadın hastadan gelen 13 kateter kültürü, 33 kan kültürü örneği değerlendirilmiştir. Servislere göre bakılacak olursa; 14 örnek yoğun bakım servislerinden, 10 örnek acil servislerden, 22 örnek ise diğer servislerden gönderilmiştir. Yaş aralığı 7 ile 83 yaş arasında değerlendirilmiş olup, 15 yaş altı 3 hasta örneği çalışmaya dahil edilmişken, 60 yaş üzeri 25 hasta izolatı çalışılmıştır. Her hastadan bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Olgulara ait klinik bulgular Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Olgulara ait klinik bulgular

Olgu	Yaş	Cinsiyet	Servis	Örnek Türü
1	84	Kadın	Dahiliye Servisi	Kateter
2	88	Erkek	Dahiliye Servisi	Kan
3	74	Kadın	Dahiliye Servisi	Kateter
4	45	Kadın	Nöroloji Y.B. ^a Servisi	Kateter
5	55	Kadın	K.V.C. ^b Servisi	Kan
6	81	Erkek	K.V.C. Y.B. Servisi	Kan
7	64	Kadın	Nöroloji Y.B. Servisi	Kan
8	34	Kadın	Dahiliye Servisi	Kan
8	34	Kadın	Dahiliye Servisi	Kan
9	36	Erkek	Dahiliye Y.B. Servisi	Kateter
10	89	Kadın	Dahiliye Servisi	Kan
11	64	Erkek	Onkoloji Servisi	Kateter
12	51	Kadın	Onkoloji Servisi	Kan
13	52	Kadın	Kadın Hast. ve Doğum S.	Kateter
14	71	Kadın	Acil Servis	Kan
15	76	Kadın	Kardiyoloji Y.B. Servisi	Kateter
16	27	Erkek	Dahiliye Y.B. Servisi	Kan
17	63	Erkek	G.Cerrahi ^c Y.B. Servisi	Kan
18	51	Kadın	G. Cerrahi Y.B. Servisi	Kan
19	80	Erkek	Dahiliye Y.B. Servisi	Kan
20	25	Erkek	Dahiliye Y.B. Servisi	Kateter
21	48	Erkek	Nöroloji Y.B. Servisi	Kan
22	33	Kadın	Dahiliye Y.B. Servisi	Kateter
23	68	Kadın	Acil Servis	Kan
24	78	Erkek	Acil Servis	Kan
25	69	Erkek	K.V.C. Servisi	Kan
26	78	Erkek	Acil Servis	Kan
27	82	Kadın	Dahiliye Y.B. Servisi	Kan
28	51	Erkek	Acil Servis	Kateter
29	51	Kadın	Nöroloji Servisi	Kan
30	66	Kadın	Onkoloji Servisi	Kan
31	42	Kadın	Acil Servis	Kan
32	58	Kadın	Dahiliye Y.B. Servisi	Kan
33	68	Erkek	Dahiliye Servisi	Kan
34	8	Erkek	Onkoloji Servisi	Kan
35	24	Erkek	Anestezi Y.B. Servisi	Kateter
36	57	Kadın	K.B.B. Servisi	Kan
37	66	Kadın	Onkoloji Servisi	Kan
38	73	Erkek	Beyin Cerrahi Servisi	Kan
39	14	Erkek	Çocuk Acil Servisi	Kateter
40	75	Erkek	Kardiyoloji Servisi	Kan
41	25	Kadın	Dahiliye Servisi	Kan
42	65	Kadın	Acil Servis	Kateter
43	83	Kadın	Acil Servis	Kan
44	64	Erkek	K.B.B. Servisi	Kan
45	83	Kadın	Acil Servis	Kan
46	7	Erkek	Ortopedi Servisi	Kan

^a :Yoğun Bakım ^b : Kalp Damar Cerrahisi^c : Genel Cerrahi

4.2. İzolatların Tanımlanması

Üreme saptanan kan kültürü şişeleri değerlendirilirken çalışma kapsamına alınan 46 adet *T. otitidis* ve *C. mucifaciens* izolatının tanımlaması şu şekilde yapılmıştır: pozitiflik veren kan kültür şişesinden yapılan Gram boyamada tekli, birbirine paralel çizgiler şeklinde veya “V” şeklinde çiftler halinde Gram pozitif basiller görülmüştür. Pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden yapılan pasajlar %5 CO₂'li ortamda, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. %5 koyun kanlı agar ve çikolata agarda bakteri üremesi tespit edilirken, MacConkey besiyerinde üreme olmadığı görülmüştür. Koloniler makroskopik açıdan değerlendirildiğinde izolatların çoğunun 1-2 mm çapında, gri-beyaz renkli, düz, opak, mukoid olmayan ve gama hemolitik koloniler şeklinde olduğu gözlenmiştir. İzolatlardan bir tanesinin ise yuvarlak, konveks, parlak, açık sarımsı renkte ve oldukça mukoid kolonilerinin olması dikkat çekmiştir. Kolonilerden yapılan Gram boyalı yaymaların mikroskopik incelemesinde kısa, dallanmayan, sporsuz, Çin harfleri görünümünde, pleomorfik Gram pozitif basiller izlenmiştir.

4.3. MALDI-TOF MS ve VITEK 2 Compact ile Tanımlama Sonuçları

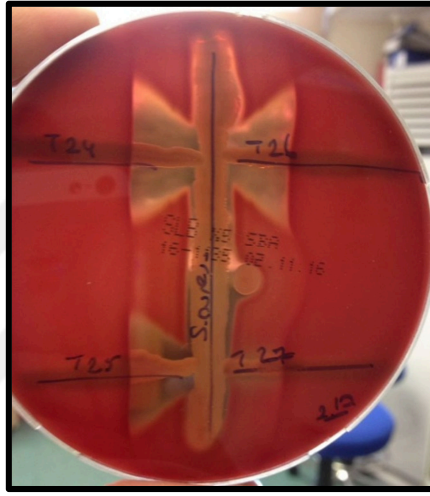
Korineform bakteri olduğu düşünülen 46 izolat için hem MALDI-TOF MS hem de VITEK 2 Compact ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapılmıştır. Koyun kanlı agarda üreyen koloniler MALDI-TOF MS cihazında çalışılmış, izolatlardan 1 tanesi *C. mucifaciens* olarak tanımlanmış ancak diğer 45 izolat MALDI-TOF MS ile tanımlanamamıştır. MALDI-TOF MS ile *C. mucifaciens* olarak tanımlanan izolat VITEK 2 Compact otomatize sistemiyle tanımlanamamış, MALDI-TOF MS ile tanımlanamayan 45 izolat ise VITEK 2 Compact ile *T. otitidis* olarak tanımlanmıştır.

4.4. Konvansiyonel Test Sonuçları (Katalaz, CAMP, DNaz Testleri)

Korineform bakteri olduğu düşünülen 46 izolatın tamamı ek konvansiyonel testlerle tür düzeyinde tanımlanmıştır. Bu amaçla katalaz, CAMP, DNaz testleri yapılmıştır. Tüm izolatlarda katalaz testi pozitif saptanmıştır. *C. mucifaciens* olarak

tanımlanan izolatin CAMP testi negatif bulunmuştur. *T. otitidis* olarak tanımlanmış izolatlarda ise 1 izolat hariç hepsinde CAMP testi pozitif olarak saptanmıştır. *C. mucifaciens* olarak tanımlanan 27 numaralı izolatin negatif CAMP test görüntüsü ve *C. afermentans* olarak tanımlanan 24, 25, 26 numaralı izolatların pozitif CAMP reaksiyon görüntüsü Resim 4'te gösterilmiştir. *C. mucifaciens* izolatinın %5 koyun kanlı agarda 36 saat inkübasyon sonrası koloni yapısı Resim 5'te gösterilmiştir.

Resim 4. *C. mucifaciens* (27 numaralı izolat) ve *C. afermentans* (24, 25, 26 numaralı izolatlar) izolatları CAMP testi reaksiyon görüntüleri



Resim 5. *C. mucifaciens* izolatinın makroskopik görünümü

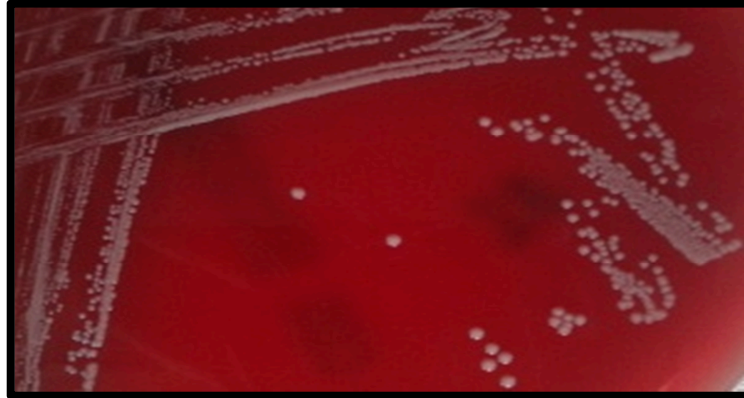


45 izolatin tamamının koloni morfolojisi olarak *C. mucifaciens*'in konveks, parlak, açık sarı ve mukoid yapıdaki kolonilerine benzemeyip; *C. afermentans* izolatlarına benzer şekilde gri-beyaz, opak, düz koloniler olduğu görülmüştür. Ayrıca 45

izolatın 44'ünde CAMP testi *C. mucifaciens*'in aksine, pozitif olarak değerlendirilmiştir.

T. otitidis, *C. afermentans* spp. (CDC korineform grup ANF-1) izolatlarına çok benzediğinden ANF-1 benzeri bakteri olarak adlandırılmıştır. Her iki bakterinin koloni yapıları birbirinden farklılık göstermez. Gram boyalı preparatlarda ise *T. otitidis*'in daha uzun hücrelere sahip olması dışında *C. afermentans* ile benzer görünümündedir. Tür düzeyinde tanımlamada CAMP ve DNaz testlerinin kullanılması ek bilgi sağlamaktadır. *C. afermentans* bazı suşları, *T. otitidis* izolatlarının ise hepsinde CAMP testi pozitifdir. *T. otitidis* izolatlarında DNaz testi pozitif iken, *C. afermentans* izolatlarının DNaz testi negatiftir. Çalışılan 45 izolatın tamamının DNaz testleri negatif olarak bulunmuştur. Çalışmamızdaki 1 adet *C. mucifaciens* izolatının da DNaz testi negatif olarak saptanmıştır. Konvansiyonel testlerle *C. afermentans* spp. olduğu tespit edilen 45 izolatın alt tür ayrımı koloni morfolojisine göre yapılmıştır. %5 koyun kanlı agarda, 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası, *C. afermentans* subsp. *afermentans* kolonileri gama hemolitik, düzgün kenarlı, opak, beyaz-krem rengi morfolojide ve 1-2 mm büyüklüğünde iken, *C. afermentans* subsp. *lipophilum* kolonileri parlak, gri, camsı ve 0.5 mm'den küçük görülürler. Koloni morfolojisi değerlendirildiğinde 45 izolatın hepsi *C. afermentans* subsp. *afermentans* ile uyumlu olarak bulunmuştur (Resim 6).

Resim 6. *C. afermentans* subsp. *afermentans* izolatının makroskopik görünümü

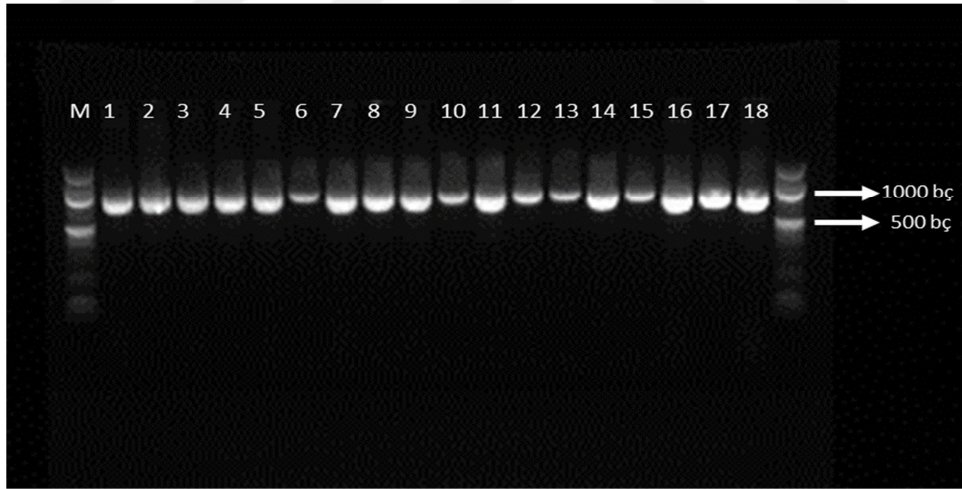


4.5. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Katalaz ve CAMP testi sonuçları *T. otitidis* bakterisi ile uyumlu bulunmuş olsa da, nadir görülen bu bakterilere kan ve kateter kültürü örneklerinde sık rastlanmış olması ve elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçlarında penisilin direncinin yaygın görülüp, literatürde *T. otitidis* izolatlarında penisilin direncine rastlanmamış olması üzerine izolatlara 16S rDNA dizi analizi yapılmıştır. MALDI-TOF MS tanımlama sonucu *C. mucifaciens* olan izolat dizi analizi sonucunda *C. mucifaciens* olarak tanımlanmıştır. Böylece makroskopik olarak *C. mucifaciens* ile uyumlu olan 1 izolat konvansiyonel yöntemler, MALDI-TOF MS ve dizi analizi sonucu *C. mucifaciens* olarak tanımlanmıştır.

VITEK 2 Compact sistem tanımlama sonucu *T. otitidis* olarak bulunmuş olan 45 izolat ise 16S rDNA dizi analizi sonucunda *C. mucifaciens*/*C. afermentans* spp. olarak tanımlanmıştır. İzolatlara ait 16S rDNA PZR sonucu Resim 7’de gösterilmiştir.

Resim 7. *C. mucifaciens*/*C. afermentans* spp. 16S rDNA PZR sonucu

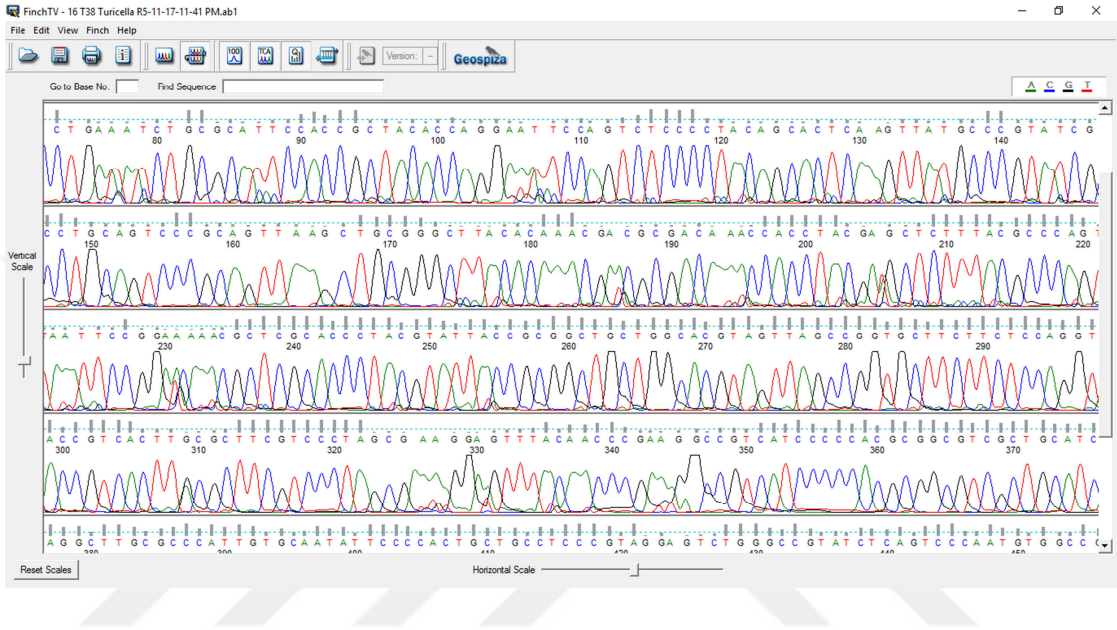


bç: baz çifti **M:** Marker

Dizi analizi sonuçları analiz edilirken, dizileme sonuçlarını içeren kromatogram dosyaları FinchTV v1.3.1 yazılımına aktarılarak, diziler üzerinde gerekli görülen düzeltmeler yapılmıştır. Elde edilen DNA dizileri NCBI’da yer alan Gen Bankası ve BLAST sunucusu kullanılarak veri bankasında kayıtlı diğer izolatlar ile karşılaştırılarak tanımlama yapılmıştır. *C. afermentans* izolatlarından bir örneğin, FinchTV v1.3.1

yazılımı ile elde edilen 16S rDNA Dizi analizi kromotogram görüntüsü Resim 8’de gösterilmiştir. Çalışma kapsamında kan kültürü şişesindeki üremeleri değerlendirilen 46 hastaya ait konvansiyonel tanımlama ve dizi analizi sonuçları Tablo 8’de özetlenmiştir.

Resim 8. *C. afermentans* izolatlarından 38 nolu örneğin, FinchTV v1.3.1 yazılımı (GeoSpiza Inc., ABD) ile elde edilen 16S rDNA Dizi analizi kromotogram görüntüsü



Tablo 8. Olgulara ait konvansiyonel tanımlama ve dizi analizi sonuçları

Olgu	Örnek Türü	Katalaz Testi	CAMP Testi	DNaz Testi	Tanımlama Sonucu
1	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
2	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
3	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
4	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
5	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
6	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
7	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
8	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
8	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
9	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
10	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
11	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
12	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
13	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
14	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
15	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
16	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
17	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
18	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
19	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
20	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
21	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
22	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
23	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
24	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
25	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
26	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
27	Kan	+	-	-	<i>C. mucifaciens</i>
28	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
29	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
30	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
31	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
32	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
33	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
34	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
35	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
36	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
37	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
38	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
39	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
40	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
41	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
42	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
43	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
44	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
45	Kan	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>
46	Kateter	+	+	-	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>

4.6. Olguların Aynı Gün ve Bir Haftalık Kan ve Kateter Kültürü Üremelerinin Değerlendirilmesi

Kan kültüründe *C. afermentans* üremesi olan 10 numaralı olgunun, bir hafta sonra gelen kateter kültürü örneğinde de aynı bakteri üremiştir. *C. afermentans* üremesi olan 32 numaralı olgunun ise 6 ay sonra gelen kan kültürü örneğinde aynı bakteri üremesi saptanmıştır. Olgulara ait üremeler Tablo 9’da özetlenmiştir.

Tablo 9. Olguların bir haftalık kan kültürü üremelerinin değerlendirilmesi

Olgu	Örnek Türü	Aynı gün gelen başka örnek	Aynı gün gelen diğer örnekte üreme varlığı	Bir hafta içinde gelen başka örnek	Bir hafta içinde gelen diğer örnekte üreme varlığı
1	Kateter	Var	Üreme yok (Kan)	Var	Üreme yok (Kan)
2	Kan	Yok	-	Var	<i>Candida albicans</i> (Kan-kateter) KNS (Kan-kateter)
3	Kateter	Var	KNS (Kan)	Var	Üreme yok (Kan)
4	Kateter	Yok	-	Var	KNS (Kan)
5	Kan	Yok	-	Var	<i>C. glucuronolyticum</i> (Kan) KNS (Kan)
6	Kan	Yok	-	Var	KNS (Kan)
7	Kan	Yok	-	Var	Üreme yok (Kan)
8	Kan	Yok	-	Yok	-
9	Kateter	Var	Üreme yok (Kan)	Var	Üreme yok (Kan-kateter)
10	Kan	Yok	-	Var	<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i> (Kateter)
11	Kateter	Var	Üreme yok (Kan)	Var	<i>S. epidermidis</i> (Kateter)
12	Kan	Var	<i>C. glabrata</i> kompleks (Kateter)	Var	Üreme yok (Kan-kateter)
13	Kateter	Yok	-	Var	Üreme yok (Kan-kateter)
14	Kan	Yok	-	Var	Üreme yok (Kan)
15	Kateter	Var	<i>C. glabrata</i> kompleks (Kan)	Var	<i>C. glabrata</i> kompleks (Kan, kateter) <i>Enterococcus faecalis</i> (Kateter) KNS (Kan, kateter)
16	Kan	Var	KNS (Kateter)	Var	<i>S. epidermidis</i> (Kan)
17	Kan	Var	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Kateter) <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> (Kateter)	Var	<i>Klebsiella pneumonia</i> (Kan) <i>Acinetobacter baumannii</i> kompleks (Kan) <i>S. epidermidis</i> (Kateter)
18	Kan	Yok	-	Var	<i>S. epidermidis</i> (Kan, kateter)
19	Kan	Yok	-	Var	<i>S. epidermidis</i> (Kateter)
20	Kateter	Yok	-	Var	Üreme yok (Kan, kateter)

Tablo 9 (Devamı). Olguların bir haftalık kan kültürü üremelerinin değerlendirilmesi

Olgu	Örnek Türü	Aynı gün gelen başka örnek	Aynı gün gelen diğer örnekte üreme varlığı	Bir hafta içinde gelen başka örnek	Bir hafta içinde gelen diğer örnekte üreme varlığı
21	Kan	Yok	-	Yok	-
22	Kateter	Yok	-	Var	KNS (Kateter)
23	Kan	Yok	-	Yok	-
24	Kan	Yok	-	Yok	-
25	Kan	Yok	-	Var	<i>A. baumannii</i> kompleks (Kan) <i>Enterobacter cloaca</i> (Kan, kateter)
26	Kan	Var	Üreme yok (Kan)	Var	Üreme yok (Kan)
27	Kan	Var	Üreme yok (Kateter)	Var	Üreme yok (Kan)
28	Kateter	Var	Üreme yok (Kan)	Var	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Kan, kateter) Gram pozitif basil (Kan)
29	Kan	Yok	-	Var	<i>Escherichia coli</i> (Kan)
30	Kan	Yok	-	Var	Üreme yok (Kan)
31	Kan	Yok	-	Yok	-
32	Kan	Var	KNS (Kateter)	Var	<i>A. baumannii</i> kompleks (Kateter)
33	Kan	Var	Üreme yok (Kan)	Var	<i>C. striatum</i> (Kan)
34	Kan	Yok	-	Var	KNS (Kan)
35	Kateter	Var	KNS (Kateter)	Var	KNS (Kateter)
36	Kan	Var	KNS (Kateter)	Var	<i>S. aureus</i> (Kan)
37	Kan	Var	KNS (Kan)	Var	Üreme yok (Kan)
38	Kan	Var	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kan)	Var	<i>K. pneumoniae</i> (Kan)
39	Kateter	Yok	-	Var	Üreme yok (Kan)
40	Kan	Var	Üreme yok (Kan)	Var	KNS (Kateter)
41	Kan	Var	<i>Streptococcus gallolyticus</i> (Kan)	Var	<i>Streptococcus gallolyticus</i> (Kan)
42	Kateter	Yok	-	Var	Üreme yok (Kan)
43	Kan	Var	Üreme yok (Kan)	Yok	-
44	Kan	Yok	-	Var	<i>A. baumannii</i> kompleks (Kan)
45	Kan	Yok	-	Yok	-
46	Kan	Var	Üreme yok (Kan)	Yok	-

Çalışma kapsamındaki 46 olgunun 21'inde aynı gün ikinci bir kan/kateter kültür örneği laboratuvara gönderilmiştir. Bu 21 hastanın 3'ünde örnek geliş saati ilk gelen kültürden farklı bir saatte, diğer 18 örnek ise ilk örnek ile aynı saatte gönderilmiştir. Farklı saatte örneği gelen üç hastadan ikisinin, ikinci kültüründe üreme olmazken, bir hastada ise KNS üremiştir. Aynı saatte örneği gelen 18 hastanın 9'unda ikinci kültürde bakteri üremesi saptanmış, 9'unda ise bakteri üremesi olmamıştır. Hastaların *C. afermentans* ve *C. mucifaciens* üremelerinin saptandığı kan kültürü tarihini kapsayan bir hafta içinde başka kan kültürü örneği gelip gelmediği değerlendirilmiş, aynı hafta içinde başka örneği gelen 38 hastanın 15'inde üreme saptanmazken, 23'ünde üreme olduğu görülmüştür. Sonuçlar Tablo 10'da özetlenmiştir.

Tablo 10. Olguların diğer kan kültürlerinin değerlendirilmesi

	Sayı	Bakteri Üremesi Olmayanlar	Bakteri Üremesi Olanlar
Aynı gün gelen başka örnek	21 hasta örneği	11 hasta	10 hasta
Bir hafta içinde gelen başka örnek	38 hasta örneği	15 hasta	23 hasta

4.7. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Antibiyotik duyarlılığını saptamak amacıyla yapılan E-test sonuçları, CLSI M45-A2 kılavuzundaki *Corynebacterium* spp. direnç sınır değerlerine göre yorumlanmıştır. *C. mucifaciens* olarak tanımlanan izolatin penisilin, vankomisin, daptomisin ve TMP-SMX antibiyotiklerine duyarlı olduğu, eritromisin ve klindamisin antibiyotiklerine ise dirençli olduğu belirlenmiştir. *C. afermentans* subsp. *afermentans* olarak tanımlanan 45 izolatin ise tamamının; penisilin, eritromisin ve klindamisin antibiyotiklerine dirençli; vankomisin ve daptomisine duyarlı oldukları; 8 (%18) izolatin TMP-SMX'e duyarlı olduğu, 31 (%69) izolatin ise TMP-SMX'e dirençli olduğu saptanmış, 6 (%13) izolat ise orta duyarlı olarak tespit edilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına ait bazı örnekler Resim 10'da gösterilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılık profilleri Tablo 11'de özetlenmiştir.

Resim 9. *C. afermentans* subsp. *afermentans* izolatlarından birinin E-test antibiyotik duyarlılık görüntüsü



TS: Trimetoprim-Sulfometoksazol PG: Penisilin EM: Eritromisin DPC: Daptomisin

Tablo 11. İzolatların antibiyotik duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi

Antibiyotik	<i>C. mucifaciens</i> (1 izolat)		<i>C. afermentans</i> (45 izolat)		
	S (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Penisilin	1 (100)				45 (100)
Eritromisin		1 (100)			45 (100)
Klindamisin		1 (100)			45 (100)
Vankomisin	1 (100)		45 (100)		
Daptomisin	1 (100)		45 (100)		
TMP-SMX	1 (100)		8 (18)	6 (13)	31 (69)

S: Duyarlı (Susceptible) I: Orta Duyarlı (Intermediate) R: Dirençli (Resistant)

5. TARTIŞMA

Klinik örneklerden izole edilen *Corynebacterium* türlerinin klinik önemine karar vermek, genellikle klinik mikrobiyologlar için oldukça zordur. Yıllarca bu mikroorganizmalar cilt kontaminantları olarak düşünülüp göz ardı edilmiş ve tür düzeyinde tanımlama için girişimlerde bulunulmamıştır. Ancak bu bakteriler giderek artan şekilde önemli insan patojenleri olarak tanınmaya başlamışlardır (30).

Corynebacterium türleri sağlıklı insan cildinde ve mukozalarda flora elemanı olarak bulunmaktadır. Cundell'in 2016 yılında yayınlanan insan cildinin mikrobiyal ekolojisi makalesinde cilt mikrobiyotasının doğumla birlikte oluşmaya başladığı ve sezeryan ile doğan bebeklerin *Corynebacterium* ile doğumdan itibaren kolonize olduğu, puberte döneminde ise hormonların etkisine bağlı olarak ciltte bu mikroorganizmaların baskın hale geldiği vurgulanmıştır. İnsan mikrobiyom projesiyle de, ciltte 1200 bakteri türünün bulunduğu; bunlar içinde *Propionibacterium*, *Staphylococcus* ve *Corynebacterium* cinslerinin baskın olduğu gösterilmiştir (134).

Huang ve ark. tarafından 2016'da yapılan, konjunktival mikrobiyal toplulukların normal çekirdek mikrobiyomunun tanımlanması çalışmasında 31 adet konjunktival sürüntü örneği incelenmiştir. Oküler yüzey ile ilişkili hastalıklarda çeşitli mikrobiyotanın oynadığı potansiyel rolleri araştırmanın amaçlandığı bu çalışmada *Corynebacterium* (%28), *Pseudomonas* (%6), *Staphylococcus* (%5), *Acinetobacter* (%4), *Streptococcus* (%2), *Millisia* (%2), *Anaerococcus* (%1), *Finogoldia* (%1), *Simonsiella* (%1) ve *Veillonella* (%1) bakterilerinin mikrobiyal topluluğun %76'sından fazlasını oluşturduğu belirlenmiştir (135).

Imamura ve ark.'nın 2016'da yaptıkları, prematüre infantlarda alt solunum yolu mikrobiyom belirleme çalışmasında hastalar; ağır bronkopulmoner displazisi (BPD) olan ve ağır BPD'si olmayan hastalar şeklinde iki gruba ayrılmıştır. 169 prematüre infanttan ağır BPD'si olan 67'sinde *Corynebacterium* türlerinin BPD'si olmayan hastalara göre çok daha sık ($p=0.03$) izole edildiği belirtilmiştir (136).

2005'te Polonya'da yürütülen bir diğer çalışmada sağlıklı kişilerin derin dermis tabakalarından izole edilen 474 korineform bakteri tür düzeyinde tanımlanmış, koagülaz negatif stafilokoklarla beraber bu bakterilerin kalıcı aerobik floranın parçası olduğu ve lipofilik türlerin daha baskın olarak bulunduğu; ayrıca bu lipofilik türlerin fırsatçı

enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen türler olduğu belirtilmiştir. Fırsatçı enfeksiyonların sıklıkla fizyolojik floradan köken alan endojenik flora tarafından meydana getirildiği ve korinebakterilerin fırsatçı enfeksiyonlardaki öneminin gittikçe arttığı vurgulanmıştır (137).

Korineform bakterilerin klinik mikrobiyolojik incelenmeleriyle ilgili çalışmalarda yıllar içinde çok fazla artış görülmüştür. Bağışıklık sistemi baskılanmış hasta sayısında artış olması ve bu hastaların teşhis-tedavi süreçlerinin daha yoğun ve invaziv hale gelmesi sonucu fırsatçı mikroorganizmalar için daha elverişli üreme koşulları oluşması; bunun temel nedeni olarak kabul edilmektedir. Ayrıca korineform bakterilerin patojenik potansiyellerinin uzun yıllar küçümsenmesi bir başka neden olarak görülmektedir (13). *Corynebacterium* türlerinin hastalık etkeni olarak saptandığı, hastanelerde klinik örneklerden izole edilen korineformların tanımlandığı ve antibiyotik duyarlılık profillerinin test edildiği çalışmalar da çok sayıdadır.

Riegel ve ark. Fransa’da 14 aylık süre boyunca, çeşitli 415 klinik örnekte üreyen korineform Gram pozitif basillerin tür düzeyinde tanımlama ve antibiyogram çalışmalarını yürütmüşlerdir. Kan kültürü örneklerinde en sık *C. afermentans*, *C. jeikeum* ve CDC Grup G bakterilerinin izole edildiğini, bu bakterilerin aynı zamanda kateter enfeksiyonlarında da baskın görüldüğü bildirilmiştir. Çeşitli türlerde ortaya çıkan antimikrobiyal direncin korineform mikroorganizmaların tür düzeyinde doğru tanımlanması ve antimikrobiyal direnç paternlerinin sürekli izlenmesini gerekli kıldığı vurgulanmıştır (36).

Lagrou ve ark. Belçika’da bir üniversite hastanesinde 6 aylık süre boyunca rutin laboratuvara gelen kültürlerde üreyen korineform bakterileri değerlendirmişlerdir. Bakterilerin çoğu yara ve kan kültürü örneklerinden izole edilmiş, çalışılan 150 izolattan 37’sinin (%25), ‘enfeksiyon etkeni’ olduğuna karar verilmiş, 113 (%75) örnek ise ‘klinik önemi şüpheli’ olarak değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamındaki 150 izolattan 10 izolat *C. afermentans* bakterisine ait olup, izolatlar ‘klinik önemi şüpheli grup’ içerisinde sınıflandırılmıştır. Ayrıca bu türün antibiyotik duyarlılık test sonuçları çalışmamızla uyumlu olarak tesbit edilmiş; izolatların tamamı eritromisin ve klindamisine dirençli, vankomisine ise duyarlı bulunmuştur. Aynı çalışmada, korineform bakterilerin steril vücut sıvılarında koloni sayısına bakılmaksızın, diğer örneklerde ise fazla sayıda veya baskın olarak görüldüğünde ileri tanımlama yapılması

gerektiği; idrar örneklerinde bu bakterilerin üremeleri durumunda tek başına üremişse $\geq 10^4$ CFU/mL, baskın olarak üremişse $\geq 10^5$ CFU/mL olduğunda tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılması gerektiği vurgulanmıştır (138).

Balcı ve ark. Gaziantep Üniversite Hastanesinde yaptıkları bir çalışmada 1999-2001 yılları arasında kan kültürlerinde üreyen 31 adet korineform bakteriyi tanımlayıp antibiyotik duyarlılık testlerini çalışmışlardır. *C. afermentans* olarak tanımlanan iki izolattan biri penisiline dirençli, her iki izolat ta eritromisin, klindamisin, TMP-SMX'e dirençli ve her ikisi de vankomisine duyarlı bulunmuş; sonuçlar çalışmamızdaki antibiyotik duyarlılık sonuçları ile benzerlik göstermiştir. Korinebakterilere karşı antibiyotiklerin invitro aktiviteleriyle ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğundan, farklı jeografik bölgelerden korineform bakteri antibiyotik duyarlılıklarına yönelik ek çalışmalar yapılması gerekliliği vurgulanmıştır (9).

Babay ve Kambal tarafından yapılan kan kültürü örneklerinde üreyen korineform bakterilerin değerlendirilmesi çalışmasında *Corynebacterium* cinsine ait 19 farklı türün ürediği 50 izolat çalışmaya dahil edilmiş; en sık üreyen türler *C. propinquum*, *C. auris*, *C. afermentans* ve *C. striatum* olarak belirlenmiştir. E-test metodu ile yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmasında ise test edilen 10 çeşit antibiyotik ile çalışmamızda test edilen 6 çeşit antibiyotikten ortak olan penisilin, vankomisin, klindamisin, eritromisin ve TMP-SMX kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmada *C. afermentans* izolatlarının tamamı çalışmamızla uyumlu şekilde vankomisine duyarlı bulunmuş olup; penisilin, klindamisin, eritromisin ve TMP-SMX için duyarlı veya dirençli şeklinde sonuçlar elde edilmiştir (139). Çalışmamızdaki tüm *C. afermentans* izolatları penisilin, klindamisin ve eritromisine dirençli bulunmuş, TMP-SMX için ise Babay'ın çalışmasıyla uyumlu şekilde duyarlı veya dirençli şeklinde sonuçlar elde edilmiştir.

Petit ve ark. yaptıkları çalışmada endokarditli 126 hastada etken olarak korineform bakteriler izole edildiği, bu hastaların 73'ünde (%58) doğal kapak endokarditi, 53 (%42) hastada ise prostetik kapak endokarditi görülmüş; en sık etkenler olarak *C. jeikeum* ve *C. pseudodiphthericum* bildirilmiştir. 126 hastanın 107'sinde cilt florasında bulunan bakterilerin üremesi üzerine enfeksiyonun ciltten, cerrahi sırasında veya damar içi ilaç kullanımı yoluyla meydana gelme ihtimalinden bahsedilmiştir. Prostetik kapak endokarditlerinin korineform bakterilere ait enfeksiyonlar arasında en

fazla raporlanmış enfeksiyonlar olduğu; doğal kapak endokarditlerinin sıklıkla hasarlanmış kapaklarda meydana geldiği; ilaç bağımlılığı, alkolizm, mevcut kalp hastalığı gibi faktörlerin endokardit riskini artırdığı bildirilmiştir (42).

Bayram, Ekşi ve Balcı tarafından 2003 yılında ülkemizde yapılan bir çalışmada 16 aylık süre içinde 594 solunum yolu örneği incelenmiştir. Saf kültür veya baskın mikroorganizma olarak *Corynebacterium* spp.'nin ürediği 20 örnek çalmaya dahil edilmiş, örneklerden *C. striatum*, *C. xerosis*, *C. minutissimum*, *C. pseudodiphthericum* bakterileri izole edilmiştir. Bu bakterilerin farens, burun ve cilt florasında bulunabildiğini ancak özellikle yoğun antibiyotik kullanımı sonrası asemptomatik olarak kolonizan olabileceği ve *C. striatum*'un gittikçe artan oranlarda insanlarda enfeksiyon etkeni olarak bildirildiği vurgulanmıştır. *C. striatum* bakteriyemi, ölümcül plöropulmoner enfeksiyon, nötropenik kanserli hastalarda kateter ilişkili bakteriyemi, doğal kapak endokarditi, kalp pili ilişkili endokardit, menenjit, çocuklarda beyin omurilik sıvısı şant enfeksiyonu, pürülan konjuktivit, koriyoamniyonit, peritonit ve ampiyem etkeni olarak bildirilmiştir (140).

Weinstein 2008 yılında yayınladığı kan kültür pozitifliklerinin değerlendirilmesi rehberinde, altta yatan hastalığı bulunan bir hastada kan kültürlerinde üreyen *Corynebacterium* spp. izolatının cilt kontaminasyonu olarak değerlendirilip uygun tedavi verilmemesi sonucu hastanın kalp kapakçığında vejetasyon geliştiği, ardından vankomisin tedavisiyle hastanın tamamen iyileştiğini bildirmiştir (141).

Kumari ve ark. 1996 yılında letarji ve görme bulanıklığı şikayetleriyle gelen ve supraserebellar kitle saptanan bir erkek hastada cerrahi sonrası gelişen beyin absesinin yerleştiği kemik dokudan *C. afermentans* subsp. *afermentans* bakterisini etken olarak izole etmişlerdir. *C. afermentans* subsp. *afermentans* bakterisinin patojen olarak raporlandığı bu tek vakanın antibiyotik duyarlılık testinde ise izolat penisiline ve eritromisine dirençli, vankomisine duyarlı olarak bulunmuş, sonuçlar çalışmamızdaki *C. afermentans* subsp. *afermentans* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçlarıyla uyum göstermiştir (26).

Sewell ve ark. tarafından 1995 yılında İsviçre'de prostetik kapak endokarditli bir hastada; *C. afermentans* subsp. *lipophilum* bakterisi kalp kapağı apse materyalinden ve hastaya ait 15 kan kültür şişesinin 5'inden etken olarak izole edilmiştir. Korineform bakterilerin özellikle kan kültür şişelerinden izole edildiklerinde kontaminant olarak

düşünüldüğü, etkenin kimi zaman gözden kaçırıldığı vurgulanmıştır (24). Minkin ve ark. 2004 yılında HIV (Human Immunodeficiency Virüs) enfeksiyonlu bir hastada akciğer absesi ve ampiyem etkeni olarak *C. afermentans* subsp. *lipophilum* bakterisini plevral sıvı ve kan kültürü örneklerinden izole etmişlerdir (28). Dykhuizen ve ark. ise altta yatan hastalığı bulunmayan bir kişide, *C. afermentans* subsp. *lipophilum* bakterisini beyin ve karaciğer absesi etkeni olarak izole etmişler, bakteri karaciğerden diyafram yoluyla göğüs kafesi kemiklerine yayılarak hastada periostit ve plevral efüzyona neden olmuştur (27).

Djossou ve ark. 2010 yılında sundukları vakada, yüksek ateş, nefes darlığı, kuru öksürük, göğüs ağrısı şikayetleriyle gelen immunokompetan bir hastada kavitsiyonlu pnömoni teşhisi konulduğu ve bu hastanın kan kültürü örneklerinde etken olarak *C. mucifaciens* izolatu saptandığını bildirmişlerdir. Antibiyotik duyarlılık testleri çalışmamızdaki *C. mucifaciens* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleriyle uyumlu şekilde; β -laktam, aminoglikozit ve glikopeptitlere duyarlı bulunmuştur (31). Cantarelli ve ark. ise 2006 yılında Brezilya'da ölümcül bir bakteriyemi vakasında, hastanın üç farklı veninden alınan kan kültürlerinde *C. mucifaciens* bakterisinin ürediğini belirtmişlerdir (30). Kaya ve ark. tarafından 2016 yılında ülkemizden bildirilen bir vakada; dilate kardiyomyopati nedeniyle implante edilebilir kardiyoverter defibrilatör (ICD) takılmış olan bir hastada, ICD'nin ve vena cava superior deliğinin üzerinde vejetasyonlar ve dalakta apse saptamışlardır. Hastadan alınan tüm kan kültürlerinde *C. mucifaciens* üremesi saptanmış olup, *C. mucifaciens*'e bağlı olarak bildirilen ilk ve tek infektif endokardit vakasıdır (142).

Ergin ve ark. Pamukkale Üniversite Hastanesinde, 2001-2002 yılları arasında 8 aylık bir dönemde yoğun bakım hastalarından gelen 205 trakeal aspirat örneğinin 6'sında *C. striatum* bakterisini izole etmişlerdir. Korineform bakterilerin izolasyonu ve tanımlanmasında çekingenlik olduğundan bu bakteriler ile meydana gelen enfeksiyonlarla ilgili sağlıklı verilere ulaşılmasının güçleştiği ancak korineform bakterilerin yoğun bakım gibi sürekli bakım gerektiren hastane ortamlarında personel aracılığı ile yayılabildiği belirtilmiştir. *C. striatum*'un bulunduğu cilt florasının özellikle gram pozitif bakteriler arasındaki antibiyotik direnci ile ilgili genetik madde aktarımı için uygun bir alan olduğu ve *C. striatum* suşlarının ve direnç genlerinin aynı yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar arasında görevli personel ile hastadan hastaya yayıldığı

bildirilmiştir (143). Direnç genlerinin aktarılmasıyla ilgili; Tauch ve ark. *C. xerosis* izolatlarında, Rosato ve ark. ise *C. jeikeum* izolatlarında özellikle makrolid direnci taşıyan ve yayılmasında rol aldığı saptanan transpozon Tn5432 varlığını göstermişlerdir (68, 144). Tn5432 transpozonu alışılmamış ve açıklanamayan direnç varlığında, özellikle Gram pozitif flora elemanı bakterilerin bulunduğu ortamlarda makrolid direncinin ortaya çıkış nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (143).

Leonard ve ark. 14 aylık süre içinde yoğun bakım ünitelerinde yatan 11 hastada, *C. striatum* kahverengi pigmentli aynı suşunun hastadan hastaya yayıldığını moleküler olarak göstermişlerdir (145). Brandenburg ve ark. tarafından yürütülen başka bir çalışma sonucunda, cerrahi yoğun bakım ünitelerinde *C. striatum*'un ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabileceği ve hastane personeli elleri aracılığıyla hastadan hastaya yayılabileceği sonucuna varılmıştır (146). Martinez ve ark. İspanya'da bir üniversite hastanesinde yaptıkları çalışmada çeşitli klinik örneklerde *C. striatum* izole ettikleri 127 hastanın 49'unda yeterli klinik verilere ulaşamadığını, 26'sında izole edilen suşun enfeksiyon etkeni olarak kabul edildiğini, 52'sinde ise bakterinin kolonizan kabul edildiğini bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda *C. striatum*'un özellikle altta yatan hastalığı olan veya önceden antibiyotik tedavisi almış kişilerde enfeksiyon etkeni olabileceği, hatta ölümcül seyredebileceği belirtilmiştir (147).

Williams ve Noble 1986 yılında İngiltere'de yaptıkları plazmid profil çalışmaları ile, *C. jeikeum*'un kanser hastaları arasında kişiden kişiye bulaştığını göstermişler ve bu bakterinin hastalar arasında yayıldığı ilk kez bildirilmiştir (148). Benzer bir çalışma Khabbaz ve ark. tarafından Baltimore'de bir kanser ünitesinde yapılmış, ancak bu çalışmada *C. jeikeum*'un hastadan hastaya geçtiğine dair delil bulunamamıştır (149). Pitcher ve ark. 1990 yılında, 10 aylık süre içinde 10 cerrahi hastasından izole edilen *C. jeikeum* DNA'sının ribotiplendirilmesini yaptıktan sonra, tek bir suşun küçük varyantlarının 6 hasta arasında aktarıldığını gösteren veriler bulmuşlardır (150).

Chandra ve ark. tarafından 2016'da yapılan bir diğer çalışmada klinik olarak enfeksiyon bulguları olan, Gram boyanmış örnek yaymasında inflamatuvar hücreler görülen ve klinik örnekte saf kültür şeklinde üreyen 100 difteroid basilin tanımlama ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları yapılmıştır. İzole edilen türlerde çok ilaca dirençliliğin yüksek seviyede görüldüğü ve bunun muhtemel nedeninin ise izolatların baskın olarak nazokomiyal patojen olmalarından kaynaklandığı bildirilmiştir. Hastane personelinin

çok ilaca dirençli korineform izolatlarla kolonize olma ihtimali olduğundan, hastane personeli yoluyla enfeksiyon bulaşma riskinin göz önünde bulundurulması gerektiği; bununla birlikte difteroidlerin endojen enfeksiyonlara da neden olabileceği ve bu mikroorganizmalarla ilişkili en önemli risk faktörünün biyofilm üretilmesi olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle nazokomiyal difteroid suşlarının biyofilm formunda hayatta kaldığı ve çok ilaca dirençli enfeksiyonlara neden olduğu düşünülmüş, bu bakterilerin gittikçe daha fazla direnç kazanmaları yönünde büyük riskin söz konusu olduğu aktarılmıştır. *Corynebacterium* türlerinin sıklıkla deri kolonizanları olarak bulunsalar bile, klinik örnekten izolasyonlarının değerlendirilmesi, kütle spektrometrik tanımlama gibi daha yeni teknikler kullanılarak tanımlamalarının yapılması ve klinik önemi ile ilişkilendirilmek için antimikrobiyal duyarlılıklarının test edilmesi gerekliliği vurgulanmış; ayrıca hastaneye bağlı enfeksiyonların yayılımını önleme uygulamalarında, potansiyel nazokomiyal patojen olan difteroidlerin göz önünde bulundurulması önerilmiştir (151).

Yapılmış çeşitli antibiyotik duyarlılık çalışmalarında insanlardan izole edilen *Corynebacterium* izolatlarının %80'den fazlasının aminoglikozitlere (amikasin ve gentamisin), %60'ının oksasilin ve siprofloksasine duyarlı olduğu bildirilmiş; izolatların büyük bölümünün penisilin, eritromisin ve klindamisine dirençli olduğu; ko-trimaksazol, nitrofurantoin, teikoplanin, doksisisiklin, norfloksasin ve sefalosporinlere duyarlılığın ise değişken olduğu saptanmıştır. Bu bakterilere karşı en etkili antibiyotikler vankomisin, linezolid, dalfopristin ve kinopristin olarak belirlenmiştir (152).

Szemraj ve ark. tarafından 2014'te yapılan bir çalışmada sağlıklı kişilerin ciltlerinden izole edilmiş 99 lipofilik korinebakteride makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLSB) direnci araştırılmış, izolatların %70'ten fazlasında eritromisin, klindamisin direnci saptanmıştır. İzolatların tümünde MLSB direncinden sorumlu olabilecek erm (A), erm (B), erm (C), erm (X), lin (A), msr (A) ve mph (C) genleri varlığı araştırılmış, MLSB dirençli olan tüm suşlarda erm (X) geni bulunmuş olup diğer genlere rastlanmamıştır. Bu bakteriler fırsatçı enfeksiyonlar için etyolojik bir faktör olduğundan, MLSB direnç mekanizmasının sağlıklı insan cildinde bu denli yaygın bulunmasının enfeksiyon açısından tehdit oluşturduğu vurgulanmıştır (153). Lipofilik

korinebakteriler dışında non-lipofilik *C. diphteria* ve *C. xerosis* bakterilerinde de MLSB direnç varlığı gösterilmiştir (144, 154).

2011 yılında Verroken ve ark. tarafından, Belçika'da bir hastanede çok ilaca dirençli *C. striatum* izolatları tarafından meydana getirilen nazokomiyal enfeksiyon salgınından bahsedilmiştir. 10 hastanın solunum yolu örneklerinden izole edilen bakteri MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper System, Bruker Daltonics, MA) ve 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanmış, PFGE (Pulsed-field jel elektroforezi) analizleri sonucu 7 hastada aynı PFGE paterni izlenmiş olup, toplamda 3 farklı PFGE paterni saptanmıştır (155). Bu bakterinin neden olduğu hastane salgınlarıyla ilgili benzer raporlar da bulunmaktadır (156, 157). *C. striatum*'un özellikle uzun süre hastanede yatan kişilerde ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı nazokomiyal patojen olduğu ve büyük salgınlara neden olabileceği vurgulanmıştır (155).

Alatoom ve ark.'nın yürüttüğü MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper System, Bruker Daltonics, MA) kullanarak *Corynebacterium*'ların tanımlanması çalışmasında elde edilen sonuçlar 16S rRNA dizi analizi yöntemiyle karşılaştırılmış ve sonuç olarak bu otomatize sistem ile *Corynebacterium* cinsinin tür düzeyinde ayırt edilmesinde güçlükler bulunduğu bildirilmiştir (158). Çalışmamızda da otomatize sistemlerin tek başına *C. afermentans* bakterisinin tanımlanmasında yetersiz kaldığı saptanmıştır.

Konrad ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise *C. diphteria*, *C. pseudotuberculosis* ve *C. ulcerans* (*C. diphteria* grubu) bakterilerinin MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper System, Bruker Daltonics, MA) ile, rpoB gen dizi analizi sonuçlarına kıyasla %99.1 oranında doğru ve daha hızlı sonuç veren bir sistem olduğu ancak henüz *C. diphteria* biyotip sınıflandırılmasının yapılamadığı, laboratuvarlarda toksijenik korinebakterilerin tanımlanmasında hızlı ve güvenilir sistemlerin ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (159). MALDI-TOF MS otomatize sistemi mikroorganizmaların tanımlanmasında sonuç verme süresi ve iş yükü açısından konvansiyonel yöntemlere göre daha avantajlı bulunmuştur. Daha erken tanımlama yapıldığı için uygun antibiyotik seçimi ve tedaviye başlama; dolayısıyla hastanede yatış süresi, mortalite, morbidite azalması gibi dolaylı etkileri de görülmektedir (160).

Rennie ve ark. tarafından yapılan; anaerob bakteriler ve *Corynebacterium* türlerinin Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) ANC kart ile ve 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanması çalışmasında *C. amycolatum*, *C. diphteria*, *C. jeikeum*, *C.*

pseudodiphthericum, *C. striatum* ve *C. ulcerans* türlerinden oluşan 46 izolatın tamamı doğru tanımlanmış olup, 5 adet *C. urealyticum* izolatından 4'ü tür düzeyinde doğru tanımlanmış, 1 adet *C. urealyticum* izolatu ise Vitek 2 ile *C. pseudodiphthericum* olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak Vitek 2 ANC kartın rutin laboratuvarında kullanılabilecek bir tanımlama metodu olduğu bildirilmiştir (161).

Korineform bakterilerin patojenik potansiyellerinin akılda tutulması gerekirken, kan kültürlerinde kontaminant olarak izole edilmelerinde en önemli etken kan kültürü örneğinin bir şekilde kontamine edilmesidir. Kontamine kan kültürlerinin en sık nedeni kan kültürünün yanlış teknikle alınması olduğundan, kan kültürünün uygun şekilde alınması çok önemlidir. Çalışmalarda yetiştirilmiş flebotomistlerin veya kan kültür takımlarının normal sağlık personeline göre, aldıkları kanlardaki kontaminasyonun daha az olduğu gösterilmiştir (141). Surdulescu ve ark. yaptıkları çalışmada flebotomistlerin kan kültür alımına başlamasıyla kontaminasyon oranlarının %5.6'dan %2.6'ya, Weinbaum ve ark.'nın yaptığı bir diğer çalışmada ise kontaminasyon oranlarının %4.8'den %1.2'ye düştüğü ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$; χ^2 test) olduğu belirtilmiştir (162, 163).

Kan kültürü alınırken kullanılan povidin iyot solüsyonunun en yüksek etkinliği sağlama için 1.5-2 dakika boyunca uygulandığı yüzeyde kalması gereklidir. Ancak çoğu zaman kan kültürü alacak kişi acele eder ve bu süreyi beklemez. Tentürdiyotun ise ciltte 30 saniye kalması antiseptik etki için yeterlidir. Kan kültürü alımında tentürdiyotun veya klorheksidin glukonatın tercih edilmesinin kontaminasyon oranını azalttığı gösterilmiştir (164). Strand ve ark. yaptıkları çalışmada iyodofor yerine tentürdiyot kullanımının kontaminasyon oranını %6.25'ten %3.74'e düşürdüğü, Little ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada ise povidin iyot yerine tentürdiyot kullanımının kan kültürlerinde kontaminasyon oranını %3.8'den %2.4'e düşürdüğü ve bunun istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturduğu ($p=0.01$) bildirilmiştir (165, 166). Ayrıca kalıcı intravenöz kateterlerden alınan kan kültürleri, periferik damardan alınan kanlara göre daha sık kontamine olmaktadır (167).

Antibiyotik bağlayıcı reçineler veya aktif kömür içeren modern kan kültür sistemleri gerçek patojenleri daha iyi tespit ederken, en sık görülen kan kültür kontaminantı olan koagülaz negatif stafilokokların saptanmasını da büyük oranda artırmaktadır. Çalışmaların çoğunda kan örneği alındıktan sonra şişeye aktarılmadan

önce iğne ucunun değiştirilmesi ile kontaminasyon oranının değişmesi arasında ilişki gösterilememiştir ve iğne ile yaralanma ihtimali nedeniyle örnek alımında iki iğne ucu kullanımı önerilmemektedir (141). Ancak Spitalmic ve ark. tarafından yapılan bir meta-analizde iğne ucu değiştirmenin kontaminasyon oranını %3.7'den %2'ye düşürdüğü bildirilmiştir (168).

Kültürde üreyen mikroorganizma çeşidi de üremenin kontaminasyon olup olmadığını değerlendirmede yardımcı olabilmektedir. *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *E. coli* ve Enterobacteriaceae ailesi diğer üyeleri, *P. aeruginosa*, *B. fragilis* grup ve *Candida* türleri gibi bazı mikroorganizmalar sıklıkla etken olarak izole edilirler; bunun aksine koagülaz negatif stafilkoklar, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. (*B. anthracis* dışı), *Propionibacterium acnes*, *Micrococcus* spp. gibi bakteriler ise sıklıkla cilt kontaminantı olarak izole edilirler. Pozitiflik veren kan kültür şişesi sayısı da pozitifliğin gerçek olup olmadığını test etmede yararlı bir belirteçtir; özellikle farklı venlerden alınan iki set kan kültüründe de aynı bakterinin üremesi kontaminasyon olasılığını çok düşürmektedir (141). Birden fazla kan kültür şişesinde üreme saptanması, hastanın semptomlarının mevcut olması veya başka patojen mikroorganizma saptanamaması *Corynebacterium* cinsi bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasını gerekli kılmaktadır (30).

Corynebacterium türleri genellikle normal flora elemanı olarak bilinseler de, potansiyel patojen olarak akılda tutulmalıdır. *T. otitidis* eksternal otit, mastoidit gibi kulak enfeksiyonları yanında servikal abse ve bakteriyemi etkeni olarak ta gösterilmiştir (37, 169). *C. mucifaciens* pnömoni ve ölümcül sepsislere neden olabilir (30, 31). *C. afermentans* subsp. *lipophilum* akciğer-karaciğer-beyin absesi ve endokardit gibi enfeksiyonlarda, *C. afermentans* subsp. *afermentans* ise beyin absesinde etken olarak bildirilmiştir (24, 26-28).

C. afermentans izolatları sıklıkla tigesiklin, gentamisin, rifampisin, doksisisiklin, teikoplanin, vankomisin, tetrasiklin, siprofloksasin, fusidik asit ve linezolid antibiyotiklerine duyarlı bulunmuş; penisilin ve ampisiline ise dirençli izolatlar bildirilmiştir (23, 138, 170, 171). Ayrıca *C. afermentans* izolatlarında sefazolin, seftriakson, sefepim, sefotaksim, meropenem, kinopristin-dalfopristin duyarlılığı değişken saptanmış olup, izolatlar sıklıkla klindamisin ve eritromisine dirençli olarak tespit edilmiştir (172). *C. mucifaciens* ise genellikle; beta laktam antibiyotikler,

aminoglikozitler ve glikopeptitlere duyarlı; makrolidlere dirençli bulunmuştur (7, 31). *T. otitidis* klindamisin ve eritromisin dışında, penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, aminoglikozitler, tetrasiklinler, kloramfenikol, siprofloksasin, rifampisin, linezolid, teikoplanin ve vankomisin gibi pek çok antibiyotiğe duyarlı bir bakteridir (35, 173). *T. otitidis*'deki makrolid ve linkozamid direncinin 23S rRNA mutasyonuna bağlı olarak meydana gelebildiği gösterilmiştir (174). Çalışmamızda da literatürdeki bilgilerle uyumlu şekilde; *C. mucifaciens* olarak tanımlanan izolatin penisilin, vankomisin, daptomisin ve TMP-SMX antibiyotiklerine duyarlı olduğu, eritromisin ve klindamisin antibiyotiklerine ise dirençli olduğu belirlenmiştir. *C. afermentans* subsp. *afermentans* olarak tanımlanan 43 izolatin ise tamamının; penisilin, eritromisin ve klindamisin antibiyotiklerine dirençli, vankomisin ve daptomisine duyarlı oldukları saptanmıştır.

Corynebacterium türleri cilt, mukokutanöz membranlar ve gastrointestinal sistemde normal flora elemanı olarak bulunurlar. Bazı türler ise çevre veya hayvan kaynaklıdır. Aerobik veya fakültatif anaerobik, pleomorfik, dallanmayan, spor oluşturmayan, aside dirençli boyanmayan bu Gram pozitif basillerin patojenik potansiyelleri ise kafalarda soru işaretleri oluşturmaktadır. Ancak insanlarda bakteriyemi, endokardit, osteomyelit, alt solunum yolu, göz ve genitoüriner sistem enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlarda etken olarak bildirilmişlerdir. Bu bakterilerin gittikçe artan oranda enfeksiyon etkeni olarak bildirilmesinde; immunkompromize hasta sayısındaki artış, bu hastaların daha invaziv teşhis yöntemlerine ve yoğun tedavi süreçlerine maruz kalması ile korineform bakteri tanımlama yöntemlerinin pek çok klinik laboratuvarında gelişmiş olması etkili olmuştur. *Corynebacterium* türleri sıklıkla altta yatan ciddi hastalığı olan, damar içi kateteri bulunan veya geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan immunsuprese hastalarda fırsatçı patojen gibi davranarak enfeksiyonlara neden olmaktadır (139).

Corynebacterium türleri normal flora elemanı olsa da, giderek artan sayıda çalışmalarda gösterildiği üzere hastalık yapıcı potansiyelleri göz önünde bulundurulmalı, klinik örneklerden izole edildiklerinde kontaminant olarak düşünülüp etken atlanılmamalıdır. Ayrıca korineform bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması hastane ve hasta popülasyonuna göre veri tabanı oluşturulması açısından son derece önemlidir. *Corynebacterium* türlerinde

gelişmekte olan antibiyotik direnci, korineform bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasını ve antimikrobiyal direnç paternlerinin sürekli izlenmesini gerekli kılmıştır.

Kültürlerde üreyen bakterilerin hızlı ve doğru tanısının yapılması, hastaya uygulanacak olan tedavinin yönlendirilmesi açısından oldukça önemlidir. Günümüzde hızlı tanı amacıyla mikrobiyoloji laboratuvarlarında otomatize sistemlerin kullanımı oldukça yaygınlaşmış ve pek çok merkezde konvansiyonel yöntemlerin yerini almıştır. Ancak otomatize sistemlerin de eksiklikleri bulunmaktadır. Çalışmamızda vurgulandığı üzere, hızlı tanı amaçlı kullanılan otomatize sistem sonuçları mutlaka konvansiyonel testlerle doğrulanmalıdır. Özetle; çalışma sonucunda otomatize sistemlerle konvansiyonel yöntemlerin birlikte kullanılmasının doğru tanımlama için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma ile kontaminant olarak düşünülüp kolaylıkla atlanabilen bu bakterilerin etken olabildiğine dikkat çekilmek istenmiştir. Hastaların bu bakterilere bağlı enfeksiyonlardan kaybedilmesinin veya hastanede kalış süresi uzaması, buna bağlı hastane enfeksiyonu bulaşma riski ve hem morbidite hem de tedavi maliyeti açısından daha büyük sorunlar çıkmasını engellemek amacıyla hızlı ve doğru tanı için çeşitli tanımlama yöntemlerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Ayrıca izole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık profilleri çalışılmış olup türlere özgü antibiyotik duyarlılık profillerine katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Bitirgen M. *Corynebacterium diphtheria* ve Diğer *Corynebacterium* Türleri. Topçu AW, Söyletir G ve Doğanay M (Editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul; 2081-2089, 2008.
2. Funke G, Bernard KA ve Çöplü N, (çeviren). Korineform Gram-Pozitif Çomaklar. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML ve ark. (Editörler). Klinik Mikrobiyoloji. Atlas Kitapçılık: Ankara; 485-514, 2009.
3. Euzéby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Corynebacterium*. 2013.
4. Hollis DG ve Weaver RE. Gram-positive organisms: a guide to identification. (Editörler). Special Bacteriology Section, Centers for Disease Control. Atlanta, 1981.
5. Riegel P, De Briel D, Prévost G, Jehl F ve ark. 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; 43(2): 287-292, 1993.
6. Renaud F, Gregory A, Barreau C, Aubel D ve ark. Identification of *Turicella otitidis* isolated from a patient with otorrhea associated with surgery: differentiation from *Corynebacterium afermentans* and *Corynebacterium auris*. Journal of clinical microbiology; 34(10): 2625-2627, 1996.
7. Funke G, Lawson PA ve Collins MD. *Corynebacterium mucifaciens* sp. nov., an unusual species from human clinical material. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 47(4): 952-957, 1997.
8. Coyle MB ve Lipsky B. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. Clinical Microbiology Reviews; 3(3): 227-246, 1990.
9. Balci I, Ekşi F ve Bayram A. Coryneform bacteria isolated from blood cultures and their antibiotic susceptibilities. Journal of international medical research; 30(4): 422-427, 2002.
10. Yenen OŞ, (çeviren). Aerop Sporsuz Gram Pozitif Çomaklar: *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Actinomyces* ve İlişkili Patojenler. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA ve ark. (Editörler). Jawetz, Melnick ve Adelberg-Tıbbi Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul; 187-197, 2015.
11. Goodfellow M ve Minnikin DE. Introduction to chemosystematics. Goodfellow M ve Minnikin DE (Editörler). Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press: London; 1-15, 1985.
12. Collins MD, Smida J, Dorsch M ve Stackebrandt E. *Tsukamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 38(4): 385-391, 1988.
13. Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge JE ve Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clinical microbiology reviews; 10(1): 125-159, 1997.

14. Lindenmann K, Von-Graevenitz A ve Funke G. Evaluation of the Biolog system for the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. *Medical Microbiology Letters*; 4(6): 287-296, 1995.
15. Kämpfer P. Differentiation of *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., and related organisms by using fluorogenic substrates. *Journal of clinical microbiology*; 30(5): 1067-1071, 1992.
16. Lechevalier MP ve Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 20(4): 435-443, 1970.
17. Bernard KA, Bellefeuille M ve Ewan EP. Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. *Journal of clinical microbiology*; 29(1): 83-89, 1991.
18. De Briel D, Couderc F, Riegel P, Jehl F ve ark. High-performance liquid chromatography of corynomycolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and related organisms. *Journal of clinical microbiology*; 30(6): 1407-1417, 1992.
19. Graevenitz A, Punter V, Gruner E, Pfyffer G ve ark. Identification of coryneform and other Gram positive rods with several methods. *APMIS*; 102(16): 381-389, 1994.
20. Vaneechoutte M, Riegel P, De Briel D, Monteil H ve ark. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. *Research in microbiology*; 146(8): 633-641, 1995.
21. Koneman EW, Janda W, Winn JW, Allen S ve ark. *Aerobic and Facultative gram-Positive Bacilli* (Chapter 14). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA; 2006.
22. Funke G ve Bernard KA. Genus *Corynebacterium*, Lehmann and Neumann 1896. Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ ve ark. (Editörler). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer New York Dordrecht Heidelberg: Londra; 245-289, 2012.
23. Funke G, Lawson PA ve 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*; 45(4): 735-739, 1995.
24. 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*; 33(3): 759-761, 1995.
25. Früh M, von Graevenitz A ve Funke G. Use of second-line biochemical and susceptibility tests for the differential identification of coryneform bacteria. *Clinical microbiology and infection*; 4(6): 332-338, 1998.
26. Kumari P, Tyagi A, Marks P ve Kerr K. *Corynebacterium afermentans* spp. *afermentans* sepsis in a neurosurgical patient. *Journal of Infection*; 35(2): 201-202, 1997.

27. Dykhuizen RS, Douglas G, Weir J ve Gould IM. *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*: multiple abscess formation in brain and liver. Scandinavian journal of infectious diseases; 27(6): 637-639, 1995.
28. Minkin R ve Shapiro JM. *Corynebacterium afermentans* lung abscess and empyema in a patient with human immunodeficiency virus infection. Southern medical journal; 97(4): 395-398, 2004.
29. Graevenitz A, Osterhout G ve Dick J. Grouping of some clinically relevant Gram positive rods by automated fatty acid analysis. APMIS; 99(16): 147-154, 1991.
30. Cantarelli VV, Brodt TC, Secchi C, Inamine E ve ark. Fatal case of bacteremia caused by an atypical strain of *Corynebacterium mucifaciens*. Brazilian Journal of Infectious Diseases; 10(6): 416-418, 2006.
31. Djossou F, Bézian MC, Moynet D, Le Flèche-Matéos A ve ark. *Corynebacterium mucifaciens* in an immunocompetent patient with cavitary pneumonia. BMC infectious diseases; 10(1): 355, 2010.
32. Funke G, Pfyffer GE ve Von Graevenitz A. A hitherto undescribed coryneform bacterium isolated from patients with otitis media. Medical Microbiology Letters; 2(4): 183-190, 1993.
33. Simonet M, De Briel D, Boucot I, Minck R ve ark. Coryneform bacteria isolated from middle ear fluid. Journal of clinical microbiology; 31(6): 1667-1668, 1993.
34. Funke G, Stubbs S, Altwegg M, Carlotti A ve ark. *Turicella otitidis* gen. nov., sp. nov., a coryneform bacterium isolated from patients with otitis media. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 44(2): 270-273, 1994.
35. Funke G, Pünter V ve Von Graevenitz A. Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy; 40(12): 2874-2878, 1996.
36. Riegel P, Ruimy R, Christen R ve Monteil H. Species identities and antimicrobial susceptibilities of corynebacteria isolated from various clinical sources. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 15(8): 657-662, 1996.
37. Loiez C, Wallet F, Fruchart A, Husson MO ve ark. *Turicella otitidis* in a bacteremic child with acute lymphoblastic leukemia. Clinical Microbiology and Infection; 8(11): 758-759, 2002.
38. Reynolds SJ, Behr M ve McDonald J. *Turicella otitidis* as an unusual agent causing a posterior auricular abscess. Journal of clinical microbiology; 39(4): 1672, 2001.
39. Dana A, Fader R ve Sterken D. *Turicella otitidis* mastoiditis in a healthy child. The Pediatric infectious disease journal; 20(1): 84-85, 2001.
40. Riegel P, De Briel D, Prévost G, Jehl F ve ark. Proposal of *Corynebacterium propinquum* sp. nov. for *Corynebacterium* group ANF-3 strains. FEMS microbiology letters; 113(2): 229-234, 1993.
41. Pascual C, Lawson PA, Farrow JA, Gimenez MN ve ark. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 45(4): 724-728, 1995.

42. Petit P, Bok J, Thompson J, Buiting A ve ark. Native-valve endocarditis due to CDC coryneform group ANF-3: report of a case and review of corynebacterial endocarditis. *Clinical infectious diseases*; 19(5): 897-901, 1994.
43. Morris A ve Guild I. Endocarditis due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: five case reports, review, and antibiotic susceptibilities of nine strains. *Review of Infectious Diseases*; 13(5): 887-892, 1991.
44. Izurieta HS, Strebel PM, Youngblood T, Hollis DG ve ark. Exudative pharyngitis possibly due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, a new challenge in the differential diagnosis of diphtheria. *Emerging infectious diseases*; 3(1): 65, 1997.
45. Collins MD, Burton RA ve Jones D. *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS microbiology letters*; 49(3): 349-352, 1988.
46. Barreau C, Bimet F, Kiredjian M, Rouillon N ve ark. Comparative chemotaxonomic studies of mycolic acid-free coryneform bacteria of human origin. *Journal of clinical microbiology*; 31(8): 2085-2090, 1993.
47. Funke G, Lawson PA, Bernard KA ve Collins MD. Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *Journal of clinical microbiology*; 34(5): 1124-1128, 1996.
48. Riegel P, Ruimy R, De Briel D, Prevost G ve ark. *Corynebacterium argentoratense* sp. nov., from the human throat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 45(3): 533-537, 1995.
49. Funke G, Bernard KA, Bucher C, Pfyffer GE ve ark. *Corynebacterium glucuronolyticum* sp. nov. isolated from male patients with genitourinary infections. *Medical Microbiology Letters*; 4(4): 204-215, 1995.
50. Riegel P, Ruimy R, De Briel D, Prevost G ve ark. *Corynebacterium seminale* sp. nov., a new species associated with genital infections in male patients. *Journal of clinical microbiology*; 33(9): 2244-2249, 1995.
51. Collins MD. Reclassification of *Bacterionema matruchotii* (Mendel) in the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium matruchotii* comb. nov. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*; 3(3): 364-367, 1982.
52. Wilhelmus KR, Robinson NM ve Jones DB. *Bacterionema matruchotii* ocular infections. *American journal of ophthalmology*; 87(2): 143-147, 1979.
53. Dent VE ve Williams RA. Chemotaxonomic identity of *Corynebacterium matruchotii* from animal and human dental plaques. *Current Microbiology*; 15(5): 273-276, 1987.
54. Golledge C ve Phillips G. *Corynebacterium minutissimum* infection. *Journal of Infection*; 23(1): 73-76, 1991.
55. Collins MD ve Jones D. *Corynebacterium minutissimum* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 33(4): 870-871, 1983.

56. Riegel P, Ruimy R, De Briel D, Prévost G ve ark. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev. FEMS microbiology letters; 126(3): 271-276, 1995.
57. De Carpentier J, Flanagan P, Singh I, Timms M ve ark. Nasopharyngeal *Corynebacterium ulcerans*: a different diphtheria. The Journal of Laryngology & Otology; 106(09): 824-826, 1992.
58. Dessau R, Brandt-Christensen M, Jensen O ve Tonnesen P. Pulmonary nodules due to *Corynebacterium ulcerans*. European Respiratory Journal; 8(4): 651-653, 1995.
59. Neubauer M, Šourek J, Rýc M, Boháček J ve ark. *Corynebacterium accolens* sp. nov., a gram-positive rod exhibiting satellitism, from clinical material. Systematic and applied microbiology; 14(1): 46-51, 1991.
60. Claeys G, Vanhouteghem H, Riegel P, Wauters G ve ark. Endocarditis of native aortic and mitral valves due to *Corynebacterium accolens*: report of a case and application of phenotypic and genotypic techniques for identification. Journal of clinical microbiology; 34(5): 1290-1292, 1996.
61. Smith L ve Locksley R. The lowly diphtheroid-non-diphtheria *Corynebacterium* infections in humans. Western Journal of Medicine; 137(1): 45-52, 1982.
62. Lipsky BA, Goldberger AC, Tompkins LS ve Plorde JJ. Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. Review of Infectious Diseases; 4(6): 1220-1235, 1982.
63. Collins MD, Goodfellow M ve Minnikin DE. A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. Microbiology; 128(1): 129-149, 1982.
64. Collins MD ve Cummins CS. Genus *Corynebacterium*, Lehmann and Neumann 1896. Sneath HA, Mair NS, Sharpe ME ve Holt JG (Editörler). Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams & Wilkins Co.: Baltimore,
65. Jackman PJ, Pitcher DG, Pelczynska S ve Borman P. Classification of corynebacteria associated with endocarditis (group JK) as *Corynebacterium jeikeium* sp. nov. Systematic and applied microbiology; 9(1-2): 83-90, 1987.
66. Moore LS, Schneider B ve Holloway WJ. Minimal inhibitory concentrations and minimal bactericidal concentrations of quinupristin/dalfopristin against clinical isolates of *Corynebacterium jeikeium* and *Listeria monocytogenes*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 39(suppl 1): 67-68, 1997.
67. Johnson AP, Warner M, Malnick H ve Livermore DM. Activity of the oxazolidinones AZD2563 and linezolid against *Corynebacterium jeikeium* and other *Corynebacterium* spp. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 51(3): 745-747, 2003.
68. Rosato AE, Lee BS ve Nash KA. Inducible Macrolide Resistance in *Corynebacterium jeikeium*. Antimicrobial agents and chemotherapy; 45(7): 1982-1989, 2001.
69. Marshall R ve Johnson E. *Corynebacteria*: incidence among samples submitted to a clinical laboratory for culture. Medical laboratory sciences; 47(1): 36-41, 1990.
70. Larson EL, McGinley KJ, Leyden JJ, Cooley ME ve ark. Skin colonization with antibiotic-resistant (JK group) and antibiotic-sensitive lipophilic diphtheroids in hospitalized and normal adults. Journal of Infectious Diseases; 153(4): 701-706, 1986.

71. van der Lelie H, Hall ML-V, Mertens M, Van Zaanen HC ve ark. *Corynebacterium* CDC group JK (*Corynebacterium jeikeium*) sepsis in haematological patients: a report of three cases and a systematic literature review. *Scandinavian journal of infectious diseases*; 27(6): 581-584, 1995.
72. Riegel P, De Briel D, Prévost G, Jehl F ve ark. Genomic diversity among *Corynebacterium jeikeium* strains and comparison with biochemical characteristics and antimicrobial susceptibilities. *Journal of clinical microbiology*; 32(8): 1860-1865, 1994.
73. Funke G, Pagano-Niederer M ve Bernauer W. *Corynebacterium macginleyi* has to date been isolated exclusively from conjunctival swabs. *Journal of clinical microbiology*; 36(12): 3670-3673, 1998.
74. Joussen AM, Funke G, Joussen F ve Herberitz G. *Corynebacterium macginleyi*: a conjunctiva specific pathogen. *British journal of ophthalmology*; 84(12): 1420-1422, 2000.
75. Pitcher D, Soto A, Soriano F ve Valero-Guillén P. Classification of coryneform bacteria associated with human urinary tract infection (group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 42(1): 178-181, 1992.
76. Nieto E, Vindel A, Valero-Guillen P, Saez-Nieto J ve ark. Biochemical, antimicrobial susceptibility and genotyping studies on *Corynebacterium urealyticum* isolates from diverse sources. *Journal of medical microbiology*; 49(8): 759-763, 2000.
77. Soriano F, Rodriguez-Tudela J, Fernández-Roblas R, Aguado J ve ark. Skin colonization by *Corynebacterium* groups D2 and JK in hospitalized patients. *Journal of clinical microbiology*; 26(9): 1878-1880, 1988.
78. Nadal D, Schwöbel M ve Von Graevenitz A. *Corynebacterium* group D2 and urolithiasis in a boy with megacalycosis. *Infection*; 16(4): 245-247, 1988.
79. Aguado JM, Morales JM, Salto E, Lumbreras C ve ark. Encrusted pyelitis and cystitis by *Corynebacterium urealyticum* (CDC group D2): a new and threatening complication following renal transplant. *Transplantation*; 56(3): 617-622, 1993.
80. Ena J, Berenguer J, Pelaez T ve Bouza E. Endocarditis caused by *Corynebacterium* group D2. *Journal of Infection*; 22(1): 95-96, 1991.
81. Marshall R, Routh K ve MacGowan A. *Corynebacterium* CDC group D2 bacteraemia. *Journal of clinical pathology*; 40(7): 813, 1987.
82. Soriano F, Ponte C, Ruiz P ve Zapardiel J. Non-urinary tract infections caused by multiply antibiotic-resistant *Corynebacterium urealyticum*. *Clinical infectious diseases*; 17(5): 890-891, 1993.
83. Chomar M, Breton P ve Dubost J. Osteomyelitis due to *Corynebacterium* group D2. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; 10(1): 43-43, 1991.
84. Saavedra J, Rodriguez J, Fernandez-Jurado A, Vega M ve ark. A necrotic soft-tissue lesion due to *Corynebacterium urealyticum* in a neutropenic child. *Clinical infectious diseases*; 22(5): 851-52, 1996.

85. Digenis G, Dombros N, Devlin R, Rosa S ve ark. Struvite stone formation by *Corynebacterium* group F1: a case report. *The Journal of urology*; 147(1): 169, 1992.
86. Williams DY, Selepak ST ve Gill VJ. Identification of clinical isolates of nondiphtherial *Corynebacterium* species and their antibiotic susceptibility patterns. *Diagnostic microbiology and infectious disease*; 17(1): 23-28, 1993.
87. Quinn A, Comaish J ve Pedler S. Septic arthritis and endocarditis due to group G-2 coryneform organism. *The Lancet*; 338(8758): 62-63, 1991.
88. Kerr JR, Murphy PG ve Doherty CC. *Corynebacterium* CDC group G1 infection in a patient receiving maintenance haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*; 10(4): 559-559, 1995.
89. Furness G ve Evangelista AT. Infection of a nonspecific urethritis patient and his consort with a pathogenic species of nonspecific urethritis *Corynebacteria*, *Corynebacterium genitalium*, N. SP. *Investigative urology*; 14(3): 202-205, 1976.
90. Furness G, Sambury S ve Evangelista AT. *Corynebacterium pseudogenitalium* sp. nov. Commensals of the human male and female urogenital tracts. *Investigative urology*; 16(4): 292-295, 1979.
91. Brown S, Lanéelle MA, Asselineau J ve Barksdale L. Description of *Corynebacterium tuberculostearicum* sp. nov., a leprosy-derived *Corynebacterium*. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*; 135(3): 251-267, 1984.
92. Arda M. Boyalar ve Boyama Metotları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Temel Mikrobiyoloji 1 Ders Notları.
93. Hardy J. Gram's serendipitous stain. *Hardy Diagnostics*: 2008.
94. Gram boyama (Bakteriyel Patojenlerin Mikroskopik İncelemesi). *Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS) T.C.Sağlık Bakanlığı*; 1-22, 2015.
95. Vashist H, Sharma D ve Gupta A. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare journal of life science*; 1(1): 1-7, 2013.
96. Koneman EW, Janda W, Winn JW, Allen S ve ark. Gram-Positive Cocci (Chapter 12). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA; 624-671, 2006.
97. York MK ve Church DL. Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. Catalase Test. York MK, Traylor MM, Hardy J ve Henry M (Editörler). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. ASM Press: Washington D.C; 3.17.10, 2010.
98. Reiner K. Catalase Test Protochols. *American Society for Microbiology*: 2010.
99. Christie R, Atkins N ve Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science*; 22(3): 1944.
100. Tiong Kiong L. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Volume 3, Fruits. *Springer Netherlands*: New Delhi, India; 802, 2013.

101. Koneman EW, Janda W, Winn JW, Allen S ve ark. Charts. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA; 1442-1535, 2006.
102. Barksdale L, Linder R, Sulea IT ve Pollice M. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. Journal of clinical microbiology; 13(2): 335-343, 1981.
103. Hansen MV ve Elliott LP. New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test. Journal of clinical microbiology; 12(4): 617, 1980.
104. McKellar R. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. Applied and environmental microbiology; 60(12): 4219, 1994.
105. Litwin CM ve Johnson JM. Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene (*cfa*) of *Bartonella henselae*. Infection and immunity; 73(7): 4205-4213, 2005.
106. Darling CL. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. Journal of clinical microbiology; 1(2): 171-174, 1975.
107. Hanson A. CAMP test protocols. American Society for Microbiology: 2006.
108. Weckman BG ve Catlin BW. Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. Journal of bacteriology; 73(6): 747, 1957.
109. Jeffries CD, Holtman DF ve Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. Journal of Bacteriology; 73(4): 590, 1957.
110. Isenberg HD ve Garcia LS. DNase Test-Rapid Thermonuclease Test. Isenberg HD (Editörler). Clinical Microbiology Procedures Handbook ASM press: Washington; 527-529, 2007.
111. Smith P, Hancock G ve Rhoden D. Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria. Applied microbiology; 18(6): 991-993, 1969.
112. Schreier JB. Modification of deoxyribo-nuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. American journal of clinical pathology; 51(6): 711-16, 1969.
113. Acharya T. Deoxyribonuclease (DNase) Test: Principle, Procedure and results. MicrobeOnline: 2014.
114. Wieser A, Schneider L, Jung J ve Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Applied microbiology and biotechnology; 93(3): 965-974, 2012.
115. Anhalt JP ve Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Analytical Chemistry; 47(2): 219-225, 1975.
116. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB ve ark. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix assisted laser desorption/ionization with time of flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry; 10(10): 1227-1232, 1996.

117. Beşergil B. Kütle Spektrometresi. Enstrümental Analiz, Temel İlkeler.
118. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A ve Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*; 16(11): 1604-1613, 2010.
119. De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R ve ark. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *The Journal of Infection in Developing Countries*; 8(09): 1081-1088, 2014.
120. Febbraro F, Rodio DM, Puggioni G, Antonelli G ve ark. MALDI-TOF MS Versus VITEK 2: Comparison of Systems for the Identification of Microorganisms Responsible for Bacteremia. *Current microbiology*; 73(6): 843-850, 2016.
121. Croxatto A, Prod'hom G ve Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*; 36(2): 380-407, 2012.
122. Pincus DH. Microbial identification using the bioMérieux VITEK 2 System. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association: 2006.
123. Hata DJ, Hall L, Fothergill AW, Larone DH ve ark. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. *Journal of clinical microbiology*; 45(4): 1087-1092, 2007.
124. VITEK 2 Systems Ürün Bilgisi. bioMérieux, Inc.: Durham, North Carolina / USA; 1-278, 2010.
125. Felmingham D ve Brown DFJ. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 48(suppl 1): 81-85, 2001.
126. Woese CR, Kandler O ve Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 87(12): 4576-4579, 1990.
127. Busse HJ, Denner EB ve Lubitz W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of biotechnology*; 47(1): 3-38, 1996.
128. Koneman EW, Janda W, Winn JW, Allen S ve ark. *Medical Bacteriology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence (Chapter 5)*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA; 2006.
129. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS ve Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*; 19(2): 259-282, 2006.
130. Tindall BJ, Rosselló-Mora R, Busse H-J, Ludwig W ve ark. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 60(1): 249-266, 2010.
131. Stackebrandt E ve Goebel B. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in

- bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 44(4): 846-849, 1994.
132. Kirby BM, Everest GJ ve Meyers PR. Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella*. *Antonie van Leeuwenhoek*; 97(2): 131-142, 2010.
133. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-second edition. CLSI document M45- A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2011.
134. Cundell AM. Microbial Ecology of the Human Skin. *Microbial ecology*: 1-8, 2016.
135. Huang Y, Yang B ve Li W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clinical Microbiology and Infection*; 22(7): 643. e7-643. e12, 2016.
136. Imamura T, Sato M, Go H, Ogasawara K ve ark. The Microbiome of the Lower Respiratory Tract in Premature Infants with and without Severe Bronchopulmonary Dysplasia. *American journal of perinatology*; 34(01): 80-87, 2017.
137. Kaźmierczak AK, Szarapińska-Kwaszewska JK ve Szewczyk EM. Opportunistic coryneform organisms—residents of human skin. *Pol J Microbiol*; 54(1): 27-35, 2005.
138. Lagrou K, Verhaegen J, Janssens M, Wauters G ve ark. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance, and antibiotic susceptibility. *Diagnostic microbiology and infectious disease*; 30(1): 7-15, 1998.
139. Babay HA ve Kambal AM. Isolation of coryneform bacteria from blood cultures of patients at a University Hospital in Saudi Arabia. *Saudi medical journal*; 25(8): 1073-1079, 2004.
140. Bayram A, Eksi F ve Balci I. Resistance problem of coryneform bacteria isolated from intensive care unit samples. *Res J Microbiol*; 1: 136-41, 2006.
141. Weinstein M. Contaminated or not? Guidelines for interpretation of positive blood cultures. *WebM&M*. January: 2008.
142. Kaya A, Tekkesin AI, Kalenderoglu K ve Alper AT. An unusual etiological agent of implantable cardioverter device endocarditis: *Corynebacterium mucifaciens*. *Indian heart journal*; 68(2): 190-191, 2016.
143. Ergin Ç, Kaleli İ, Serin S, Cevahir N ve ark. Yoğun bakım hastalarının trakeal aspirasyon örneklerinden izole edilen *Corynebacterium striatum* suşları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*; 33: 329-332, 2003.
144. Tauch A, Kassing F, Kalinowski J ve Pühler A. The *Corynebacterium xerosis* Composite Transposon Tn5432 Consists of Two Identical Insertion Sequences, Designated IS1249, Flanking the Erythromycin Resistance Gene *ermCX*. *Plasmid*; 34(2): 119-131, 1995.
145. Leonard RB, Nowowiejski DJ, Warren JJ, Finn DJ ve ark. Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of *Corynebacterium striatum* in intensive care units. *Journal of clinical microbiology*; 32(1): 164-169, 1994.

146. Brandenburg AH, Van Belkum A, Van Pelt C, Bruining HA ve ark. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *Journal of clinical microbiology*; 34(9): 2089-2094, 1996.
147. Martínez-Martínez L, Suárez A, Rodríguez-Baño J, Bernard K ve ark. Clinical significance of *Corynebacterium striatum* isolated from human samples. *Clinical Microbiology and Infection*; 3(6): 634-639, 1997.
148. Kerry-Williams S ve Noble W. Plasmids in group JK coryneform bacteria isolated in a single hospital. *Journal of hygiene*; 97(02): 255-263, 1986.
149. Khabbaz RF, Kaper JB, Moody MR, Schimpff SC ve ark. Molecular epidemiology of group JK *Corynebacterium* on a cancer ward: lack of evidence for patient-to-patient transmission. *Journal of Infectious Diseases*; 154(1): 95-99, 1986.
150. Pitcher D, Johnson A, Allerberger F, Woodford N ve ark. An investigation of nosocomial infection with *Corynebacterium jeikeium* in surgical patients using a ribosomal RNA gene probe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*; 9(9): 643-648, 1990.
151. Chandra R, Puthukkichal DR, Suman E ve Mangalore SK. Diphtheroids-Important Nosocomial Pathogens. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*; 12(10): DC28-DC31, 2016.
152. Ramana K, Vikram G, PadmaWali P, Anand K ve ark. Non Diphtheritic *Corynebacteria* (NDC) and Their Clinical Significance: Clinical Microbiologist's Perspective. *American Journal of Epidemiology and Infectious Disease*; 2(3): 83-87, 2014.
153. Szemraj M, Kwaszewska A, Pawlak R ve Szewczyk EM. Macrolide, lincosamide, and streptogramin B resistance in lipophilic corynebacteria inhabiting healthy human skin. *Microbial Drug Resistance*; 20(5): 404-409, 2014.
154. Hodgson A, Krywult J ve Radford AJ. Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene from the *Corynebacterium* plasmid pNG2. *Nucleic acids research*; 18(7): 1891, 1990.
155. Verroken A, Bauraing C, Deplano A, Bogaerts P ve ark. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clinical Microbiology and Infection*; 20(1): 44-50, 2014.
156. Renom F, Garau M, Rubí M, Ramis F ve ark. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of clinical microbiology*; 45(6): 2064-2067, 2007.
157. Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S ve ark. Emergence of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. *Diagnostic microbiology and infectious disease*; 54(2): 109-114, 2006.
158. Alatom AA, Cazanave CJ, Cunningham SA, Ihde SM ve ark. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*; 50(1): 160-163, 2012.

159. Konrad R, Berger A, Huber I, Boschert V ve ark. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. *Euro Surveill*; 15(43): 19699, 2010.
160. Gaillot O, Blondiaux N, Loïez C, Wallet F ve ark. Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine bacterial identification. *Journal of clinical microbiology*; 49(12): 4412-4412, 2011.
161. Rennie RP, Brosnikoff C, Turnbull L, Reller LB ve ark. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. *Journal of clinical microbiology*; 46(8): 2646-2651, 2008.
162. Surdulescu S, Utamsingh D ve Shekar R. Phlebotomy teams reduce blood-culture contamination rate and save money. *Clinical performance and quality health care*; 6(2): 60-62, 1997.
163. Weinbaum FI, Lavie S, Danek M, Sixsmith D ve ark. Doing it right the first time: quality improvement and the contaminant blood culture. *Journal of Clinical Microbiology*; 35(3): 563-565, 1997.
164. Weinstein MP. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *Journal of clinical microbiology*; 41(6): 2275-2278, 2003.
165. Strand CL, Wajsbort RR ve Sturmman K. Effect of iodophor vs iodine tincture skin preparation on blood culture contamination rate. *Jama*; 269(8): 1004-1006, 1993.
166. Little JR, Murray PR, Traynor PS ve Spitznagel E. A randomized trial of povidone-iodine compared with iodine tincture for venipuncture site disinfection: effects on rates of blood culture contamination. *The American journal of medicine*; 107(2): 119-125, 1999.
167. Everts RJ, Vinson EN, Adholla PO ve Reller LB. Contamination of catheter-drawn blood cultures. *Journal of clinical microbiology*; 39(9): 3393-3394, 2001.
168. Spitalnic SJ, Woolard RH ve Mermel LA. The significance of changing needles when inoculating blood cultures: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*; 21(5): 1103-1306, 1995.
169. Fernández PA, Palop BB, Moreno LJ ve Fernández-Nogueras JF. Cervical abscess due to *Turicella* otitidis. *Acta otorrinolaringologica espanola*; 50(4): 333-335, 1999.
170. von Graevenitz A ve Funke G. *Turicella* otitidis and *Corynebacterium auris*: 20 years on. *Infection*; 42(1): 1-4, 2014.
171. Fernandez-Roblas R, Adames H, Martin-de-Hijas N, Almeida DG ve ark. In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. *International journal of antimicrobial agents*; 33(5): 453-455, 2009.
172. Bernard K ve Pacheco AL. In vitro activity of 22 antimicrobial agents against *Corynebacterium* and *Microbacterium* species referred to the Canadian National Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*; 37(23): 187-198, 2015.
173. Gómez-Garcés J-L, Alos J-I ve Tamayo J. In vitro activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria. *International journal of antimicrobial agents*; 29(6): 688-692, 2007.

174. Boumghar-Bourtchai L, Chardon H, Malbruny B, Mezghani S ve ark. Resistance to macrolides by ribosomal mutation in clinical isolates of *Turicella otitidis*. *International journal of antimicrobial agents*; 34(3): 274-277, 2009.



7. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzincan’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini aynı ilde çeşitli devlet okullarında tamamladı. 2002 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi’ni kazandı. 2008 yılında tıp fakültesinden mezun oldu. 2008-2011 yılları arasında Gümüşhane, Ankara ve Diyarbakır illerinde pratisyen hekim olarak görev yaptı. 2012 yılı Nisan ayında yapılan Tıpta Uzmanlık Sınavında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji bölümünü kazandı ve araştırma görevlisi doktor olarak çalışmaya başladı. 2016 yılı Eylül ayında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’na mazeretsiz yatay geçiş yaptı ve halen bu bölümde uzmanlık eğitimine devam etmektedir. Evli ve iki çocuk annesidir.