

Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması

Investigation of Various Virulence Factors of *Klebsiella pneumoniae* strains Isolated from Nosocomial Infections

Halit KUŞ¹, Uğur ARSLAN², Hatice TÜRK DAĞI², Duygu FINDIK²

¹ Konya Beyhekim Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya.

¹ Konya Beyhekim State Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Konya, Turkey.

² Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

² Selçuk University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Konya, Turkey.

* Bu çalışma 25. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (25-28 Nisan 2015, Kopenhag, Danimarka)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 23.05.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.09.2017

ÖZ

Klebsiella pneumoniae genellikle immünsupresif hastaları etkileyen ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir. *K.pneumoniae* özellikle kapsül polisakkaridi, hipermukoviskozite (HV), fimbria, toksinler ve demir alım determinantları gibi pek çok virülans faktörüne sahiptir. Bu çalışmanın amacı, iki yıl içerisinde hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen *K.pneumoniae* izolatlarında çeşitli virülans faktörlerini araştırmaktır. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2011-2013 yılları arasında çeşitli kliniklerde hastane enfeksiyonu tanısı almış hastalara ait örneklerden izole edilen 53 adet *K.pneumoniae* izolatı çalışmaya alınmıştır. İzolatların tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testleri VITEK 2 otomatik sistemi (bioMérieux, Almanya) ile yapılmıştır. Biyofilm oluşturma yetenekleri, alfa hemolizin üretimi, kapsül ve hipermukoviskozite özellikleri fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır. Adezin kodlayan virülans genleri (*fimH-1*, *mrkD*, *kpn*, *ycfM*), siderofor genleri (*entB*: enterobactin, *iutA*: aerobactin, *irp-1*, *irp-2*, *ybtS*, *fyuA*: yersiniabactin, *iroN*: catechols receptor) protektin veya invazinin (*rrmPA*, *magA*, *traT*) ve toksin (*hlyA*, *cnf-1*) virülans genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Toplam 53 *K.pneumoniae* izolatının 12 (%22.6)'si reanimasyon yoğun bakım ünitesi, 8 (%15.1)'i tıbbi onkoloji servisi, 7 (%13.2)'si yenidoğan yoğun bakım ünitesi ve 26 (%49)'sı diğer servislerde ya-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Uğur Arslan, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 42131, Selçuklu, Konya, Türkiye.
Tel (Phone): +90 533 365 3391, E-posta (E-mail): drarslanugur@gmail.com

tan hastalardan izole edilmiştir. Örneklerle göre izolatların dağılımı şu şekildedir: 14 (%26.4)'ü idrar, 13 (%24.5)'ü kan, 10 (%18.9)'u drenaj sıvısı, 8 (%15.1)'i yara, 7 (%13.2)'si bronkoalveoler lavaj ve 1 (%19)'i beyin omurilik sıvısından üretilmiştir. İzolatların %5.7'si meropeneme dirençli, %71.7'si genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi pozitif olarak bulunmuştur. Kapsül, biyofilm formasyonu ve HV görülme sıklığı sırasıyla %100, %79.2 ve %1.9 olarak saptanmıştır. Alfa hemolizin varlığı tespit edilmemiştir. *entB* (%96.2), *ycfM* (%86.8) ve *mrkD* (%83.0) genleri en yüksek düzeyde saptanan genler olmuştur. Araştırılan diğer genler; *fimH-1* (%64.2), *fyuA* (%54.7), *kpn* (%49.1), *ybtS* (%41.5), *irp-1* (%41.5), *irp-2* (%37.7), *traT* (%11.3) ve *iutA* (%5.7%) farklı sıklıklarda saptanmıştır. İzolatlarda *iroN*, *rmpA*, *magA*, *hlyA* ve *cnf-1* genleri tespit edilmemiştir. Enterobaktin geni sideroforlar arasında, *ycfM* ve *mrkD* genleri adezinler arasında en sık saptanan virülans genleri olmuştur. Kapsül ve biyofilm oluşumu izolatlarda sıklıkla belirlenmiştir. Hipermukoviskozite yalnızca bir izolatta belirlenmiş ancak ilişkili genler tespit edilmemiştir. Sonuç olarak; alfa hemolizin üretimi, *hlyA* ve *cnf-1* genleri hiçbir izolatta gözlenmemiştir. Hastane enfeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* izolatlarında kapsül, adezinler, enterobaktin ve biyofilm oluşturma bu izolatların patojenitelerinin temelini oluşturmuştur. *K.pneumoniae*'ya bağlı hastane enfeksiyonlarının kontrolünde antibiyotik direncinin yanı sıra toksin ve invazyon yeteneğinin sürekli takip edileceği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Hastane enfeksiyonu; *Klebsiella pneumoniae*; virülans.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen that commonly affects immunosuppressed patients and causes nosocomial infections. *K.pneumoniae* has a variety of virulence factors, especially capsule polysaccharide, hypermucoviscosity (HV), fimbriae, toxins and determinants for iron acquisition. The aim of this study was to detect the virulence factors in *K.pneumoniae* strains isolated from nosocomial infections in two years. Fifty three *K.pneumoniae* strains isolated from the samples of patients with nosocomial infections in the Medical Microbiology Laboratory of Selcuk University Faculty of Medicine Hospital between 2011 and 2013 were included in the study. Identification and antimicrobial susceptibilities of the isolates were performed by VITEK 2 automatic system. Biofilm formation, α -hemolysin, capsule and HV were investigated by phenotypic methods. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect virulence genes encoding adhesins (*fimH-1*, *mrkD*, *kpn*, *ycfM*), siderophores (*entB*: enterobactin, *iutA*: aerobactin, *irp-1*, *irp-2*, *ybtS*, *fyuA*: yersiniabactin, *iroN*: catechols receptor), protectines or invasins (*rmpA*, *magA*, *traT*) and toxins (*hlyA*, *cnf-1*). Of the 53 *K.pneumoniae* isolates, 12 (22.6%) were isolated from in patients of reanimation intensive care unit, 8 (15.1%) medical oncology, 7 (13.2%) newborn intensive care unit and 26 (49%) other clinics. The distribution of the isolates according to the samples was as follows: urine (n= 14), blood (n= 13), wound (n= 8), drainage fluid (n= 10), broncho-alveolar lavage (n= 7), and cerebrospinal fluid (n= 1). Isolates which were resistant to meropenem were 5.7% and production of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) was 71.7%. The capsule, biofilm formation, and HV were observed in 100%, 79.2%, and 1.9% of the isolates, respectively. Production of α -hemolysin was not detected in any of the isolates. The genes; *entB* (96.2%), *ycfM* (86.8%), and *mrkD* (83.0%) showed high prevalence. The other genes were detected in different ratios: *fimH-1* (64.2%), *fyuA* (54.7%), *kpn* (49.1%), *ybtS* (41.5%), *irp-1* (41.5%), *irp-2* (37.7%), *traT* (11.3%) and *iutA* (5.7%). Virulence genes; *iroN*, *rmpA*, *magA*, *hlyA* and *cnf-1* were not detected in any of the isolates. Enterobactin had the highest rate among siderophores, and *ycfM* and *mrkD* in adhesins. The capsule and biofilm formation were commonly found in the isolates. Hypermucoviscosity was only found in one isolate but associated genes were not detected. Alfa hemolysin production and *hlyA* gene were not determined. As a result, it seems that the basis of the pathogenicity of *K.pneumoniae* strains isolated from nosocomial infections are capsule, adhesins, enterobactin and ability of biofilm formation. There is a need for new studies for the continuous monitoring of toxin and invasion ability as well as antibiotic resistance in the control of hospital infection caused by *K.pneumoniae*.

Keywords: Hospital infection; *Klebsiella pneumoniae*; virulence.

GİRİŞ

Klebsiella pneumoniae genellikle immünsupresif ve yatan hastaları etkileyen fırsatçı bir patojendir. Üriner sistem, yumuşak doku, pnömoni ve bakteremi gibi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmaktadır¹. *K.pneumoniae* özellikle kapsül polisakkaridi, hipermukoviskozite (HV), fimbriya, toksinler ve demir alım determinantları gibi pek çok virülans faktörüne sahiptir². Kapsüler polisakkaritler fagositoza direnci sağlayan ve bakterisidal serum faktörleri tarafından bakterinin öldürülmesini önleyen önemli bir virülans faktörüdür. HV fenotipi *K.pneumoniae*'nin invaziv sendromları ile ilişkilidir ve bakterinin virülansını artırdığı düşünülmektedir^{3,4}. *K.pneumoniae* izolatlarının siderofor genlerinden herhangi birini kazanması insanlarda ciddi enfeksiyon riskini artırmaktadır. Demir bakterilerin hayatta kalması için gereklidir ve HV fenotipi, artmış demir bağlama aktivitesi ile ilişkilidir^{5,6}. Diğer önemli bir virülans faktörü biyofilm oluşturma yeteneğidir^{7,8}. Biyofilm, birbirine ya da bir yüzeye ve dokulara yapışık bakterinin kendi ürettiği organik bir polimer matriks içine gömülmesidir. Biyofilm bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden ve ultraviyolenin zararlarından korumaktadır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve humoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur⁹. Bu çalışmanın amacı, nozokomiyal enfeksiyonu olan hastalardan elde edilen *K.pneumoniae* izolatlarında antibiyotik direnç oranlarını ve çeşitli virülans faktörlerini belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2011-2013 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve Enfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından hastane enfeksiyonu etkeni olarak kabul edilen 53 adet *K.pneumoniae* izolatu çalışmaya alındı. Aynı hastadan izole edilen *K.pneumoniae* izolatlarından sadece biri çalışmaya dahil edildi. Kalite kontrol olarak ATCC 700603 *K.pneumoniae* standart suşu kullanıldı. Konvansiyonel yöntemlerle cins düzeyinde *Klebsiella* olarak tanımlanan izolatların tür düzeyinde ayrımı ve antibiyotik duyarlılık testi VITEK 2 otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa) ile gerçekleştirildi.

Alfa Hemoliz Oluşumunun Araştırılması

Alfa hemolizin testi iki farklı yöntemle gerçekleştirildi. İlk yöntemde *K.pneumoniae* izolatları %5'lik koyun kanlı agar ekildi ve 18-24 saat 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda alfa hemoliz oluşumu varlığı gözle değerlendirildi. Üreyen kolonilerin etrafında oluşan yeşil renkli hemoliz varlığı alfa hemoliz açısından pozitif olarak kabul edildi. İkinci yöntemde ise *K.pneumoniae* izolatları 2 ml triptik soy buyyonda 37°C etüvde bir gece inkübe edildi. Daha sonra tüpler 4000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 1 ml alınıp cam tüpe konuldu ve üzerine %2'lik koyun eritrosit süspansiyonundan 1 ml ilave edildikten sonra 37°C'de iki saat inkübe edildi. Süre sonunda tekrar santrifüj edilerek süpernatanda görülen kırmızı renk varlığı alfa hemoliz açısından pozitif olarak kabul edildi¹⁰.

Kapsül Varlığının Araştırılması

Kapsül varlığı negatif bir boyama yöntemi olan çini mürekkebi boyama tekniği ile araştırıldı. Mikroskopta x40 objektifle inceleme yapıldı. Bakteri etrafında görülen beyaz boşluklar kapsül varlığı açısından pozitif olarak değerlendirildi. Daha sonra preparatlar sulu fuksin boyası ile boyandı ve mikroskop altında ikinci bir inceleme yapıldı. İnceleme sonucunda kapsül olarak tanımlanan beyaz alanların renk alıp almadığı değerlendirildi¹¹.

HV Varlığının Araştırılması

HV varlığını araştırmak için *K.pneumoniae* izolatları brain heart infüzyon agarda 37°C'ye ayarlanmış etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Standart öze ile tek başına üreme olan bir koloninin yüzeyine değdirilip yavaşça yükseltiyle ip şeklinde uzama olup olmadığı incelendi. İp şeklindeki oluşum 5 mm'den büyük ise HV testi pozitif olarak kabul edildi¹².

Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

K.pneumoniae izolatları Luria buyyonda üç gün arka arkaya pasajlanarak üretildi. Üçüncü pasajın sonrasında örneklerin optik dansitesi spektrofotometre (Boeco S-22 UV/Vis, Almanya) cihazında 540 nm'de 0.56-0.64 absorbans olacak şekilde ayarlandı. Absorbans ayarlanan örneklerden 200 µL 96 kuyucuklu mikrolaklara aktarıldı. Kontrol kuyucuklarına sadece LB besiyeri konuldu. Mikrolaklar 25°C'de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda her kuyucuğa 25 µL kristal viyole eklendi. Mikrolaklar çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında beklendi. Fosfat tamponu (PBS) ile üç kere yıkandıktan sonra %96 konsantrasyonda etanol eklendi. Örneklerin absorbansı 590 nm dalga boyunda (BioTek ELx800, BioTek Instruments, Inc., ABD) spektrofotometrede ölçüldü. Ölçüm sonucunda bakteri içeren kuyucuklardan elde edilen değerlerden kontrol kuyucuğundan elde edilen değer çıkarıldı. Sonuç 0.1'in üstünde ise pozitif, 0.1'in altında ise negatif olarak kabul edildi¹⁰.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Virülans Genlerinin Araştırılması

K.pneumoniae izolatlarının DNA izolasyonu QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın önerilerine göre yapıldı. Daha önceden tanımlanmış olan virülans genlerinden tip1 ve tip3 adezin (*fimH-1*, *mrkD*), FimH-like adezin (*kpn*), dış membran lipoprotein (*ycfM*), katekolat siderofor reseptör (*iroN*), enterobaktin biyosentez (*entB*), aerobaktin reseptör (*iutA*), yersiniabaktin reseptör (*fyuA*), yersiniabaktin biyosentez (*irp-1*, *irp-2*, *ybtS*), serum direnci ile ilişkili dış membran lipoprotein (*traT*), mukoid düzenleyici fenotip A (*rmpA*), mukoviskosite-ilişkili gen A (*magA*), hemolizin A (*hlyA*) ve sitotoksik nekrotizan faktör-1 (*cnf-1*) için uygun primerler kullanılarak PCR yöntemiyle araştırıldı (Tablo I). Amplifikasyon ürünleri %2 agaroz jelde 100V'da 1 saat yürütüldükten sonra etidyum bromür ile boyanarak UV ışık altında GelDoc sistemi yardımıyla görüntülendi.

Tablo 1. Çalışmamızda Araştırılan Virülans Genlerinin Primer Dizileri, Bağlanma Isıları ve Baz Çifti (bp) Uzunlukları

Primer	Primer dizisi (5'-3')	Bağlanma ısısı (°C)	Çoğaltılan baz çifti (bp)	Kaynak
<i>fimH-1-F</i>	ATGAACGCCTGGTCCTTTGC	55	688	10
<i>fimH-1-R</i>	GCTGAACGCCTATCCCCCTGC			
<i>mrkD-F</i>	CCACCAACTATTCCCTCGAA	52	240	13
<i>mrkD-R</i>	ATGGAACCCACATCGACATT			
<i>Kpn-F</i>	GTATGACTCGGGGAAGATTA	55	626	10
<i>Kpn-R</i>	CAGAAGCAGCCACCACACG			
<i>ycfM-F</i>	ATCAGCAGTCGGGTCAGC	55	160	10
<i>ycfM-R</i>	CTTCTCCAGCATTAGCG			
<i>entB-F</i>	ATTCCTCAACTTCTGGGGC	57	371	10
<i>entB-R</i>	AGCATCGGTGGCGGTGGTCA			
<i>iutA-F</i>	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	63	300	14
<i>iutA-R</i>	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
<i>irp-1-F</i>	TGAATCGCGGTGTCTTATGC	57	238	15
<i>irp-1-R</i>	TCCCTCAATAAAGCCCACGCT			
<i>irp-2-F</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	57	287	15
<i>irp-2-R</i>	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT			
<i>ybtS-F</i>	AGTGGTGCGTTCTGCGTC	50	477	10
<i>ybtS-R</i>	ATTCTACATCTGGCGTTA			
<i>fyuA-F</i>	GCGACGGGAAGCGATGATTTA	56	547	15
<i>fyuA-R</i>	TAAATGCCAGGTCAGGTCACCT			
<i>iroN-F</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	63	665	14
<i>iroN-R</i>	GACGCCCACATTAAGACGCAG			
<i>traT-F</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	63	290	14
<i>traT-R</i>	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG			
<i>rmpA-F</i>	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	50	535	16
<i>rmpA-R</i>	CTTGATGAGCCATCTTTCA			
<i>magA-F</i>	GGTGCTCTTTACATCATTGC	59	1282	17
<i>magA-R</i>	GCAATGGCCATTTGCGTTAG			
<i>hlyA-F</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	63	1177	14
<i>hlyA-R</i>	ACCATATAAGCGGTCATCCCCGTCA			
<i>cnf-1-F</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	56	498	14
<i>cnf-1-R</i>	CATTAGAGTCTCTGCCCTCATTATT			
<i>Int-F</i>	TGCGCCATGCGGTCCATC	55	714	10
<i>Int-R</i>	GGTGATAAGATTCTCGG			
<i>asnT-int-F</i>	ATCGCTTTGCGGGCTTCTAGGT	55	1393	10
<i>asnT-int-R</i>	GAACGGCGGACTGTTAAT			

BULGULAR

Toplam 53 *K.pneumoniae* izolatının 12 (%22.6)'si reanimasyon yoğun bakım ünitesi, 8 (%15.1)'i tıbbi onkoloji servisi, 7 (%13.2)'si yenidoğan yoğun bakım ünitesi ve 26 (%49)'sı diğer kliniklerde yatan hastalardan izole edilmiştir. İzolatların 14 (%26.4)'ü idrardan, 13 (%24.5)'ü kandan, 10 (%18.9)'u drenaj sıvısından, 8 (%15.1)'i yara örneklerinden, 7 (%13.2)'si bronkoalveoler lavajdan ve 1 (%1.9)'i beyin omurilik sıvısı (BOS)'ndan üretilmiştir. İzolatların %5.7'si meropeneme dirençli, %71.7'si genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi pozitif olarak bulunmuştur. *K.pneumoniae* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları Tablo II'de gösterilmiştir.

K.pneumoniae izolatlarının hiçbirinde triptik soy buyyon ve %5 koyun kanlı agar yöntemleriyle alfa hemolizin üretimi belirlenmemiştir. İzolatların tümünde çini mürekkebi yöntemiyle kapsül varlığı görülmüştür. HV testi onkoloji servisinden gelen yara örneğinden izole edilen 1 (%1.9) izolatta saptanmıştır. Bu izolatta adezin genlerinin tümü (*ycfM*, *mrkD*, *fimH-1* ve *kpn*) PCR ile pozitif bulunmuştur. İzolatın ampisilin dışında test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo II).

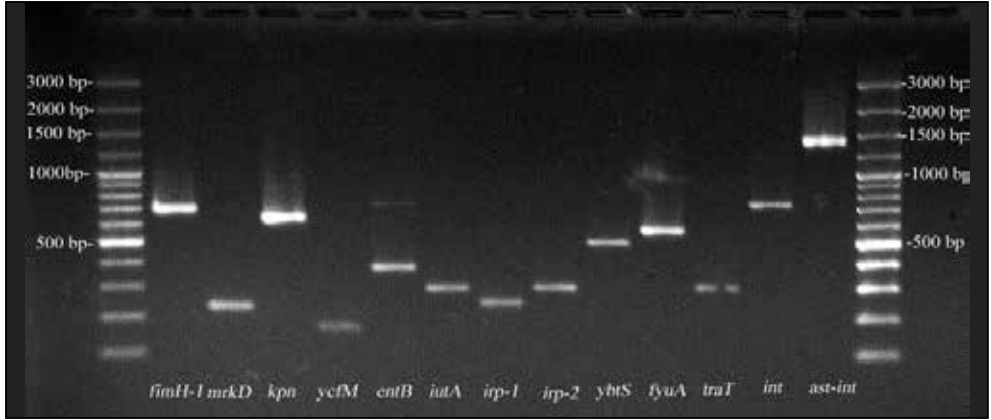
Biyofilm oluşumu 43 (%81.1) izolatta pozitif, 10 (%18.9) izolatta negatif olarak tespit edilmiştir. Virülans genlerinden siderofor ilişkili *entB* geni %96.2, *fyuA* %54.7, *irp-1* ve *ybtS* %41.5, *irp-2* %37.7 ve *iutA* %5.7 sıklığında bulunurken, *iroN* izolatların hiçbirinde belirlenmemiştir. Adezin genlerinden *ycfM* geni %86.8, *mrkD* %83.0, *fimH-1* %64.2 ve *kpn* %49.1 oranında tespit edilmiştir. Serum direnci ile ilişkili dış membran lipoprotein geni *traT* geni (%11.3) invazin genleri arasında saptanan tek gen olmuş, diğer invazin genleri *magA* ve *rmpA* izolatların hiçbirinde belirlenmemiştir. Toksin varlığını gösteren *hlyA* ve *cnf-1* genleri de izolatların hiçbirinde saptanmamıştır (Tablo III). PCR'de pozitif saptanan genlerin jelde örnek bir görünümü Resim 1'de sunulmuştur.

Tablo II. *K.pneumoniae* İzolatlarının Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Oranları

Antibiyotikler	Direnç oranları (%)
Ampisilin	100
Sefuroksim aksetil	69.1
Seftriakson	67.9
Amoksisilin-klavulanik asit	62.3
Seftazidim	60.4
Trimetoprim-sülfametoksazol	56.6
Piperasilin-tazobaktam	41.5
Gentamisin	39.6
Siprofloksasin	32.1
Amikasin	18.9
Ertapenem	7.5
Meropenem	5.7

Tablo III. *K.pneumoniae* İzolatlarına Ait Virülans Genlerinin Sayı ve Yüzdeleri

Virülans faktörleri	Adezinler				invasinler			Siderofor						Toksinler		
	ycfM	mrkD	fimH-1	kpn	traT	rmpA	magA	ENT	AER	CR	YEB					
Toplam sayı (n= 53)	46	44	34	26	6	0	0	51	3	0	29	22	22	20	0	0
%	86.8	83	64.2	49.1	11.3	0	0	96.2	5.7	0	54.7	41.5	41.5	37.7	0	0



Resim 1. PCR sonucu genlerin jelde görünümü ve baz çiftleri (bp): *fimH-1* (688 bp), *mrkD* (240 bp), *kpn* (626 bp), *ycfM* (160 bp), *entB* (371 bp), *iutA* (300 bp), *irp-1* (238 bp), *irp-2* (287 bp), *ybtS* (477 bp), *fyuA* (547 bp), *traT* (290 bp), *int* (714 bp), *ast-int* (1393 bp).

TARTIŞMA

Klebsiella patogeneğinde biyofilm oluşumu ve gelişiminin önemli bir rolü olduğu ileri sürülmüştür. İdrar yolu enfeksiyonları ve kateter ilişkili enfeksiyonlar ile biyofilm oluşumu arasında ilişki olup olmadığı birçok araştırmada irdelenmiştir. Tekrarlayan ve kronik idrar yolları enfeksiyonlarında idrar yollarında biyofilm oluşumu bu enfeksiyonların patogeneğini açıklamaktadır^{9,10}. Çalışmamızda 53 hastane enfeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* izolatının 43 (%81.1)'ünde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumunda rolü olduğu düşünülen adezin genlerinden dış membran lipoprotein geni *ycfM* izolatların %86.8'inde pozitif bulunmuştur. Ardından en sık saptanan gen *mrkD* (%83) olarak saptanmıştır. Bu gruba ait diğer adezin genleri *fimH-1* %64.2 ve *kpn* %49.1 oranında belirlenmiştir. El Fertas-Aissani ve arkadaşlarının¹⁰ araştırmasında, *K.pneumoniae* izolatlarında biyofilm oluşumunu mikropalak yöntemiyle incelemiş, izolatların %88.8'inde biyofilm oluşumu saptanmıştır. Ayrıca adezin genlerinden *fimH-1* geni tüm izolatlarda tespit edilmiştir. Diğer adezin genleri *ycfM*, *mrkD* ve *kpn* genleri sırasıyla %96.3, %96.3 ve %63 olarak bulunmuştur. Alcántar-Curiel ve arkadaşlarının¹⁸ tip1, tip3 adezin ve biyofilm varlığının araştırılmasıyla ilgili yaptıkları çalışmalarında, 69 *K.pneumoniae* izolatının 55 (%79.7)'inde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. İzolatların 52 (%75.4)'sinde tip1, 38 (%55.1)'inde tip3 adezin pozitif olarak belirlenmiş ve izolatların 14 (%20.3)'ünde *mrkD* geni saptanmıştır. Kore'de CTX-M üreten 33 *K.pneumoniae* izolatı ile GSBL negatif 65 izolatın virülans faktörlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada izolatların tamamında *fimH-1* geni tespit edilmiştir¹⁹.

Bakteri hemolizini, ekstraselüler sitotoksik polipeptitlerdir. Eritrosit yanında polimorfonükleer lökosit, monosit ve fibroblast gibi hücrelere de in vitro toksik etki gösterirler. Bakteremili ve piyelonefritli hastalardan elde edilen izolatların alfa hemolizin üretiminin, dışkıdan ve asemptomatik bakteriüri hastalardan izole edilen izolatlardan daha fazla ol-

duğu belirtilmiştir²⁰. Çalışmamızda %5 koyun kanlı agar ve triptik soy buyyon yöntemiyle alfa hemolizin varlığını araştırdığımız *K.pneumoniae* izolatlarının hiçbirinde fenotipik yöntemlerle alfa hemolizin üretimi görülmemiş, alfa hemolizin ilişkili *hlyA* ve *cnf-1* genleri de saptanmamıştır. *K.pneumoniae* izolatlarında alfa hemolizin varlığının araştırıldığı benzer bir çalışmada fenotipik yöntemle izolatların hiçbirinde hemolitik aktivite saptanmamış ve izolatlarda *hlyA* ve *cnf-1* genleri negatif bulunmuştur¹⁰.

Kapsül, *Klebsiella* türlerinin en önemli virülans faktörüdür. Kapsül, bakteriyi polimorfonükleer lökositlerin fagositozundan koruyarak bakterinin bakterisidal serum faktörleri tarafından ölmesini engellemektedir. Klinik izolatların serotip K1 ya da K2 kapsülleri ve/veya HV fenotip olarak bilinen bir kapsül ile bağlantılı mukopolisakkarit ağ yapısı ile ilişkili genlere sahip olduğu bilinmektedir². Singapur ve Taiwanlı araştırmacıların yaptıkları çok merkezli çalışmada karaciğer apselerinden izole edilen 73 *K.pneumoniae* izolatında kapsüller serotiplerle *magA* ve *rpmA*'nın ilişkisi araştırılmış, K1 serotipine sahip 34 izolatta *magA* ve *rpmA* geni, K2 serotipine sahip 15 izolatta sadece *rpmA* geni pozitif bulunmuştur. K1 ve K2 serotipinde olmayan 24 izolatın 16 (%66.7)'sında sadece *rpmA* geni belirlenmiştir. Araştırmacılar, *K.pneumoniae*'ya bağlı karaciğer apselerinde virülansı belirlemede K1 ve K2 kapsüller serotiplerinin *magA* ve *rpmA* genlerinden daha önemli olduğunu ifade etmişlerdir¹⁶. Lin ve arkadaşlarının²¹ 76 sağlıklı yetişkinden ve 67 klinik örnekten izole ettikleri *K.pneumoniae* izolatları ile yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada; peritonitli hastaların hiçbirinde HV fenotipi ve *rpmA* geni saptanmamıştır. Üriner sistem enfeksiyonu olan hastalara ait izolatların 15 (%27.8)'inde HV fenotipi ve 16 (%29.6)'sında *rpmA* geni belirlenirken sağlıklı yetişkinlerin 2 (%2.6)'sinde HV fenotipi ve 9 (%11.8)'unda *rpmA* geni saptanmış ve *K.pneumoniae*'ya bağlı üriner sistem enfeksiyonlarında HV'nin ve *rpmA* geninin önemi vurgulanmıştır. El Fertas-Aissani ve arkadaşlarının¹⁰ *K.pneumoniae* izolatlarında yapılan ve fenotipik yöntemlerin kullanıldığı araştırmalarında izolatların tamamında kapsül varlığı belirlenmiş ve HV testi izolatların %9.2'sinde pozitif bulunmuştur. HV ile ilgili virülans genlerinden *rpmA* izolatların %3.7'sinde pozitif, *magA* izolatların tümünde negatif olarak tespit edilmiştir. Serum direnci ile ilişkili dış membran lipoprotein geni olan *traT* geni izolatların %1.8'inde belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda izolatların tamamında kapsül varlığı gösterilmiştir. HV fenotipi izolatların birinde saptanmış olup, *magA* ve *rpmA* genleri izolatların hiçbirinde belirlenmemiştir. İnvazin genleri arasında saptanan tek gen, *traT* geni olup izolatların %11.3'ünde tespit edilmiştir.

Birçok bakteri, konakta siderofor denilen yüksek afiniteli düşük molekül ağırlıklı şelatlar salgılayarak hücrelerine demir sağlamaktadır. Bu sideroforlar çok hızlı şekilde konak proteinlerine bağlı demiri alma yeteneğindedir. En sık rastlanılan grup fenolat tipi sideroforlardır ve en iyi bilinen örneği *Enterobacteriaceae*'nin ana demir yükseltme sistemini oluşturan ve hemen hemen *Escherichia coli* ve *Salmonella* türlerinin klinik izolatlarında bulunan enterobaktindir²². Yapılan çalışmalarda, *K.pneumoniae* izolatlarında enterobaktin varlığını gösteren enterobaktin biyosentez geni (*entB*) %99-100 oranında belirlenmiştir^{10,23,24}. Buna karşın, çalışmalarda aerobaktin biyosentez geni (*iutA*) daha düşük

düzeyde (%5.5-29.5) bulunmuştur^{10,19,23}. Çalışmamızda *entB* ve *iutA* genleri %96.2 ve %5.7 olarak tespit edilmiştir. Diğer siderofor genlerinden sırasıyla *fyuA* %54.7, *irp-1* %41.5, *ybtS* %41.5, *irp-2* %37.7 ve *iutA* %5.7 olarak bulunurken, *iroN* geni izolatların hiçbirinde belirlenememiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada hastane enfeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* izolatlarının yüksek oranda biyofilm oluşturduğu, ancak düşük oranda HV özelliği gösterdiği saptanmıştır. İzolatların çoğunun siderofor genlerinden *entB* genini ve adezin genlerinden *ycfM* ve *mrkD* genlerini taşıdığı belirlenmiştir. Toksin varlığını gösteren *hlyA* ve *cnf-1* geni izolatların hiçbirinde saptanmamıştır. Hastane enfeksiyonu etkeni olan *K.pneumoniae* izolatlarında kapsül, adezinler, enterobaktin ve biyofilm oluşturma, bu izolatların patojenitelerinin temelini oluşturmıştır. Ancak toksijenite ve HV invazivliği artıran güçlü virülans faktörleri olarak bilinmektedir. Bu virülans faktörleri yatkınlığı olan kişilerde gerçek bir tehdit oluşturmaktadır. Antibiyotik direnci ile birlikte ortaya çıktığında ise daha tehlikeli olacaktır. Hastane enfeksiyonunun kontrolünde antibiyotik direncinin yanı sıra toksin ve invazyon yeteneğinin sürekli takip edileceği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Cescutti P, De Benedetto G, Rizzo R. Structural determination of the polysaccharide isolated from biofilms produced by a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. Carbohydr Res 2016; 430: 29-35.
2. Hennequin C, Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35(3): 333-41.
3. Fang CT, Chuang YP, Shun SC, Wang JT. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. J Exp Med 2004;199(5): 697-705.
4. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, et al. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clin Infect Dis 2006; 42(10): 1351-8.
5. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112(27): e3574-81.
6. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr 2016; 4(1).
7. Domenico P, Salo RJ, Cross AS, Cunha BA. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun 1994; 62(10): 4495-9.
8. Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. Pathogens 2014; 3(3): 743-58.
9. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. APMIS. 2017; 125(4): 272-5.
10. El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. Pathol Biol (Paris) 2013; 61(5): 209-16.
11. Küçüker MA. Boyaların ve besiyerlerinin prensipleri, pp: 182-91. In: Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M (çev.ed.), Klinik Mikrobiyoloji (Manuel of Clinical Microbiology). 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara.
12. Lin WH, Kao CY, Yang DC, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33(9): 1533-9.
13. Sahly H, R Podschun, TA Oelschlaeger, et al. Capsule impedes adhesion and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun 2000; 68: 6744-9.

14. Mamlouk K, Boubaker IBB, Gautier V, et al. Emergence and outbreaks of CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. J Clin Microbiol 2006; 44(11): 4049-56.
15. Schubert S, Cuenca S, Fischer D, Heesemann J. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. J Infect Dis 2000; 182(4): 1268-71.
16. Yeh KM, Karup A, Siu LK, et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 466-71.
17. Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME, Pitt TL. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. FEMS Microbiol Lett 2008; 284(2): 247-52.
18. Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldana Z, et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. Virulence 2013; 4(2): 129-38.
19. Shin J, Ko KS. Comparative study of genotype and virulence in CTX-M-producing and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(4): 2463-7.
20. Kepekçi PS. İdrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* izolatlarında fosfomisin trometamol duyarlılığı, 2005. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
21. Lin WH, Tseng CC, Wu AB, et al. Clinical and microbiological characteristics of peritoneal dialysis-related peritonitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in southern Taiwan. J Microbiol Immun and Infect 2015; 48(3): 276-83.
22. Griffiths E, Chart H, Stevenson P. High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence, pp: 121-37. In Roth JA (eds), Virulence mechanisms of bacterial pathogens, American Society for Microbiology. 1988, Washington.
23. Podschun R, Fischer A, Ullman U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. J Med Microbiol 2000; 49(2): 115-9.
24. Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. Infect Immun 2011; 79(8): 3309-16.