

Corynebacterium striatum İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları, Biyofilm Üretimi ve Klonal Analizlerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Antibiotic Susceptibility, Biofilm Production and Clonal Analysis of *Corynebacterium striatum* Isolates

Fatma ÖCALAN¹(ID), İpek MUMCUOĞLU¹(ID), Özlem ÜNALDI²(ID), Zekiye BAKKALOĞLU²(ID), Bedia DİNÇ¹(ID)

¹ Ankara Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

¹ Ankara City Hospital, Laboratory of Medical Microbiology, Ankara, Türkiye.

² T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Ankara.

² TR Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Department of Microbiology Reference Laboratory and Biological Products, Ankara, Türkiye.

Makale Atfı: Öcalan F, Mumcuoğlu İ, Ünalı Ö, Bakkaloğlu Z, Dinç B. *Corynebacterium striatum* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları, biyofilm üretimi ve klonal analizlerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2023;57(1):1-13.

ÖZ

Bu çalışmada, enfeksiyon etkeni ya da kontaminasyon/kolonizasyon olarak kabul edilen *Corynebacterium striatum* izolatlarının klinik ve mikrobiyolojik özellikleri, antimikrobiyal duyarlılık sonuçları, biyofilm oluşturma kabiliyetleri ve genotipik özellikleri karşılaştırılarak bu izolatların klinik önemini etkileyen olası faktörlerin saptanması amaçlanmıştır. Laboratuvara gelen çeşitli klinik örneklerde *C.striatum* üremesi olan hastaların; ilgili hekimi tarafından, muayene bulguları ve diğer laboratuvar parametreleri değerlendirilmiş ve üreyen izolatlar enfeksiyon etkeni veya kontaminasyon/kolonizasyon olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya 29'u enfeksiyon, 29'u kontaminasyon/kolonizasyon olarak kabul edilen 58 izolat dahil edilmiştir. Hastaların hastanede yatış süresi, altta yatan hastalık varlığı [diyabetes mellitus (DM), nörolojik hastalık, iskemik kalp hastalığı, kronik böbrek hastalığı, solid tümör], son bir ay içerisinde cerrahi operasyon durumu ve son üç ay içerisinde antibiyotik kullanım durumu incelenmiştir. Tür düzeyinde tanımlamalar MALDI-TOF MS (Bruker/Almanya) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri disk difüzyon ve gradient difüzyon yöntemiyle yapılmış, EUCAST standartlarına göre değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumu, negatif yüklü polistiren yüzeylerde 96 kuyucuklu mikropiplarda belirlenmiştir. Klonal değerlendirme PFGE yöntemiyle Xba1 enzimi kullanılarak yapılmıştır. Çalışmaya alınan iki hasta grubunda demografik özellikler açısından fark olmadığı izlenmiştir. Poliklinik hastalarından elde edilen *C.striatum* izolatlarının daha çok kontaminasyon/kolonizasyon grubunda bulunduğu görülmüştür. İki hasta grubunda altta yatan hastalık varlığı açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Nörolojik hastalığı olan hastaların klinik örneklerde üreyen *C.striatum* izolatlarının daha çok enfeksiyon etkeni grubunda bulunduğu görülmüştür ($p=0.025$). Kültürde saf olarak üreyen *C.striatum* izolatlarının daha çok enfeksiyon etkeni grubunda bulunduğu görülmüştür ($p=0.001$). Biyofilm üretiminin enfeksiyon grubunda anlamlı şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0.015$). Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde her iki grupta da yaygın çok

ilaç direnci (ÇİD) olduğu izlenmiş ve gruplar arasında antimikrobiyal duyarlılık açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Çalışmada izolatların çok farklı PFGE paternleri gösterdiği ve klonal olarak birbiriyile ilişkili olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada *C.striatum*'un klinik öneminin değerlendirilmesinde hastaların demografik özellikleri ve komorbiditelerinin yol gösterici olmadığı görülmüştür. Biyofilm üretiminin *C.striatum* suşlarında yaygın bir virülans faktörü olduğu izlenmiştir. *C.striatum* suşlarında yaygın ÇİD saptanması nedeniyle gelecekte bu bakterinin tedavisinde güçlükler yaşanabileceği düşünülmüştür. Çalışma artan *C.striatum* enfeksiyonlarına yaklaşım, virülans faktörleri ve artan direnç konularına dikkat çekmek açısından katkı sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler: *Corynebacterium striatum*; antimikrobiyal direnç; biyofilm.

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the possible factors affecting the clinical importance of *Corynebacterium striatum* isolates, which were accepted as infectious or contamination/colonization agents, by comparing their clinical and microbiological characteristics, antimicrobial susceptibility results, biofilm forming abilities and genotypic characteristics. The patients with *C.striatum* growth in the clinical samples sent to the laboratory were evaluated as infection or contamination/colonization with the evaluation of the examination findings and other laboratory parameters by the relevant physician. This study included 58 isolates, 29 of which were considered as infection and 29 as contamination/colonization. Length of hospital stay, presence of underlying disease [diabetes mellitus (DM), neurological disease, ischemic heart disease, chronic kidney disease, solid tumor], surgical operation status in the last month, and antibiotic use in the last three months of the patients were examined. Identification of the bacterial type was made with MALDI-TOF MS (Bruker/Germany) system. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disc diffusion and gradient diffusion method and evaluated according to EUCAST standards. Biofilm production was determined in 96-well microtiter plates on negatively charged polystyrene surfaces. Clonal analyzes were performed by PFGE method using XbaI enzyme. It was observed that there was no difference in terms of demographic characteristics in the two patient groups included in the study. It was observed that *C.striatum* strains isolated from outpatients were mostly found in the contamination/colonization group. The presence of diabetes mellitus, ischemic heart disease, chronic kidney disease and solid tumor was not statistically different in the two patient groups. It was observed that *C.striatum* strains grown in the samples of patients with neurological disease were mostly found in the infectious agent group ($p=0.025$). It has been observed that *C.striatum* strains grown purely in culture were mostly found in the infectious agent group ($p=0.001$). Biofilm production was found to be significantly higher in the infectious agent group ($p=0.015$). In antimicrobial susceptibility tests, it was observed that there was widespread multidrug resistance (MDR) in both groups and there was no significant difference between the groups in terms of antimicrobial susceptibility. In our study, it was determined that the strains showed very different PFGE patterns and were not clonally related to each other. In this study, it was determined that the demographic characteristics and comorbidities of the patients were not helpful in evaluating the clinical significance of *C.striatum*. Biofilm production was observed to be a common virulence factor in *C.striatum* strains. It was thought that there may be difficulties in the treatment of *C.striatum* in the future due to the widespread MDR detection among this bacterium strains. Our study contributes to draw attention to the increase in *C.striatum* infections, resistance and virulence factors.

Keywords: *Corynebacterium striatum*; antimicrobial resistance; biofilm.

GİRİŞ

Corynebacterium spp. aerobik, katalaz pozitif, spor oluşturmeyen, genellikle hareket-siz gram-pozitif basillerdir. Difteri etkeni dışındaki *Corynebacterium* türleri cilt ve müköz membranların mikrobiyotasında bulunur ve kültürlerden izole edilme durumunda genellikle kontaminasyon olarak kabul edilirler¹.

Son yıllarda laboratuvarlarda *Corynebacterium striatum* izolatlarının görülme sıklığında hızlı bir artışın olduğu dikkat çekmiştir. Konuyla ilişkili son on yıla ait literatür taraması

gerçekleştirildiğinde *C. striatum*'a bağlı meydana gelen enfeksiyonların artan sıklıkta bildirildiği görülmüştür. Bunlar hem bağışıklık sistemi baskılanmış hem de bağışıklık sistemi sağlam kişilerde görülen septisemi, artrit, vertebral osteomyelit, menenjit, endokardit, meme apsesi, peritonit, yara enfeksiyonları, prostetik eklem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlardır. Bunun yanı sıra *C. striatum* ile meydana gelen hastane kaynaklı salgınlar da bildirilmiştir^{2,3}.

C. striatum ile meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde doğru antibiyotiklerin kullanılabilmesi için in vitro antimikrobiyal duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesinin büyük önemi bulunmaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda *C. striatum* klinik izolatlarının farklı duyarlılık profillerine sahip olduğu görülmekle birlikte son yıllarda artan sıklıkla çok ilaca dirençli (ÇİD) *C. striatum* izolatları bildirilmiştir⁴. Çok ilaca dirençli *C. striatum* izolatlarıyla gerçekleştirilen genomik çalışmalar sonucunda bu mikroorganizmaların sağlık kurumları içinde klonal yayılım gösterebileceği saptanmıştır⁵⁻⁷. Bu çalışmalar sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonlarda da *C. striatum*'un önemli bir etken olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çeşitli araştırmalarda invaziv enfeksiyonu olan hastalardan elde edilen *C. striatum* izolatlarının biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir. Bu durum, mikroorganizmanın virülans faktörlerinden birinin biyofilm oluşumu olduğunu göstermektedir. Ancak, *C. striatum*'un biyofilm oluşturma kabiliyeti ile klinik enfeksiyon arasında bir ilişki olup olmadığı henüz bilinmemektedir^{2,8,9}. Kültürde üreme saptanması durumunda mikrobiyologların ya da hastayı takip eden klinisyen hekimin kültür sonucunu nasıl değerlendirmesi gerektiği konusu net değildir. Bu çalışmada enfeksiyon etkeni ya da kontaminasyon/kolonizasyon olarak kabul edilen *C. striatum* izolatlarının klinik ve mikrobiyolojik özellikleri, in vitro antimikrobiyal duyarlılık sonuçları, biyofilm oluşturma kabiliyetleri ve genotipik özellikleri karşılaştırılarak bu izolatların klinik önemini etkileyen olası faktörlerin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, SBÜ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 18.04.2019 ve Karar No: 2668/2019).

İzolatların Toplanması

Laboratuvara gelen çeşitli klinik örneklerde [yara (n= 23), trakeal aspirat (n= 23), balgam (n= 6), apse (n= 5), idrar (n= 1)] 1 Ocak-31 Mart 2019 tarihleri arasında *C. striatum* üremesi olan hastalarda muayene eden hekim tarafından tespit edilen bulgular ve diğer laboratuvar parametreleri değerlendirildi. Bakteri izolatları, enfeksiyon etkeni (n= 29) veya kontaminasyon/kolonizasyon (n= 29) olarak iki grup altında toplandı.

Epidemiyolojik ve Klinik Verilerin Toplanması

Hastaların tıbbi kayıtları gözden geçirilerek hastanede yatış süresi, altta yatan hastalık varlığı [diyabetes mellitus (DM), nörolojik hastalık, iskemik kalp hastalığı, kronik böbrek hastalığı, solid tümör], bir ay içerisinde cerrahi operasyon durumu ve son üç ay içerisinde antibiyotik kullanım durumu incelendi.

İzolatların Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya dahil edilen izolatlar tür düzeyinde matriks aracılı lazer desorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi [matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] Biotyper (Bruker, Almanya) ile tanımlandı. İzolatlar ileri çalışmalar yapılabilmek için gliserollü beyin-kalp infüzyon buyyonda -80°C'de saklandı. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlar Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi uygulandı. Disk difüzyon testi için penisilin (1 µg), siprofloksasin (5 µg), gentamisin (10 µg), vankomisin (5 µg), klindamisin (2 µg), tetrasiklin (30 µg), linezolid (10 µg), rifampin (5 µg) (Oxoid, Birleşik Krallık) diskleri kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen 58 izolatın 26 [rastgele seçilerek enfeksiyon etkeni (n= 13), kontaminasyon/kolonizasyon (n= 13) olarak kabul edilen izolatlar]'sına gradiyent difüzyon duyarlılık testi yapıldı. Gradiyent difüzyon duyarlılık testi için penisilin, siprofloksasin, gentamisin, vankomisin, klindamisin, linezolid (Oxoid, Birleşik Krallık) test şeritleri kullanıldı. Her iki yöntem için de %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β-NAD (nikotinamid adenin dinükleotit) eklenmiş Mueller-Hinton Fastidious (MH-F) (Becton Dickinson, New Jersey, ABD) agar plakları kullanıldı. Tüm plaklar 35 ± 1°C, %5-10 CO₂ içeren atmosferik ortamda 16-20 saat inkübasyonun ardından değerlendirildi. Tüm sonuçlar "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" kriterlerine göre değerlendirildi¹⁰.

Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

Biyofilm oluşumu, negatif yüklü polistren yüzeye sahip 96 kuyucuklu mikropaklarda çalışıldı. Beyin-kalp infüzyon buyyon içerisinde hazırlanmış 0.5 McFarland [1-2 X 10⁸ koloni oluşturan birim (kob)/mL] bakteri içeren süspansiyondan 200 µl 96 kuyucuklu mikropak kuyucuklarının her birine eklendi ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Sonra her kuyucuk iki kere 200 µl fosfat tamponlu serum fizyolojik ile yıkandı. Biyofilmler 200 µl %99'luk metanol ile beş dakika süre ile fikse edildi ve 200 µl %2'lik kristal viyole ile beş dakika boyandı. Uygulanan her basamağın sonunda kuyucuk içindeki reaktif, mikropaklar ters çevirilerek boşaltıldı. Daha sonra 160 µl %95'lik etanol her kuyucuğa eklendi ve etanol dökülmeden en kısa sürede mikropakların okunması gerçekleştirildi. Optik dansite 595 nm'de (OD₅₉₅) SpectraMax i3x Multi-mode Microplate Reader ile üç kez ölçüldü (Molecular Devices, ABD). Negatif kontrol olarak sadece beyin-kalp infüzyon buyyon, pozitif kontrol olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 suşu kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi Stepanovic ve arkadaşlarının çalışmasında¹¹ tanımlandığı şekilde yapıldı. Ölçümler OD₅₉₅'de üç kez yapıldıktan sonra test edilen tüm suşlar ve negatif kontrol için ortalama OD değeri hesaplandı. Daha sonra cut-off değeri (OD_c) oluşturuldu. OD_c değeri negatif kontrolün ortalama OD'sinin üç standart sapma (SD) üstü olarak tanımlandı.

$$[OD_c = \text{negatif kontrolün ortalama OD'si} + (3 \times \text{negatif kontrolün SD})]$$

Test edilen bir izolatın ortalama OD değeri OD_c'den büyük ise izolatın biyofilm oluşturduğu, küçük ise biyofilm oluşturmadığı kabul edildi.

Pulsed Field Jel Elektroforezi

'Pulsed field' jel elektroforez yöntemi daha önce literatürde tanımlandığı şekilde uygulandı¹². Bakteri hücre süspansiyonu %1'lik SeaKem® Gold Agarose (Lonza Rockland, USA) ile karıştırılarak "plug" kuyucukları hazırlandı. Hazırlanan "plug"lar lizis çözeltisinde 37°C'de bir gün bekletildi ve ardından 55°C'de bir gün proteinaz K çözeltisinde bekletildikten sonra yıkama işlemlerine geçildi. Pluglar her biri 30 dakika olmak koşuluyla dört kez TE (Tris-HCl, EDTA) ile yıkandı. Yıkamanın ardından kromozomal DNA 30 U XbaI (Fermantas Corporation, ABD) enzimi ile kesildi. Oluşan DNA parçaları %1'lik agaroz jelde, 0.5 X TBE (Trisma base, Borik asit, EDTA) tamponunda CHEF-DR III sistemi (Bio-Rad Laboratories, Belçika) kullanılarak başlangıç vuruş süresi 10 saniye, bitiş vuruş süresi 40 saniye, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 15°C, süre 24 saat olarak elektroforez yapıldı. Jeller 0.5 µg/mL etidyum bromür ile boyanıp Gellogic 2200 görüntüleme sistemi (Kodak Company, NY, ABD) kullanılarak DNA bantları değerlendirildi. BioNumerics version 7.5 yazılımı (Applied Maths, SintMaarten Latem, Belçika) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" yöntemi ve Dice benzerlik katsayısı kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümelenme analizi yapıldı. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında tolerans %1.5; optimizasyon %1 olarak alındı. İzolatlar arasındaki ilişki Tenover ve arkadaşları¹³ tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 25 programı ile yapıldı ve %95 güven düzeyi ile çalışıldı. Çalışmada nitel değişkenler için frekans ve yüzde değerleri, nicel değişkenler için ise minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma gibi değerler verildi. Test tekniklerinden ki-kare testi kullanıldı. Ki-kare testi; bağımsız iki kategorik değişken arasındaki ilişkinin belirlenmesinde kullanılan test tekniğidir. Değişkenler ile grup arasındaki ilişki ki-kare testi ile analiz edildi.

BULGULAR

C. striatum'un enfeksiyon etkeni ya da kontaminasyon/kolonizasyon olarak kabul edildiği hastalarda yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hastanede yatış süresi açısından iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0.034$). Poliklinik hastalarından izole edilen *C. striatum* suşlarının daha çok kontaminasyon/kolonizasyon grubunda bulunduğu görülmüştür. İki grupta DM, iskemik kalp hastalığı, kronik böbrek hastalığı ve solid tümör varlığı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Nörolojik hastalığı olan hastaların trakeal aspirat, balgam, yara ve apse örneklerinde saptanan *C. striatum* izolatlarının daha çok etken grubunda bulunduğu görülmüştür ($p=0.025$). İki grup arasında son bir ay içerisinde cerrahi operasyon ya da son üç ay içerisinde antibiyotik kullanım öyküsü açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kültürde saf olarak üreyen *C. striatum* izolatlarının daha çok etken grubunda yer aldığı görülmüştür ($p=0.001$) (Tablo I).

Suşların biyofilm oluşturabilme özellikleri değerlendirilirken çalışmaya dahil edilen 58 *C. striatum* izolatının 36 (%62.1)'sında ortalama OD değerinin OD_c'den yüksek olduğu

Tablo 1. Enfeksiyon Etkeni ya da Kontaminant/Kolonizan Olarak Kabul Edilen *C.striatum* Suşlarının İzole Edildiği Hastalara Ait Demografik ve Klinik Özelliklerin Karşılaştırılması

		Enfeksiyon Etkeni	Kontaminant/ Kolonizan	p
		n (%)	n (%)	
Yaş	60 yaş ve altı	10 (40)	15 (60)	0.289
	60 yaş üstü	19 (57.6)	14 (42.4)	
Cinsiyet	Erkek	23 (54.8)	19 (45.2)	0.378
	Kadın	6 (37.5)	10 (62.5)	
	Yatmamış	2 (16.7)	10 (83.3)	
Kültür Alındığı Anda Hastanede Yatış Günü	20 gün ve daha kısa	15 (57.7)	11 (42.3)	0.034*
	20 günden daha uzun	12 (60)	8 (40)	
Diyabetes mellitus	Var	8 (34.8)	15 (65.2)	0.107
	Yok	21 (60)	14 (40)	
Nörolojik Hastalık	Var	14 (73.7)	5 (26.3)	0.025*
	Yok	15 (38.5)	24 (61.5)	
İskemik Kalp Hastalığı	Var	8 (61.5)	5 (38.5)	0.529
	Yok	21 (46.7)	24 (53.3)	
Kronik Böbrek Hastalığı	Var	6 (75)	2 (25)	0.253
	Yok	23 (46)	27 (54)	
Solid Tümör	Var	4 (66.7)	2 (33.3)	0.666
	Yok	25 (48.1)	27 (51.9)	
Son Bir Ayda Cerrahi Girişim	Var	5 (55.6)	4 (44.4)	0.717
	Yok	24 (49)	25 (51)	
Son Üç Ayda Antibiyotik Kullanım Öyküsü	Var	28 (51.9)	26 (48.1)	0.300
	Yok	1 (25)	3 (75)	
Kültürde Saf Üreme Saptanması	Var	17 (81)	4 (19)	0.001*
	Yok	12 (32.4)	25 (67.6)	

*p< 0.05 anlamlı ilişki var, p> 0.05 anlamlı ilişki yok; Ki-kare testi.

görülmüş ve biyofilm oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşturan izolatların 23 (%63.9)'ünün etken grubunda yer aldığı görülmüştür. Biyofilm oluşumu ile etken grupta olma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p= 0.015).

Çalışmaya dahil edilen izolatların disk difüzyon testi ve gradient difüzyon testi ile elde edilen duyarlılık sonuçları Tablo II'de verilmiştir. İki yöntem arasındaki kategorik uyum tüm antimikrobiyaller için %100 olarak bulunmuştur. Gradient difüzyon test uygulanan 23 izolattan etken olarak kabul edilen grupta bulunanların MİK değerleri Tablo III'te, kontaminasyon/kolonizasyon grubunda bulunanların MİK değerleri Tablo IV'de verilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 58 suşun PFGE ile değerlendirilmesi sonucunda 20 farklı PFGE grubu tanımlanmıştır. Bunlardan sekizi yalnızca birer izolat içermektedir. Kalan 12 grup

Tablo II. Disk Difüzyon ve Gradyent Difüzyon Duyarlılık Testleriyle Elde Edilen Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

Antimikrobiyal	Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi		Gradyent Difüzyon Duyarlılık Testi				
	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	MİK ₅₀ Değeri	MİK ₉₀ Değeri	MİK Aralıkları
Penisilin	7 (12.1)	51 (87.9)	3 (11.5)	23 (88.5)	> 256	> 256	0.06-> 256
Siprofloksasin	2 (3.4)	56 (96.6)	1 (3.8)	25 (96.2)	> 32.0	> 32.0	0.25-> 32.0
Gentamisin	7 (12.1)	51 (87.9)	3 (11.5)	23 (88.5)	8.00	16.0	0.06-> 256
Vankomisin	58 (100)	0 (0)	26 (100)	0 (0)	0.50	1.00	0.50-1.00
Klindamisin	7 (12.1)	51 (87.9)	3 (11.5)	23 (88.5)	> 256	> 256	0.25-> 256
Linezolid	58 (100)	0 (0)	26 (100)	0 (0)	0.25	0.25	0.12-0.50
Tetrasiklin	7 (12.1)	51 (87.9)	-	-	-	-	-
Rifampin	7 (12.1)	51 (87.9)	-	-	-	-	-

Tablo III. Etken Grubunda Bulunan İzolatların MİK Değerleri

Örnek Numarası	Penisilin	Siprofloksasin	Gentamisin	Vankomisin	Klindamisin	Linezolid
1	32	> 32	4	0.5	> 256	0.25
2	32	> 32	4	0.5	> 256	0.25
3	32	> 32	16	0.5	> 256	0.12
4	16	> 32	4	0.5	> 256	0.12
5	64	> 32	> 256	1	> 256	0.25
6	0.06	2	0.06	1	> 256	0.25
7	> 256	> 32	16	1	> 256	0.25
8	> 256	> 32	16	1	> 256	0.25
9	> 256	> 32	32	1	> 256	0.25
10	> 256	> 32	8	1	> 256	0.25
11	16	> 32	8	1	> 256	0.25
12	> 256	> 32	16	0.5	> 256	0.25
13	16	> 32	8	0.5	0.5	0.25

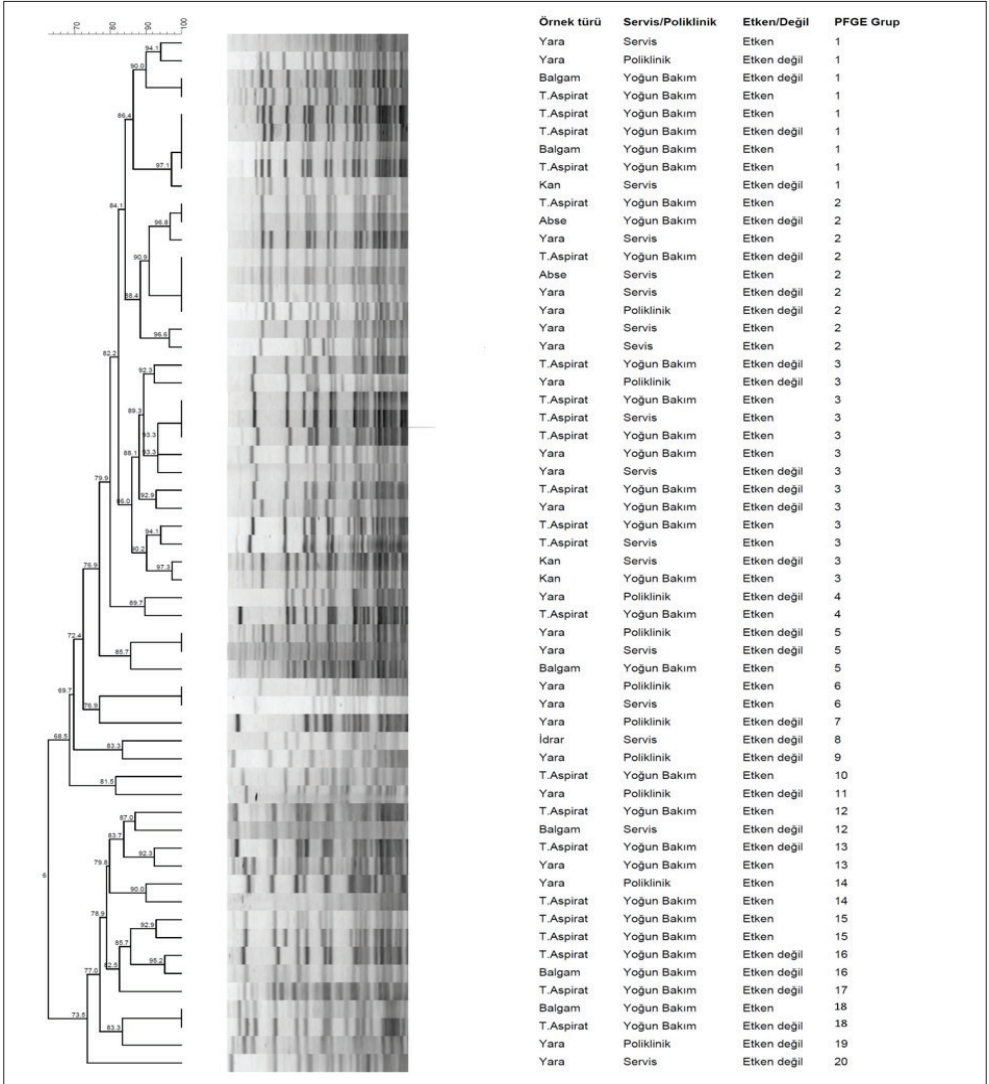
ise küme oluşturan izolatları içermekte olup küme genişliği 2-13 arasında değişmektedir. Kümeleşme oranı %89.6 olarak saptanmıştır. PFGE profilleri arasındaki benzerlik oranı $\geq$ %85 olarak ele alındığında; 58 izolatın sekizi özgül profil gösterirken, kalan 50 izolat epidemiyolojik olarak ilişkili olan 12 grup içinde sınıflandırılmıştır. Epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların 43'ü yatan hastalardan, yedisi poliklinik hastalarından izole edilmiştir. Bu izolatlar aynı poliklinik ya da serviste kümelenmemektedir. Etken ve kontaminasyon/kolonizasyon gruplarında PFGE dağılımının benzer olduğu görülmüştür. Bu iki gruptaki izolatların belirli bir PFGE grubunda yoğunlaşmadığı ve gruplara homojen dağıldığı görülmüştür (Tablo V). Tüm izolatların PFGE bant profilleri ve grup dağılımı Şekil 1'de verilmiştir.

Tablo IV. Kontaminasyon/Kolonizasyon Grubunda Bulunan İzolatların MİK Değerleri

Örnek Numarası	Penisilin	Siprofloksasin	Gentamisin	Vankomisin	Klindamisin	Linezolid
1	> 256	> 32	8	0.5	> 256	0.25
2	32	> 32	4	0.5	> 256	0.25
3	0.06	> 32	0.06	0.5	0.25	0.5
4	> 256	> 32	8	1	> 256	0.25
5	> 256	> 32	4	1	> 256	0.25
6	> 256	> 32	16	1	> 256	0.25
7	> 256	> 32	16	0.5	> 256	0.25
8	32	> 32	8	0.5	> 256	0.25
9	0.12	0.25	0.06	0.5	0.25	0.25
10	> 256	> 32	16	0.5	> 256	0.25
11	> 256	> 32	8	0.5	> 256	0.25
12	> 256	> 32	16	0.5	> 256	0.25
13	> 256	> 32	16	0.5	> 256	0.12

Tablo V. Etken ve Kontaminasyon/Kolonizasyon Gruplarında Bulunan İzolatların PFGE Gruplarında Dağılımı

Grup	Etken Sayısı	Kontaminasyon/ Kolonizasyon Sayısı	Toplam
1	5	4	9
2	5	4	9
3	7	6	13
4	1	1	2
5	1	2	3
6	2	0	2
7	0	1	1
8	0	1	1
9	0	1	1
10	1	0	1
11	0	1	1
12	1	1	2
13	1	1	2
14	2	0	2
15	2	0	2
16	0	2	2
17	0	1	1
18	1	1	2
19	0	1	1
20	0	1	1



Şekil 1. Tüm izolatların PFGE bant profilleri.

TARTIŞMA

C. striatum klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen korineform bakteri türlerinden biridir. İnsanların normal cilt ve müköz membran mikrobiyotasında bulunduğu için bu bakterilerin klinik örneklerden izolasyonu genellikle kontaminasyon olarak kabul edilir. Ancak son yıllarda *C. striatum*'un pnömoni, endokardit ve sepsis gibi çeşitli klinik enfeksiyonları ve salgınları bildirilmiştir². İlk çalışmalar *C. striatum* izolatlarının β -laktamlar, tetrasiklin ve florokinolonlar dahil olmak üzere birçok antimikrobiyal ilaca sıklıkla duyarlı olduğunu tespit ederken, son yıllarda yapılan çalışmalar artan çok ilaç direncini göstermiştir¹⁴.

Bu çalışmada; enfeksiyon etkeni ve kontaminant/kolonizan olarak kabul edilen *C.striatum* izolatlarının; antimikrobiyal duyarlılıkları, moleküler epidemiyolojileri, biyofilm üretme özellikleri ve hastaların demografik özellikleri incelenerek klinik önemi etkileyen faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla Türkiye’de *C.striatum* izolatlarının klinik, mikrobiyolojik ve genotipik özelliklerini araştıran ilk çalışmadır.

Çalışmada etken ve kontaminant grupta yer alan bakterilerin izole edildiği hastaların özelliklerine bakıldığında nörolojik hastalığı olan ve hastanede uzun süre yatan hastaların trakeal aspirat, balgam, yara ve apse örneklerinde üreyen *C.striatum* izolatlarının daha çok enfeksiyon etkeni olduğu görülmüştür. Bu hasta grubunda *C.striatum* izolatlarının daha sık etken olma nedenlerinin ve risk faktörlerinin daha ayrıntılı araştırılması ve bununla ilgili daha çok çalışma yapılması gerektiği düşünülmüştür. Bulgular *C.striatum* enfeksiyonlarının altta yatan tıbbi durumlarla ilişkili olduğunu bildiren önceki çalışmalarla tutarlıdır^{2,15}. Kang ve arkadaşları² gerçek bakteriyemisi olan hastalarda, kontaminasyonu olan hastalara göre DM ve solid tümörün daha fazla olduğunu bildirmiştir.

Çalışmada kültürde saf olarak üreyen *C.striatum* izolatlarının daha çok etken grubunda olduğu görülmüştür ($p = 0.001$). Bu bulguya benzer şekilde Funke ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada¹⁶ kültürde saf veya baskın bir *Corynebacterium* üremesi varsa, bu bakterileri tür düzeyinde tanımlamak gerektiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada izolatların penisilin, gentamisin, klindamisin, tetrasiklin ve rifampine direnç oranı %87.9 (51/58), siprofloksasine direnç oranı %96.5 (56/58) olarak bulunmuştur. Tüm izolatlar vankomisin ve linezolide duyarlı olarak bulunmuştur. Tüm hastalardan, poliklinik hastalarından ve yatan hastalardan izole edilen izolatların ÇİD oranları sırasıyla %87.9 (51/58), %81.8 (9/11), %89.3 (42/47) olarak bulunmuştur. Hem poliklinik hastalarından hem yatan hastalardan izole edilen izolatlar arasında ÇİD yaygın olarak bulunmuştur. Bu bulgular *C.striatum* izolatlarının çok ilaca dirençli olduğunu gösteren son çalışmalarla uyumludur¹⁷⁻²⁰. Campanile ve arkadaşları yaptıkları çalışmada¹⁷ *C.striatum* suşlarının yalnızca glikopeptidler, kinopristin/dalfopristin, daptomisin ve linezolid gibi gram-pozitif mikroorganizmaların tedavisinde kullanılan en yeni ilaçlara duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Mumcuoğlu ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada¹⁸ disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve tüm izolatların vankomisin ve linezolide duyarlı; penisilin, siprofloksasin, gentamisin, klindamisin, tetrasiklin, rifampin ve eritromisine dirençli olduğu saptanmıştır.

Çalışmada etken ve kontaminant olarak kabul edilen izolatlar arasında antimikrobiyal duyarlılık sonuçları açısından fark görülmemiştir. İki grupta da baskın olarak ÇİD izolatları bulunmaktadır. Çalışmaya benzer şekilde Kang ve arkadaşları bir çalışmada² kan kültürlerinde üreyen *C.striatum* izolatlarının tümünün gradient difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal duyarlılık testine göre sadece vankomisin, linezolid ve daptomisine duyarlı olduğunu ve etken ve kontaminant olarak kabul edilen izolatlar arasında antimikrobiyal duyarlılık sonuçları açısından anlamlı bir fark olmadığını raporlamışlardır. Hahn

ve arkadaşları¹⁴ etken olmayan izolatlarda bile ÇİD izolatların yaygın olduğunu göstermiş ve bu dirençli izolatların hastane ortamında ortaya çıkmadığı ve toplumda dolaşmakta olduğu hipotezini ortaya atmışlardır.

CLSI kılavuzunda *Corynebacterium* izolatları için sadece MİK klinik sınır değerleri yer almaktadır. Ancak 2014 yılının başında EUCAST kılavuzunda, *Corynebacterium* izolatları için disk difüzyon yöntemi için klinik sınır değerleri yer almıştır. Bu nedenle literatürde 2014 yılından önce yapılan çalışmalarda MİK değerinin saptandığı mikrodilüsyon ve gradiyent difüzyon duyarlılık testi yöntemi kullanılmıştır^{17,19}. 2014 yılından sonraki çalışmalarda ise sıklıkla EUCAST önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır^{18,21,22}. Bu çalışmada tüm izolatlar disk difüzyon yöntemi ve bazı izolatlar gradiyent difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Hem disk difüzyon hem gradiyent difüzyon testi çalışılan izolatlarda sonuçlar birbiriyle uyumlu bulunmuştur. İki yöntem arasındaki kategorik uyum %100 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada izolatların %62.1'inde biyofilm oluşumu gözlenmiş ve etken olarak kabul edilen grupta biyofilm oluşumu anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak saptanmıştır. Özdemir ve arkadaşlarının çalışmasında²¹ tüm non-difteroid *Corynebacterium* izolatlarında %54, *C. striatum* izolatlarında ise %62.06 oranında biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Liang Quin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada⁸ *Corynebacterium* izolatlarının %82.4 oranında biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Souza ve arkadaşları yaptıkları çalışmada⁹ *C. striatum*'un poliüretan kateterler de dahil hidrofilik ve hidrofobik abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma-bildiğini ve *C. striatum*'un insan fibrinojenine olan afinitesinin bu mikroorganizma için ek bir potansiyel virülans faktörü olduğunu göstermişlerdir. Kang ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada² enfeksiyon etkeni olan izolatlarda kontaminant olan izolatlar göre daha yüksek oranda biyofilm varlığını göstermişlerdir.

Çalışmada 58 *C. striatum* izolatının 50'si epidemiyolojik olarak ilişkili alt gruplarda bulunmuştur. Epidemiyolojik olarak ilişkili bulunan izolatlar belirli bir poliklinik ya da serviste kümelenmemiştir. *C. striatum* izolatları ile yapılan bazı çalışmalarda izolatların aynı PFGE paterninde olduğu gösterilmiş; bazı çalışmalarda ise baskın bir PFGE paterni gösterilememiştir. Campanile ve arkadaşları yaptıkları çalışmada¹⁷ İtalya'da üç hastaneden elde edilen ÇİD *C. striatum* izolatlarına PFGE uygulamışlar ve izolatların tek bir klona ait olduklarını raporlamışlardır. Baio ve arkadaşları ÇİD *C. striatum* izolatları ile yaptıkları bir çalışmada²⁰ izolatların çoğunun bulunduğu baskın bir PFGE paterni olduğunu raporlamışlardır. Alibi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada⁴ 63 *C. striatum* izolatında 22 farklı PFGE modeli göstermiş ve yüksek bir genotip çeşitliliğinin olduğunu, izolatların tek bir klondan kaynaklanmadığını raporlamıştır. Bu çalışmada ayrıca iki grup arasında da PFGE paternlerinde bir fark olmadığı görülmüştür. Aynı PFGE paternindeki izolatların hem enfeksiyon etkeni hem kontaminasyon/kolonizasyon grubunda olması, enfeksiyon oluşumunda asıl önemli olan faktörlerin hastaya özgül değişkenler ve bakteriye ait virülans faktörleri olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada sonuç olarak etken ve kontaminasyon/kolonizasyon ayırımını yapabilecek çok keskin tanımlamalar yapılamamıştır. *C. striatum*'un klinik öneminin değerlendirilmesinde hastaların demografik özellikleri ve komorbiditelerinin yol gösterici olmadığı görülmüştür. Bu bakteride biyofilm üretiminin yaygın bir virülans faktörü olduğu izlenmiştir. Bir diğer önemli bulgu olarak *C. striatum* suşlarında yaygın ÇİD olduğu ve gelecekte bu bakterinin tedavisinde güçlükler yaşanabileceği düşünülmüştür. Çalışma; artan *C. striatum* enfeksiyonlarına yaklaşım, virülans faktörleri ve artan direnç konularına dikkat çekmek açısından katkı sağlamaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, SBÜ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 18.04.2019 ve Karar No: 2668/2019).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Daisuke U, Oishi T, Yamane K, Terada K. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with a catheter-related blood stream infection. Case Rep Infect Dis 2017; 2017(3): 1-3. <https://doi.org/10.1155/2017/2682149>
2. Kang SJ, Choi SM, Choi JA, Choi JU, Oh TH, Kim SE, et al. Factors affecting the clinical relevance of *Corynebacterium striatum* isolated from blood cultures. PLoS One 2018; 13(6): e0199454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199454>
3. Navas J, Fernandez-Martinez M, Salas C, Cano ME, Martinez-Martinez L. Susceptibility to aminoglycosides and distribution of aph and aac (3)-XI genes among *Corynebacterium striatum* clinical isolates. PLoS One 2016; 11(12): e0167856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167856>
4. Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, Cano ME, Fernandez-Martinez M, Martinez-Martinez L, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. Sci Rep 2017; 7(1): 9704. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10081-y>
5. Verroken A, Bauraing C, Deplano A, Bogaerts P, Huang D, Wauters G, et al. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. Clin Microbiol Infect 2014; 20(1): 44-50. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12197>
6. Brandenburg AH, van Belkum A, van Pelt C, Bruining HA, Mouton JW, Verbrugh HA. Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. J Clin Microbiol 1996; 34(9): 2089-94. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2089-2094.1996>
7. Renom F, Garau M, Rubi M, Ramis F, Galmes A, Soriano JB. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Microbiol 2007; 45(6): 2064-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00152-07>
8. Qin L, Sakai Y, Bao R, Xie H, Masunaga K, Miura M, et al. Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium* spp. isolated from blood cultures of hospitalized patients in Japan. Jpn J Infect Dis 2017; 70(2): 152-7. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.530>
9. Souza C, Faria YV, Sant'anna LO, Viana VG, Seabra SH, Souza MC, et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015; 110(2): 242-8. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140373>
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0.2022.

11. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115(8): 891-9. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
12. Garcia-Crespo D, Navas J, Gradillas G, Juste RA. Molecular typing of *Corynebacterium bovis* isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Dairy Sci* 2005; 88(5): 1705-7. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72842-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72842-3)
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18(6): 426-39. <https://doi.org/10.2307/30141252>
14. Hahn WO, Werth BJ, Butler-Wu SM, Rakita RM. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* associated with increased use of parenteral antimicrobial drugs. *Emerg Infect Dis* 2016; 22(11): 1908-14. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160141>
15. Tarr PE, Stock F, Cooke RH, Fedorko DP, Lucey DR. Multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* pneumonia in a heart transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2003; 5(1): 53-8. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2003.00002.x>
16. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(1): 125-59. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.1.125>
17. Campanile F, Carretto E, Barbarini D, Grigis A, Falcone M, Goglio A, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* strains, Italy. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(1): 75-8. <https://doi.org/10.3201/eid1501.080804>
18. Mumcuoğlu İ, Hazirolan G, Kuşun Ş, Aksu N. Evaluation of the *Corynebacterium striatum* isolated with increasing frequency in one of the training and research hospital. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2015; 72(4): 281-8. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.65668>
19. Weiss K, Labbe AC, Laverdiere M. *Corynebacterium striatum* meningitis: Case report and review of an increasingly important *Corynebacterium* species. *Clin Infect Dis* 1996; 23(6): 1246-8. <https://doi.org/10.1093/clinids/23.6.1246>
20. Baio PV, Mota HF, Freitas AD, Gomes DL, Ramos JN, Sant'Anna LO, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108(1): 23-9. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100004>
21. Özdemir S, Aydoğan O, Köksal Çakırlar F. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of non-diphtheria *Corynebacterium* strains isolated from blood cultures: First report from Turkey. *Medeni Med J* 2021; 36(2): 123-9. <https://doi.org/10.5222/MMJ.2021.60252>
22. Aşgın N, Otlı B. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Corynebacterium striatum* isolated in a tertiary hospital in Turkey. *Pathogens* 2020; 9(2): 136. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020136>