MİKROBİYOLOJİ BÜLTENİ / *BULLETIN OF MICROBIOLOGY*

ISSN: 0374-9096
e-ISSN: 2667-2994

AMAÇ VE KAPSAM

Mikrobiyoloji Bülteni, Ankara Mikrobiyoloji Derneğinin bilimsel içerikli resmi yayın organıdır. Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında olmak üzere yılda 4 sayı olarak yayınlanmaktadır. Mikrobiyoloji Bülteni'nin hedefi, tıbbi ve klinik mikrobiyoloji alanında bilimsel açıdan yüksek nitelikli araştırma makalelerini yayınlamaktır. Ayrıca derleme, kısa bildiri ve raporlar, olgu sunumları, editör görüşü, editöre mektup ve eğitim amaçlı diğer bilimsel yazılar da kabul edilmektedir. Yayın dili Türkçe olan ve kapsamlı Ingilizce özet kısmı içeren Mikrobiyoloji Bülteni, bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik (peer-review) ilkelerine dayanan bir dergidir. Mikrobiyoloji Bülteni'nin hedef kitlesi, tıbbi/klinik mikrobiyoloji uzmanları, enfeksiyon hastalıkları uzmanları, halk sağlığı uzmanları ve ilgili konularda uzmanlık eğitimi alan araştırıcılardır.

Mikrobiyoloji Bülteni, SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED, CLARIVATE ANALYTICS, MEDLINE/PUBMED, SCOPUS, EMBASE, RESEARCHGATE, GENAMICS, TÜRKİYE ATIF DİZİNİ, TÜBİTAK ULAKBIM ve CABELLS SCHOLARLY ANALYTICS veri tabanlarında dizinlenmektedir.

Mikrobiyoloji Bülteni'nin yayınlanmış tüm sayılarına www.mikrobiyolbul.org sitesinden serbest olarak erişilebilir.

Abone İşlemleri

Mikrobiyoloji Bülteni, birçok sağlık kuruluşuna ve üniversite kütüphanelerine ücretsiz olarak gönderilmektedir. Dergiye abone olmak isteyenler, editöre başvurmalıdır.

Editör : Prof. Dr. Özgen Eser
Adres : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye 06100, Ankara
E-posta : ankara.mikrobiyoloji@gmail.com
Web sitesi : www.ankaramikrobiyoloji.org.tr

Aidatlar için banka bilgileri:
Banka adı : Yapı Kredi Bankası, Hacettepe Şb., Ankara
Hesap adı : Ankara Mikrobiyoloji Derneği
IBAN No : TR06 0006 701 00000007 1095946

Baskı İzinleri ve Reklam

Baskı izinleri için başvurular Editöre yapılmalıdır. Ancak Ankara Mikrobiyoloji Derneği, kanunen "Kamu Yararına Dernek" kapsamında olduğundan reklam alamamaktadır.

Yazarlara Bilgi

Yazarlara Bilgi kısmına dergi sayfalarından ve www.ankaramikrobiyoloji.org.tr adresinden ulaşılabilir.

Materyal Sorumluluk Reddi

Mikrobiyoloji Bülteni'nde yayımlanan tüm yazılardaki görüş ve raporlar yazar(lar)ın görüşü olup yayın sahibi, editör, yayın kurulu ya da yayımcının görüşü değildir. Ankara Mikrobiyoloji Derneği, yayın sahibi, editör, yayın kurulu ya da yayımcı bu yazılar için herhangi bir sorumluluk kabul etmemektedir.

Dergimizde asitsiz kağıt kullanılmaktadır.

AIMS AND SCOPE

Bulletin of Microbiology is the scientific official publication of Ankara Microbiology Society. It is published quarterly in January, April, July and October. The aim of Bulletin of Microbiology is to publish high quality scientific research articles on the subjects of medical and clinical microbiology. In addition, review articles, short communications and reports, case reports, editorials, letters to editor and other training-oriented scientific materials are also accepted. Publishing language is Turkish with a comprehensive English abstract. The editorial policy of the journal is based on independent, unbiased, and double-blinded peer-review. Specialists of medical and/or clinical microbiology, infectious disease and public health, and clinicians and researchers who are training and interesting with those subjects, are the target groups of Bulletin of Microbiology.

Bulletin of Microbiology is indexed in SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED, CLARIVATE ANALYTICS, MEDLINE/PUBMED, SCOPUS, EMBASE, RESEARCHGATE, GENAMICS, TURKIYE CITATION INDEX, TUBITAK ULAKBIM TR INDEX and CABELLS SCHOLARLY ANALYTICS databases.

Al of the published issues of Microbiology Bulletin are open accessed at www.mikrobiyolbul.org web site.

Subscription Information

Bulletin of Microbiology is sent free of charge to many health care centers and university libraries. Those who demand to subscribe to the journal should contact with the editor.

Editor : Prof. Dr. Özgen Eser
Address : Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sihhiye 06100, Ankara, Turkey
E-mail : ankara.mikrobiyoloji@gmail.com
Web site : www.ankaramikrobiyoloji.org.tr

Permissions and Advertisements

Applications for print permissions should be submitted to the editor. However, advertisements could not be accepted since Ankara Microbiology Society is a public weal society according to the law.

Instructions for Authors

Instructions for authors are published in the journal pages and could be accessed at: www.ankaramikrobiyoloji.org.tr

Material Disclaimer

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in Bulletin of Microbiology reflect the views of the author(s) and not the opinions of the publication owner, editor, editorial board and the publisher. Ankara Microbiology Society, the publication owner, the editor, the editorial board and the publisher disclaim any responsibility or liability for such materials.

The journal is printed on acid-free paper.

MIKROBIYOLOJI BULTENI

PublisherName ANKARA MICROBIOLOGY SOC

Journal Impact Factor ™

2021	Five Year
0.76	**0.756**

JCR Category	Category Rank	Category Quartile
MICROBIOLOGY *in SCIE edition*	133/137	Q4

Source: Journal Citation Reports 2021. Learn moreopen_in_new

Journal Citation Indicator ™ New

2021	2020
0.14	**0.15**

JCI Category	Category Rank	Category Quartile
MICROBIOLOGY *in SCIE edition*	153/158	Q4

The Journal Citation Indicator is a measure of the average Category Normalized Citation Impact (CNCI) of citable items (articles and reviews) published by a journal over a recent three year period. It is used to help you evaluate journals based on other metrics besides the Journal Impact Factor (JIF).

Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2023;57(1):30-44*/doi: 10.5578/mb.20239903

Geliş Tarihi (Received): 04.07.2022 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 15.10.2022

Klebsiella pneumoniae Hipervirülan Kapsül Genotiplerinin Antibiyotik Duyarlılığı ve Beta-Laktamaz Genleri ile İlişkisi

Relationship of Hypervirulent Capsular Genotypes of *Klebsiella pneumoniae* with Antibiotic Susceptibility and Beta-Lactamase Genes

Duygu DALĞIÇ(ID), Tülay KANDEMİR(ID), Ali ÜÇKAYABAŞI(ID), Toğrul NAĞIYEV(ID)

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.
Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Türkiye.

**Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL 2021-13497 numaralı proje ile desteklenmiş olup Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmaya ait veriler Taşkent Uluslararası Modern Bilimsel Araştırmalar Kongresi (Taşkent Kimya-Teknoloji Enstitüsü 10-11 Mayıs 2022)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.*

Makale Atıfı: *Dalğıç D, Kandemir T, Üçkayabaşı A, Nağıyev T. Klebsiella pneumoniae hipervirülan kapsül genotiplerinin antibiyotik duyarlılığı ve beta-laktamaz genleri ile ilişkisi. Mikrobiyol Bul 2023;57(1):30-44.*

ÖZ

Hastane enfeksiyonu etkeni olan *Klebsiella pneumoniae* sahip olduğu kapsül polisakkaritleri (KP) ile fagositozdan ve serum bakterisidal proteinlerin öldürücü etkisinden korunmaktadır. Özellikle mobil genetik elemanlar vasıtasıyla başarılı bir şekilde antimikrobiyal direnç geliştiren bu bakterinin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde en önemli sorunların başında beta-laktam antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu tutulan beta-laktamaz genlerini edinmeleri gelmektedir. Aşı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde KP'yi hedef alan çalışmaların artması nedeniyle, bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden elde edilen *K.pneumoniae* izolatlarında kapsül genotiplerinin antibiyotik duyarlılığı ve beta-laktamaz genleri ile muhtemel ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. *K.pneumoniae* klinik izolatlarında polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yöntemi ile hipervirülan kapsül tipleri olarak bilinen K1, K2, K5, K20, K54 ve K57 araştırılmıştır. Kapsül genotipleri belirlenen izolatların Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Kolistin direnci sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Karbapenem direnci karbapenem inaktivasyon testi ile doğrulanmıştır. Beta-laktamaz genlerinden $bla_{\text{CTX-M1}}$, $bla_{\text{CTX-M2}}$, $bla_{\text{CTX-M9}}$, $bla_{\text{CTX-M8/25}}$, bla_{KPC}, $bla_{\text{NDM-1}}$ ve $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$ PCR ile araştırılmıştır. Çalışmada kapsül genotipi belirlenmiş 38 *K.pneumoniae* izolatının 15 (%39.5)'inin K5-KP, 12 (%31.6)'sinin K2-KP, yedisinin (%18.4) K20-KP, ikisinin (%5.3) K1-KP, birinin (%2.6) K54-KP ve birinin (%2.6) K57-KP genotipleri olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların %68.4'ünde $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$, %10.5'inde $bl_{\text{aNDM-1}}$, %7.9'unda $bla_{\text{CTX-M1}}$ tespit edilirken; %7.9'unda $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$ ile $bla_{\text{NDM-1}}$, %5.3'ünde de $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$ ile $bla_{\text{CTX-M1}}$ birlikteliği saptanmıştır. Yalnızca üç K20-KP izolatında saptanan $bla_{\text{CTX-M1}}$ geninin, bu genotiple ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, $bla_{\text{NDM-1}}$ tespit edilen izolatların üçü K5-KP ve biri K2-KP iken, $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$ yine en çok K5-KP ve K2-KP'de (sırası ile 10 ve 9 izolatta) saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda; biri K1-KP, diğeri K5-KP olmak üzere kolistine dirençli bulunan iki izolat dışında, en yüksek direnç

İletişim (Correspondence): *Dr. Öğr. Üyesi Toğrul Nağıyev, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balcalı kampüsü, Sarıçam, Adana, Türkiye.*
Tel (Phone): *+90 322 338 6060 (3480),* ***E-posta (E-mail):*** *tnagiyev@cu.edu.tr*

sefotaksime (36/38), en düşük direnç ise gentamisine (23/38) karşı tespit edilmiştir. K5-KP izolatlarının amoksisilin/klavulonat, piperasilin/tazobaktam, sefoksitin ve ertapenem ile direnç ilişkisi; K20-KP izolatlarının amoksisilin/klavulonat, piperasilin/tazobaktam, imipenem, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol ile duyarlılık ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çalışma, Türkiye'de *K.pneumoniae* kapsül genotipleri ile beta-laktamaz genlerinin ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Sonuç olarak araştırmanın, kapsülün virülanstaki önemini aydınlatmaya yönelik daha geniş çaplı ve diğer kapsül genotipleri ile antibiyotik direnç genlerinin de inceleneceği bölgesel araştırmalara veri sağlayarak, aşı ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesine katkıda bulunacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Antibiyotik duyarlılık; beta-laktamaz; kapsül genotipleri; Klebsiella pneumoniae.*

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae which is a causative agent of nosocomial infections, is protected from phagocytosis and the lethal effect of serum bactericidal proteins owing to its capsular polysaccharides (CPS). The important leading problem in treating infections caused by this bacterium that successfully develops antimicrobial resistance, especially via mobile genetic elements, is that it acquires beta-lactamase genes, which are responsible for the resistance against beta-lactam antibiotics. Due to the increase in studies targeting capsular polysaccharides in developing strategies for vaccination and treatment, we aimed to investigate the possible relationship of the capsular genotypes of *K.pneumoniae* isolates obtained from various clinical specimens with antibiotic susceptibility and beta-lactamase genes. In *K.pneumoniae* clinical isolates; K1, K2, K5, K20, K54 and K57, which are known as hypervirulent capsular types, were investigated by polymerase chain reaction (PCR) method. In isolates whose capsular genotypes were determined, antibiotic susceptibility was examined by Kirby-Bauer disc diffusion method. Colistin resistance was investigated by the broth microdilution method. Carbapenem resistance was confirmed with the carbapenem inactivation test. The beta-lactamase genes $bla_{\text{CTX-M1}}$, $bla_{\text{CTX-M2}}$, $bla_{\text{CTX-M9}}$, $bla_{\text{CTX-M8/25}}$, bla_{KPC}, $bla_{\text{NDM-1}}$, and $bla_{\text{OXA-48-like}}$ were investigated by using PCR. Of the 38 *K.pneumoniae* isolates whose capsular genotypes were determined, 15 (39.5%), 12 (31.6%), seven (18.4%), two (5.3%), one (2.6%) and one (2.6%) were K5-CPS, K2-CPS, K20-CPS, K1-CPS, K54-CPS and K57-CPS genotypes, respectively. $bla_{\text{OXA-48-like}}$, $bla_{\text{NDM-1}}$, and $bla_{\text{CTX-M1}}$ were detected in 68.4, 10.5, and 7.9%, whereas coexistence of $bla_{\text{OXA-48-like}}$ with $bla_{\text{NDM-1}}$, and $bla_{\text{OXA-48-like}}$ with $bla_{\text{CTX-M1}}$ were determined in 7.9, and 5.3% of the isolates, respectively. The relationship of the $bla_{\text{CTX-M1}}$ gene, detected only in three K20-CPS isolates, was found to be statistically significant with this genotype. In addition, of the $bla_{\text{NDM-1-positive}}$ four isolates, three were K5-CPS, and one was K2-CPS, while $bla_{\text{OXA-48-like}}$ was similarly detected mostly in K5-CPS and K2-CPS (10 and 9 isolates, respectively). Except for the two isolates that were resistant to colistin, one K1-CPS and the other K5-CPS, the highest resistance was detected against cefotaxime (36/38) and the lowest resistance was detected against gentamicin (23/38) as a result of antibiotic susceptibility tests. The resistance relationship of K5-CPS isolates with amoxicillin/clavulanate, piperacillin/tazobactam, cefoxitin and ertapenem and the susceptibility relationship of K20-CPs isolates with amoxicillin/clavulanate, piperacillin/tazobactam, imipenem, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole were found as statistically significant. Our study is the first to investigate the relationship between *K.pneumoniae* capsular genotypes and beta-lactamase genes in Turkey. As a result, it is believed that this research will contribute to the determination of vaccine and treatment options by providing data to wider and regional studies that will examine other capsule genotypes and antibiotic resistance genes to clarify the importance of the capsule in virulence.

Keywords: *Antibiotic susceptibility, beta-lactamase, capsular genotypes, Klebsiella pneumoniae.*

GİRİŞ

Hastane enfeksiyonlarında fırsatçı patojenler arasında en sık izole edilen *Klebsiella pneumoniae* gram-negatif, basil formunda, hareketsiz, kapsüllü, sporsuz, mukoid koloniler oluşturan, intestinal florada bulunan *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi bir bakteridir[1]. *K.pneumoniae* suşlarının virülansında önemli rol oynayan ve güçlü bir immünojen olan kapsül, enfeksiyon sırasında bakterinin immün sistemden kaçmasını sağlayarak hem op-

sonofagositozdan hem de bakterisidal serum faktörlerinin öldürücü etkisinden korunmasına yardımcı olmaktadır[2]. Kapsüler polisakkaritlerin tanıda güçlü bir belirteç olma özelliğinden dolayı *K.pneumoniae* suşlarının kapsül (K) antijenlerine göre tiplendirilmesi klinik öneme sahiptir. Günümüze kadar en az 79 kapsül tipi tanımlanmış olup, son yıllarda yapılan tüm genom dizileme çalışmaları ile 100'ün üzerinde kapsül lokus tipi belirlenmiştir. Dünyada en yaygın görülen K tiplerine ait *K.pneumoniae* (KP) suşları K1-KP, K2-KP, K5-KP, K20-KP, K54-KP ve K57-KP olup, invaziv septisemi, piyojenik karaciğer apsesi ve pnömoni olgularından sıklıkla izole edilmektedir. Hipervirülan olarak tanımlanan bu izolatlar bölgesel farklılık göstermektedir[1,3-5].

K.pneumoniae suşlarının hayatta kalmasında ve patojenitesinde en az kapsül polisakkaritleri kadar antimikrobiyal ilaç direnci de klinik öneme sahiptir. Ampisiline doğal dirençli olan *K.pneumoniae* birçok antimikrobiyal ilaca karşı farklı direnç mekanizmaları ile çok ilaç direnci göstermektedir. Özellikle de direnç genlerinin tür içi ve türler arasında mobil genetik elemanlar ile hızla aktarılması sayesinde yüksek seviyede direnç geliştirmesi tedaviyi zorlaştırmakta, mortalite oranlarını artırmakta ve önemli derecede ekonomik yük oluşturmaktadır[6-8]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 yılı verilerine göre en tehlikeli "superbug" (çok antibiyotiğe dirençli suş)'lar listesinde yer alan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *K.pneumoniae* izolatlarının toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlarda klonal seleksiyonla yayılacağı ve mortalitenin en önemli nedenlerinden birisi haline geleceği iddia edilmiştir[7,9]. Antimikrobiyal dirence karşı küresel olarak önlem alınmazsa, 2050 yılına gelindiğinde buna bağlı ölümlerin yılda 10 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir[10].

K.pneumoniae suşlarında hipervirülansa ek olarak çok ilaç direncinde artışla birlikte yeni antimikrobiyal ilaçların eksikliği tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Bu durum kapsüler polisakkaritleri hedef alan immünoterapi gibi alternatif tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, deney hayvanlarında yapılan aşı çalışmalarında *K.pneumoniae* K2 ve K5 antijenlerine karşı yüksek antikor titreleri ile karakterize güçlü immün yanıtın geliştiği başarılı sonuçlar alındığı gözlenmiştir. Böylece, bölgesel olarak farklılık gösteren kapsül tipleri göz önüne alınarak geliştirilecek aşıların ve tedavi stratejilerinin hipervirülans ve çok ilaç direnci gösteren *K.pneumoniae* enfeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde çok önemli bir yer alacağı düşünülmektedir[5,11]. Bu çalışmada bölgemizde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K.pneumoniae* izolatlarının kapsül genotiplerinin antibiyotik duyarlılığı ve beta-laktamaz genleri ile muhtemel ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Karar No: 28 ve Tarih: 06.11. 2020).

Bölgeden izole edilen *K.pneumoniae* izolatlarında dünyada yaygın olarak görülen ve hipervirülan olarak tanımlanan kapsül genotipleri araştırılıp, kapsül tipleri belirlenen izolatların antibiyotik duyarlılıkları ve beta-laktamaz genleri belirlenerek kapsül genotipleri ile antibiyotik direnç profilleri arasında bir ilişki olup olmadığı incelendi.

Örneklerin Toplanması

Çalışmaya Adana Şehir Hastanesinde Kasım 2020 ile Şubat 2021 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilerek anabilim dalında kapsül genotipleri (K1, K2, K5, K20, K54 ve K57) belirlenen 180 *K.pneumoniae* izolatı ve daha önce anabilim dalında yürütülen çalışmada karbapeneme dirençli *K.pneumoniae* izolatlarından kapsül genotipleri belirlenmiş olan 27 izolat dahil edildi.

İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanması

Çalışmada kullanılan tüm izolatların tür düzeyinde tanımlamaları konvansiyonel kültür yöntemleri, üç şekerli demirli besiyerinde [triple sugar iron agar (TSI)] üreme ve biyokimyasal testler [indol, metil kırmızısı, Voges Proskauer, sitrat testleri (IMVIC)] ile yapıldı. Tür tanımlamasını polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yöntemiyle doğrulamak amacıyla, Luria Bertani sıvı besiyerine ekim yapılarak üreyen kolonilerden kaynatma yöntemiyle DNA izole edildi. 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) gen bölgesine ait 130 baz çiftlik [base pair (bp)] bant profiline sahip özgül primer dizisi (F:5'- ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T-3', R: 5'- TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT GTT C-3') kullanıldı[3].

Kapsül Genotiplerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi

Anabilim dalında kapsül genotipleri önceden belirlenmiş olan 27 izolatın kapsül genotipleri (K1, K2, K5, K20, K54 ve K57) özgül primerler kullanılarak PCR yöntemiyle doğrulanırken, 180 *K.pneumoniae* izolatında bu kapsül genotipleri aynı şekilde araştırıldı (Tablo I)[12,13]. Pozitif kontrol olarak daha önce anabilim dalında tespit edilip DNA dizi analizi ile doğrulanan izolatlar kullanıldı. Araştırdığımız kapsül genotiplerine sahip olan izolatların antibiyotik duyarlılıkları ve taşıdıkları beta-laktamaz direnç genlerinin varlığı incelendi.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların ampisilin + sulbaktam (SAM), amoksisilin + klavulonat (AMC), piperasilin + tazobaktam (TPZ), sefotaksim (CTX), sefoksitin (FOX), sefepim (FEP), aztreonam (ATM), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), gentamisin (CN), tetrasiklin (TE), siprofloksasin (CIP) ve trimetoprim/sulfometoksazol (SXT)'e duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) kullanılarak Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)] kriterlerine göre belirlendi[14]. Kolistin direnci için sıvı mikrodilüsyon yöntemi EUCAST kriterlerine göre uygulandı[15]. Karbapenem direncinin doğrulanması için karbapenem inaktivasyon testi kullanıldı[16]. Bu testlerde kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suşu kullanıldı.

Beta-Laktamaz Genlerinin Belirlenmesi

Sık görülen beta-laktamaz genleri (bla$_{CTX-M1}$, *bla*$_{CTX-M2}$, *bla*$_{CTX-M9}$, *bla*$_{CTX-M8/25}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM-1}$ ve *bla*$_{OXA-48-benzeri}$) özgül primer dizileri kullanılarak PCR yöntemiyle daha önce tanımlandığı şekilde araştırıldı (Tablo I)[17-19]. Pozitif kontrol olarak, daha önce anabilim

Tablo I. *Çalışmada Kullanılan Primerler*[13,14,17-19]

Hedef		Primer Adı	Primer Dizilimi (5'–3')	Amplikon Büyüklüğü
Kapsüler Genotipler	K1	MagAF1	GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC	1283 bp
		MagAR1	GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG	
	K2	K2wzy-F1	GAC CCG ATA TTC ATA CTT ACA GAG	641 bp
		K2wzy-R1	CCT GAA GTA AAA TCG TAA ATA GAT GGC	
	K5	K5wzxR639	CCT GAA CCC ACC CCA ATC	280 bp
		K5wzxF360	TGG TAG TGA TGC TCG CGA	
	K20	wzyK20F	CGG TGC TAC AGT GCA TCA TT	741 bp
		wzyK20R	GTT ATA CGA TGC TCA GTC GC	
	K54	wzxK54F	CAT TAG CTC AGT GGT TGG CT	881 bp
		wzxK54R	GCT TGA CAA ACA CCA TAG CAG	
	K57	wzyK57F	CTC AGGGCTAGAAGTGTCAT	1037 bp
		wzyK57R	CAC TAACCCAGAAAGTCGAG	
Beta-laktamazlar	CTXM grup 1	CTXMGp1 F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688 bp
		CTXMGp1-2 R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
	CTX-M grup 2	CTXMGp2 F	CGTTAACGGCACGATGAC	404 bp
		CTXMGp1-2 R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
	CTX-M grup 9	CTXMGp9 F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561 bp
		CTXMGp9 R	TGATTCTCGCCGCTGAAG	
	CTX-M grup 8/25	CTX-MGp8/25 F	AACRCRCAGACGCTCTAC	326 bp
		CTX-MGp8/25 R	TCGAGCCGGAASGTGTYAT	
	KPC	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893 bp
		KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	
	NDM	NDM-1 F	GGTTTGCGATCTGGTTTTC	621 bp
		NDM-1 R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
	OXA-48 benzeri	OXA-48 benzeri F	GCTTGATCGCCCTCGATT	281 bp
		OXA-48 benzeri R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	

*Y= C veya T, R= A veya G,S= G veya C, D= A veya G veya T.

dalında bu gen bölgeleri tespit edilmiş olan, DNA dizi analizi ile doğrulanan izolatlar ve bla_{KPC} için *Enterobacter cloacae* 4861 kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Fisher's exact testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

BULGULAR

Adana Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında elde edilen 180 *K.pneumoniae* izolatının, 11 (%6.1)'inin çalışmada araştırılan hipervirülan kapsül genotiplerine (K1, K2, K5, K20, K54 ve K57) ait olduğu PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Daha önce anabilim dalında çalışılmış olan karbapeneme dirençli *K.pneumoniae* izolatlarından çalışmada araştırılan hipervirülan kapsül genotiplerine sahip 27 izolat PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Kapsül genotipleri belirlenen toplam 38 *K.pneumoniae* izolatının izole edildiği hastaların 21 (%55.3)'inin erkek, 17 (%44.7)'sinin kadın olduğu belirlenmiştir. Kapsül genotipleri belirlenen izolatların yedisi kan, 19'u idrar, beşi aspirat, ikisi balgam, dördü yara ve biri beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinden izole edilmiştir (Tablo II).

Kapsül genotipleri belirlenen toplam 38 *K.pneumoniae* izolatının 15 (%39.5)'inin K5-KP, 12 (%31.6)'sinin K2-KP, yedisinin (%18.4) K20-KP, ikisinin (%5.3) K1-KP, birinin (%2.6) K54-KP ve birinin (%2.6) K57-KP olduğu gözlenmiştir. Kapsül genotipi belirlenen izolatların antibiyotik duyarlılıkları tespit edilmiştir (Tablo II, III).

Biri K1-KP, diğeri K5-KP olmak üzere kolistine dirençli bulunan iki (%5.3) izolat dışında, en düşük direnç %60.5 (23/38) oranı ile gentamisine, en yüksek direnç ise %94.7 (36/38) oranı ile sefotaksime karşı tespit edilmiştir. K2-KP ait izolatlarda direnç oranları en fazla olan antibiyotiklerin %91.7 (11/12) ile trimetoprim/sülfametoksazol ve sefotaksim olduğu, en az direncin ise %41.7 (5/12) oranı ile sefoksitin ve gentamisine karşı olduğu tespit edilmiştir. K5-KP ait izolatlarda, direnç oranı en fazla olan antibiyotiğin %100 (15/15) ile sefotaksim olduğu, en az direncin ise %73.3 (11/15) ile gentamisin ve tetrasikline karşı olduğu tespit edilmiştir. K20-KP ait izolatlarda, direnç oranı en fazla olan antibiyotiğin %100 (7/7) ile sefotaksim olduğu, en az direncin ise %28.6 (2/7) ile amoksisilin/klavulonat, piperasilin/tazobaktam ve tetrasikline karşı olduğu belirlenmiştir (Tablo III).

Kapsül genotiplerinin, saptadığımız antibiyotik direnç oranları ile karşılaştırılması sonucunda K2-KP izolatlarının antibiyotiklerle olan duyarlılık ve direnç ilişkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Buna karşılık K5-KP izolatlarında amoksisilin/klavulonat, piperasilin/tazobaktam, sefoksitin, ertapenem antibiyotikleriyle direnç ilişkisinin (sırasıyla p değerleri= 0.012, 0.005, 0.005, 0.026); K20-KP izolatlarında ise amoksisilin/klavulonat, piperasilin/tazobaktam, imipenem, tetrasiklin, trimetoprim/sülfametoksazol antibiyotikleriyle duyarlılık ilişkisinin (sırasıyla p değerleri= 0.022, 0.034, 0.041, 0.034, 0.041) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Tablo IV).

Kapsül tipi belirlenmiş olan 38 izolatın üçünün (%7.9) $bla_{\text{CTX-M-1}}$, 26 (%68.4)'sının $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$ ve dördünün (%10.5) $bla_{\text{NDM-1}}$ direnç genlerini barındırdığı görülmüştür. $bla_{\text{CTX-M-2}}$, $bla_{\text{CTX-M-9}}$, $bla_{\text{CTX-M-8/25}}$ ve bla_{KPC} direnç genleri hiçbir izolatta tespit edilememiştir. $bla_{\text{CTX-M-1}}$ geni tespit edilen izolatların her üçünün de K20-KP oldukları ve K20-KP'nin %42.9'unu (3/7) oluşturduğu, bunların da ikisinin (%66.7) aynı zamanda $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$ genini de taşıdığı görülmüştür. $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$ geni taşıyan toplam 26 izolatın 10 (%38.5)'unun K5-KP, dokuzunun (%34.6) K2-KP, beşinin (%20.0) K20-KP, birinin (%4.2) K1-KP ve birinin (%4.2) K57-KP olduğu tespit edilmiştir. $bla_{\text{NDM-1}}$ geni taşıyan dört izolattan üçünün (%75.0) K5-KP, birinin (%19.2) ise K2-KP olduğu tespit edilmiştir.

Tablo II. *Kapsül Genotipleri Belirlenen K.pneumoniae İzolatlarında Beta-Laktamaz Gen Dağılımı*

No	Cinsiyet	Yaş	Ünite	Örnek tipi	Kapsüler genotip	Beta-laktamaz genleri
1	Erkek	3	Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	K1	OXA-48 benzeri
2	Erkek	1	Yenidoğan Servisi	Kan	K2	OXA-48 benzeri, NDM-1
3	Kadın	51	Organ Nakli Ünitesi	Kan	K2	OXA-48 benzeri
4	Kadın	89	Genel Yoğum Bakım Ünitesi	Aspirat	K2	
5	Erkek	78	Anestezi ve Reanimasyon Ünitesi	Balgam	K2	
6	Kadın	56	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	İdrar	K2	OXA-48 benzeri
7	Erkek	4	Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi	BOS	K5	NDM-1
8	Erkek	84	Anestezi ve Reanimasyon Ünitesi	Kan	K5	
9	Erkek	54	Palyatif Yoğun Bakım Ünitesi	İdrar	K5	
10	Kadın	62	Nefroloji Servisi	İdrar	K5	OXA-48 benzeri
11	Erkek	81	Organ Nakli Ünitesi	Aspirat	K5	OXA-48 benzeri
12	Erkek	73	Ortopedi Servisi	Yara	K5	OXA-48 benzeri, NDM-1
13	Kadın	44	Üroloji Servisi	İdrar	K5	OXA-48 benzeri
14	Erkek	58	Organ Nakli Ünitesi	İdrar	K5	OXA-48 benzeri
15	Erkek	79	Organ Nakli Ünitesi	İdrar	K5	OXA-48 benzeri
16	Erkek	88	Üroloji Servisi	İdrar	K5	OXA-48 benzeri
17	Kadın	73	Koroner Yoğun Bakım Ünitesi	İdrar	K5	
18	Kadın	77	Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi	İdrar	K5	OXA-48 benzeri
19	Erkek	78	Organ Nakli Ünitesi	Kan	K5	OXA-48 benzeri, NDM-1
20	Kadın	80	Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	K5	OXA-48 benzeri
21	Erkek	79	Fizik Tedavi Servisi	İdrar	K5	
22	Kadın	82	Onkoloji Servisi	İdrar	K20	CTX-M1
23	Kadın	68	Üroloji Servisi	İdrar	K20	OXA-48 benzeri
24	Erkek	63	Nefroloji Servisi	İdrar	K20	OXA-48 benzeri
25	Kadın	4	Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	K20	CTX-M1, OXA-48 benzeri
26	Erkek	53	Beyin Cerrahi Servisi	İdrar	K54	
27	Kadın	42	Dahiliye Servisi	İdrar	K57	OXA-48 benzeri
28	Erkek	56	Genel Yoğum Bakım Ünitesi	İdrar	K1	
29	Erkek	64	Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi	Aspirat	K2	
30	Erkek	35	Palyatif Yoğun Bakım Ünitesi	Yara	K2	OXA-48 benzeri
31	Kadın	69	Genel Yoğun Bakım Ünitesi	Yara	K2	OXA-48 benzeri
32	Kadın	63	Dahili Yoğun Bakım Ünitesi	Aspirat	K2	OXA-48 benzeri
33	Erkek	82	COVID Servisi	Balgam	K2	OXA-48 benzeri
34	Erkek	58	Üroloji Servisi	İdrar	K2	OXA-48 benzeri
35	Erkek	78	Dahili Yoğun Bakım Ünitesi	Aspirat	K2	OXA-48 benzeri
36	Kadın	84	Acil Ambulans Birimi	İdrar	K20	OXA-48 benzeri
37	Kadın	63	Genel Yoğun Bakım Ünitesi	İdrar	K20	
38	Kadın	24	Beyin Cerrahi Servisi	Yara	K20	CTX-M1, OXA-48 benzeri

BOS: Beyin omurilik sıvısı.

bla$_{NDM-1}$ geninin *bla*$_{OXA-48-benzeri}$ ile birlikteliğinin %75.0 (3/4) oranında olduğu, bunlardan da ikisinin (%50.0) K5-KP, birinin (%25.0) K2-KP olduğu gözlenmiştir (Tablo II).

bla$_{OXA-48-benzeri}$ ve *bla*$_{NDM-1}$ genlerinin kapsül genotipleri ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunurken, *bla*$_{CTX-M-1}$ geninin K20-KP ile ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı (p= 0.004) olduğu gözlenmiştir.

Tablo III. *Kapsül Genotipleri Belirlenmiş İzolatların Antibiyotik Direnç Durumu*

	Dirençli İzolat Sayısı														
Kapsüler Genotip	**SAM***	**AMC**	**TPZ**	**CTX**	**FOX**	**FEP**	**ATM**	**ETP**	**IPM**	**MEM**	**CN**	**TE**	**CIP**	**SXT**	**CL**
K1 (n= 2)	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
K2 (n= 12)	9	9	8	11	5	8	8	7	9	9	5	9	8	11	0
K5 (n= 15)	14	14	14	15	14	13	14	14	14	13	11	11	13	12	1
K20 (n= 7)	3	2	2	7	4	4	6	3	3	3	4	2	4	3	0
K54 (n= 1)	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
K57 (n= 1)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Toplam (n= 38)	28	26	25	36	26	27	30	27	29	28	23	25	26	29	2

*SAM: Ampisilin/sulbaktam, AMC: Amoksisilin/klavulonat, TPZ: Piperasilin/tazobaktam, CTX: Sefotaksim, FOX: Sefoksitin, FEP: Sefepim, ATM: Aztreonam, ETP: Ertapenem, IPM: İmipenem, MEM: Meropenem, CN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol, CL: Kolistin.

Tablo IV. *Kapsül Genotiplerinin Antibiyotik Duyarlılığı ile İlişkisi*

		Kapsül Genotipleri			
		K5		K20	
Antibiyotikler		**Negatif**	**Pozitif**	**Negatif**	**Pozitif**
	Duyarlı	11 %91.7	1 %8.3	7 %58.3	5 %41.7
*AMC	Dirençli	12 %46.2	14 %53.8	24 %92.3	2 %7.7
	Ki-Kare Testi Sonucu	p= 0.012		p= 0.022	
	Duyarlı	12 %92.3	1 %7.7	8 %61.5	5 %38.5
TPZ	Dirençli	11 %44	14 %56	23 %92	2 %8
	Ki-Kare Testi Sonucu	p= 0.005		p= 0.034	
	Duyarlı	12 %92.3	1 %7.7	10 %76.9	3 %23.1
FOX	Dirençli	11 %44.0	14 %56	21 %84	4 %16
	Ki-Kare Testi Sonucu	p= 0.005		p= 0.672	
	Duyarlı	10 %90.9	1 %9.1	7 %63.6	4 %36.4
ETP	Dirençli	13 %48.1	14 %51.9	24 %88.9	3 %11.1
	Ki-Kare Test Sonucu	p= 0.026		p= 0.161	
	Duyarlı	8 %88.9	1 %11.1	5 %55.6	4 %44.4
IPM	Dirençli	15 %51.7	14 %48.3	26 %89.7	3 %10.3
	Ki-Kare Test Sonucu	p= 0.061		p= 0.041	
	Duyarlı	9 %69.2	4 %30.8	8 %61.5	5 %38.5
TE	Dirençli	14 %56	11 %44	23 %92	2 %8
	Ki-Kare Test Sonucu	p= 0.501		p= 0.034	
	Duyarlı	6 %66.7	3 %33.3	5 %55.6	4 %44.4
SXT	Dirençli	17 %58.6	12 %41.4	26 %89.7	3 %10.3
	Ki-Kare Test Sonucu	p= 1.000		p= 0.041	

*AMC: Amoksisilin/klavulonat, TPZ: Piperasilin/tazobaktam, FOX: Sefoksitin, ETP: Ertapenem, IPM: İmipenem, TE: Tetrasiklin, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol. p≤ 0.05: İstatistiksel olarak anlamlı.

TARTIŞMA

K.pneumoniae enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminden sorumlu tutulan enzimlerin başında CTX-M gelir. Bu enzimlerin varlığında genellikle diğer antibiyotik grupları ile de birlikte direnç görülmektedir. Dizi homolojilerine göre 170'den fazla alel varyanta sahip olan ve beş majör grupta (CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 ve CTX-M25) kümelenen CTX-M tipi enzimlerin dağılımı bölgesel olarak değişse de, dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de CTX-M1 ve CTX-M2 en yaygın gruplardır. Son yıllarda CTX-M üreten enterobakterilerin prevalansındaki önemli artış tedavi seçeneklerinin sınırlanmasına ve karbapenem kullanımının artmasına yol açarak karbapenem direncinde de artışla sonuçlanmaktadır. Özellikle de *K.pneumoniae* izolatlarında yaygın olan karbapenemazların üretiminden sorumlu direnç genlerinin başında bla_{KPC}, bla_{NDM-1} ve ülkemiz için endemik olan bla_{OXA-48} genleri

gelmektedir[20,21]. *K.pneumoniae* için önemli virülans faktörü olan kapsül, patojenitede ve fagositozdan kaçışta rol oynamaktadır. Aynı zamanda kapsül tipleri enfeksiyonların şiddeti ile ilişkilendirilmiştir[1]. Hipervirülan *K.pneumoniae* (hvKp) izolatları ilk tanımlandığı zamanlarda yaygın kullanılan antibiyotiklere çoğunlukla duyarlıyken, bu izolatlarda antibiyotik direnç genlerini kodlayan mobil genetik elemanların yayılması ile birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişiminin giderek arttığı görülmektedir. Bunun nedeni, şimdiye kadar tam olarak açıklanamasa da hipervirülan izolatlarda hipermukoid fenotipe yol açan kapsüler polisakkaritlerle ilişkili genlere ek olarak diğer bazı virülans genlerini de taşıyan büyük plazmitlerin bulunması, antibiyotik direnç genlerinin de bunun gibi plazmitlerle taşınabileceğini ve hızla yayılabileceğini akla getirmektedir[22-24]. Bu nedenlerle, çalışmada *K.pneumoniae* izolatlarında kapsül genotipleri ile antibiyotik duyarlılıklarının ve $bla_{\text{CTX-M}}$ grup genleri, $bla_{\text{KPC,}}$ bla_{NDM} ve $bla_{\text{OXA-48}}$ gibi beta-laktamaz genlerinin muhtemel ilişkisi araştırılmıştır. Araştırılan kaynaklarda, Türkiye'de kapsül genotiplerinin incelendiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bulgular Türkiye için bu konudaki ilk verileri oluşturmaktadır. Ancak, farklı hasta gruplarından izole edilen *K.pneumoniae* izolatlarında diğer virülans genlerinin antibiyotik duyarlılıkları ve antibiyotik direnç genleri ile ilişkisinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmada izolatların %55.3'ünün yalnız $bla_{\text{OXA-48}}$, %7.9'unun $bla_{\text{OXA-48}}$ ve $bla_{\text{NDM-1,}}$ %2.6'sının yalnız $bla_{\text{NDM-1}}$, %5.3'ünün $bla_{\text{OXA-48}}$ ve $bla_{\text{CTXM-1}}$, %2.6'sının yalnız $bla_{\text{CTXM-1}}$ genlerini taşıdığı, %26.3'ünün ise araştırılan direnç genlerinden hiçbirini taşımadığı tespit edilmiştir. Ankara'da Candan ve arkadaşları[25] 50 *K.pneumoniae* klinik izolatının %66'sında $bla_{\text{OXA-48}}$, %10'unda $bla_{\text{NDM-1}}$ tespit etmiş, ancak hiçbirinde bla_{KPC}, bla_{IMP} ve bla_{VIM} genlerini bulamamış, %8'inde $bla_{\text{OXA-48}}$ ve $bla_{\text{NDM-1}}$ birlikteliği saptamışlardır. Çalışmada direnç genleri ile virülans genleri arasında net bir ilişki gösterilememiştir. Aynı direnç genlerinin Sakarya'da 125 *K.pneumoniae* klinik izolatında araştırıldığı bir çalışmada yine bla_{KPC}, $bla_{\text{IMP-1}}$ ve bla_{VIM} saptanmamış, farklı olarak $bla_{\text{NDM-1}}$ (%21.6), $bla_{\text{OXA-48}}$ (%8.8)'den daha yüksek oranda bulunmuş ve 20 (%16.0) izolatta $bla_{\text{NDM-1}}$ ile $bla_{\text{OXA-48}}$ birlikteliği görülmüştür[26]. İstanbul'da yapılan bir çalışmada, karbapenem dirençli 37 *K.pneumoniae* klinik izolatının tamamının $bla_{\text{CTXM-2-benzeri}}$ taşıdığı, bunların da %86'sının $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$, %62'sinin $bla_{\text{CTXM-1-benzeri}}$ ve %19'unun $bla_{\text{NDM-1}}$ genlerini birlikte taşıdığı belirlenmiş, ancak bla_{KPC} hiçbir izolatta bulunamamıştır. İzolatların %51.4'ünde $bla_{\text{CTX-M1-benzeri}}$ ile $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$, %5.4'ünde ise $bla_{\text{CTX-M1-benzeri}}$ ile $bla_{\text{OXA-48-benzeri}}$ ve $bla_{\text{NDM-1}}$ birlikteliği görülmüştür[18]. Direnç genleri ile ilgili bulgularımız bu çalışmalarla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Ülkemiz için endemik olan $bla_{\text{OXA-48}}$ geni çalışmamızda da yüksek oranda (%68.4) bulunmuştur. Son yıllarda *K.pneumoniae* izolatlarında artış gösteren $bla_{\text{NDM-1}}$ geni çalışmamızda %10.5, $bla_{\text{CTX-M1}}$ geni de % 7.9 oranlarında tespit edilmiş, ancak bla_{KPC} geni tespit edilememiştir. Çalışmamızda bla_{KPC} geninin bulunamaması bölgesel ve dönemsel nedenlere bağlı olduğu şeklinde açıklanabilir.

Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada, Süzük ve arkadaşları[27] karbapenem dirençli 134 *K.pneumoniae* izolatının %96.3'ünde $bla_{\text{OXA-48}}$, %11.9'unda $bla_{\text{NDM-1}}$ ve %1.5'inde bla_{KPC} tespit etmiş, %9.7'sinde $bla_{\text{OXA-48}}$ ile $bla_{\text{NDM-1}}$ ve %0.7'sinde $bla_{\text{OXA-48}}$ ile bla_{KPC} birlikteliği olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada elde edilen bulgular, bizim bulgularımızla büyük oranda benzerlik göstermektedir. Ancak araştırmacılar farklı olarak iki izo-

latta bla_{KPC} direnç geni tespit etmişlerdir. Çukurova bölgesinde Güran ve arkadaşları[28] 85 *K.pneumoniae* klinik izolatında bla_{CTX-M1} ve bla_{CTX-M9} genlerini araştırmış, yalnızca %31.8'inde bla_{CTX-M1} tespit etmişlerdir. Çalışmamızda da %7.9 gibi düşük oranda da olsa, bla_{CTX-M1} tespit edilmiş, ancak araştırdığımız diğer bla_{CTX-M} genleri hiçbir izolatta bulunamamıştır. Bu genleri az bulmuş olmamız yıllar içinde bölgemizde beta-laktam antibiyotiklerine karşı gelişen direncin azalmış olduğunu ve bu antibiyotiklerin daha rasyonel olarak kullanıldığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, Zonguldak'ta Deniz Ögedey ve arkadaşları[29] da 96 K. pneumoniae izolatında çalışmamızda da araştırılan bla_{CTX-M} genlerini incelemiş ve yalnız %29.2 izolatta bla_{CTX-M1} saptamışlardır. Bu benzer sonuçlar ülkemizde *K.pneumoniae* izolatlarında bla_{CTX-M} genlerinden bla_{CTX-M1} geninin baskın olduğunu göstermektedir.

Kapsül, fagositozu bloke etme yeteneğinden ötürü *K.pneumoniae*'nın önemli bir virülans faktörüdür. Klebsiella enfeksiyonlarının şiddeti genellikle özgül K antijenlerinin tipine göre değişmektedir. K1-KP ve K2-KP suşları başta olmak üzere hipervirülan olarak tanımlanan kapsüler genotiplerin serum komplemanı tarafından öldürülmeye daha dayanıklı oldukları, fagositik lökositler tarafından daha zor fagosite edildikleri ve piyojenik karaciğer apseleri gibi invaziv toplum kökenli enfeksiyonlarının gelişmesine daha fazla katkıda bulundukları gösterilmiştir[5]. Yapılan araştırmalarda kapsül genotipine sahip izolatların, çoğu antibiyotiğe duyarlı oldukları bildirilmiş, ancak mobil genetik elemanlar vasıtasıyla direnç genlerini edinerek antibiyotiklere direnç geliştirdikleri görülmüştür. Çalışmada kapsüler genotipleri belirlenen 38 izolat içerisinde baskın genotiplerin K5-KP (%39.5) ve K2-KP (%31.6) olduğu belirlenmiştir. İzolatların %68.4'ünde bla_{OXA-48}, %10.5'inde bla_{NDM-1}, %7.9'unda bla_{CTX-M1} tespit edilmişken; %7.9'unda bla_{OXA-48} ile bla_{NDM-1}, %5.3'ünde de bla_{OXA-48} ile bla_{CTX-M1} birlikteliği saptanmıştır. Karbapenem direnç genlerinden $bla_{OXA-48-benzeri}$ ve bla_{NDM-1} genlerinin kapsül genotipleri ile ilişkisinin istatistiksel olarak anlamsız, beta-laktam direnç geni olan $bla_{CTX-M-1}$ geninin K20-KP ile ilişkisinin ise istatistiksel olarak anlamlı (p= 0.004) olduğu ve bla_{CTX-M1} geni taşıyan izolatların fenotipik olarak da beta-laktam antibiyotiklere (sefotaksime, sefoksitine ve sefepime) karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu durum henüz tedavilerde son seçenek olarak kullanılan ilaçlardan olan karbapenemlerin kullanımını kısıtlamasa da beta-laktam kullanımını kısıtlamaktadır. Aynı zamanda K20 kapsül genotipine sahip izolatların daha kolay plazmitle taşınan beta-laktamaz genlerini edinerek antibiyotiklere direnç geliştirebileceği ve dolayısıyla bu suşların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinin daha zor olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Çalışmada bla_{NDM-1} tespit edilen izolatların üçü K5-KP ve biri K2-KP iken, bla_{OXA-48} yine en fazla K5-KP ve K2-KP (sırası ile 10 ve 9 izolatta) izolatlarında saptanmıştır. bla_{NDM-1} taşıyan izolatların tamamının, bla_{OXA-48} taşıyan izolatların ise %88.5'inin fenotipik olarak karbapenem direncine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Dünyada kapsül genotipleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen yapılan çalışmadaki gibi antibiyotik direnç genleri ile kapsül genotiplerinin karşılaştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Wei ve arkadaşlarının[30] 2020 yılında Çin'de yaptığı bir çalışmada, Uzak Doğu ülkelerinde yaygın olduğu bilinen K57-KP klinik izolatlarının bazı virülans özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları K1/K2-KP klinik izolatları ile

karşılaştırılmış, ancak antibiyotik direnç genleri yalnızca K57 genotipinde araştırılmıştır. İncelediklerı 39 K57-KP izolatının beşinin (%12.8) karbapeneme dirençli olduğu ve bu beş izolatın bla_{KPC-2} taşıdığı belirlenmişken, hiçbirinde bla_{OXA-48}, bla_{NDM-1}, bla_{IMP-1} ve bla_{VIM} tespit edilememiştir. Araştırmacılar, bla_{CTX-M1} grubundan bla_{CTX-M3}'ü ve bla_{CTX-M9} grubundan $bla_{CTX-M14}$'ü daha yüksek oranlarda (sırasıyla %79.5 ve %38.5) bulmuşlardır. K57-KP grubunda sefotaksim, seftriakson ve sefazoline karşı direnç K1/K2-KP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar karbapenem dirençli K57-KP izolatlarının gittikçe arttığına ve virülans ile çok ilaç direnci birlikteliğinin dünya genelinde bu izolatların neden oldukları enfeksiyonların kontrolündeki zorluklara dikkat çekmişlerdir. Çalışmada K57-KP olduğu belirlenen tek izolatın kolistin dışında bütün antibiyotiklere dirençli olduğu ve bla_{OXA-48} genini taşıdığı tespit edilmiştir. Lui ve arkadaşlarının Çin'de yaptığı bir çalışmada[31], 413 *K.pneumoniae* izolatında yalnızca K1 genotipi araştırılmış ve izolatların %8.4'ünün K1-KP olduğu tespit edilmiştir. K1-KP izolatlarında direnç genlerinin ve virülansla ilişkili genlerin varlığı araştırılmış ve bu suşların %60.0'ının beta-laktamaz genlerinden en az birini taşıdığı, beta-laktamaz genlerinin %33.3'ünün bla_{CTX-M9}, %19.0'unun bla_{CTX-M1}, %14.3'ünün bla_{SHV} ve %42.9'unun bla_{TEM} olduğu, ancak karbapenemaz genlerinin ($bla_{KPC,}$ $bla_{OXA-48,}$ bla_{NDM}, bla_{IMP} ve bla_{VIM}) hiçbir izolatta bulunmadığı tespit edilmiştir. Sonuçta K1-KP suşlarının mobil genetik elemanlar vasıtasıyla çeşitli direnç mekanizmalarını edinebileceği bildirilmiştir. Tayvan'da Juan ve arkadaşlarının 337 *K.pneumoniae* izolatının kapsül genotiplerinin dağılımlarını ve antimikrobiyal direncini araştırdıkları çalışmada izolatların %31.2'sinin kapsül genotipleri (K1, K2, K5, K20, K54, K57) tespit edilmiş olup, K2-KP (%32,4) ve K1-KP (%28.6) izolatlarının baskın olduğu belirlenmiştir. İzolatların %11.4'ünün çok ilaç direncine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, kapsül tipleri ile antibiyotik dirençleri arasında karşılaştırma yapılmamıştır[32]. Çalışmalarda *K.pneumoniae* kapsül genotiplerinin dağılımının bölgesel olarak farklılık gösterdiği görülmektedir. Tayvan'da K2-KP ve K1-KP[32], Londra'da Turton ve arkadaşları[33] K1-KP, İran'da Hasani ve arkadaşları[34] K54-KP, çalışmada ise K5-KP baskın genotip olarak tespit edilmiştir. Çalışmada K5-KP izolatlarda amoksisilin/klavulonat, piperasilin/tazobaktam, sefoksitin, ertapenem antibiyotikleriyle direnç ilişkisinin istatistiksel olarak anlamlı bulunması, hipervirülan kapsül genotiplerine sahip izolatlarda son yıllardaki antibiyotik direnç artışını doğrular niteliktedir.

Çalışmada az sayıda izolatın kapsül genotipini belirlenmiş olmasının nedeni günümüzde tanımlanmış olan en az 79 farklı *K.pneumoniae* kapsüler genotipi arasında yalnızca çok çalışılmış olan ve hipervirülan olarak tanımlanan altı kapsüler genotipin araştırılmasından dolayı olabilir. Bölgesel farklılık ihtimalinden ötürü kapsüler genotiplendirme yönteminin ileri çalışmalarla geliştirilmesinin bu konuda yardımcı olacağı düşünülmektedir. Özellikle K1 ve K2 kapsül tiplerini taşıyan hipervirülan izolatların ek olarak çok ilaç direncinin de olması, buna karşılık bu izolatların etken olduğu enfeksiyonların tedavisi için kullanılacak yeni antimikrobiyal ilaçların olmayışı, tedavide kullanılacak alternatif stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Çok ilaca dirençli *K.pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde son seçenek ilaç olan kolistinin nefrotoksisite ve nörotoksisite özelliklerinden dolayı çok tercih edilmemesine rağmen, bu antibiyotiğe karşı gelişen fenotipik direncin yanı sıra

dünya genelinde plazmitlerle taşınan kolistin direnç genlerinin ortaya çıkması ve yayılması, konak immünizasyonunu sağlamak gibi yeni tedavi ve korunma seçeneklerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Tedavi bu izolatlara karşı gelişmiş özgül antikorların kullanıldığı pasif immünizasyon yoluyla, korunma ise bu suşların antijenlerinin kullanılarak geliştirilen aşılarla aktif immünizasyon şeklinde yapılabilir[5,35]. Çalışma Türkiye'de *K.pneumoniae* izolatlarında kapsül genotipleri ile beta-laktamaz genlerinin ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır ve bu açıdan kapsül tiplerini aydınlatmaya yönelik olan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmüştür. Bunun yanında, kapsül genotipleri ile birlikte çalışmada yer almayan diğer antibiyotik direnç genlerinin araştırılması tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından faydalı olabilir.

Sonuç olarak, dünya çapında gerek kapsül genotipleriyle gerekse GSBL genleriyle ilgili yapılan araştırmalarda bölgesel farklılıkların görülmesi nedeniyle, bölgesel ve çok sayıda izolatın dahil edileceği çalışmaların kapsül genotipleriyle GSBL genleri arasındaki muhtemel ilişkiyi daha iyi aydınlatacağı düşünülmektedir. Ayrıca, mevcut yöntemlerle kapsüler genotiplendirme oranlarının genellikle düşük olması nedeniyle, ileri çalışmalarla bu yöntemlerin geliştirilmesi de kapsülün virülanstaki önemini daha iyi kavramaya katkı sağlayacaktır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Karar No: 28 ve Tarih: 06.11.2020).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of Klebsiella spp. Sci Rep 2015; 5(1): 15573. https://doi.org/10.1038/srep15573
2. Kuş H, Arslan U, Türk Dağı H, Fındık D. Investigation of various virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from nosocomial infections. Mikrobiyol Bul 2017; 51(4): 329-39. https://doi.org/10.5578/mb.59716
3. Rodrigues C, Sousa C, Lopes JA, Novais Â, Peixe L. A front line on *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide knowledge: Fourier transform infrared spectroscopy as an accurate and fast typing tool. mSystems.asm 2020; 5(2): e00386-19. https://doi.org/10.1128/mSystems.00386-19
4. Ssekatawa K, Byarugaba DK, Nakavuma JL, Kato CD, Ejobi F, Tweyongyere R, et al. Prevalence of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* based on PCR capsular typing harbouring carbapenemases encoding genes in Uganda tertiary hospitals. Antimicrob Resist Infect Control 2021; 10: 57. https://doi.org/10.1186/s13756-021-00923-w
5. Opoku-Temeng C, Kobayashi SD, DeLeo FR. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. Comput Struct Biotechnol J 2019; 17: 1360-6. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.09.011
6. Sato S, Aoyama T, Uejima Y, Furuichi M, Suganuma E, Takano T, et al. Pyogenic liver abscess due to hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a 14-year-old boy. J Infect Chemother 2019; 25(2): 137-40. https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.07.006

7. World Health Organization. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities. World Health Organization, 2017. Available from: https://apps.who.int/iris/handle/10665/259462. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO (Accessed date: 21.03.2021)
8. Büyüktuna SA, Hasbek M, Çelik C, Ünlüsavuran M, Avcı O, Baltacı S, et al. *Klebsiella pneumoniae* infections in the intensive care unit: Risk factors related to carbapenem resistance and patient mortality. Mikrobiyol Bul 2020; 54(3): 378-91. https://doi.org/10.5578/mb.69679
9. Branswell H. WHO releases list of world's dangerous superbugs. Stat 2017; February, 27.
10. de Kraker MEA, Stewardson AJ, Harbarth S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? PLoS Med 2016; 13(11): e1002184. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184.
11. Zhu Y, Galani I, Karaiskos I, Lu J, Aye SM, Huang J, et al. Multifaceted mechanisms of colistin resistance revealed by genomic analysis of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from individual patients before and after colistin treatment. J Infect 2019; 79(4): 312-21. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.07.009
12. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: An emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. Clin Infect Dis 2007; 45(3): 284-93. https://doi.org/10.1086/519262
13. 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. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01208.x
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. 30th ed. Wayne, PA, 2020.
15. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. Available from: http://www.eucast.org (Accessed date: 10.03.2021).
16. Hoşbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Levent B, Türkmen Albayrak H, Şahiner F, et al. Salmonella ve Shigella klinik izolatlarında azitromisin minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin ve karbapenem direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2021; 55(4): 480-91. https://doi.org/10.5578/mb.20219702
17. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2010; 65(3): 490-5. https://doi.org/10.1093/jac/dkp498
18. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, et al. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the *Enterobacteriaceae* family. J Clin Microbiol 2009; 47(10): 3261-5. https://doi.org/10.1128/JCM.02368-08
19. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(1): 119-23. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
20. Iraz M, Düzgün AÖ, Sandallı C, Doymaz MZ, Akkoyunlu Y, Saral A, et al. Distribution of β-lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. Ann Lab Med 2015; 35(6): 595-601. https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.6.595
21. Zeynudin A, Pritsch M, Schubert S, Messerer M, Liegl G, Hoelscher M, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of CTX-M type extended-spectrum β-lactamases among clinical isolates of gram-negative bacilli in Jimma, Ethiopia. BMC Infect Dis 2018; 18(1): 524. https://doi.org/10.1186/s12879-018-3436-7.
22. Fu Y, Xu M, Liu Y, Li A, Zhou J. Virulence and genomic features of a *bla*CTX-M-3 and *bla*CTX-M-14 coharboring hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of serotype K2 and ST65. Infect Drug Resist 2019; 12: 145-59. https://doi.org/10.2147/IDR.S187289
23. Pajand O, Darabi N, Arab M, Ghorbani R, Bameri Z, Ebrahimi A, et al. The emergence of the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) strains among circulating clonal complex 147 (CC147) harbouring *bla*NDM/OXA-48 carbapenemases in a tertiary care center of Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2020; 19(1): 12. https://doi.org/10.1186/s12941-020-00349-z

24. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev 2019; 32(3): e00001-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19

25. Candan ED, Aksöz N. *Klebsiella pneumoniae*: Characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. Acta Biochim Pol 2015; 62(4): 867-74. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1148

26. Demiray T, Aydemir Ö, Kılıç Ü, Yılmaz K, Köroğlu M, Altındiş M. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz saptanmasında karbapenemaz inaktivasyon testinin kullanımı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2017; 47(2): 78-82. https://doi.org/10.5222/TMCD.2017.078

27. Süzük Yıldız S, Kaşkatepe B, Simşek H, Mutlu Sarıgüzel F. High rate of colistin and fosfomycin resistance among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Turkey. Acta Microbiol Immunol Hung 2019; 66(1): 103-12. https://doi.org/10.1556/030.65.2018.042

28. Güran M, Köksal F. Çukurova bölgesindeki *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların araştırılması. Flora 2013; 18(1): 20-7.

29. Deniz Ögedey E, Cömert F, Köktürk F, Külah C, Aktaş E. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve Klebsiella spp. izolatlarında CTX-M enzimlerinin belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2016; 46(2): 88-96. https://doi.org/10.5222/TMCD.2016.088

30. Wei DD, Xiong XS, Mei YF, Du FL, Wan LG, Liu Y. Microbiological and clinical characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates of K57 capsular serotype in China. Microb Drug Resist 2021; 27(3): 391-400. https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0456

31. Liu Y, Du FL, Xiang TX, Wan LG, Wei DD, Cao XW, et al. High prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinants among serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. Microb Drug Resist 2019; 25(5): 681-9. https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0173

32. Juan CH, Chuang C, Chen CH, Li L, Lin YT. Antimicrobial resistance and capsular types of community-acquired, healthcare-associated, and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. Antimicrob Resist Infect Control 2019; 8: 1. https://doi.org/10.1186/s13756-018-0426-x

33. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol 2010; 59: 541-7. https://doi.org/10.1099/jmm.0.015198-0

34. Hasani A, Soltani E, Rezaee MA, Pirzadeh T, Oskouee MA, Hasani A, et al. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae* and its relation with capsule-associated virulence genes, antimicrobial resistance pattern, and clinical infections: A descriptive study in medical practice. Infect Drug Resist 2020; 13: 1971-80. https://doi.org/10.2147/IDR.S243984

35. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health 2020; 17: 6278. https://doi.org/10.3390/ijerph17176278