

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Corynebacterium* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun, Anti-Quorum Sensing Aktivitesinin ve Antimikrobiyal Direnç Durumunun Araştırılması

Investigation of Biofilm Formation, Anti-Quorum Sensing Activity and Antimicrobial Resistance in *Corynebacterium* Species Isolated from Clinical Samples

Banu Hümeyra KESKİN¹(ID), İdris ŞAHİN²(ID), Gözde KAHRAMAN²(ID), Pelin Kamuran DURAN²(ID), Görkem DÜLGER³(ID), Mehmet Akif DURMUŞ⁴(ID), Ayşe Nur CEYLAN⁴(ID), Emel ÇALIŞKAN²(ID), Şükrü ÖKSÜZ²(ID)

¹ Zonguldak Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Zonguldak.
¹ Zonguldak Gynecology and Obstetrics Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Zonguldak, Türkiye.

² Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce.

² Düzce University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Düzce, Türkiye.

³ Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Düzce.

³ Düzce University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Düzce, Türkiye.

⁴ Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

⁴ Başakşehir Çam ve Sakura City Hospital, Clinic of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

*Bu çalışma, Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından (2022.04.01.1353) desteklenmiştir.

Makale Atfı: Keskin BH, Şahin İ, Kahraman G, Duran PK, Dülger G, Durmuş MA ve ark. Klinik örneklerden izole edilen *Corynebacterium* türlerinde biyofilm oluşumunun, anti-quorum sensing aktivitesinin ve antimikrobiyal direnç durumunun araştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(3):239-258.

ÖZ

Son on yılda *Corynebacteria* kaynaklı farklı klinik enfeksiyonların sayısında artış bildirilmiştir. Bu çalışma, kültürde üreme şekline göre (saf, başka bir patojen bakteriyel birlikte ve polimikrobiyal üreme) üç gruba ayrılan korinebakterilerin antibiyotik direnç oranları ile biyofilm oluşturma kapasitelerini değerlendirmek ve "anti-quorum-sensing [çoğunluk algısı (QS)]" aktivitesini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına Haziran 2021 ile Haziran 2022 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 240 adet *Corynebacterium* spp. izolatu, kültürdeki üreme şekillerine göre saf, başka bir patojen etkenle birlikte ve polimikrobiyal olmak üzere üç grupta sınıflandırılmıştır. Bakterilerin tanımlanması dış merkezde matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon- uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] Biotyper (Bruker, Almanya) ile yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları, disk difüzyon ve vankomisin için sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. İzolatların biyofilm oluşturma özellikleri, kantitatif olarak saptanmıştır. Güçlü biyofilm yapan 17 izolatu biyoaktif bileşen ekstraksiyonu yapıldı

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Banu Hümeyra Keskin, Zonguldak Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Zonguldak, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 (372) 268 3222, **E-posta (E-mail):** banuhumeyra.keskin@saglik.gov.tr

Chromobacterium violaceum ATCC 12472 suşu kullanılarak agar difüzyon yöntemiyle anti-quorum sensing aktivitesine bakılmış, sonrasında viyolasin pigment üretimi kantitatif olarak ölçülmüştür. Çalışmaya alınan 240 adet *Corynebacterium* spp. izolatının; 138 (%58)'i saf, 52 (%22)'si başka bir patojen etkenle birlikte ve 50 (%20)'si ise polimikrobiyal grupta yer almıştır. İzolatların 140'ı *Corynebacterium striatum*, 34'ü *Corynebacterium amycolatum*, 24'ü *Corynebacterium afermentans* olarak tanımlanmıştır. *Corynebacterium* izolatlarının antibiyotik direnç oranları gruplara göre incelendiğinde; rifampisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direnç oranı, polimikrobiyal grupta diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptanmıştır. İzolatlarda penisilin, klindamisin, siprofloksasin, moksifloksasin, rifampisin, tetrasiklin ve linezolidde karşı sırasıyla %96.7, %88.3, %86.3, %73.8, %62.5, %59.2 ve %0.8 oranında direnç görülmüştür. Tüm izolatlar vankomisine karşı duyarlı iken iki adet *C. afermentans* izolatında linezolid direnci saptanmıştır. Biyofilm oluşturma kapasiteleri incelendiğinde 87 (%36.3) izolatın biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Polimikrobiyal üreme saptanan gruptaki izolatların biyofilm oluşturma oranı, diğer iki gruptan daha düşük bulunmuştur. Güçlü biyofilm oluşturma özelliğine sahip 17 izolatın anti-quorum sensing aktivitesine bakılmış, test edilen hiç bir *Corynebacterium* ekstraktının, *C. violaceum* ile yapılan QS çalışmasında anti-QS aktivitesi (bakteriyel üremeyi önlemeden viyolasin pigment üretimini inhibe edici aktivitesi) bulunmamışken, beş adet izolat ekstraktının antibakteriyel etkisi (bakteriyel üremeyi inhibe etmesi) saptanmıştır. Antimikrobiyal etki gözlenen bakteri ekstraktlarının dördünün *C. amycolatum*, birinin ise *C. afermentans*'a ait olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; hem antibiyotik direnç oranlarına hem de biyofilm oluşturma oranlarına bakıldığında kültürde başka bir patojen etkenle birlikte üreme gösteren korinebakterilerin saf kültür olarak üreyen korinebakteriler ile benzer özellikler gösterdiği görülmektedir. Bu nedenle başka bir patojen etkenle birlikte üreme gösteren korinebakterilerin göz ardı edilmemesi gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca bazı korinebakteri ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin görülmesi, mikrobiyota bakterileriyle daha fazla sayıda QS çalışması yapılması gerektiğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci; biyofilm; çoğunluk algısı; korinebakteri.

ABSTRACT

An increasing number of different clinical infections caused by *Corynebacteria* have been reported in the last decade. The aim of this study was to evaluate the antibiotic resistance rates, biofilm formation capacities and to investigate the "anti-quorum-sensing (anti-QS)" activities of corynebacteria, which were divided into three groups according to the type of growth in culture (pure, with another pathogenic bacterium and polymicrobial growth). In total 240 *Corynebacterium* spp. isolates from different clinical specimens sent to the medical microbiology laboratories of Düzce University Faculty of Medicine Hospital and Başakşehir Çam and Sakura City Hospital between June 2021 and June 2022 were classified into three groups: pure, isolated with another pathogen and polymicrobial, according to their growth patterns in culture. Bacteria were identified by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Biotyper (Bruker, Germany) at an external centre. Antibiotic susceptibilities were determined by disc diffusion method and for vancomycin broth microdilution method was used. Results were interpreted according to EUCAST recommendations. The biofilm-forming properties of the isolates were determined quantitatively. Bioactive components of 17 isolates with strong biofilm formation were extracted and anti-QS activity was determined by agar diffusion method using *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 strain and then violacein pigment production was measured quantitatively. Of the 240 *Corynebacterium* spp. isolates, 138 (58%) were pure, 52 (22%) were isolated with another pathogen and 50 (20%) were part of a polymicrobial infection. Of the isolates, 140 were identified as *Corynebacterium striatum*, 34 as *Corynebacterium amycolatum* and 24 as *Corynebacterium afermentans*. When the antibiotic resistance rates of the *Corynebacterium* isolates were analysed according to the groups, the resistance rates to rifampicin and tetracycline antibiotics were found to be statistically significantly lower in the polymicrobial group than in the other groups. The resistance rates to penicillin, clindamycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, rifampicin, tetracycline and linezolid were 96.7%, 88.3%, 86.3%, 73.8%, 62.5%, 59.2% and 0.8%, respectively. While all isolates were susceptible to vancomycin, linezolid resistance was detected in two *C. afermentans* isolates. When the biofilm formation ability was analysed, it was observed that 87 (36.3%) isolates formed biofilm. The biofilm formation rate of the isolates in the polymicrobial

growth group was lower than the other two groups. The anti-QS activity of 17 isolates with strong biofilm formation was investigated and none of the *Corynebacterium* extracts tested were found to have anti-QS activity (inhibition of violacein pigment production without inhibiting bacterial growth) in the QS study with *C.violaceum*, whereas five isolate extracts had antibacterial activity (inhibition of bacterial growth). Four of the bacterial extracts with antimicrobial activity belonged to *C.amycolatum* and one to *C.fermentans*. In conclusion, when both antibiotic resistance rates and biofilm formation rates were analysed, the corynebacteria growing in culture with another pathogen showed similar characteristics to the corynebacteria growing as a pure culture. Therefore, it was thought that corynebacteria growing with another pathogen should not be ignored. In addition, the antimicrobial effects of some corynebacterial extracts suggested that more QS studies should be carried out with microbiota bacteria.

Keywords: Antibiotic resistance; biofilm; quorum sensing; *Corynebacterium*.

GİRİŞ

Korinebakteriler; *Corynebacterium diphtheriae* ve difteri dışı korinebakteriler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Difteri dışı korinebakteriler, cilt ve müköz membranların mikrobiyotasında bulunur. Bu bakteriler, klinik örneklerden izole edildiklerinde genellikle kontaminasyon ya da kolonizasyon olarak kabul edilir. Bununla birlikte son on yılda artan sayıda çeşitli klinik enfeksiyonları bildirilmiştir. Bunlar hem immünsuprese hem bağışıklık sistemi sağlam kişilerde görülen septisemi, artrit, vertebral osteomyelit, menenjit, endokardit, meme apsesi, peritonit, yara enfeksiyonları, prostetik eklem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlardır¹⁻⁴.

Son yıllarda bazı türler de artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir. Bu türler, başta *Corynebacterium striatum* olmak üzere *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium afermentans*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium propinquum* ve *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*'dur^{1,5}.

Corynebacterium cinsinde iki adet virülans faktörü tanımlanmıştır. Bunlardan biri adezyonda rol oynayan pilus, diğeri ise difteri toksinidir. Gram-pozitif bakterilerde konak dokuda kolonizasyon, immün sistemden kaçma ve biyofilm oluşumu için yüzey pilusu oldukça önemlidir^{6,7}. Biyofilm yapısı, birbirleriyle haberleşerek ve belli bir yapısal bütünlük içinde yaşayarak devamlılığını sağlayan hücresel organizasyon olarak tanımlanmış ve biyofilm yapısını oluşturan bakterilerin "quorum-sensing [çoğunluk algısı (QS)]" özelliğine dikkat çekilmiştir⁸.

Bakterilerin, belli bir yoğunlukta hücreler arası iletişim sinyallerini algılayarak çeşitli davranışlar sergilemesine QS adı verilir⁹. Bakteriler, QS sayesinde çevrelerindeki mikrobiyal yoğunluk ve hücre sayılarından haberdar olabilmekte ve birçok virülans özelliğini (biyofilm, antimikrobiyal direnç, patogeneze, vb.) gerçekleştirebilmektedir^{10,11}. Bakteriye öldürmek yerine QS mekanizmasını inhibe ederek aralarında kurdukları iletişimi engellemek, enfeksiyon hastalıklarında kullanılan antimikrobiyal tedavilere alternatif yeni bir yaklaşımı oluşturmaktadır¹².

Klinik örneklerden izole edildiklerinde sıklıkla kontaminant olarak kabul edilen korinebakterileri klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında değerlendirmeye alırken her zaman klinisyenle iletişim kurulamayabilir ve bu nedenle bakterilerin kültürdeki üreme paterni ile direkt mikroskopik inceleme ön plana çıkabilmektedir. Böyle durumlarda genelde kültürde saf ya da baskın üreme gösteren izolatlar işleme alınırken etken olduğu düşünülen patojen bir bakteriyle birlikte üreyen *Corynebacterium* izolatları sıklıkla kontaminant olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada izolatlar kültürdeki üreme şekline göre; i) saf üreme, ii) etken olduğu düşünülen başka bir patojen bakteriyle birlikte üreme iii) polimikrobiyal üreme olmak üzere üç grupta incelenmiştir. Bu çalışmada, saf kültür şeklinde üreme olmayan korinebakterilerin patojen olma potansiyeli araştırılarak izolatların antibiyotik direnç oranları, biyofilm oluşturma kapasiteleri ve anti-QS aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (Karar no= 2022/132 ve Tarih no= 04.07.2022) onaylandı.

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına Haziran 2021 ile Haziran 2022 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplam 240 adet *Corynebacterium* spp. izolatu çalışmaya dahil edildi. Bakterilerin tanımlanması, dış merkezde matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon- uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] Biotyper (Bruker, Almanya) ile yapıldı. Hastaların yaş, cinsiyet, buldukları servis/yoğun bakım/poliklinik ve klinik örnek türü bilgisi kaydedildi. Tüm izolatlar, kültürdeki üreme şekillerine göre saf, başka bir patojen etkenle birlikte ve polimikrobiyal üreme olmak üzere üç grupta sınıflandırıldı. Korinebakterilerle birlikte üreme gösteren, patojen olduğu düşünülen bakteriler kaydedildi.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılığın belirlenmesi

Çalışmaya alınan tüm izolatlara disk difüzyon yöntemiyle Mueller-Hinton Fastidious agar [%5 oranında defibrine at kanı ve 20 mg/L β -NAD (Biosynth Carbosynth, Birleşik Krallık) eklenmiş Mueller-Hinton agar (Condalab, İspanya)] kullanılarak antibiyotik duyarlılık testi yapıldı. EUCAST önerileri doğrultusunda penisilin (1 ünite), siprofloksasin (5 μ g), moksifloksasin (5 μ g), klindamisin (2 μ g), tetrasiklin (30 μ g), rifampisin (5 μ g), vankomisin (5 μ g) ve linezolid (10 μ g) diskleri (Bioanalyse, Türkiye) ve indüklenebilir klindamisin direncinin bakılması amacıyla eritromisin (15 μ g) diski yerleştirildi. Disk difüzyon metoduyla linezolid dirençli bulunan izolatların minimum inhibitör konsantrasyon değerleri gradiyent test yöntemi (E-test; bioMérieux, Fransa) ile belirlendi. 16-20 saat inkübasyon süresinin sonunda yetersiz üreme gösteren izolatlar tekrar inkübe edildi ve inhibisyon zonları, toplam 40-44 saat inkübasyonun ardından plak kapakları çıkarılmış ve yansıyan ışıkla aydınlatılmış halde, plak ön yüzünden değerlendirildi¹³.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle vankomisin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)'unun belirlenmesi

Çalışmada 132 adet saf, 58 adet başka bir patojen etkenle birlikte üreme gösteren toplam 190 *Corynebacterium* izolatında sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle vankomisin MİK değeri belirlendi. Vankomisin stok çözeltisi (320 µg/mL) MİK aralığı 0.25-8 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. ISO 20776-1 standardına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" önerileri doğrultusunda çalışıldı^{13,14}. Kalite kontrol için *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Çalışmaya alınan tüm izolatların biyofilm oluşumları, kantitatif olarak 96 kuyucuklu U tabanlı mikropklarda çalışıldı. Biyofilm oluşumunun belirlenmesi için; beyin-kalp infüzyon sıvı besiyeri içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyondan 200 µl kuyucuklara konuldu ve 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Kuyucuklar, iki kere 200 µl fosfat tamponlu salin solüsyonu kullanılarak yıkandı. Biyofilmler, 200 µl %99'luk metanol ile beş dakika fikse edildi. 200 µl %0.3'lük kristal viyole ile 15 dakika boyandı. Mikropklaklar, iki kez distile su kullanılarak yıkanıp kurutuldu. Son olarak 200 µl %95'lik etanol her kuyucuğa eklendi ve okumaya geçildi¹⁵.

Mikropklaklar, optik dansite (OD) 560 nm'de mikropklak okuyucusunda (Robonik, Hindistan) üç kez ölçüldü. Negatif kontrol kuyucuğuna sadece sıvı besiyeri eklendi. Pozitif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı. Sınır değer, negatif kontrolün ortalama OD'sinin üç standart sapma üstü olarak tanımlandı. Optik dansite değerlerinin ortalama, sınır değer üzerinde olan suşlar biyofilm pozitif olarak kabul edildi. Optik dansite değeri sınır değerle bunun iki katı arasında olanlar zayıf (+), 2-4 katı arasında olanlar orta (++) , dört katı ve üzerinde olanlar ise güçlü biyofilm pozitif (+++) olarak sınıflandırıldı¹⁶.

Anti-QS Aktivitesinin Belirlenmesi

Güçlü biyofilm oluşturan izolatların ekstraktları kullanılarak anti-QS aktivitesine bakıldı.

Bakteriyel biyoaktif bileşen ekstraksiyonu

Bakteri kültürleri, 100 ml beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerinde 48-72 saat süre ile 35-37 °C'de çalkalanarak inkübe edildi. Dört derece sıcaklıkta 20 dakika santrifüjlendi ve süpernantlar toplandı. Elde edilen süpernant, eşit hacimde etil asetat kullanılarak 15-20 dakika çalkalama cihazında karıştırıldı. Ekstraksiyon işlemi, iki kez tekrarlandı. Etil asetat ekstraksiyonuyla elde edilen organik ekstrakt fraksiyonları birleştirildi. Elde edilen karışım, döner vakum evaporatörüyle (Heidolph, Almanya) 45 °C'de buharlaştırıldı. Evaporasyon öncesinde ve sonrasında, balon joje hassas teraziyile tartıldı. Balon jolenin son ağırlığından boş olduğu ilk ağırlığı çıkartılarak etil asetatın buharlaşması sonrasında balon jodede kalan bakteriyel ekstrakt miktarı ölçüldü. Elde edilen ekstrakt, %1'lik dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldükten sonra 0.22 µm membran filtreden geçirilerek sterilize edildi^{17,18}.

Her ekstrakt için dört adet seri dilüsyon yapıldı ve konsantrasyonları kaydedildi (Tablo VIII).

Anti-QS aktivitesinin agar difüzyon yöntemiyle belirlenmesi

Çalışmada, %1 oranında agar eklenerek hazırlanmış 100 ml Luria Bertani (LB) besiyerine (Condalab, İspanya) yaklaşık 45 °C'ye kadar soğuduğunda 1 ml 0.5 McFarland bulanıklığında *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 suşu eklendi ve petrilere dağıtıldı. Besiyeri üzerinde kuyucuklar açılarak 100 µl farklı konsantrasyonlardaki bakteriyel ekstraktlar eklendi ve 30 °C'de 48 saat inkübe edildi. Çözücü olarak kullanılan DMSO, kontrol olarak kullanıldı. *C.violaceum* ATCC 12472 suşu ürettiğinde besiyerinde koyu mavi renk bir pigment (viyolasin) oluşturmaktadır. Pigment üretimini QS mekanizması aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Kuyucukların etrafında bakteriyel üremenin olduğu ancak viyolasin pigment üretiminin olmadığı opak zonlar anti-QS etki, bakteriyel üremenin olmadığı şeffaf zonlar ise antibakteriyel etki olarak değerlendirildi¹⁹.

Viyolasin pigment üretiminin kantitatif olarak ölçülmesi

Çalışmada, 18 saatlik *C.violaceum* ATCC 12472 sıvı kültürü 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlandı ve taze LB sıvı besiyerine eklenerek steril bir test tüpüne aktarıldı. Bakteri ekstraktları çözeltiliye ilave edildi. Aynı hacimdeki çözücü DMSO, negatif kontrol olarak kullanıldı. 24-48 saat boyunca 150 rpm'lik rotasyonla 30 °C'de inkübe edildi. 10000 rpm'de 30 dakika santrifüjleme işlemi yapıldı. Daha sonra üst sıvı uzaklaştırılıp 0.5 ml DMSO eklenerek vortekslenildi ve viyolasinin iyice çözünmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra yeniden 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjleme yapıldı. Viyolasin içeren üst sıvıdan 200 µl alınarak mikropalak okuyucu ile OD585 değerleri okundu²⁰.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi, "IBM SPSS Statistics 23" programı kullanılarak yapıldı. Veriler, sayı ve yüzde olarak belirtildi. Sonuçların analizinde "Ki-kare Testi", "Fisher's exact" ve "Fisher-Freeman-Halton" testleri kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 240 adet *Corynebacterium* izolatu dahil edilmiştir. İzolatların 138'i (%58)'i saf üreme, 52 (%22)'si başka bir patojen etkenle birlikte üreme ve 50 (%20)'si polimikrobiyal üreme gösteren grupta yer almıştır. İzolatların sıklık sırasına göre; 141'i *C.striatum*, 34'ü *C.amycolatum*, 25'ü *C.afermentans*, sekizi *Corynebacterium argenteratense*, beşi *C.propinquum*, dördü *Corynebacterium aurimucosum*, dördü *Corynebacterium coyleae*, dördü *Corynebacterium imitans*, üçü *C.pseudodiphtheriticum*, üçü *Corynebacterium riegelii*, ikisi *Corynebacterium accolens*, ikisi *Corynebacterium phoceense*, biri *Corynebacterium glucuronolyticum*, biri *Corynebacterium mucifaciens*, biri *Corynebacterium simulans*, biri *Corynebacterium singulare*, biri *Corynebacterium* spp. olarak tanımlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen *Corynebacterium* izolatlarının 101 (%42.3)'i yoğun bakım ünitesi, 61 (%25.3)'i klinik servis,

61 (%25.3)'i poliklinik, 17 (%7.1)'si ise acil servis hastalarından gönderilen klinik örneklerden izole edilmiş olup çoğunluğunu yoğun bakım üniteleri oluşturmuştur.

Corynebacterium türlerinin 68 (%28.2)'i derin trakeal aspirattan, 50 (%20.7)'si idrar örneğinden izole edilmiş olup bu iki klinik örnek türü, diğer örnek türlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Klinik örneklerin 110 (%45.6)'unu solunum yolu örnekleri oluşturmuştur. En fazla sayıda izole edilen tür *C.striatum* olup bunların 57 (%40)'si derin trakeal aspirat örneğinde üremiştir. *Corynebacterium* türlerinin izole edildiği klinik örnekler göre dağılımları ve hastaların yaş ortalamaları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Doku örneklerinden izole edilen altı izolatin tamamı *C.striatum* olarak belirlenmiş olup DTA, yara ve balgam örneklerinde de *C.striatum* diğer türlerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek oranda saptanmıştır (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). Kan ve idrar örneklerinde de en sık izole edilen tür *C.striatum* olmakla birlikte kan örneklerinde ikinci sıklıkta *C.fermentans*, idrar örneklerinde *C.amycolatum* saptanmış olup istatistiksel olarak *C.striatum*'la aralarında anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla $p = 0.577$, $p = 0.095$). Kateter ve santral sinir sistemi örneklerinde ise en sık izole edilen tür *C.amycolatum* olmakla birlikte *C.striatum*'la aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla $p = 0.257$, $p = 0.564$).

Corynebacterium türleri kültürde üreme şekillerine göre saf, başka bir patojen etkenle birlikte ve polimikrobiyal üreme olarak gruplandırıldığında; *C.coyleae*, *C.glucuronolyticum*, *C.mucifaciens*, *C.simulans*, *C.singulare* kültürde saf olarak üremiştir. *C.accolens* ve *C.phoceense* ise sadece polimikrobiyal üremelerde görülmüştür. *C.fermentans* izolatlarının %68'i, *C.amycolatum* izolatlarının %53'ü, *C.striatum* izolatlarının ise %55'i kültürde saf olarak üremiştir. *C.argentoratense* ve *C.propinquum* izolatlarının ise çoğunluğu polimikrobiyal olarak üremiştir (Tablo II).

Patojen olduğu düşünülen başka bir etkenle birlikte üreme gösteren 58 *Corynebacterium* izolatının yanında üreyen etkenler bazı klinik örneklerde monobakteriyel bazı örneklerde ise polimikrobiyal şekilde üremiştir. Sıklık sırasına göre üreyen etkenler; *Pseudomonas aeruginosa* (n= 18), *Acinetobacter baumannii* (n= 12), *Escherichia coli* (n= 10), *Klebsiella pneumoniae* (n= 10), enterokok (n= 5), *S.aureus* (n= 5), *Enterobacter* spp. (n= 5), *Morganella morganii* (n= 3), *Serratia marcescens* (n= 2), *Achromobacter* (n= 1), *Providencia rettgeri* (n= 1), koagülaz negatif stafilokok (n= 1), *Proteus mirabilis* (n= 1), *Stenotrophomonas maltophilia* (n= 1), *Cedecea lapagei* (n= 1), pnömokok (n= 1), *Streptococcus agalactiae* (n= 1) olarak tanımlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen *Corynebacterium* izolatlarının antibiyotik direnç oranları gruplara (saf/başka bir patojen etkenle birlikte/polimikrobiyal üreme) göre incelendiğinde; rifampisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direnç oranı, polimikrobiyal grupta diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak saptanmıştır (sırasıyla, $p = 0.003$ ve $p < 0.001$). Diğer antibiyotiklere karşı direnç oranlarına bakıldığında (penisilin, siprofloksasin,

Bakteri Adı	Bulunduğu Klinik Örnek Türü n (%)											Yaş ort.	Toplam (n)
	Apse	BAL*	Balgam	Burun	Doku	DTA*	İdrar	Kan	Kateter	SVS*	Yara		
<i>C. striatum</i>	2 (2)	5 (4)	18 (13)	0 (0)	6 (%4)	57 (40)	19 (13)	16 (11)	1 (1)	1 (1)	16 (11)	60.8	141
<i>C. amycolatum</i>	2 (6)	1 (3)	3 (9)	-	-	3 (9)	10 (29)	4 (12)	5 (14)	2 (6)	4 (12)	49.6	34
<i>C. afermentans</i>	-	-	2 (8)	-	-	3 (12)	6 (24)	13 (52)	1 (4)	-	-	53.2	25
<i>C. argentoratense</i>	1 (12)	1 (12)	4 (52)	-	-	1 (12)	-	1 (12)	-	-	-	61.7	8
<i>C. propinquum</i>	-	1 (20)	3 (60)	1 (20)	-	-	-	-	-	-	-	62.2	5
<i>C. aurimucosum</i>	-	-	-	-	-	-	2 (50)	-	-	-	2 (50)	63.7	4
<i>C. coyleae</i>	-	-	-	-	-	-	4 (100)	-	-	-	-	13.5	4
<i>C. imitans</i>	-	-	1 (25)	-	-	1 (25)	1 (25)	1 (25)	-	-	-	58.5	4
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	-	-	1 (33)	-	2 (67)	-	-	-	-	-	72.3	3
<i>C. riegelii</i>	-	-	-	-	-	-	3 (100)	-	-	-	-	15	3
<i>C. phoceense</i>	-	-	-	-	-	-	2 (100)	-	-	-	-	55.5	2
<i>C. accolens</i>	-	-	1 (50)	-	-	-	1 (50)	-	-	-	-	43	2
<i>C. mucifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-	-	64	1
<i>C. glucuronolyticum</i>	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-	-	-	32	1
<i>C. simulans</i>	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-	-	-	-	57	1
<i>C. singulare</i>	-	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-	-	66	1
<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-	-	-	30	1
Toplam	5 (2.1)	8 (3.3)	32 (13.3)	2 (0.8)	6 (2.5)	68 (28.2)	50 (20.7)	37 (15.4)	7 (2.9)	3 (1.2)	22 (9.1)	56.8 ± 25.41	240

BAL: Bronkoalveolar lavaj, DTA: Derin trakeal aspirat, SVS: Steril vücut sıvısı.

Tablo II. *Corynebacterium* Türlerinin Gruplara (Saf/Başka Bir Patojen Etkenle Birlikte/Polimikrobiyal) Göre Dağılımı

Bakteri Adı	Sayısı n (%)			
	Saf (n= 132)	Başka bir patojen etkenle birlikte (n= 58)	Polimikrobiyal (n= 50)	Toplam (n= 240)
<i>C. accolens</i>	-	-	2 (100)	2
<i>C. afermentans</i>	17 (68)	4 (16)	4 (16)	25
<i>C. amycolatum</i>	18 (53)	6 (17)	10 (30)	34
<i>C. argentoratense</i>	1 (12.5)	2 (25)	5 (62.5)	8
<i>C. aurimucosum</i>	2 (50)	2 (50)	-	4
<i>C. coyleae</i>	4 (100)	-	-	4
<i>C. glucuronolyticum</i>	1 (100)	-	-	1
<i>C. imitans</i>	2 (50)	-	2 (50)	4
<i>C. mucifaciens</i>	1 (100)	-	-	1
<i>C. phoceense</i>	-	-	2 (100)	2
<i>C. propinquum</i>	2 (40)	-	3 (60)	5
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	2 (67)	1 (33)	-	3
<i>C. riegelii</i>	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	3
<i>C. simulans</i>	1 (100)	-	-	1
<i>C. singulare</i>	1 (100)	-	-	1
<i>Corynebacterium</i> spp.	1 (100)	-	-	1
<i>C. striatum</i>	78 (55)	42 (30)	21 (15)	141

Tablo III. *Corynebacterium* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranlarının Gruplara (Saf/Başka Bir Patojen Etkenle Birlikte/Polimikrobiyal) Göre Dağılımı

Antibiyotikler	Saf (n= 132)		Başka bir patojen etkenle birlikte (n= 58)		Polimikrobiyal (n= 50)		p	Toplam	
	n	%	n	%	n	%		n	%
Penisilin	129	97.7	56	96.6	47	94	0.490	232	96.7
Siprofloksasin	112	84.8	54	93.1	41	82	0.203	207	86.3
Moksifloksasin	99	75.0	46	79.3	32	64	0.175	177	73.8
Rifampisin	84	63.6	44	75.9	22	44	0.003	150	62.5
Klindamisin	116	87.9	54	93.1	42	84	0.345	212	88.3
Tetrasiklin	84	63.6	41	70.7	17	34	<0.001	142	59.2
Linezolid	2	1.5	-	0	-	0	0.503	2	0.8
Vankomisin	-	0	-	0	-	0	-	-	0

moksifloksasin, klindamisin, linezolid) ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (sırasıyla, $p= 0.490$, $p= 0.203$, $p= 0.175$, $p= 0.345$ ve $p= 0.503$). Tüm izolatlarda en yüksek direnç oranı %96.7 ile penisiline karşı görülmüştür (Tablo III). İzolatların vankomisin MİK değerlerine göre dağılımı incelendiğinde; saf ve başka bir

Tablo IV. *Corynebacterium* İzolatlarının Vankomisin MİK Değerlerinin Gruplara (Saf/Başka Bir Patojen Etkenle Birlikte) Göre Dağılımı

Vankomisin MİK (µg/mL)	Saf (n= 132)		Başka bir patojen etkenle birlikte (n= 58)		p	Toplam (n= 190)	
	n	%	n	%		n	%
< 0.25	82	62.1	29	50	0.132	111	58.4
0.5	47	35.6	25	43.1		72	37.9
1	1	0.8	3	5.2		4	2.1
2	2	1.5	1	1.7		3	1.6

patojen etkenle birlikte üreme gösteren tüm izolatlar, vankomisine duyarlı olup (MİK ≤ 2 µg/mL) saf ve başka bir patojen etkenle birlikte üreme grupları arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (p= 0.132) (Tablo IV).

Linezolid direnci sadece iki adet *C. fermentans* izolatında görülmüştür. Disk difüzyon yöntemiyle linezolide karşı dirençli bulunan izolatlar, gradiyent test yöntemiyle de linezolide karşı dirençli (MİK= 4 µg/mL) olarak belirlenmiştir. Türlerin antibiyotik direnç oranları, Tablo V'te gösterilmiştir.

Korinebakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri incelendiğinde; toplamda 87 (%36.3) izolat biyofilm oluşturmuştur. Biyofilm oluşturma kapasitelerinin gruplara göre dağılımına bakıldığında; polimikrobiyal üreme gösteren gruptaki izolatların biyofilm oluşturma oranı, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte diğer iki gruptan daha düşük oranda bulunmuştur (p= 0.077). Güçlü biyofilm oluşturan izolatların çoğu saf üreme gösteren grupta yer almıştır (Tablo VI). *Corynebacterium* türlerine göre biyofilm oluşturma kapasiteleri, Tablo VII'de gösterilmiştir.

Biyofilm oluşturma kapasitelerine göre güçlü biyofilm oluşturan 17 adet izolatın anti-QS aktivitesi agar difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Bu yöntemle test edilen hiçbir *Corynebacterium* ekstraktının, *C. violaceum* ATCC 12472 ile yapılan QS çalışmasında anti-QS aktivitesi (bakteriyel üremeyi önlemeden viyolasin pigment üretimini inhibe edici aktivitesi) bulunmamışken beş adet izolat ekstraktının antibakteriyel etkisinin (bakteriyel üremeyi inhibe etmesi) olduğu saptanmıştır (Şekil 1). Agar difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etki gözlenen petrielerde bakteriyel üremenin olmadığı inhibisyon zon çapları ve ekstrakt konsantrasyonları Tablo VIII'de gösterilmiştir. Antimikrobiyal etki gözlenen bakteri ekstraktlarının dördünün *C. amycolatum*'a, birinin ise *C. fermentans*'a ait olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyal etki gözlenen bakteri ekstraktlarının, *C. violaceum*'un viyolasin pigment üretimine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ekstraktların antimikrobiyal etkisinden kaynaklanan viyolasin pigment üretimini azaltıcı etkisi, tüm dilüsyonlarda görülmüştür (Şekil 1).

Tablo V. *Corynebacterium* Türlerine Göre Antibiyotik Direnç Oranları [n (%)]

Bakteri Adı (n)	Penisilin	Siprofloksasin	Moksifloksasin	Rifampisin	Klindamisin	Tetrasiklin	Linezolid	Vankomisin
<i>C. accolens</i> (2)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. afermentans</i> (25)	25 (100)	23 (92)	22 (88)	18 (72)	25 (100)	11 (44)	2 (8)	0 (0)
<i>C. amycolatum</i> (34)	33 (97)	32 (94)	16 (47)	7 (21)	25 (73)	5 (15)	0 (0)	0 (0)
<i>C. argenteoratese</i> (8)	8 (100)	4 (50)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. aurimucosum</i> (4)	4 (100)	3 (75)	2 (50)	2 (50)	4 (100)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. coyleae</i> (4)	4 (100)	3 (75)	3 (75)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. glucuronolyticum</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. imitans</i> (4)	3 (75)	3 (75)	2 (50)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. mucifaciens</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. phoceense</i> (2)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. propinquum</i> (5)	2 (40)	3 (60)	1 (20)	0 (0)	3 (60)	1 (20)	0 (0)	0 (0)
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (3)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	3 (100)	1 (33)	0 (0)	0 (0)
<i>C. regelii</i> (3)	3 (100)	2 (67)	1 (33)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. simulans</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. singulare</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>Corynebacterium</i> spp. (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. striatum</i> (141)	140 (99)	124 (88)	121 (86)	118 (84)	134 (95)	116 (82)	0 (0)	0 (0)
p	<0.001	0.034	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.164	-

Tablo VI. *Corynebacterium* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Gruplara (Saf/Başka Bir Patogen Etkenle Birlikte/Polimikrobiyal) Göre Dağılımı

Biyofilm	Saf (n= 132)		Başka bir patojen etkenle birlikte (n= 58)		Polimikrobiyal (n= 50)		p	Toplam (n= 240)	
	n	%	n	%	n	%		n	%
Zayıf	18	13.6	19	32.8	8	16		45	18.8
Orta	20	15.2	3	5.2	2	4		25	10.4
Güçlü	11	8.3	4	6.9	2	4		17	7.1
Toplam	49	37.1	26	44.9	12	24	0.077	87	36.3

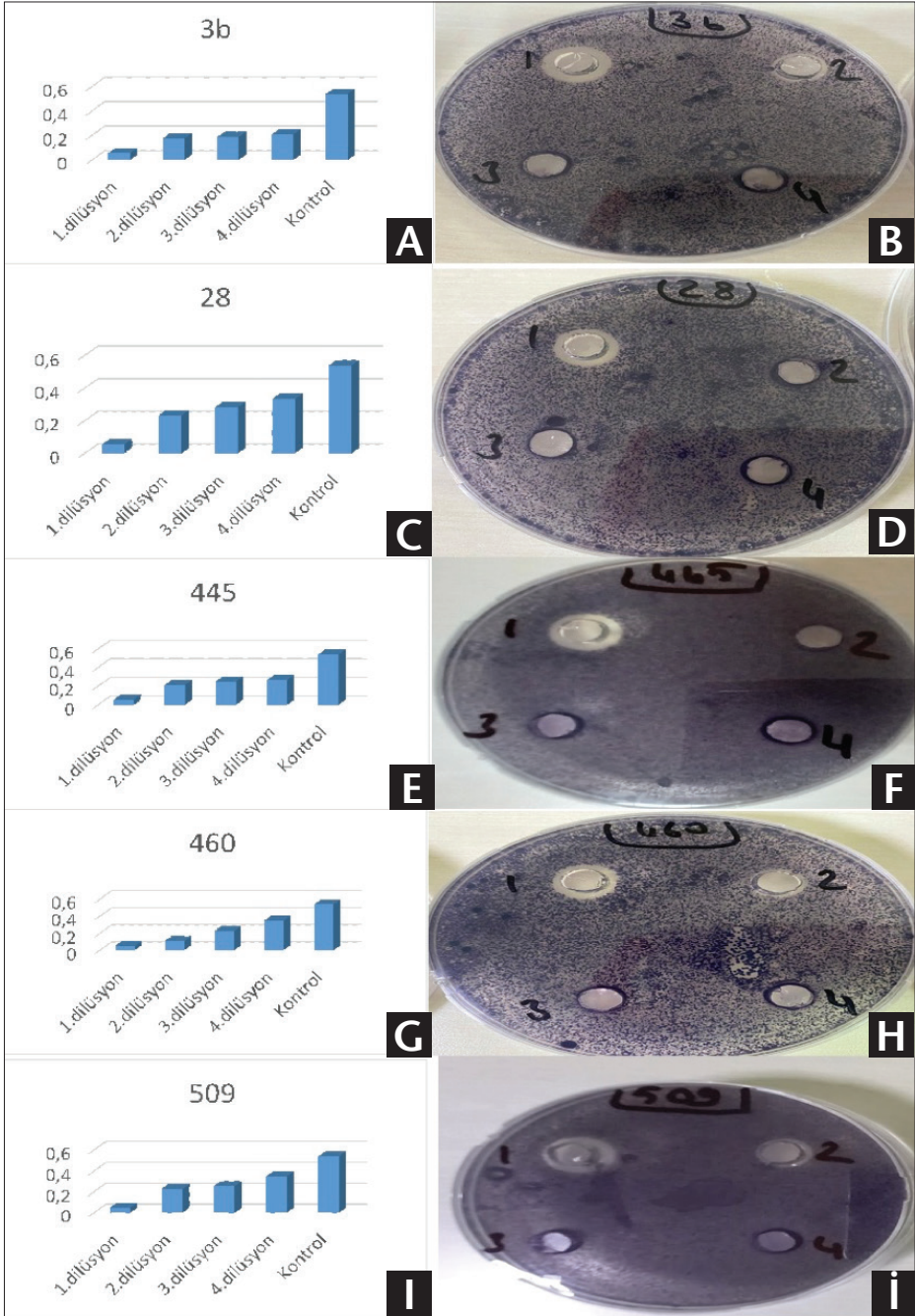
Tablo VII. *Corynebacterium* Türlerine Göre Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri

Bakteri Adı (n)	Biyofilm							
	Zayıf		Orta		Güçlü		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>C. accolens</i> (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. afermentans</i> (25)	5	20	1	4	1	4	7	28
<i>C. amycolatum</i> (34)	1	2.9	4	11.8	7	20.6	12	35.3
<i>C. argentoratense</i> (8)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. aurimucosum</i> (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. coyleae</i> (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glucuronolyticum</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. imitans</i> (4)	-	-	1	25	-	-	1	25
<i>C. mucifaciens</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. phoceense</i> (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. propinquum</i> (5)	2	40	1	20	-	-	3	60
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (3)	1	33.3	-	-	1	33.3	2	66.6
<i>C. riegelii</i> (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. simulans</i> (1)	1	100	-	-	-	-	1	100
<i>C. singulare</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> spp. (1)	0	0	1	100	0	0	1	100
<i>C. striatum</i> (141)	35	24.8	17	12.1	8	5.7	60	42.6

TARTIŞMA

Korinebakteriler, çoğu insan ve memelilerde deri ve müköz membranların mikrobiyotasında bulunmaktadır²¹. Son yıllarda, uygulanan invaziv işlemlerin, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının ve immüsupresif hasta sayısının artması, *Corynebacterium* cinsi bakterilere bağlı enfeksiyon ve salgınların sayısında ciddi bir artışa neden olmuştur²².

Corynebacterium türleri, kültürde üreme şekillerine göre saf, başka bir patojen etkenle birlikte ve polimikrobiyal olarak gruplandırıldığında, patojenik potansiyeli yüksek olan



Şekil 1. Agar difüzyon yöntemi ile anti-quorum sensing aktivitesinin değerlendirilmesi sonucunda antimikrobiyal etki gözlenen izolatların üreme görüntüleri ve viyolasin pigment üretimine etkisinin spektrofotometrik ölçüm değerleri (OD585). A, B: 3b numaralı izolat; C, D: 28 numaralı izolat; E, F: 445 numaralı izolat; G, H: 460 numaralı izolat; I, i: 509 numaralı izolat.

Tablo VIII. Korinebakterilerin Agar Difüzyon Yöntemiyle Anti-Quorum Sensing Aktivitesine Bakıldığında Antimikrobiyal Etki Gözlenen İzolatlarda Ölçülen İnhibisyon Zon Çapları (mm) ve Bakteriyel Ekstraktların Konsantrasyonları (mg/mL)

Bakteri No	Bakteri Adı	1. Dilüsyon			2. Dilüsyon			3. Dilüsyon			4. Dilüsyon		
		Zon çapı	Ekstrakt konsantrasyonu	Ekstrakt	Zon çapı	Ekstrakt konsantrasyonu	Ekstrakt	Zon çapı	Ekstrakt konsantrasyonu	Ekstrakt	Zon çapı	Ekstrakt konsantrasyonu	
3b	<i>C. amycolatum</i>	13	100	50	11	50	25	-	25	-	12.5		
28	<i>C. amycolatum</i>	12	85	42.5	-	42.5	21.25	-	21.25	-	10.625		
445	<i>C. amycolatum</i>	13	75	37.5	-	37.5	19.75	-	19.75	-	9.875		
460	<i>C. afermentans</i>	13	60	30	8.5	30	15	-	15	-	7.5		
509	<i>C. amycolatum</i>	14	80	40	11	40	20	-	20	-	10		

C. fermentans izolatlarının %68'inin, *C. amycolatum* izolatlarının %53'ünün ve *C. striatum* izolatlarının ise %55'inin saf kültür olarak ürettiği görülmüştür. Daha çok kontaminasyon olarak düşünülen *C. argentoratense* ve *C. propinquum* izolatlarının ise çoğunluğu polimikrobiyal klinik örneklerde üremiştir. Bu durum, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda tespit edilen ve polimikrobiyal üreme göstermeyen korinebakterilerin enfeksiyon etkeni olma olasılığının daha yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Corynebacterium spp.'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisiyle ilgili en ciddi sorunlardan biri, klinik örneklerden çok ilaca dirençli türlerin izole edilmesi ve belirli bir enfeksiyon türü için uygun antibiyotik tedavisinin seçilmesidir²³. Neemuchwala ve arkadaşları²⁴, 2011-2016 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden (kan, balgam, kemik, sinovyal sıvı vb.) izole edilen 1970 adet *Corynebacterium* izolatının sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında tüm izolatların vankomisin ve linezolide duyarlı olduklarını bulmuşlardır. Antibiyotik direnç oranlarını ise klindamisin, penisilin, siprofloksasin, moksifloksasin, tetrasiklin ve rifampisin için sırasıyla %91.3, %85.5, %73.1, %72.3, %35.8 ve %8.6 olarak bildirmişlerdir. Çaycı ve arkadaşları²², 2014-2016 yılları arasında alt solunum yolu, yara, kan, idrar, kateter, apse, vb. çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan ve etken kabul ettikleri 199 *Corynebacterium* izolatını değerlendirdikleri çalışmalarında izolatların disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik direnç oranlarını siprofloksasin, klindamisin, penisilin, rifampisin, gentamisin, tetrasiklin ve linezolid için sırasıyla %97.7, %96.3, %95.4, %89.6, %75, %69.5 ve %0.5 olarak bulmuşlar, bir izolatın linezolid dirençli olduğunu ve tüm izolatların ise vankomisin duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Çelik ve arkadaşları²⁵ ise çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş anlamlı kabul edilen 107 adet *Corynebacterium* izolatının disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında izolatlarının tamamının vankomisin ve linezolide duyarlı olduğunu; siprofloksasin, rifampisin, tetrasiklin ve klindamisine ise %90 ile %100 arasında değişen oranlarda dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Bu durum, *Corynebacterium* izolatlarında rutin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılmasının gerekliliğini göstermektedir. Farklı ülkelerden yapılan çalışmalarda rifampisin direnç oranları oldukça düşük iken bu çalışmada ve ülkemizde yapılan çalışmalarda bu oranın daha yüksek olması dikkat çekmektedir. Literatür tarandığında hemen hemen bütün *Corynebacterium* izolatları linezolide karşı duyarlı bulunmuşken sadece disk difüzyon yöntemiyle çalışılmış bir çalışmada dirençli izolat bildirilmiştir²². Mevcut durum, bu çalışmanın linezolide dirençli *C. fermentans* bildiren ikinci çalışma olduğunu göstermektedir. Başta linezolid olmak üzere direnç oranlarında farklılık görülmesinde, kullanılan yöntemlerin aynı olmamasının rolü olabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla bu çalışmada disk difüzyon yöntemiyle belirlenen linezolid direnci, gradiyent test yöntemiyle de gösterilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle linezolid direncinin test edilememesi çalışmanın kısıtlılığıdır.

Biyofilm enfeksiyonlarında etken mikroorganizma, mikrobiyota üyesi veya nozokomial bir patojen olabilmektedir²⁶. Oin ve arkadaşları²⁷, hastanede yatan hastaların kan kültürlerinden izole ettikleri çok ilaca dirençli *Corynebacterium* izolatlarının biyofilm oluşturma

oranını %80.4 olarak bulmuş ve bunların %64.3'ünü *C.striatum* olarak tanımlamışlardır. Özdemir ve arkadaşları²⁸, kan kültürlerinden izole ettikleri 126 *Corynebacterium* suşunun antimikrobiyal duyarlılık ve biyofilm oluşturma durumlarını araştırdıkları çalışmalarında izolatların %50.8'inin biyofilm oluşturduğunu bulmuşlardır. Biyofilm oluşturma oranlarını *C.striatum*, *Corynebacterium matruchotii*, *C.affermentans*, *C.amycolatum* ve *C.jejkeium* için sırasıyla %62, %53.8, %50, %50 ve %46 olarak tespit etmişlerdir. *C.mucifaciens*, *Corynebacterium kutscheri*, *C.pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium xerosis*, *C.imitans* ve *C.minutissimum* izolatlarının da biyofilm oluşturdıklarını göstermişlerdir. *C.singulare*, *Corynebacterium aquaticum*, *C.aurimucosum*, *C.propinquum* ve *Corynebacterium bovis* izolatlarının ise biyofilm oluşturmadığı saptanmıştır. Öcalan ve arkadaşları²⁹, çeşitli klinik örneklerden elde edilen *C.striatum* izolatlarını etken ve kontaminasyon/kolonizasyon olarak iki gruba ayırmışlardır. Çalışmaya dahil ettikleri 58 *C.striatum* izolatının 36 (%62.1)'sında biyofilm oluşumu pozitif olarak bildirilmiştir. Biyofilm oluşturan izolatların 23 (%63.9)'ünün etken grubunda yer aldığı ve biyofilm oluşumuyla etken grupta olma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada ise *Corynebacterium* izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri incelendiğinde; izolatların %36.3'ünün biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşturma kapasitelerinin gruplara göre dağılımına bakıldığında; polimikrobiyal gruptaki izolatların biyofilm oluşturma oranı istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte diğer iki gruptan daha düşük oranda bulunmuştur. Güçlü biyofilm oluşturan izolatların çoğu (%64.7) saf kültür grubunda yer almaktadır. Tür düzeyinde biyofilm oluşturma özellikleri değerlendirildiğinde biyofilm oluşturma oranları; *C.striatum*, *C.amycolatum* ve *C.affermentans* izolatları için sırasıyla %42.6, %35.3 ve %28 olarak bulunmuştur. *C.amycolatum* izolatlarının %20.6'sı güçlü biyofilm oluşturmıştır. Bu konuyla ilgili yapılan diğer çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde klinik örnek çeşidine ve *Corynebacterium* türüne göre biyofilm oluşum oranlarının farklılık gösterdiği saptanmıştır. Biyofilm oluşumunun kateter ve yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere birçok enfeksiyona sebep olabilmesi, antibiyotik ve dezenfektanlara direnç gibi konularda önemli role sahip olması nedeniyle *Corynebacterium* kaynaklı enfeksiyonlarda, özellikle tedavi seçiminde, biyofilm oluşturma potansiyeli de göz önünde bulundurulmalıdır.

Hem antibiyotik direnç oranlarına hem de biyofilm oluşturma oranlarına bakıldığında; kültürde başka bir patojen etkenle birlikte üreyen *Corynebacterium* izolatlarının, saf kültür olarak üreyen korinebakteriler ile benzer özellikler gösterdiği, iki grubun da polimikrobiyal üreme saptanan plaklardan elde edilen *Corynebacterium* izolatlarından daha yüksek oranda biyofilm yaptıkları ve çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı daha yüksek oranda dirence sahip oldukları görülmüştür. Elde edilen bu verilere göre, sadece saf olarak üreyen *Corynebacterium* izolatlarının değil, patojen olduğu düşünülen başka bir bakteriyle birlikte üremesi saptanan *Corynebacterium* izolatlarının da dikkate alınması gerektiği düşünülmüştür. *C.striatum*, *C.amycolatum* ve *C.affermentans* izolatlarında biyofilm oluşumları ve antibiyotik direnç oranlarına bakıldığında, özellikle bu türlerin saptanması

durumunda kontaminasyon olarak göz ardı edilmemesi, çok ilaca dirençli profile sahip olabilmeleri nedeniyle tür düzeyinde tanımlama yapılması ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin çalışılması gereklidir.

QS inhibitörleri, biyofilm oluşumunu engellediğinden ve bakteriyel virülansı azalttığından, patojenlerin biyofilm oluşumunu inhibe etmek ve bakteriyel enfeksiyonu kontrol etmek için iyi bir hedef sağlamada ideal bir araç olarak kabul edilirler³⁰. Bu nedenle bilim insanları, antibakteriyel tedaviye alternatif olarak terapötik amaçlı kullanılabilircek antibiyofilm ve anti-QS molekül arayışındadır^{31,32}. Doğal biyolojik aktif bileşiklerin en önemli kaynaklarından biri de mikroorganizmalardır³³. Yapılan çalışmalar, çeşitli bakteri topluluklarından elde edilen ve biyolojik etkiye sahip farklı kimyasal bileşenlerin patojen mikroorganizmalar üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir³¹.

Raissa ve arkadaşları¹⁸, *Actinomyces* izolatlarının biyoaktif bileşiklerinin *Vibrio harveyi*, *Aeromonas hydrophila* ve *S.agalactiae* gibi suda yaşayan patojenik bakterilerin biyofilm yapısına karşı etkisi ve anti-QS aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında; *Actinomyces* izolatu tarafından üretilen ekstraktların, *C.violaceum*'a (vahşi tip) karşı anti-QS aktivitesi gösterdiğini ve bu ekstraktların çoğunun, test edilen tüm patojenik bakterilerin biyofilm yapısını inhibe edici etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. *S.aureus* virülansı, kapsamlı bir şekilde incelenmiş olan QS kontrollü aksesuar gen regülatör (*agr*) genetik lokusunun ekspresyonundan büyük ölçüde etkilenir. Ramsey ve arkadaşları³⁴, *S.aureus*'un *Corynebacterium* spp. ile etkileşimlerinin *S.aureus* virülansını azalttığını varsayarak bunu, bir cilt ve burun kommensali olan *C.striatum* ile *S.aureus*'un in vitro ortamda tek başına ve birlikte yapılan kültürü sırasında gen ekspresyonundaki değişiklikleri test ederek araştırmışlardır. *C.striatum* ile birlikte üretildiğinde, *S.aureus*'ta *agr* QS sistemi tarafından indüklenen birçok genin ekspresyonunu azaltmak için yeterli olduğu bulunmuştur. *C.striatum*'a maruz kalan *S.aureus*'un, epitel hücrelerine artan adezyon sergilediği, bunun kommensal bir durumu yansıttığı ve virülansın zayıflamasını yansıtan hemolizin aktivitesini azalttığı görülmüştür.

Menberu ve arkadaşları³⁵, *C.accolens*'in kronik rinosinüzit hastalarından izole edilen *S.aureus* ve metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda *C.accolens*'in kültür süperantlarının, hem planktonik hem de biyofilm formlarında *S.aureus* ve MRSA'lara karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği belirtilmiştir.

Benli Yardımcı'nın³⁶, toprak örneklerinden izole ettikleri *Bacillus* spp. supernatantlarının antibakteriyel, antibiyofilm ve anti-QS aktivitelerini araştırdığı tez çalışmasında, izolatlardan birinin *P.aeruginosa* ve birinin *S.aureus* üzerinde olan antibakteriyel etkisi saptanmıştır. Sadece bir izolata ait süperantın, bakteriyel iletişim molekülü olan AHL üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu saptanmıştır. Raheel, 2022 yılında yaptığı tez çalışmasında³⁷, vajinal kaynaklı *Lactobacillus* spp. izolatlarından elde ettiği ekzopolisakkaritlerin anti-biyofilm ve anti-QS aktivitelerini belirlemiş ve ayrıca bu maddenin meme kanser hücre hattı hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkilerinin olduğunu tespit etmiştir.

Yapılan çalışmalarda *Lactobacillus*, *Bacillus* gibi mikrobiyota üyesi bakteriler ile *Actinomycetes*, *Streptomyces* gibi çevresel bakterilerin anti-QS aktiviteleri araştırılmış, ancak mikrobiyotamızda yaygın olarak bulunan *Corynebacterium* türleri ile ilgili *C.striatum*'un *S.aureus*'un agr QS sistemi etkisinin araştırıldığı çalışma dışında anti-QS çalışmasına rastlanılmamıştır^{18,34,36,37}. Bu çalışmada, izolat ekstraktlarımızın anti-QS aktivitesi görülmemiş ancak beş izolata ait ekstraktın antimikrobiyal etkisinin gözlenmesi değerli bulunmuştur. Yapılan literatür araştırmasında, *C.accolens*'in kültür süpertenantlarının antimikrobiyal etkisi olduğu bildirilmiştir³⁵. Bu çalışmada ise antimikrobiyal etki gözlenen bakteri ekstraktlarının dördünün *C.amycolatum*, birinin *C.ifermentans*'a aittir. Korinebakterilerin sahip olduğu antimikrobiyal etkiyi, mikrobiyota bakterilerini baskılayarak virülanslarını arttırmada mı yoksa patojen bakterileri baskılayarak enfeksiyon oluşumunu önlemede mi kullandıklarının belirlenmesi için ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak; mikrobiyotamızda bulunan çoğunlukla kontaminant olarak düşünülen korinebakterilerin, aynı zamanda enfeksiyon etkeni olması ve biyofilm gibi nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli olan virülans faktörlerinin bulunması nedeniyle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha dikkatli değerlendirilmesi gereken bir cins bakteri olduğu akılda bulunmalıdır. Ayrıca bazı korinebakteri ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin görülmesi, mikrobiyota bakterileri ile daha fazla sayıda QS çalışması yapılması gerektiğini düşündürmüştür.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Düzce Üniversitesi Girişimsel Olmayan Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 04.07.2022 ve Karar No: 2022/132).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Listeria* and related gram-positive bacteria. *Medical Microbiology*. 9th edition. pp. 217-25. Elsevier, USA, 2021.
2. Funke G, Bernard KA. *Coryneform gram-positive rods*. pp: 474-505, In: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 2015, 11th ed. ASM Press, Washington, DC, USA. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch28>
3. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. *Corynebacterium* species. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 7th edition. pp.1284-312. Wolters Kluwer Health, 2017.
4. Kim R, Reboli AC. Other coryneform bacteria, *Arcanobacterium haemolyticum* and *Rhodococci*.pp. 2532-43. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2020, 9th edition, Elsevier, USA,.
5. Nudel K, Zhao X, Basu S, Dong X, Hoffmann M, Feldgarden M, et al. Genomics of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen of immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(9): 1016.e7-1016.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.024>

6. Ramos JN, Rodrigues IDS, Baio PVP, Veras JFC, Ramos RTJ, Pacheco LG, et al. Genome sequence of a multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* isolated from bloodstream infection from a nosocomial outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018; 113(9): e180051. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180051>
7. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12(3): 185-90. <https://doi.org/10.1097/01.moo.0000124936.46948.6a>
8. Çepni FE. Bakteriyel quorum-sensing inhibitörlerinin araştırılması ve biyokimyasal olarak tanımlanması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 2014.
9. Kong KF, Vuong C, Otto M. Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(2-3): 133-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.042>
10. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(2-3): 149-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>
11. Russo E. The birth of biotechnology. *Nature* 2003; 421(6921): 456-7. <https://doi.org/10.1038/nj6921-456a>
12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2024. Available from: <http://www.eucast.org/>
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Reading Guide For Broth Microdilution. Version 4.0. January 2022. Available from: <https://www.eucast.org>.
14. 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>
15. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175-9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
16. Ma ZP, Song Y, Cai ZH, Lin ZJ, Lin GH, Wang Y, et al. Anti-quorum sensing activities of selected coral symbiotic bacterial extracts from the South China Sea. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8: 144. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00144>
17. Raissa G, Waturangi DE, Wahjuningrum D. Screening of antibiofilm and anti-quorum sensing activity of *Actinomycetes* isolates extracts against aquaculture pathogenic bacteria. *BMC Microbiol* 2020; 20(1): 343. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02022-z>
18. Erdönmez D, Rad AY, Aksöz N. Anti-quorum sensing potential of antioxidant quercetin and resveratrol. *Brazilian Arch Biol Technol* 2018; 61: e18160756. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160756>
19. Miao L, Xu J, Yao Z, Jiang Y, Zhou H, Jiang W, et al. The anti-quorum sensing activity and bioactive substance of a marine derived *Streptomyces*. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2017; 31(5): 1007-15. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1348253>
20. Kaźmierczak AK, Szarapińska-Kwaszewska JK, Szewczyk EM. Opportunistic coryneform organisms-residents of human skin. *Polish J Microbiol* 2005; 54(1): 27-35.
21. Tanrıverdi Çaycı Y, Korkmaz F, Birinci A. Hastanemizde 2014-2017 yıllarında üreyen *Corynebacterium* izolatlarının değerlendirilmesi. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilim Derg* 2017; 3(2): 6-8. <https://doi.org/10.30934/kusbed.319802>
22. Olender A. Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy* 2013; 59(4): 294-306. <https://doi.org/10.1159/000357467>
23. Neemuchwala A, Soares D, Ravirajan V, Marchand-Austin A, Kus JV, Patel SN. In vitro antibiotic susceptibility pattern of non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(4): e01776-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01776-17>
24. Çelik C, Büyüktuna SA, Tutar U, Gözel MG, Uysal EB, Bakıcı MZ. Antimicrobial susceptibility in bacteria of *Corynebacterium* species the pathogen role of which regains importance in various infections. *Türkiye Klin J Med Sci* 2016; 36(3): 138-42. <https://doi.org/10.5336/medsci.2016-52325>
25. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med* 2008; 59: 415-28. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.132000>

26. 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>
27. Ozdemir S, Aydoğan O, Koksak Cakırlar F. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of non-diphtheriae *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>
28. 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. <https://doi.org/10.5578/mb.20239901>
29. Liu L, Wu R, Zhang J, Shang N, Li P. D-ribose interferes with quorum sensing to inhibit biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9. *Front Microbiol* 2017; 8: 1860. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01860>
30. Nithya C, Begum MF, Pandian SK. Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 88(1): 341-58. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2777-y>
31. Uroz S, Dessaux Y, Oger P. Quorum sensing and quorum quenching: The yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem* 2009; 10(2): 205-16. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800521>
32. Esikova TZ, Temirov IV, Sokolov SL, Alakhov IB. Secondary antimicrobial metabolites produced by thermophilic *Bacillus* spp. strains VK2 and VK21. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2002; 38(3): 261-7. <https://doi.org/10.1023/A:1015463122840>
33. Ramsey MM, Freire MO, Gabriliska RA, Rumbaugh KP, Lemon KP. *Staphylococcus aureus* shifts toward commensalism in response to *Corynebacterium* species. *Front Microbiol* 2016; 7: 1230. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01230>
34. Menberu MA, Liu S, Cooksley C, Hayes AJ, Psaltis AJ, Wormald PJ, et al. *Corynebacterium accolens* has antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S.aureus* pathogens isolated from the sinonasal niche of chronic rhinosinusitis patients. *Pathogens* 2021; 10(2): 207. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020207>
35. Benli Yardımcı G. Toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* sp. metabolitlerinin antibakteriyel, antibiyofilm ve anti-quorum sensing aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2022.
36. Raheel NM. Vajinal kaynaklı *Lactobacillus* spp. suşlarından elde edilen ekzopolisakaritlerin antibiyofilm ve anti-quorum sensing aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, 2022.