T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HASTANE KAYNAKLI KAN DOLAŞIM ENFEKSİYON ETKENİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VİRÜLANS GENLERİNİN TÜM GENOM DİZİLEME YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Şeyda Şilan OKALİN
ORCID: 0000-0002-4249-8113

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

100/2000 YÖK DOKTORA BURSU

MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR

MAYIS 2023

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-201797135

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HASTANE KAYNAKLI KAN DOLAŞIM ENFEKSİYON ETKENİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VİRÜLANS GENLERİNİN TÜM GENOM DİZİLEME YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Şeyda Şilan OKALİN
ORCID: 0000-0002-4249-8113

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

100/2000 YÖK DOKTORA BURSU

MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM
ORCID: 0000-0002-3185-8355

İZMİR
MAYIS 2023

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Doktora Programı öğrencisi Şeyda Şilan OKALİN tarafından hazırlanan **"Hastane Kaynaklı Kan Dolaşım Enfeksiyon Etkeni *Klebsiella pneumoniae* Virülans Genlerinin Tüm Genom Dizileme Yöntemi İle Değerlendirilmesi"** başlıklı tez çalışması 25.05.2023 Perşembe günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Özgen Alpay ÖZBEK
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
ORCID ID No: 0000-0003-4415-7205
İMZA

Üye: Prof. Dr. Sabire Şöhret AYDEMİR
Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
ORCID ID No: 0000-0001-8354-9100
İMZA

Üye (Danışman): Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
ORCID ID No: 0000-0002-3185-8355
İMZA

Üye: Doç. Dr. Mahmut Cem ERGON
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
ORCID ID No: 0000-0002-4847-987X
İMZA

Üye: Doç. Dr. Reyhan YİŞ
İzmir Bakırçay Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
ORCID ID No: 0000-0001-5774-0315
İMZA

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sema ALP ÇAVUŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
ORCID ID No: 0000-0003-2807-8769
İMZA

Yedek Üye: Prof. Dr. Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
ORCID ID No:0000-0002-1710-2287
İMZA

Yedek Üye: Prof. Dr. Sevin KIRDAR
Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
ORCID ID No: 0000-0002-4511-578X
İMZA

T.C

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Hastane Kaynaklı Kan Dolaşım Enfeksiyon Etkeni *Klebsiella pneumoniae* Virülans Genlerinin Tüm Genom Dizileme Yöntemi İle Değerlendirilmesi" başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Öğrencinin Adı Soyadı: Şeyda Şilan OKALİN

Tarih: 25/05/2023

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi ve tez süreci boyunca desteğini ve tecrübesini esirgemeyen değerli tez danışmanı hocam Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Klinik Mikrobiyoloji alanındaki birikimi ve tecrübesiyle her zaman yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Zeynep GÜLAY'a, bana zaman ayıran ve önerileri ile tezime katkı sunan Tez İzleme Komitesi jürileri sayın hocalarım Doç. Dr. Cem ERGON'a ve Dr. Öğr. Üyesi Sema ALP ÇAVUŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Güncel bilgiler ışığında doktora eğitimime katkı sunan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma,

Tez laboratuvar uygulamalarında her türlü desteği sunan değerli arkadaşlarım Dr. Ayşe Nur SARI KAYGISIZ, Araş. Gör. Dr. Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ'e ve Araş. Gör. Nazlı ARSLAN'a,

Bölüm sekreterimiz sevgili Aysun CANER'e ve DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personellerine,

Doktora süreci boyunca bana destek olan sevgili arkadaşlarım Elmas KÖÇKÜN'e, Tuğçe ÇİMEN'e, Bilge KOCABIYIK'a ve eşim Gürsel YAMAÇ'a teşekkür etmekten mutluluk duyarım.

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ……i
ŞEKİLLER DİZİNİ……iii
SİMGELER VE KISALTMALAR ……iv
ÖZET……viii
ABSTRACT……x
1. GİRİŞ VE AMAÇ ……1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi……1
1.2. Araştırmanın Amacı ……2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri……3
2. GENEL BİLGİ……4
2.1. *Klebsiella pneumoniae* ve Genel Özellikleri……4
2.2. *Klebsiella pneumoniae* ve Virülans Genleri……4
2.2.1. Kapsül……5
2.2.2. Lipopolisakkarit ……5
2.2.3. Fimbria……6
2.2.4. Dış Membran Proteinleri ve Porinleri ……7
2.2.5. Demir Alım Sistemi / Sideroforlar ……8
2.2.6. Biyofilm……8
2.2.7. Sekresyon Sistemleri ……9
2.3. *Klebsiella pneumoniae* ve Antimikrobiyal Direnç……10
2.3.1. β – laktam Direnç Genleri ……12
2.3.2. Karbapenem Direnç Genleri……12
2.3.3. Aminoglikozid Direnç Genleri ……13
2.3.4. Kinolon Direnç Genleri ……14
2.3.5. Tigesiklin Direnç Genleri……14
2.3.6. Polimiksin Direnç Genleri……15
2.4. *Klebsiella pneumoniae* ve İmmün Yanıt ……16
2.5. *Klebsiella pneumoniae* ve Genetik Yapısı ……19
2.6. *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Tiplendirilmesi……20
2.7. *Klebsiella pneumoniae* ve Sağlık Hizmeti ile İlişkili Enfeksiyonlar ……21
2.8. Hipervirülan/Hipermukoviskoz *Klebsiella pneumoniae*……22

2.8.1. Hipervirülan/Hipermukoviskoz *Klebsiella pneumoniae* ve Virülans Genleri ……23
2.8.2. Hipervirülan/Hipermukoviskoz *Klebsiella pneumoniae* ve Antimikrobiyal Direnç……..25
2.9. Tüm Genom Dizileme Teknolojisi ……..26
2.9.1. Oxford Nanopore Platformu ……27
3. GEREÇ VE YÖNTEM……...29
3.1. Araştırmanın Tipi ……29
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı ……29
3.3. Veri Toplama Araçları ……30
3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları ……31
3.5. Etik Kurul Onayı ……..32
3.6. Örneklerin Toplanması ve Tanımlanması ……32
3.7. String Testi ……...33
3.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri ……..33
3.9. PCR Yöntemiyle *rmpA/rmpA2* ve Karbapenem Direnç Genlerinin Belirlenmesi ……33
3.10. PFGE Yöntemi ile Faklı Klonların Belirlenmesi……...37
3.11. Plazmid Ekstraksiyonu ……38
3.12. Tüm Genom Dizileme……39
3.12.1. DNA Ekstraksiyonu……39
3.12.2. Qubit 3.0 fluorometer ile Ölçüm ……41
3.12.3. Kütüphane Hazırlığı ……42
3.13. Biyoinformatik Analizler ...……47
3.13.1. Base Calling, Kalite Kontrolü ve Referans Genomla Hizalama …….47
3.13.2. Kapsül Tipilerinin Belirlenmesi ……..48
3.13.3. O Antijen Tiplerinin Belirlenmesi ……..48
3.13.4. ST'lerin Belirlenmesi ……..48
3.13.5. Direnç Genlerinin Belirlenmesi……...49
3.13.6. Virülans Genlerinin Belirlenmesi...……49
3.13.7. Plazmidlerin Bulunması, Plazmid Üzerindeki Virülans ve Direnç Genlerinin Belirlenmesi ……50

3.13.8. VFDB'de Karşılığı Olmayan Açık Okuma Çerçevelerinin Araştırılması...
……50
3.13.9. Filogenetik Ağacın Oluşturulması……...50
3.13.10. Ham Okuma Verilerinin Açık Veri Tabanlarında Yayınlanması……..51
4. BULGULAR……...52
4.1. Örneklerin Toplanması ve Tanımlanması……52
4.2. String Testi……...52
4.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi……...52
4.4. PCR ile *rmpA/rmpA2* ve Karbapenem Direnç Genlerinin Belirlenmesi……..54
4.5. PFGE Yöntemi ile Faklı Klonların Belirlenmesi……54
4.6. Plazmid Ekstraksiyonu……56
4.7. Biyoinformatik Analizler……57
4.7.1. Base Calling, Kalite Kontrolü ve Referans Genomla Hizalama ……...57
4.7.2. Kapsül Tipilerinin Belirlenmesi ……62
4.7.3. O Antijen Tiplerinin Belirlenmesi……63
4.7.4. Sekans Tiplerinin Belirlenmesi ……64
4.7.5. Direnç Genlerinin Belirlenmesi……65
4.7.6. Virülans Genlerinin Belirlenmesi……..71
4.7.7. Plazmidlerin Bulunması, Plazmid Üzerindeki Virülans ve Direnç Genlerinin Belirlenmesi..……90
4.7.8. VFDB'de Karşılığı Olmayan Açık Okuma Çerçevelerinin Araştırılması..
……92
4.7.9. Filogenetik Ağaç Oluşturulması……93
4.7.10. Ham Okuma Verilerinin Açık Veri Tabanlarında Yayınlanması……94
5. TARTIŞMA……95
6. SONUÇ VE ÖNERİLER……..113
7. KAYNAKLAR……114
8. EKLER ……129

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. *K. pneumonaie* virülans faktörleri ve virülans genleri……. **10**

Tablo 2. Antimikrobiyaller, direnç mekanizmaları ve direnç genleri…… **16**

Tablo 3. Araştırma planı……. **29**

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemelere ait bilgiler…… **30**

Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler……. **31**

Tablo 6. PCR tepkimesinde kullanılan malzemeler ve karışım oranları……. **34**

Tablo 7. Gene özgün primeler, hedef uzunlukları ve döngü koşulları…… **36**

Tablo 8. Her bir örnek için Qubit 3.0 fluorometer ile ölçülen DNA konsantrasyonu …….. **42**

Tablo 9. Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının zon çapları ve direnç profili …….. **53**

Tablo 10. PFGE sırası, örnek numarası, izole edildiği yıl, karbapenem direnç profili ve *rmpA/rmpA2* gen pozitifliği…… **55**

Tablo 11. Örneklerin kapsül tipleri……. **62**

Tablo 12. Örneklerin O antijen tipleri, en iyi eşleşen lokus ve eşleme yüzdesi….. **63**

Tablo 13. Hausekeeping genler, gen uzunlukları, örnekleri taşıdığı alleller ve veri tabanlarına göre ST sonuçları…….. **64**

Tablo 14. ResFinder veri tabanı ile belirlenen direnç genleri……. **65**

Tablo 15. CARD veri tabanı ile belirlenen gen ailesi, dirence neden oldukları antimikrobiyaller ve antimikrobiyal direnç ontolojisi……. **68**

Tablo 16. BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen direnç genleri…… **70**

Tablo17. VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler…….. **71**

Tablo 18. VirulenceFinder veri tabanı ile belirlenen virülans genleri, görevleri ve örneklerdeki gen bölgesiyle benzerlik yüzdesi……... **81**

Tablo 19. BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri…….. **82**

Tablo 20. PlasmidFinder veri tabanı ile belirlenen plazmid tipleri, bu plazmidler üzerinde bulunan direnç ve virülans genleri……..... **89**

Tablo 21. ORF'lere karşılık gelen enzim ve proteinler……... **92**

Tablo 22. Ham Verilerin Erişim ve ID Numaraları……. **94**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. *K. pneumoniae* antimikrobiyal direnç mekanizmaları…… **11**

Şekil 2. *K. pneumoniae* virülans faktörleri…….. **24**

Şekil 3. Manyetik ayırıcıya yerleştirilen mikrosantrifüj tüpleri…….. **43**

Şekil 4. Üst fazı uzaklaştırılan mikrosantrifüj tüpleri…….. **44**

Şekil 5. Bilgisayara bağlanan Oxford Nanopore (MinION) cihazı……. **47**

Şekil 6. String testi pozitif koloni fenotipi……... **52**

Şekil 7. PFGE jel görüntüsü…… **56**

Şekil 8. Plazmid ekstraksiyonu jel görüntüsü…….. **56**

Şekil 9a. DEUKp9961_18 örneğine ait okuma derinliği……. **57**

Şekil 9b. DEUKp1212_19 örneğine ait okuma derinliği…… **58**

Şekil 9c. DEUKp4822_20 örneğine ait okuma derinliği……. **58**

Şekil 9d. DEUKp6718_20 örneğine ait okuma derinliği…… **59**

Şekil 9e. DEUKp5889_19 örneğine ait okuma derinliği……. **59**

Şekil 10a. DEUKp9961_18'in genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom ……. **60**

Şekil 10b. DEUKp1212_19'un genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom …….. **60**

Şekil 10c. DEUKp4822_20'nin genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom …….. **61**

Şekil 10d. DEUKp6718_20'nin genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom …….. **61**

Şekil 10e. DEUKp5889_19'un genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom …….. **62**

Şekil 11. Çalışma izolatları ve standart suş arasındaki klonal ilişki…… **93**

SİMGELER VE KISALTMALAR

A. baumannii	*Acinetobacter baumannii*
ABC	ATP-Binding Cassette
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi "Amplified Fragment Length Polymorphism"
AM	Ampisilin
AMC	Amoksisilin Klavulanik Asit
AN	Amikasin
ATP	Adenozin trifosfat
β-laktamaz	Beta Laktamaz
BacWGSTdb	Bacterial Whole Genome Sequence Typing Database
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRIG	BLAST Ring Image Generator
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CAZ	Seftazidim
CC	Klonal Kompleks "Clonal Complex"
CGE	Center For Genomic Epimemiology
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX	Sefotaksim
DNA	Deoksiribonükleik asit
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EEO	Electroendosmosis
ETP	Ertapenem
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F	Forward
FOS	Fosfomisin
GC	Guanin-Sitozin "Guanine-Cytosine"
GM	Gentamisin
GSBL	Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz

ID	Identification
IFN-γ	İnterferon Gama
IL	İnterlökin
IMP	Imipenem-Resistant *Pseudomonas*
IMP	İmipenem
Inc	Incompatibility
ITOL	Interactive Tree Of Life
K	Kapsül
KPC	*Klebsiella pneumoniae* karbapenamaz
K. pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
LPS	Lipopolisakkarit
MALDI-TOF MS	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry"
MATE	Multidrug and Toxic compound Extrusion
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MEM	Meropenem
MFS	Major Facilitator
MLST	Çoklu Bölge Dizi Analizi "Multilocus Sequence Typing"
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NETs	Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları" Neutrophil Extracellular Traps"
NDM	New Delhi metallo-β-laktamaz
NK	Doğal Öldürücü "Natural Killer"
NTP	Nükleotit Trifosfatlar
ORF	Açık Okuma Çerçeveleri "Open Reading Frame"
OXA	Oksasilinaz
PCR	Polimeraz Zincir Tepkimesi "Polymerase Chain Reaction"
PGM	Personal Genome Machine
PFGE	Değişimli Alan Jel Elektroforezi "Pulsed-Field Gel Electrophoresis"
PLSDB	Plasmid Database
R	Reverse

RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA “Random Amplified Polymorphic DNA”
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RFU	Raw Fluorescence Units
RNA	Ribonükleik Asit
RND	Resistance-Nodulation-Division
RPM	Rate Per Minute
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SMR	Small Multidrug Resistance
Spp	Species Pulural
ST	Sekans Tipi “Sequence Type”
SXT	Trimetoprim Sulfametoksazol
TBE	Tris-Borik asit -EDTA
TE	Tris-EDTA
TLR	Toll-Benzeri Reseptör
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TPZ	Piperasilin Tazobaktam
UV	Ultraviyole
VFDB	Virulence Factor Database
VIM	Verona Integron-Encoded Metallo- β-laktamaz
VNTR	Çoklu-Lokus Değişken Sayı Tekrar Dizisi Analizi “Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis”
bp	Base pair
dk	Dakika
fmol	Femtomole
g	Gram
kb	Kilobase
M	Molar
mM	Milimolar
Mbp	Megabase pair

mm	Milimetre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
pmol	Picomole
s	Saniye
U	Unit
V	Volt
°C	Santigrat Derece

HASTANE KAYNAKLI KAN DOLAŞIM ENFEKSİYON ETKENİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VİRÜLANS GENLERİNİN TÜM GENOM DİZİLEME YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Doktora Tezi

Şeyda Şilan OKALİN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Hastane kaynaklı kan dolaşım enfeksiyonuna neden olan *Klebsiella pneumoniae*, hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ve klasik *K. pneumoniae* olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu tez çalışmasının amacı hastane kaynaklı kan dolaşım enfeksiyonuna neden olan hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının tüm genom dizisinin belirlenmesi, virülans ve direnç genlerinin saptanması, kullanılan veri tabanı performansının karşılaştırılmasıdır.

Ocak 2018-Aralık 2020 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gelen ve kan kültürlerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatları çalışmaya dahil edildi. Hipermukoviskoz fenotipi belirlemek üzere string testi yapıldı. Antimikrobiyal direnç profili disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarındaki karbapenem direnç genleri ve *rmpA/rmpA2* virülans genleri PCR yöntemi ile araştırıldı. Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları arasındaki klonal yakınlığı belirlemek üzere PFGE yapıldı ve birbirinden farklı kökene ait beş izolatın Oxford Nanopore (MinION) platformu ile tüm genom dizisi belirlendi. İzolatlara ait kapsül tipi, O antijen tipi, sekans tipi, plazmid tipleri, virülans ve direnç genleri çeşitli veri tabanları ile analiz edildi.

Kan kültürlerinden toplam 244 *K. pneumoniae* izole edildi. String testi sonucunda on izolat hipermukoviskoz olarak tanımlandı. Yapılan PCR'da hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatların birinde OXA-48 karbapenemaz geni, ikisinde *rmpA/rmpA2* genleri tanımlandı. Farklı klonlara ait ve tüm genom dizisi belirlenen beş izolatta farklı kapsül tipi ve sekans tipi belirlendi. İzolatların beşinde O2a antijen tipi belirlendi. Her beş izolatta bla_{SHV} tipi, *oqxB, oqxA* ve *fosA* direnç genleri ve *fimH, mrkD, iutA, iroN, entB* virülans genleri saptandı. Çalışma izolatlarımızda IncFIB(K)pCAV1099-14, Col(pHAD28), ColI440I, IncFIA (HI1)/IncR, IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR), IncL, IncFIB(K)-IncHI1(K), IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR)- IncR, IncFIB(K), IncR gibi plazmidler belirlendi. Bazı plazmidler üzerinde çeşitli direnç ve virülans genleri saptandı.

Plazmidler aracılığıyla direnç ve virülans genleri yayılmakta, her geçen gün dirençli hipermuviskoz *K. pneumoniae* sayısı artmaktadır. Dirençli hipermukoviskoz

K. pneumoniae ile ilişkili enfeksiyonlar yüksek mortaliteye neden olmaktadır. Bu nedenle dirençli ve virülansı yüksek bu izolatların rutin laboratuvar çalışmalarında takibi önem taşımaktadır. Bu çalışmada kullanılan veri tabanı sonuçları arasında bazı farklılıklar gözlenmiştir. Farklı veri tabanları kullanılarak yapılacak daha ileri çalışmaların ve güncellemelerin veri tabanları arasındaki uyumu arttıracağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Hipermukoviskoz *K. pneumoniae*, Oxford Nanopore, Tüm genom dizileme, Virülans ve direnç genleri

Tez sayfa adedi: 154

Danışman: Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM

EVALUATION OF VIRULENCE GENES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CAUSING HOSPITAL-ACQUIRED BLOODSTREAM INFECTION BY WHOLE GENOME SEQUENCING METHOD

PhD Thesis

Şeyda Şilan OKALİN

DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
Department of Medical Microbiology

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae, which causes hospital-acquired bloodstream infection, is divided into two named hypervirulence/hypermucoviscous *K. pneumoniae* and classical *K. pneumoniae*. The aim of this study is to detect whole genome sequencing of hypermucoviscous *K. pneumoniae* that induces healthcare-associated bloodstream infection, identify virulence and resistance genes using various databases, and compare these databases performance.

The *K. pneumoniae* isolates that were brought to the Dokuz Eylül University Application Research Hospital Center Laboratory and were isolated from blood cultures were included in this study between January 2018 and December 2020. The disc diffusion method was used to characterize the antimicrobial resistance profile, and the string test was used to assess the hypermucoviscous phenotype. Carbapenem resistance genes and *rmpA/rmpA2* virulence genes were detected using the PCR method. To ascertain clonal relatedness among hypermucoviscous *K. pneumoniae* isolates, PFGE was used. The Oxford Nanopore MinION technology determined the whole genome sequencing of five hypermucoviscous *K. pneumoniae* isolates with different clones. Using the various databases capsule types, O antigen types, sequence types, plasmid types, virulence, and resistance genes were examined.

A total of 244 *K. pneumoniae* isolates were included in the study. Ten isolates were found to be hypermucoviscous. In the PCR analysis was revealed $bla_{\text{OXA-48}}$ in one of the hypermucoviscous *K. pneumoniae* isolates and *rmpA/rmpA2* genes in two of them. Whole genome sequence of five hypermucoviscous *K. pneumoniae* isolates with different clones was obtained. bla_{SHV} types, *oqxB, oqxA,* and *fosA* resistance genes, and *fimH, mrkD, iutA, iroN,*and *entB* virulence genes were optained in all five isolates. Various plasmid were identified including IncFIB(K)pCAV1099-14, Col(pHAD28), IncFIA(HI1)-IncR, ColI440I, IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR), IncL, IncFIB(K)-IncHI1(K), IncFIB(K), IncR, IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR)-IncR, repB. Various virulence and resistance genes were found on some plasmids.

Transmission of resistance and virulence genes occurs through plasmids. The number of resistant hypermucoviscous *K. pneumoniae* isolates is rising daily. Infections associated with resistant hypermucoviscosis *K. pneumoniae* cause high

mortality. Therefore, it is important to follow up resistant and high virulence of these isolates in routine laboratory studies. There were some differences in the results of the databases used in this study. The compatibility between databases is anticipated to increase with additional research and updates using various databases.

Keywords: Hypermucoviscous *K. pneumoniae,* Oxford Nanopore, Whole genom secuencing, Virulence and resistance genes

Page Number: 154

Advisor: Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Klebsiella pneumoniae çeşitli direnç ve virülans genlerine sahip önemli bir patojendir. Sahip olduğu virülans faktörleri aracılığıyla kuru ve besin olmayan yüzeylerde uzun süre canlılığını koruyabilmektedir (1). Hastane çevresinde ve ekipmanlarında uzun süre kalabilen *K. pneumoniae,* sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlara ve salgınlara neden olmaktadır. *K. pneumoniae;* dünyada ve Türkiye'de pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, karaciğer apsesi ve kan dolaşım enfeksiyonlarında etken olarak bildirilmektedir (2-6). Bu etkenin genellikle sağlık hizmeti ile ilişkili olan ve yüksek mortalite ile seyreden kan dolaşım enfeksiyonları halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Kan kültüründen sıklıkla izole edilen *K. pneumoniae* kan dolaşım enfeksiyonuna neden olan patojenler arasında yer almaktadır (7,8). Sahip olduğu direnç ve virülans genlerine göre klasik *K. pneumonie* ve hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* olarak ayrılan bu patojen hem primer kan dolaşım enfeksiyonuna hem de sekonder kan dolaşım enfeksiyonuna neden olmaktadır (9). Genellikle antimikrobiyallere duyarlı olan hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları son yıllarda çeşitli direnç genlerini kazanarak birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençli hale gelmektedir (10). İnvaziv enfeksiyonlara neden olan dirençli ve birçok virülans geni taşıyan hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları sağlık hizmeti ile ilişkili salgınlara neden olmaktadır (11).

Birçok alanda kullanımı gittikçe yaygınlaşan tüm genom dizileme yöntemleri Klinik Mikrobiyoloji alanında da önemli bir yere sahiptir. Tüm genom dizileme yöntemleri ile mikroorganizmalar tanımlanmakta, virülans ve direnç genleri hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. Böylece erken tanı ile uygun enfeksiyon kontrol önlemleri alınarak sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar ve salgınlar önlenebilmektedir. Geleneksel yöntemlerle yapılan ve uzun zaman alan salgın analizleri tüm genom dizileme yöntemleri ile hızlıca yapılabilmekte ve salgının kaynağı tespit edilebilmektedir. Yeni bir teknoloji olan Oxford Nanopore uzun ve gerçek okumalar yapabilen bir platformdur. Özellikle hızlı okuma yapabilmesi ve az sayıda örneğin çalışılabilmesine uygun olması nedeniyle pratik kullanıma yönelik

avantajları olabileceği düşünülmektedir. Yeni bir teknoloji olması dolayısıyla kullanımının yaygınlaşması ve geniş bir veri tabanının oluşturulması gerekmektedir. Bu alanda yapılacak çalışmaların bu teknolojiye katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Geniş bir veri tabanına sahip tüm genom dizileme teknolojisi, sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyon ve salgınların kontrolü için kullanılabilecek ideal bir yöntemdir (12). Sağlık hizmeti ile ilişkili salgınlarında tüm genom dizileme ile etkenin hızlı tanısı, virülansının ortaya konması ve uygun tedavinin belirlenmesi hem iş yükünü hem de hasta başı maliyeti azaltarak sosyal ve ekonomik çıktı olarak avantaj sağlayacaktır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmada, hastane kaynaklı kan dolaşım enfeksiyon etkeni olan ve hipermukoviskoz fenotip gösteren *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının virülans ve direnç genlerinin tüm genom dizileme yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın amacı;

- Hastane kaynaklı kan dolaşım enfeksiyonuna neden olan *K. pneumoniae* izolatlarında hipermukoviskoz fenotipin araştırılması
- Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında *rmpA/rmpA2* gen pozitifliğinin araştırılması
- Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması
- Hipermukoviskoz fenotip ile ilişkilendirilen virülans genlerinin belirlenmesi
- Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında bulunan virülans ve direnç genlerinin tanımlanması
- Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarına ait kapsül tiplerinin, O antijen tiplerinin ve virülans plazmidlerinin tanımlanması
- Hipervirülan *K. pneumoniae* izolatlarının belirlenmesi
- Sekans tiplerinin çeşitli veri tabanları kullanılarak belirlenmesi ve standart Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* suşu ile karşılaştırılması,
- Karbapenem dirençli hipermukoviskoz *K. pneumonia* izolatlarının belirlenmesi ve bu izolatlar ile enfekte hastaların kliniğinin değerlendirilmesi

- Yapılan biyoinformatik analizlerde kullanılan veri tabanı performansının karşılaştırılmasıdır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

- Hipermukoviskoz fenotipe neden olan ve kapsüler polisakkaritin aşırı ekspresyonundan sorumlu *rmpA/rmpA2* dışında farklı gen bölgeleri bulunmaktadır.
- Hipermukoviskoz fenotip gösteren *K. pneumoniae* izolatları K1, K2 K5, K16, K20, K28, K54, K57, K63 ve KN1 gibi virülansı yüksek kapsül tiplerini taşımaktadır.
- Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında virülans plazmidleri bulundurmaktadır.
- Hastanemizde karbapenem dirençli hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının sayısı artmaktadır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. *Klebsiella pneumoniae* ve Genel Özellikleri

Klebsiella pneumoniae ilk defa 1882 yılında Carl Friedlander tarafından, pnömoniden ölen bir hastanın akciğerinden izole edilmiş ve Friedlander's bacillus olarak adlandırılmıştır (13). Gram negatif basil olan bu bakteri 1886 yılından bu yana *Klebsiella pneumoniae* olarak literatürde kullanılmaktadır (14).

Su, toprak, bitki yüzeyleri ve atık su *K. pneumoniae* izolatları için çevresel kaynaklardır. *K. pneumoniae* bu çevresel kaynaklardan insanlara bulaşarak çeşitli bölgelerde kolonize olmakta ve enfeksiyona neden olmaktadır (13). İnsanlarda *K. pneumoniae* kolonizasyonu yaşa, coğrafik bölgeye ve sağlık hizmetine başvuru sıklığına göre değişkenlik göstermektedir (6). Fırsatçı patojen olarak tanımlanan *K. pneumoniae*; ağızda, deride ve bağırsak florasında bulunabilmektedir (5). Fırsatçı *K. pneumoniae* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların çoğu alt solunum yolları, üriner sistem, yara ve kan dolaşımını tutan sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlardır (5,6). *K. pneumoniae* genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış, tıbbi bir cihaza bağlı olan hastalarda ve/veya yenidoğanlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır. *K. pneumoniae* aynı zamanda toplum kökenli enfeksiyonlara da neden olmaktadır. Sağlıklı bireylerde *K. pneumoniae* kaynaklı pnömoni, endoftalmi, nekrotizan fasiit, menenjit, piyojenik karaciğer apsesi ve karaciğer dışı apseler görülmektedir. Toplum kökenli *K. pneumoniae* enfeksiyonları için risk faktörleri genel olarak alkol kullanım alışkanlığı ve diyabettir (6).

2.2. *Klebsiella pneumoniae* ve Virülans Genleri

Virülans, bir mikroorganizmanın hastalık yapma özelliği olarak tanımlanmaktadır. Virülans faktörleri bakterinin kolonize olmasında, çoğalmasında ve konak immün yanıttan korunmasında kritik rol oynamaktadır (15). Kapsül, lipopolisakkaritler (LPS), demir taşıyıcı moleküller (sideroforlar), fimbrialar, biyofilm oluşturma ve sekresyon sistemleri *K. pneumoniae* izolatlarında en temel virülans faktörleridir.

K. pneumoniae, fimbrialar ile epitel ve cansız yüzeylere tutunabilmekte, kapsül aracılığıyla doğal ve adaptif bağışık yanıttan korunabilmektedir. LPS'de meydana gelen değişiklikler ile bakteri immün yanıttan kaçabilmektedir. Sideroforlar aracılığıyla konaktan demir ihtiyacını karşılayarak çoğalabilmektedir, sekresyon sistemleri ile diğer hücreler için toksik etkiye sahip proteinleri hücre dışına çıkarabilmektedir (11,16).

2.2.1. Kapsül

K. pneumoniae izolatlarında bulunan kapsül, bütün hücreyi saran polisakkarit bir yapıdır**.** Bazı *K. pneumoniae* türleri hipermukoviskoz olarak bilinen ve klasik kapsülden daha güçlü virülansa sahip hiperkapsül oluşturmaktadır. Hem klasik kapsül hem de hiperkapsül, K (Kapsül) antijeni olarak adlandırılan türe özgü polisakkarit yapılı birimlerden oluşmaktadır. *K. pneumoniae* izolatlarında şimdiye kadar tanımlanan ve sırasıyla 1-78 arasında numaralandırılan toplam 78 K antijeni bulunmaktadır (15). Bu kapsül tiplerindeki çeşitlilik *cps* gen kümesindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. 21 kb-30 kb arasında değişen *cps* gen kümesinde, sekizi evrimsel süreçte korunmuş toplam 16-25 gen bulunmaktadır. Evrimsel süreçte korunan ve kapsül kodlayan genler *galF, orf2, wzi, wza, wzb, wzc, gnd* ve *ugd* olarak tanımlanmaktadır (17). Plazmid aracılı olan ve transkripsiyonel düzenleyici olarak tanımlanan *rmpA/rmpA2* (mukoid fenotip A regülatörü) genlerinin ekspresyonu kapsüler polisakkaritte artışa neden olmaktadır (18) . *rmpA/rmpA2* genlerinin yanı sıra, hiperkapsül üretiminde genellikle K1 kapsül tipi ile ilişkilendirilen mukoviskozite ilişkili gen A'nın (*magA*) görev aldığı düşünülmektedir (19). Kapsüler polisakkarit sentezi arttıkça bakterinin immün yanıta karşı direnci artmaktadır. Kapsül, bakterinin hem fagositozdan kaçmasına yardımcı olmakta hem de immün yanıtın daha geç ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Buna ek olarak kompleman ve antimikrobiyal peptitler tarafından bakterinin lizise uğratılmasını engellemektedir (20).

2.2.2. Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit, lipid A, O antijeni ve "core" polisakkarit olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Lipid A dış membrana bağlıyken, "core" polisakkarit O

antijeni ve Lipid A'yı birbirine bağlamaktadır. Lipid A sitoplazmada sentezlenir ve sitoplazmadan taşınarak dış membrana bağlanır (5). *K. pneumoniae* bakterilerinde tanımlanmış en az dokuz O antijeni bulunmaktadır. Bunlar O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 ve O12 şeklinde sınıflandırılmaktadır. O1 klinik *K. pneumoniae* izolatlarında en sık bulunan O antijenidir (21). O antijen biyosentezinde görev alan enzimler, *wb* gen kümesi (*wzm*, *wzt*, *wbbM*, *glf*, *wbbN* ve *wbbO)* tarafından kodlanmaktadır (5). *K. pneumoniae* bakterilerinde tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki tip "core" polisakkarit bulunmaktadır. "Core" polissakkarit toplam 13 gen içeren iki tip *wa* gen kümesi tarafından sentezlenmektedir. Tip 2 *wa* gen kümesi *hldD*, *waaF*, *waaC*, *wabK*, *waaL*, *wabM*, *waaQ*, *wabG*, *wabH*, *orf10*, *waaA*, *waaE* ve *coaD* genlerinden oluşmaktadır. Tip 1 ise *wabI* ve *wabJ* genlerini içermektedir. Tip 2 "core" polisakkarit taşıyan izolatların Tip 1 taşıyan izolatlara göre daha yüksek virülansa sahip olduğu gösterilmiştir (22). LPS meydana gelen mutasyonlar bakterinin antimikrobiyal peptitlere duyarlılığını arttırmaktadır (23).

2.2.3. Fimbria

Önemli bir virülans faktörü olan fimbrialar *K. pneumoniae* izolatlarının çeşitli yüzeylere yapışmasında görev almaktadır. Tip 1 fimbria, Tip 3 fimbria, Kpc fimbria ve KPF-28 adezyon olmak üzere dört tip fimbria bulunmaktır (5).

Tip 1 fimbria ince, sert, yapışkan ve ip benzeri yapılardır (15). Tip 1 fimbria, 12 kb uzunluğunda olan ve kromozom üzerinde bulunan *fimBEAICDFGHK* gen lokusu tarafından kodlanmaktadır (24). Tip 1 fimbrianın en önemli alt birimleri FimA ve FimH'dir. Fimbrianın temel yapısı olan FimA, *fimA* tarafından kodlanırken, adezyonda rol oynayan FimH, *fimH* geni tarafından kodlanmaktadır. Tip 1 fimbria; kapsülün dışına doğru uzanan, konak hücre yapısında mannoz içeren yapılara yapışmada rol oynamakta ve FimH adezin ile ekstrasellüler matrise adezyona aracılık etmektedir (5). Tip 1 fimbria üriner sistem enfeksiyonları ile ilişkilendirilmekte ve bu enfeksiyona neden olan izolatlarda önemli bir virülans faktörü olarak tanımlanmaktadır (24). Tip 1 fimbria hem klinik hem de çevresel *K. pneumoniae* izolatlarının %90'nında bulunmaktadır (15). Tip 3 fimbria, 20,4 kb uzunluğunda *mrkABCDF* gen kümesi tarafından kodlanmaktadır ve 2–4 nm genişliğinde ve 0,5–2

μm uzunluğunda uzantılardır. Tip 3 fimbria, epitel hücrelere, böbreğe ve akciğer dokularına yapışmaya aracılık eder (5). Temel olarak mrkA alt biriminden ve adezyondan sorumlu mrkD alt biriminden oluşmaktadır. Tip 3 fimbrianın daha çok tip IV ve V kollajen reseptörlerine bağlandığı bilinmektedir (15). Biyofilm oluşumuna katkı sağlayan Kpc fimbria; *kpcABCD* gen kümesi tarafından sentezlenir ve birleştirilir. Kpc fimbria genellikle K1 kapsül tipine sahip *K. pneumoniae* izolatları ile ilişkilendirilmektedir (25). Diğer bir fimbria türü olan KPF-28 adezin; uzun, ince esnek bir fimbriadır. 4–5 nm çapında ve 0,5–2 μm uzunluğundadır. Genellikle KPF-28'in yapısal genleri CAZ-5/SHV-4 β-laktamazları kodlayan R plazmidinde yer almaktadır ve sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyona neden olan izolatlarda tanımlanmıştır. İnsan bağırsağında kolonizasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (26).

Fimbriaların en önemli klinik rolü bakterinin canlı ve cansız yüzeylere yapışmasına aracılık etmesidir. Böylece bakteri o bölgede kolonize olmakta ya da biyofilm oluşturmaktadır. Kolonizasyondan sonra oluşan biyofilm yapısı sonradan ortaya çıkacak olan üriner sistem enfeksiyonu, pnömoni gibi enfeksiyonlara zemin oluşturmaktadır (15).

2.2.4. Dış Membran Proteinleri ve Porinleri

K. pneumoniae virülansında rol oynayan dış membran proteinleri; dış membran protein A (OmpA), peptidoglikan ile ilişkili lipoprotein (Pal), murein lipoprotein (LppA) şeklinde sıralanmaktadır (27). OmpA Gram negatif bakterilerde bilinen en temel dış membran proteinidir (5). Dış membran proteinleri hücre bütünlüğünü korumakta ve seçici geçirgenliğe katkı sağlamaktadır. Bu proteinler bakteriyi iyonik kimyasallara ve belli antibiyotiklere karşı korumaktadır (15). Pal ve LppA proteinlerinin kaybı ile bakterinin serumda bulunan antibakteriyel proteinlere ve fagositoza direnci azalmakta, hücre geçirgenliğinde bozulmalar meydana gelmektedir (27).

K. pneumoniae temel dış membran porinleri olarak, OmpK35 ve OmpK36 porinlerini üretmektedir. Bu bakteriler OmpK35 ve OmpK36 porin eksikliğinde

alternatif olarak KpnO ve OmpK porinlerini sentezlemektedir. Bazı porin kayıpları antimikrobiyal direncin artmasında rol oynamaktadır (5,28).

2.2.5. Demir Alım Sistemi / Sideroforlar

Demir, *K. pneumoniae* izolatları için gerekli olan ve bakterinin çevreden almak zorunda olduğu bir moleküldür. Demir genellikle konakta bulunan transferrin gibi glikoproteinlere bağlı bir şekilde bulunmaktadır. Bu nedenle konak plazmasında çok az serbest demire rastlanmaktadır. Bakteriler demir gereksinimini karşılamak için siderofor olarak adlandırılan bileşikler sentezlemektedir. Sideroforlar konak hücrede bulunan ve demir taşıyan transferrin gibi glikoproteinlere göre daha yüksek afiniteye sahiptir. Bakteri bu yüksek afiniteli sideroforlar aracılığıyla konaktaki transferrin ile yarışarak demiri almakta ve böylece demir ihtiyacını karşılamaktadır (15). *K. pneumoniae* izolatları enterobaktin, yersiniabaktin, salmochelin ve aerobaktin gibi virülansa katkı sağlayan çeşitli sideroforlar sentezlemektedir. Demire afinitesi en yüksek olan siderofor enterobaktin iken en düşük afiniteli siderofor aerobaktindir. *entABCDEF* gen kümesi enterobaktini kodlarken *fepABCDG* gen kümesi bunların transportundan sorumlu proteinleri kodlamaktadır. Yersiniabaktin *ybt* ve *fyu* genleri, salmochelin *iroBCDE*, aerobaktin ise *iucABCD* ve *iutA* genleri tarafından kodlanmaktadır. Her bir siderofor farklı bölgelerdeki enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir. Yersiniabaktin özellikle solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan izolatlarda bulunurken, kan dolaşım enfeksiyonu ve üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan izolatlar ise daha çok enterobaktin sentezlemektedir (15,29).

2.2.6. Biyofilm

Biyofilm, bazı bakterilerin UV ışık, ağır metal, asit gibi çevresel hasar verici kimyasallara ve fagositoza karşı hayatta kalabilmek için oluşturduğu bir yapıdır. Hücreler polisakkaritlerden, proteinlerden ve DNA'dan oluşan kompleks bir yapı olan ekstraselüler matriks içinde birikmektedir. Biyofilm dört aşamada oluşmaktadır. Hücreler yüzeye yapışır, küçük koloniler oluşur, olgunlaşır ve yayılır (30). Bu süreçte rol olan en önemli yüzey yapıları Tip 3 fimbria ve kapsüler polisakkarittir. Fimbrialar adezyonu sağlarken kapsüler polisakkarit biyofilm yapısında ve hücre içi

iletişimde rol oynar. Transkripsiyonel regülasyon "quarum sensing" çoğunluğu algılama tarafından düzenlenir. "Quarum sensing" çoğunluğu algılama, sinyalleri koordine eden ve buna cevap olarak mikrobiyal popülasyonda gen ekspresyonunu kontrol eden bir sistemdir (31). *K. pneumoniae* biyofilm oluşturan bakteriler arasında yer almaktadır. Kateter ve diğer girişimsel cihazlarda oluşturduğu biyofilm, solunum yollarında, bağırsak sisteminde ve üriner sistemde kolonizasyona neden olmaktadır. Ayrıca invaziv enfeksiyonlar ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Matriks, antikorları, antimikrobiyal peptitleri inhibe ederek ve fagositozu önleyerek bakteriyi konak immün yanıttan korumaktadır (11). Biyofilm yapısı antibiyotiklere karşı dirençte de rol oynamaktadır (30). Hiperkapsül sentezinde sorumlu genler ve *wcaG* geni biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilmektedir (31,32).

2.2.7. Sekresyon Sistemleri

Sekresyon sistemleri, bakteriler tarafından üretilen bazı proteinleri hücre dışına taşıyan yapılardır. Bu proteinler bakterinin hücreye yapışmasını kolaylaştıran ve toksik ürünler üreten virülans faktörleridir. Mikroorganizmalara ve konak dokuya zarar verebilmektedir. Bu proteinler fosfolipit zardan çeşitli sekresyon sistemleri aracılığıyla geçebilmektedir. Proteinlerin hücre dışına taşınmasının yanı sıra bu sistemler bakteriler arasında iletişimde de rol oynamaktadır. Şimdiye kadar T1SS, T2SS, T3SS, T4SS, T5SS, T6SS, T7SS ve T9SS olmak üzere sekiz farklı sekresyon sistemi tanımlanmıştır. Bu sekresyon sistemleri yapılarına ve aktivitelerine göre sınıflandırılmaktadır. T6SS Gram negatif bakteri virülansına katkı sağlayan önemli bir sekresyon sistemidir. T6SS membran içinde bulunan bir sekresyondur ve substratların transferinden sorumludur. Bu substratlar hem prokaryot hem de ökaryot hücreler üzerinde toksik etkiye sahiptir (16). *K. pneumoniae* izolatlarında da önemli bir virülans faktörü olan T6SS, bu sekresyon sistemi aracılığıyla hücrelere saldırabilmekte ve Tip 1 fimbria ekspresyonunu arttırabilmektedir. Aynı zamanda bu sekresyon sistemi canlı yüzeylerde kolonizasyona katkı sağlamaktadır. *K. pneumoniae* izolatlarının T6SS'yi oluşturan çekirdek proteinleri F protein ailesi (IcmF), valin-glisin tekrarlanan protein (VgrG) ve hemolisin-regüle protein (Hcp) olarak belirlenmiştir (32) *K. pneumoniae* izolatlarında bulunan temel virülans faktörleri ve virülans genleri Tablo 1'de verilmiştir.

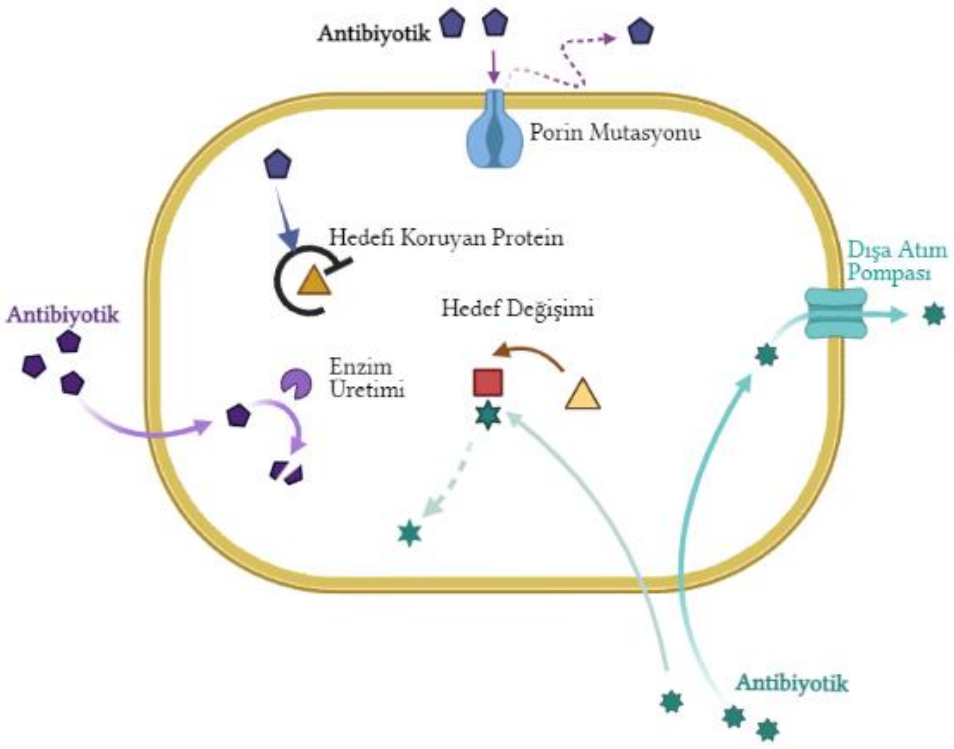
Tablo 1. *K. pneumonaie* virülans faktörleri ve virülans genleri

Virülans Faktörü	Genler	Kaynak
Kapsül	*galF, orf2, wzi, wza, wzb, wzc, gnd, ugd*	(17)
Lipopolisakkarit		
O antijeni	*wzm, wzt, wbbM, glf, wbbN, wbbO*	(21)
Core Polisakkarit	*hldD, waaF, waaC, wabK, waaL, wabM, waaQ, wabG, wabH, orf10, waaA, waaE* and *coaD, wabI* ve *wabJ*	(22)
Fimbria		
Tip 1 fimbria	*fimBEAICDFGHK*	(24) (33)
Tip 3Fimbria	*mrkABCDF*	(25)
Kpc Fimbria	*kpcABCD*	
Sideroforlar		
Enterobaktin	*entABCDEF*	(15)
Yersiniabaktin,	*ybt* ve *fyu*	
Salmochelin	*iroBCDE*	
Aerobaktin	iucABCD, iutA	
Biyofilm	*wcaG*	(31)
Sekresyon Sistemleri	*IcmF, VgrG* ve *Hcp*	(32)

2.3. *Klebsiella pneumoniae* ve Antimikrobiyal Direnç

Direnç, antibiyotik veya antiseptik gibi toksik bileşikler varlığında mikroorganizmanın hayatta kalabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyon tedavisinde zorluklar yaşanmasına neden olan antimikrobiyal direnç çeşitli mekanizmalar aracılığıyla oluşmaktadır (30). Yetmiş yılı aşkın bir süredir antimikrobiyal ajanlar enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (34). Antimikrobiyal ajanların kullanılmasıyla birlikte bakteriler bu ajanlara karşı direnç kazanmaya başlamış ve üretilen her yeni antimikrobiyal ajana karşı direnç

geliştirmiştir (35). Temel direnç mekanizmaları; ilacı inaktive eden enzim üretimi, hedef değişimi, hücre geçirgenliğinde değişim ve dışa atım pompaları olarak sınıflandırılmaktadır (34). Önemli bir direnç mekanizması olan enzim üretiminde, bakteri her bir antimikrobiyallere özgül enzim üretmekte ve bu enzimler aracılığıyla antimikrobiyali inaktive etmektedir. Hedef değişimiyle ortaya çıkan direnç, hedefi kodlayan gendeki mutasyon sonucunda oluşmaktadır. Çeşitli porin kaybı veya mutasyonları ile hücre geçirgenliğinde değişim meydana gelmekte ve direnç görülmektedir. Diğer bir direnç mekanizması olan dışa atım pompa sistemleri temel olarak beş gruba ayrılmaktadır. Bunlar; ATP-Binding Cassette (ABC), Major Facilitator (MFS), Multidrug and Toxic compound Extrusion (MATE), Resistance-Nodulation-Division (RND) ve Small Multidrug Resistance (SMR) şeklinde sınıflandırılmaktadır (36). Bakteriler arasında, horizontal geçiş yolu ile direnç genlerinin aktarılması sonucunda direnç yayılmaktadır (34). *K. pneumoniae* izolatlarındaki temel antimikrobiyal direnç mekanizmaları Şekil 1 'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Antimikrobiyal direnç mekanizmaları (37)

2.3.1. β – laktam Direnç Genleri

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde en sık kullanılan antimikrobiyal olan β-laktamlar, hücre duvar sentezi inhibitörleridir. Penisilin bağlayan proteinlere kovalent bağlanan β-laktamlar peptidoglikan oluşumunu engellemektedir. Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde hücre lizisine neden olmaktadır (38).

β–laktamlar 1940 yıllarından bu yana tedavide kullanılan önemli antimikrobiyallerdir. β-laktamların *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında kullanılmasıyla birlikte 1960 yıllarında SHV-1 ve TEM-1 gibi β – laktamazları kodlayan, penisilin dirençli ilk *K. pneumoniae* izolatları tanımlanmıştır (11). Daha sonra *Klebsiella ozaenae,* izolatlarında sefalosporin ve monobaktam gibi geniş spektrumlu β-laktam (GSBL) direncine neden olan *bla*$_{\text{SHV-2}}$ geni tanımlanmıştır (39). Sonraki yıllarda TEM-3 ve CTX-M gibi β-laktamazları kodlayan genler plazmid ve transpozon üzerinde saptanmış ve bu genlerin bakteriler arasında yayıldığı görülmüştür. Horizontal gen aktarım yoluyla *K. pneumoniae*'lar arasında yayılan diğer β-laktam direnç genleri *bla*$_{\text{OXA}}$ ve nadiren görülen *bla*$_{\text{GES}}$, *bla*$_{\text{SFO}}$, *bla*$_{\text{PER}}$, *bla*$_{\text{TLA}}$, *bla*$_{\text{VEB}}$ ve *bla*$_{\text{KLUC-5}}$'tir (11,34).

Plazmid aracılı olan ve β-laktam direncine yol açan *bla*$_{\text{ACT}}$, *bla*$_{\text{MIR}}$, *bla*$_{\text{ACC}}$ ve *bla*$_{\text{LAT}}$ gibi *AmpC* genleri *K. pneumoniae* izolatlarında nadir görülmektedir. Kromozom üzerinde görülen ilk *AmpC* geni *bla*$_{\text{ACT-1}}$'dir (34).

Çeşitli antimikrobiyallere direnç kazanma eğiliminde olan ve horizontal aktarım ile taşıdığı direnç genlerini diğer türlere aktarabilen *K. pneumoniae* izolatları, bir β-laktam olan ampisiline doğal dirençlidirler. Kromozom üzerinde bulunan ve β-laktamaz sentezinden sorumlu olan *bla*$_{\text{SHV}}$ geninin bu dirençte rol oynadığı düşünülmektedir (6).

2.3.2. Karbapenem Direnç Genleri

Karbapenemler, bakterilerde β-laktam direncinin artmasıyla birlikte tedavide kullanılmaya başlanmıştır. İmipenem *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında ilk kullanılan karbapenemdir (40). *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnci çeşitli mekanizmalar aracılığıyla oluşmaktadır. Bu mekanizmalardan en önemlisi

karbapenemleri inaktive eden enzim üretimidir. Karbapenemazlar olarak tanımlanan bu enzimler Ambler sınıflandırmalarına uygun olarak Sınıf A, Sınıf B ve Sınıf D olarak gruplandırılmaktadır. Sınıf A'da *Klebsiella pneumoniae* karbapenamaz (KPC); Sınıf B' de New Delhi metallo-β-laktamaz (NDM), "imipenem-resistant" *Pseudomonas* (IMP) ve Verona "integron-encoded" metallo- β-laktamaz (VIM); Sınıf D' de ise bir oksasilinaz olan OXA-48 karbapenemazı yer almaktadır (35).

Karbapenemaz genleri farklı zamanlarda tanımlanmış ve bakteriler arasında hızla yayıldığı görülmüştür. Önemli bir karbapenemaz olan IMP-1 ilk defa 1991 yılında, VIM-1 ise ilk defa 1997 yılında İtalya'da tanımlanmıştır (41). NDM-1 ilk defa 2008 yılında, diğer bir karbapenemaz geni olan ve Tn4401 transpozonu üzerinde taşınan KPC ise ilk defa 1996 yılında bir *K. pneumoniae* izolatında ABD'de tanımlanmıştır (42-44). Türkiye'de endemik olan ve 2001 yılında bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanan OXA-48 karbapenemazı kodlayan gen plazmid üzerinde taşınmaktadır (45). Bakteriler arasında hızlı bir şekilde yayılan karbapenemaz genleri bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde zorluklar yaşanmasına neden olmaktadır.

Enzim üretiminin yanı sıra dışa atım pompaları ve porin kaybı karbepenem direncinde rol oynamaktadır (35). Bir β-laktamaz olan, plazmid aracılı *AmpC* geni varlığında oluşan porin kaybı veya dışa atım pompalarındaki artış *K. pneumoniae* izolatlarında ertapeneme duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda AcrAB dışa atım pompası ile birlikte GSBL'nin varlığı veya OmpK36 porin kaybı karbapenem direncine neden olmaktadır (34).

2.3.3. Aminoglikozid Direnç Genleri

En çok 1940-1980 yılları arasında kullanılan aminoglikozidler, protein sentez inhibitörleridir. Antimikrobiyal ajanı modifiye edici enzimleri kodlayan ve plazmid üzerinde taşınan *aac, aph* ve *ant* genleri aminoglikozid direncinde rol oynamaktadır (46). Yine plazmid üzerinde taşınan *armA* gen ailesi ise 16SrRNA metilazları kodlayarak, aminoglikozidlerin 16SrRNA'ya bağlanmasına engel olmakta ve neredeyse bütün aminoglikozidlere karşı direncin oluşmasına neden olmaktadır (47,48). Diğer plazmid aracılı 16SrRNA metilazları *NpmA* ve *Rmt* gen aileleridir. *K. pneumoniae* izolatlarında kromozom aracılı aminoglikozid direnci, genellikle

AcrAB-TolC ve KpnEF dışa atım pompalarında ve KpnO porin kaybından kaynaklanmaktadır (34,49).

2.3.4. Kinolon Direnç Genleri

1963 yılında Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisindeki başarısı ile ön plana çıkan kinolonlar DNA replikasyonunu inhibe ederek etki göstermektedir (50) . Florokinolonlara karşı direnç; hedefteki değişim, dışa atım pompalarındaki artış, enzim modifikasyonu ve hedefi koruyan proteinlerin sentezi ile oluşmaktadır. Temel direnç mekanizması kromozom üzerinde bulunan DNA giraz (*gyrA-gyrB*) ve topoizomeraz IV (*parC-parE*) kodlayan genlerdeki mutasyondan kaynaklanmaktadır (51,52). Hedefi koruyan proteinlerin sentezi yine önemli bir direnç mekanizmasıdır. Plazmid aracılı bir gen olan ve protein kodlayan *qnr* gen ailesi (*qnrB, qnrS, qnrC* ve *qnrD*) DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini kinolon inhibitörlerine karşı korumaktadır. Florokinolon moleküllerini hücre dışına atan oqxAB ve qepA dışa atım pompaları çoklu ilaç direncine sahip *K. pneumonia* izolatlarında görülmektedir (53).

K. pneumoniae izolatlarında hücre geçirgenliğinin değişmesi de kinolon direncine neden olmaktadır. OmpK36 porin kaybı ve dışa atım pompalarını kodlayan *acrAB* geninin aşırı ekspresyonu dirençte rol oynamaktadır (34). *K. pneumoniae* izolatlarında bilinen diğer önemli dışa atım pompası kodlayan gen *oqxAB* ilk önce kromozom üzerinde bulunsa da daha sonra pOLA52-benzeri plazmid üzerinde taşındığı, kinolon direncine neden olduğu ve özellikle Gram negatif patojenler arasında yayıldığı gösterilmiştir (54).

2.3.5. Tigesiklin Direnç Genleri

Tigesiklin 2005 yılından beri kullanılan bir glisilsiklindir ve protein sentez inhibitörüdür. Özellikle bakteri kaynaklı yara enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılması önerilmektedir (55). Tetrasiklinler aerob, anaerob Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olan bir antimikrobiyaldir. Klinik suşlardaki temel tetrasiklin direnç mekanizması MFS dışa atım pompa sistemleri (tetA, tetB, tetC, tetD ve tetE) ve hedefi koruyan protein (tetM) olarak gösterilmektedir. Bunun

yanında tigesiklin direnci, 16S rRNA'daki modifikasyon ve hücre geçirgenliğinin değişmesi sonucunda oluşmaktadır. Ayrıca aşırı üretilen AcrAB-TolC, oqxAB ve kpgABC dışa atım pompaları direncin oluşmasında rol oynamaktadır (56).

2.3.6. Polimiksin Direnç Genleri

Polimiksinler karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisi için son seçenek olarak bulunmaktadır. Polimiksinler LPS'deki Ca^{+2}/Mg^{+2} iyonlarının yerine geçerek membran bütünlüğünü bozmakta ve hücre lisizine neden olmaktadır. Polimiksinlerdeki temel direnç mekanizması hedef değişimidir. LPS yapısında modifikasyona neden olan yük değişimi ile polimiksinlerin LPS'ye bağlanması engellenmekte ve polimiksinlere karşı direnç ortaya çıkmaktadır (11). Polimiksinlere karşı temel direnç mekanizmaları, kapsüler polisakkaritin dış membran yüzeyindeki molekül yüklerinin kamufle edilmesi ve aşırı üretilen KpnEF gibi dışa atım pompalarıdır (57). Plazmid aracılı olan *mcr-1* ve *pmrC* genleri Lipid A'yı modifiye eden fosfoetanolamin transferaz enzimlerini kodlamakta ve polimiksinlere karşı dirence neden olmaktadır (58). Karbapenem dirençli bakteriler arasında kolistin direnci %12 iken bu kolistine dirençli bakterilerin %95'sini *K. pneumoniae* oluşturmaktadır. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatları arasında artan kolistin direnci bu etken ile enfekte olan hastaların tedavisini zorlaştırmaktadır (34). *K. pneumoniae* izolatlarında çeşitli antimikrobiyallere karşı geliştirilen direnç mekanizmaları ve sorumlu gen bölgeleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Antimikrobiyaller, direnç mekanizmaları ve direnç genleri

Antimikrobiyaller	**Direnç Mekanizmaları**	**Direnç Genleri**
β – laktam	Enzim Üretimi	*bla*$_{SHV}$, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{GES}$, *bla*$_{SFO}$, *bla*$_{PER}$, *bla*$_{TLA}$, *bla*$_{VEB}$, *bla*$_{KLUC-5}$
Karbapenem	Enzim Üretimi	*bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$
Aminoglikozid	Enzim Üretimi Hedef Değişimi Dışa Atım Pompaları	*aac, aph, ant* *armA, NpmA, Rmt* *AcrAB-TolC, KpnEF*
Kinolon	Hedefte Değişim Hedefi Koruyan Protein Dışa Atım Pompaları	*gyrA-gyrB,parC-parE* *qnrB, qnrS, qnrC* ve *qnrD* *oqxAB* ve *qepA*
Tigesiklin	Hedefi Koruyan Protein	*tetM*
Polimiksin	Hedef Değişimi Dışa Atım Pompası	*mcr-1, pmrC* *KpnEF*

2.4. *Klebsiella pneumoniae* ve İmmün Yanıt

K. pneumoniae doğal bağışıklığın anatomik bariyerlerini ve bağışık yanıtını geçerek enfeksiyon oluşturmaktadır. İmmün yanıtta opsonik, bakteriyostatik ve bakterisidal antimikrobiyal faktörler görev almaktadır. Bakteri enfeksiyonlarında oluşan immün yanıtta kompleman sistemiyle birlikte makrofaj, nötrofil, dendritik hücreler ve monosit gibi çeşitli hücreler görev almaktadır (15).

Kompleman sistemi aktivasyonunda kapsüler polisakkarit, LPS, dış membran proteinleri ve O antijeni rol oynamaktadır *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında kompleman sistemi üç farklı yolla etki göstermektedir. İlk mekanizmada C5b-C9 gibi proteinler membrana zarar vererek hücre lizisine neden olmaktadır. İkinci mekanizmada ise bakteri hücrelerini opsonize ederek immün yanıt hücrelerinin daha kolay fagosite etmesini sağlamaktadır. Son olarak kompleman kaskadlarının aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan kemoatraktan ve proinflamatuar aracılar ile immün yanıt hücreleri uyarılmaktadır (15). Kompleman sistemi; klasik, alternatif ve lektin yol olmak üzere üç farklı mekanizma ile etki göstermektedir. LPS hem

alternatif yolu hem de klasik yolu aktive etmektedir. Dış membran proteinleri, C1q bileşeni aracılığıyla klasik yolun aktifleşmesine neden olmaktadır. Kapsüler polisakkaritte bulunan ve tekrarlanan D-mannoz veya L-ramnoz birimlerinin kapsüler polisakkarit mannoz bağlayıcı lektin ile etkileşimi sonucunda lektin yolu aktive olmaktadır (59).

Makrofajlar hem bakteriyi fagosite etmekte hem de ürettiği kemokin ve sitokinler aracılığıyla diğer immün yanıt hücrelerini aktive etmektedir. Salgıladığı kemokin ve sitokinler aracılığıyla nötrofiller uyarılmaktadır. İnterlökin-8 (IL-8), CWCL1 ve lökotrien B4, makrofajlar tarafından üretilen kemokinlerdir. Nötrofiller makrofajlardan daha iyi fagosite etme ve öldürme özelliğine sahip, immun yanıt hücreleridir. Nötrofiller *K. pneumoniae* enfeksiyonlarını önlemede ve sonlandırmada önemli rol oynamaktadır. Akciğer enfeksiyonlarında ilk 24 saatte enfeksiyonun temizlenmesi nötrofil ve $CCR2^{+}$ monosit hücre aracılığıyla gerçekleşmektedir. *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında nötrofiller birçok görev üstlenmektedir. Nötrofiller temel olarak fagositoz/opsonofagositozda, inflamatuar sitokin üretiminde, reaktif oksijen türleri, serin proteazlar, laktoferrin, lipokalin-2, miyeloperoksidaz, nötrofil hücre dışı tuzakları (NETs-Neutrophil Extracellular Traps) gibi antimikrobiyallerin salınımında rol oynamaktadır. Dendritik hücreler *K. pneumoniae* kaynaklı akciğer enfeksiyonlarında görev alan immün yanıt hücreleridir. *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında rol alması ve olgunlaşması Toll-benzeri reseptör 9 (TLR-9) aracılığıyla olmaktadır. TLR-9, dendritik hücre içinde biriken bakterilerin hücre içinde öldürülmesi için sinyaller verir (15).

K. pneumoniae enfeksiyonlarında çeşitli sitokinler salgılanarak konak immün yanıtı güçlendirilmektedir. Lenfositler tarafından üretilen IL-17 fagositik ve mikrobiyal aktivitesi olan monositlerin sayısında artışa neden olmaktadır (59). IL-17, nötrofil üretimini hedefleyerek enfeksiyon kontrolünü destekler (60). γδT hücreleri hücre dışı akut Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında oluşan immün yanıtın önemli bir bileşenidir. γδT hücreleri akciğer enfeksiyonlarında gerekli olan tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) ve interferon gama (IFN-γ) gibi sitokinlerin regülasyonunu arttırmaktadır (61). IFN-γ, *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında ve akciğerden diğer bölgelere yayılmayı önlemede rol oynamaktadır. IL-

22 de *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının kontrolü için önemli bir sitokindir. Doğal öldürücü (NK-Natural killer) hücrelerinin IL-22'nin temel kaynağı olduğu ve *K. pneumoniae* kaynaklı akciğer enfeksiyonlarında kritik rol oynadığı düşünülmektedir (15).

Patojenleri fagosite ederek immün yanıta destek sağlamanın yanında monositler, anti-inflamatuar etkiye sahip hücrelerdir. Anti-inflamatuar monositler *K. pneumoniae* kaynaklı akciğer enfeksiyonlarında önemli rol oynamakta ve enfeksiyonların erken evrelerinde görev almaktadırlar. Bakteriye ait parçalanmış yapıların enfeksiyon bölgesinden arındırılmasında, doku hasarına karşı akciğerlerin korunmasında ve IL-10 üretimi ile apoptotik nötrofillerin temizlenmesinde rol oynamaktadır (59).

K. pneumoniae çeşitli mekanizmalar ile immün yanıta direnç göstermektedir. *K. pneumonia* izolatlarında komplemana karşı direnç, kapsüler polisakkaritin modifikasyonu sonucunda meydana gelmektedir. Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları tarafından oluşturulan kalın kapsül, kompleman sistemi bileşenlerinin hücre membranına zarar vermesini ve hücre lizisini engellemektedir. Ayrıca kalın kapsüler polisakkarit tabaka LPS, O antijen ve dış membran proteinleri gibi komplemanı aktive eden yapıların tanınmasını zorlaştırmaktadır. Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında kapsüler polisakkarit motifleri kökenden kökene yapısal çeşitlilik göstermektedir. Böylece bakterinin lektin tarafından tanınması güçleşmektedir. Dolayısıyla klasik *K. pneumoniae* kökenleri, hipervirülanlara göre kompleman aracılı öldürülmeye daha duyarlıdır. Hipervirülan ve çoklu ilaç direncine sahip izolatların immün yanıttan kaçışı birbirinden farklılık göstermektedir. K2 serotip hipervirülan referans suşunun klasik suşlara göre makrofajlarca daha zor fagositoza uğradığı ve makrofajların fagozomlarında saatlerce hayatta kalabildiği gösterilmiştir. Hücre içine alındıktan sonra fagozom olgunlaşmasını ve fago-lizozom oluşumunu engellemektedir (59). Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının in vitro deneysel çalışmalarda nötrofilden kaçabildiği gösterilmiştir. K1 ve K2 kapsül tipine sahip hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının, klasik *K. pneumoniae* ve

mukoid kapsülü olmayan izolatlara göre nötrofil aracılı fagositoza daha dirençli olduğu gösterilmiştir (62).

2.5. *Klebsiella pneumoniae* ve Genetik Yapısı

K. pneumoniae 5-6 Mbp büyüklüğünde genoma sahip bir bakteridir. Bu genomda yaklaşık 5.000-6.000 arasında gen bulunmaktadır. Bugüne dek bilinen tüm *K. pneumoniae* kökenlerinden elde edilen genlerin toplamı olan pan-genomu 100.000'den fazla protein kodlama kapasitesine sahiptir (6).

K. pneumoniae izolatlarının %95'inde "core" genom bulunmakta ve bu yaklaşık 2000 geni kapsamaktadır. İzolatlar arasındaki çeşitlilik kromozom veya plazmid üzerinde taşınan "accessory" genomla ortaya çıkmaktadır. "Accessory" genom ile bakteriler kökene özgül mekanizmalara sahip olmaktadır. "Accessory" genler çeşitli virülans ve direnç genleri kodlamakta ve horizontal gen transferi ile çeşitli bakterilere aktarılmaktadır (13).

Plazmidler; çift zincirli, kromozomdan ayrı olarak çoğalabilen çeşitli virülans ve direnç genini kodlayan DNA parçalarıdır. Ağır metallere ve antimikrobiyallere dirence neden olan genleri kodlayarak bakterinin ortama adaptasyonunu arttırmaktadır. Birçok bakteride bulunan plazmidler, çeşitli uzunlukta olabilmekte ve bir bakteride birden fazla kopya bulunabilmektedir. Plazmidler incompatibility (uyumsuzluk-Inc) veya replikon gruplarına göre sınıflandırılmaktadır. *Enterobactericeae* üyelerinde bulunan replikon gruplarına göre ayrılan bazı plazmidler IncF, N, X, A/C, L/M, R, P, H, I ve W şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bu replikon grupları çeşitli karbapenemazlar ile ilişkilendirilmektedir. IncF, A/C ve X plazmidler karbapenemaz taşıyan yaygın gruptur. Bazı plazmidlerin konakçı sayısı fazla iken bazılarının daha az olabilmektedir. Belli ve dar bir grup konakçı arasında aktarımı yapılanlar IncF, IncH ve IncI plazmidleridir. L/M, IncN, IncP ve IncW ise geniş konakçı grubuna sahip plazmidler olarak tanımlanmaktadır (63).

National Center for Biotechnology Information'da (NCBI) tanımlanmış *K. pneumoniae* ile ilişkili 306 plazmid bulunmaktadır. Bunların 27'si 15 kb'dan küçük uzunluklardaki plazmidlerden 279'u ise büyük plazmidlerden oluşmaktadır. *K.*

pneumoniae izolatlarında KPC karbapenemaz genini taşıyan plazmidler pKPN, pKpQIL, IncFIIk, IncN, IncX3, IncR, IncHI1 ve IncI2 olarak tanımlanmaktadır. *K. pneumoniae* izolatlarında NDM karbapenemaz geni IncA/C2, IncHI1, IncX3 ve IncN2 plazmidleri aracılığıyla yayılmaktadır. IncA/C2 grubu aynı zamanda aminoglikozid, kloromfenikol, trimetoprim sülfametoksazol ve sulfonamid gibi antimikrobiyallere dirence neden olan genleri ve AmpC β-laktamazları taşımaktadır. CTX-M-15 ve CTX-M-1 gibi β-laktamazlar IncI1, IncR ve IncN plazmidler ile ilişkilendirilmektedir (34). Diğer bir karbapenemaz geni olan ve ülkemizde yaygın olarak bulunan OXA-48 yaklaşık 62 kb uzunluğunda IncL/M plazmidler üzerinde bulunmakta ve yayılmaktadır (64). Virülans plazmidi olarak tanımlanan ve diğer bir önemli plazmid pLVPK, *K. pneumoniae* izolatlarında tanımlanmıştır. Bu plazmid aerobaktin ve salmochelin gibi sideroforları kodlayan genleri ve *rmpA* genini taşımaktadır (65).

2.6. *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Tiplendirilmesi

Klebsiella türleri çeşitli fenotipik yöntemlerle tiplendirilmektedir. Bunlar arasında faj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme ve serotiplendirme yer almaktadır. Serotiplendirme K antijene dayanan tiplendirme yöntemidir, fakat bu tiplendirme klonlar arasındaki ilişki hakkında bir veri sağlamamaktadır (66). K antijenine göre yapılan tiplendirmede genellikle *wzi* gen dizisi kullanılmaktadır. Bunun nedeni *cps* gen kümesinde bütün kapsül tiplerine ait farklı *wzi* gen dizisi bulunmasıdır. Dolayısıyla yüzey proteini kodladığı bilinen *wzi* sekansı klinik *K. pneumoniae* izolatlarında K tipini tanımlamak için kullanılmaktadır (67).

Bakteriler arasındaki klonal yakınlığı belirlemek amacıyla kullanılan moleküler yöntemler, Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA (RAPD-Random Amplified Polymorphic DNA), Değişimli Alan Jel Elektroforezi (PFGE-Pulsed-Field Gel Electrophoresis), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP-Amplified Fragment Length Polymorphism) ve Çoklu Bölge Dizi Analizi (MLST-Multilocus Sequence Typing) şeklinde sıralanmaktadır. Bu yöntemler genellikle salgın analizinde ve klonal yayılımın izlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (66).

PFGE analizinde, bakteriye ait genom restriksiyon enzimi aracılığıyla belli bölgelerden kesilmektedir. *K. pneumoniae* için kullanılan XbaI restriksiyon enzimi bakteri genomunu yaklaşık 20 farklı bölgeden kesmektedir. Restriksiyon aşamasından sonra faklı uzunluktaki DNA parçaları jel elektroforezi ile birbirinden ayrılmaktadır. Elektroforez sonucunda görüntülenen DNA parçalarına ait bantların, sayıları ve yerleşimlerine göre bakteriler arasındaki benzerlik ve farklılıklar skorlanarak klonal yakınlık tespit edilmektedir (68).

MLST, bakteriler arasındaki klonal ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla kullanılan ve evrimsel süreçte korunmuş altı ya da yedi gen bölgesinin nükleotid dizi analizine dayanan bir yöntemdir. Altı veya yedi "house-keeping" genin dizi analizi yapılarak alellerdeki nükleotid farklılığına göre tiplendirme yapılmaktadır. *K. pneumoniae* izolatları için yapılan MLST'de baz uzunluğu 400-502 bp arasında değişen yedi "house-keeping" genlerine (*rpoB, gapA, mgh, pgi, phoE, infB, tonB*) ait diziler kullanılmaktadır. Bu "house-keeping" genlerinde tanımlanan allellere göre *K. pneumoniae* izolatlarının sekans tipleri (ST) belirlenmekte ve izolatlar arasındaki klonal ilişki gösterilmektedir (66).

2.7. *Klebsiella pneumoniae* ve Sağlık Hizmeti ile İlişkili Enfeksiyonlar

Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar, hastanın bir sağlık kurumuna başvurduğunda olmayan, sağlık kuruluşuna başvurduktan en az 48 saat sonra gelişen enfeksiyonlardır. Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar hastaneye yatış süresinde veya hastaneden taburcu olduktan sonra da gelişebilmektedir. Hastane enfeksiyonları endojen veya eksojen kaynaklı olabilmektedir. Endojen kaynakları hastanın kendi florası oluştururken, eksojen kaynakları sağlık personelleri, ziyaretçiler, tedavi amaçlı kullanılan tıbbi cihazlar ve hastane çevresi oluşturmaktadır (69).

Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar: kan dolaşımı enfeksiyonu, pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları ve katater ile ilişkili enfeksiyonlar olarak sınıflandırılmaktadır (9,69). Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlara en sık neden olan bakteriler; *Escherichia coli, Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp.,

Staphylococcus aureus, Enterococci, Pseudomonas aeruginosa ve *Acinetobacter* spp. olarak tanımlanmıştır (9).

Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar arasında yer alan ve yüksek mortalite ile ilişkilendirilen kan dolaşımı enfeksiyonu; en az bir kan kültüründen bir patojenin izole edilmesi veya hastada ateş (>38), titreme, hipotansiyon gibi semptomlardan en az birinin bulunmasıyla birlikte iki farklı kan kültüründen, koagülaz negatif *Staphylococcus, Micrococcus* spp., *Propionibacterium acnes, Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. gibi deri florasında bulunan bakterilerden birinin izole edilmesi olarak tanımlanmaktadır . Kan dolaşımı enfeksiyonu primer ve sekonder olarak ikiye ayrılmaktadır (70). Primer kan dolaşımı enfeksiyonu, sentral venöz kateter, periferik venöz kateter, arteriyel kateter gibi kateterler aracılığıyla veya bilinmeyen bir kaynaktan bir mikroorganizmanın kana geçmesi ile oluşmaktadır. Sekonder kan dolaşım enfeksiyonu ise üriner sistem enfeksiyonu, sindirim sistemi enfeksiyonu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonu gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olan etkenin kana geçmesiyle ortaya çıkmaktadır. Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyon etkenleri arasında yer alan *K. pneumoniae* kan kültürlerinden sıklıkla izole edilmekte ve kan dolaşımı enfeksiyonlarında etken olarak tanımlanmaktadır. Sahip olduğu virülans genleriyle hem primer hem de sekonder kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olmaktadır (9).

2.8. Hipervirülan/Hipermukoviskoz *Klebsiella pneumoniae*

Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumonaie* ilk defa 1980'lerin ortasında Tayvan'da tanımlanmıştır. Yeni bir varyant olan hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* invaziv enfeksiyonlara neden olması, sağlıklı genç bireylerde de enfeksiyona neden olması ve vücut içinde atlama (metastaz) yapabilme yeteneğinin yüksek olması nedeniyle klasik *K. pneumoniae* izolatlarından ayrılmaktadır (71-73). İlk defa Tayvan'da görüldükten sonra bu varyant yayılarak Asya, Avrupa ve Amerika kıtalarındaki ülkelerde de ortaya çıkmıştır (74).

Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* daha çok toplum kökenli enfeksiyonlarda etken olarak izole edilirken, klasik *K. pneumoniae* sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlarda görülmektedir (69). Hipervirülan/hipermukoviskoz

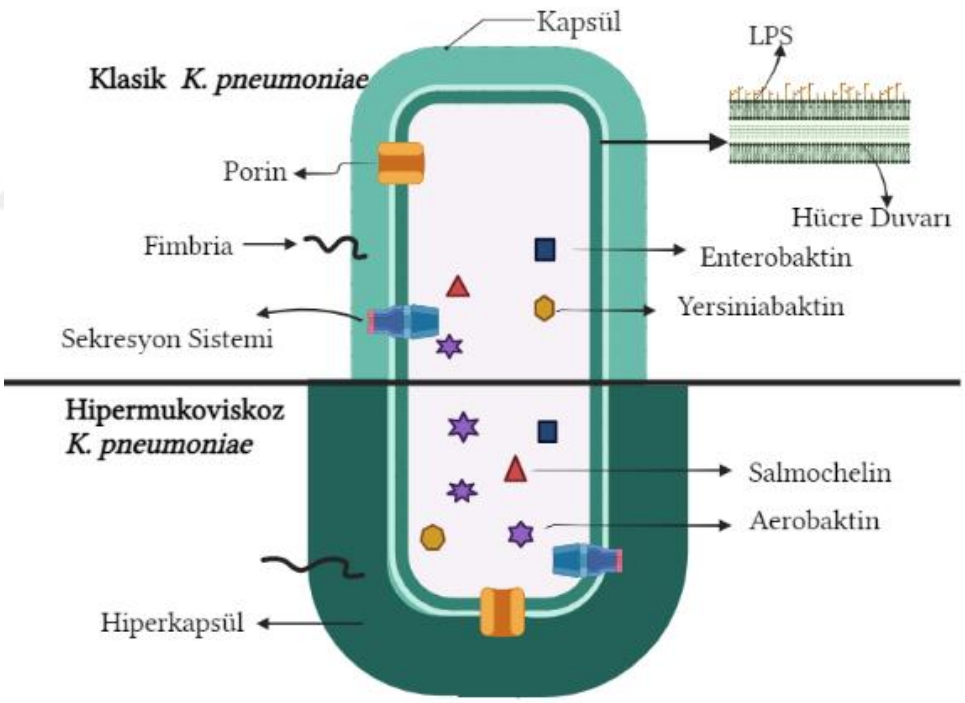
K.pneumoniae daha çok piyojenik karaciğer apsesi, bakteriyel peritonit, endoftalmi, menenjit gibi enfeksiyonlara neden olsa da üriner sistem ve yumuşak doku enfeksiyonları ile bakteriyemiye de neden olabilmektedir (14).

2.8.1. Hipervirülan/Hipermukoviskoz *Klebsiella pneumoniae* ve Virülans Genleri

Hipervirülan *K. pneumonaie* izolatları genellikle hipermuviskoz fenotip göstermektedir. Bu fenotip kapsüler polisakkaritin aşırı sentezinden kaynaklanmaktadır. Hipermukoviskoz fenotip string testi ile belirlenir. Kanlı agara ekilen bakterinin bir gecelik inkübasyonundan sonra oluşturduğu koloniye öze ile dokunularak çekildiğinde 5 mm'den fazla uzayan koloni yapısı hipermukoviskoz olarak tanımlanmaktadır (14). Kapsül üretimini aktive eden, virülansı arttıran ve hipermukoviskoz fenotip ile ilişkilendirilen *rmpA* geni hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları için önemli bir gen olarak tanımlanmaktadır. Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları ile ilgili üç *rmpA* geni saptanmıştır. Bunların ikisi plazmid (*p-rmpA* ve *p-rmpA2*) diğeri ise kromozom (*c-rmpA*) üzerinde taşınmaktadır. K1 kapsül tipine sahip izolatlarda bulunun *magA* geni de hipermukoviskoz fenotip ile ilişkilendirilmektedir (65,73,74). Fagositoza dirençli hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları sağlıklı genç bireylerin bağırsak sisteminde kolonize olmakta ve bağırsak bariyerini geçerek karaciğer apsesine neden olmaktadır. *K. pneumoniae* kaynaklı görülen endoftalmi sonucunda hastalarda görme kaybı oluşabilmektedir. Erken ve uygun antibiyotik ile yapılan tedaviyle hastada kalıcı hasar oluşumu engellenebilmektedir (60, 75). *K. pneumoniae* izolatlarındaki kapsül kaybı veya kapsül sentezinde azalma sahip oldukları antifagositik özelliğin azalmasına neden olarak virülansını etkilemektedir (75).

Enterobaktin, enterobakterilerin %90'nında üretiliyor olsa da aerobaktin ve salmochelin sideroforlarını kodlayan genler özellikle virülans plazmid pLVPK üzerinde bulunmaktadır (65). Siderofor aktivitesi hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında yaklaşık on kat daha fazladır. Aerobaktin ve salmochelin sideroforları klasik *K. pneumoniae* izolatlarına göre hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında daha çok üretilmektedir. Hipervirülan/hipermukoviskoz *K.*

pneumoniae izolatlarında her dört siderofor bulunmasına rağmen bunların büyük çoğunluğunu aerobaktin oluşturmaktadır. Üretilen aerobaktin, bakterinin insan asit sıvısında ve serumda canlılık süresini arttırmaktadır. Bu nedenle hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında bulunan aerobaktin kritik öneme sahip bir virülans faktördür. Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında bu virülans genlerini taşıyan pLVPK gibi plazmidler tanımlanmıştır (58,65,71,72,76-78). Yersiniabaktin kodlayan patojenite adası ve aerobaktin kodlayan *iucABC* genleri daha sıklıkla hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında bulunmaktadır (14). Ayrıca önemli bir virülans faktörü olan O1 antijeni hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* olan NTUH-K2044 suşunda tanımlanmıştır (14). Bunun yanı sıra hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında T6SS saptanmıştır (32). *K. pneumoniae* virülans faktörleri Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. *K. pneumoniae* virülans faktörleri (37)

Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ile en çok ilişkilendirilen kapsül serotipleri K1 ve K2'dir. K1 ve K2 kapsül tiplerini taşıyan suşların K1/K2 kapsül tipine sahip olmayan suşlara göre fagositoza daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda yapılan in vivo deneyde, fareye K1 veya K2 kapsül tipi

taşıyan suşların intraperitoneal injeksiyonu yapılmış ve injeksiyon sonrası farelerin iki hafta içinde öldüğü gösterilmiştir. (79). K1 ve K2 kapsül tipine sahip izolatların gösterdiği çeşitli özellikler nedeniyle bu izolatların daha yüksek virülansa sahip oldukları gösterilmiştir. K2 ve K21a kapsül taşıyan izolatlar üzerine yapılan çalışmalarda K21a taşıyan izolatlarının K2 taşıyanlara göre makrofajlarca daha fazla fagosite edildiği gösterilmiştir. Bunun K2 kapsül tipinin makrofajlarda bulunan mannoz bağlama reseptörünün tanıdığı bölgeyi taşımamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (80). Hipermukoviskoz fenotip gösteren bazı suşlarda siyalik asit kapsüler polisakkaritin bileşeni olarak tanımlanmıştır. Nötrofillerin siyalik asidi tanıması üzerine inflamatuar yanıtı azaltacak sinyaller göndermektedir. Hipermukoviskoz fenotip gösteren K1 kapsül tipine sahip kökenlerin diğer kökenlerden anlamlı bir şekilde daha fazla siyalik asit taşıdığı gösterilmiştir (81). K1 ve K2 kapsül tipine sahip kökenlerde virülansı arttıran diğer bir neden ise çok çeşitli O serotiplerine sahip olmalarıdır. Böylece bu kapsül tiplerini taşıyan kökenler immün yanıttan kaçabilmektedir (82).

K1 ve K2 kapsül tipi dışında hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının taşıdığı kapsül tipleri K5, K16, K20, K28, K54, K57, K63 ve KN1 şeklinde sıralanmaktadır (83,84). Ayrıca daha çok hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının yer aldığı klonal kompleks 23 (CC23) ile ilişkilendirilen KPHP1208 patojenite adası yine hipervirülan suşlarda tanımlanmıştır. CC23'te bulunan izolatların KPHP1208 patojenite adasında yersiniabaktin ve kolibaktin ekspresyonundan sorumlu genler bulunduğu gösterilmiştir (74,85).

2.8.2. Hipervirülan/Hipermukoviskoz *Klebsiella pneumoniae* ve Antimikrobiyal Direnç

Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae*, klasik *K. pneumoniae* gibi ampisiline doğal dirençli fakat diğer antimikrobiyallere genellikle duyarlı izolatlardır. Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları antibiyotiklere duyarlı olmasına rağmen sağlıklı genç bireylerde tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmakta ve etken olarak izole edildiği enfeksiyonlarda mortalite ile sonuçlanabilmektedir. Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* kaynaklı

enfeksiyonlar tedavi edilse bile görme kaybı ve nörolojik sekel gibi kalıcı hasarlar oluşabilmektedir (74). Bunun yanında son zamanlarda hareketli genlerin yayılmasıyla birlikte karbapeneme dirençli hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları tanımlanmıştır. Karbapenem dirençli hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları şiddetli ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmakta ve mortalite oranını arttırmaktadır. Genel olarak hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında KPC, NDM ve OXA-48 gibi karbapenemazlar tanımlanmıştır (10,86). Bunun yanında hastanelerde karbapenem dirençli hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ile ilişkili salgınlar bildirilmiştir (87).

Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları faklı sekans tiplerine ait olabilmektedir. Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları en sık ST23, ST11, ST65, ST86, ST268, ST29, ST82 ve ST218 gruplarında görülmektedir. K1 kapsül tipine sahip izolatlar daha çok ST23 ve ST57 ile ilişkilendirilirken, K2 kapsül tipi ST86, ST375 ve ST380 ile ilişkilendirilmektedir (14,84,88,89).

2.9. Tüm Genom Dizileme Teknolojisi

Birçok alanda olduğu gibi tüm genom dizileme teknolojisi Klinik Mikrobiyoloji alanında da kullanılmaya başlanmıştır. İlk bakteri genomu 1995 yılında dizilenmiş ve bu alanla ilgili gelişmeler hızla artarak devam etmiştir (90). Genellikle bakterilerin tanımlanmasında, direnç ve virülans genlerinin belirlenmesinde, salgın analizinde, Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS-Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry), Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR- Polymerase Chain Reaction), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP- Restriction fragment length polymorphism), Çoklu-Lokus Değişken Sayı Tekrar Dizisi Analizi (VNTR- Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis), PFGE ve MLST gibi geleneksel moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Tüm genom dizileme teknoloji sayesinde geleneksel yöntemler ile elde ettiğimiz verilere tek bir yöntemle ulaşmamız mümkün hale gelmektedir (12).

Klinik mikrobiyolojide patojenin erken, doğru tanımlanması ve antimikrobiyallere duyarlığının hızlı belirlenmesi hastanın tedavisinde kritik öneme sahiptir. Tüm genom dizileme teknolojisi birçok yönüyle Klinik Mikrobiyoloji alanında kullanılmaya uygun bir yöntem haline gelmiştir. Enfeksiyon hastalıkları ve patojenin epidemiyolojisi hakkında bilgi sahibi olmamıza olanak sağlamaktadır. Özellikle kültürü zor yapılan mikroorganizmalar için bu teknoloji gerekli hale gelmektedir (91). Tüm genom dizileme teknolojisinde kullanılan çeşitli platformlar mevcuttur. Illumina, Pacific Biosciences, Ion Torrent ve Oxford Nanopore bu teknolojide kullanılan platformlardan bazılarıdır (12).

2.9.1. Oxford Nanopore Platformu

Üçüncü nesil dizileme teknoloji içinde yer alan, tek moleküle dayanan, uzun ve gerçek zamanlı okumalar yapan iki tür tüm genom dizileme platformu bulunmaktadır. Bunlar PacBio ve Oxford Nanopore teknolojileridir (93).

Tek nükleotide dayalı dizileme sağlayan Oxford Nanopore platformunda DNA parçalara ayrılmaz ve çoğaltılmaz. Bu teknolojinin en önemli bileşeni protein nanopordur. Bu nanoporlar polimer membrana yerleştirilir ve membranlar elektrik akımına bağlanır. DNA zinciri nanopora bağlanır ve DNA molekülleri sıra ile tek bir zincir halinde nanopordan geçer (12). Nanoporların ve membranın etrafında sıvı elekrolitler bulunmaktadır. Ortama az miktarda voltaj uygulandığında nanoporda sürekli bir iyonik akım oluşur ve oluşan iyonik akım ölçülür. Nanopordan her geçen nükleotid ile birlikte, iyonik akımda değişiklikler meydana gelir. Meydana gelen bu iyonik akım değişikliği sistem tarafından okunur ve geçen iyonik akıma uygun nükleotid atanır (94). Her bir nükleotid, porda oluşturduğu özgün sinyallere (disruptions) göre adlandırılır. Bu okuma por ömrü tükenene kadar ya da kullanıcı okumayı sonlandırana kadar devam eder (12) Okuma sırasında oluşan elektriksel akım bilgisayar sistemleri tarafından kaydedilir. Okuma tamamlandıktan sonra oluşan sinyaller “Base calling” aşaması ile nükleotid dizisine dönüştürülür. “Base calling” aşamasında kullanılan yazılım programları büyük önem taşımaktadır. “Base calling” aşaması için Oxford Nanopore da kullanılan Albacore, Chiron, DeepNano, Guppy, Nanocall gibi çeşitli programlar bulunmaktadır (93).

Elde edilen nükleotid dizileri iki farklı yöntemde birleştirilebilir. Ya *de novo* birleştirme ya da referans genom ile hizalama yapılır. Birleştirme aşamasından sonra elde edilen dizi ile biyoinformatik analizler yapılarak etkene ait virülans ve direnç genleri, sahip olduğu plazmid ve sekans tipi (ST-Sequence Type) belirlenir. Bunları belirlemek için kullanılan çeşitli veri tabanları ve araçlar mevcuttur (95).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu doktora tez çalışması tanımlayıcı bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Çalışma Ocak 2019- Aralık 2022 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Araştırma planı

Zaman	**İş Tanımı**
Eylül-Ocak 2018	Literatür taraması
Haziran 2019	Etik kurul onayı
Temmuz 2020	Tez önerisinin sunumu ve kabulü
Ocak 2018- Aralık 2020	Örneklerin toplanması, string testinin yapılması
Ocak-Mart 2021	Malzeme alımı
Mayıs 2021	PCR'ın yapılması
Haziran 2021	PFGE'nin yapılması
Eylül 2021	DNA ekstraksiyonu ve tüm genom dizilemenin yapılması (Bu iş tanımında hizmet alımı yapılmıştır)
Mayıs 2020	Plazmid ekstraksiyonunun yapılması
Ocak-Haziran 2022	Biyoinformatik analizler
Ocak-Kasım2022	Tez ve makale yazımı

3.3. Veri Toplama Araçları

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemelere ait bilgiler

Malzeme Adı	Markası/Lot Numarası	Kullanım Amacı
Kanlı Agar	Becton Dickinson/2042841	Bakterinin çoğaltılması, string testi
Mueller Hinton Agar	Becton Dickinson/1216596	Antibiyogram
Brain Heart Infusion Broth	Becton Dickinson/0079804	Bakterilerin stoklanması, plazmid ekstraksiyonu
Steril öze (µl)	Fıratmed	Bakteri ekimi
Antimikrobiyaller	Becton Dickinson	Antibiyogram
Agarose Low EEO (Electroendosmosis)	AppliChem/7HOO4766	Yürütme jeli hazırlığı
Prona agarose		Kalıp jel hazırlığı
Prona agarose plus		Yürütme jeli hazırlığı
TBE (Tris-Borik asit-EDTA) solüsyonu	AppliChem/7E20627A	Agaroz jel hazırlığı
TE (Tris-EDTA) Solüsyonu	AppliChem/2K000817	Agaroz jel hazırlığı
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	AppliChem/4E017685	TBE ve TE solüsyon hazırlığı
Tris solüsyonu	AppliChem/6J011112	TBE solüsyon hazırlığı
Pipet Uçları (10 µl)	NOKE/P-202120	PCR ve PFGE analizi
Pipet Uçları (100 µl)	NOKE/P-202201	PCR, PFGE analizi ve plazmid ekstraksiyonu
Pipet Uçları (1000 µl)	Tarsons/376JS-251220	PCR, PFGE analizi ve plazmid ekstraksiyonu
Mikrosantrifüj Tüpü (1,5ml)	Greiner Bio One/E1805356	Bakteri stoklanması, süspansiyon hazırlığı
Deney Tüpü (50ml)	Greiner Bio One/08160195	Solüsyon ölçümü

Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler

Cihaz Adı	Markası/Model	Kullanım Amacı
Pipet (0,5-10µl)	Thermo Scientific/CJ10196	PCR ve PFGE analizi
Pipet (2-20µl)	Eppendorf/4973515	PCR ve PFGE analizi
Pipet (20-200µl)	Eppendorf/415959	PCR ve PFGE analizi, plazmid ekstraksiyon
Pipet (100-1000µl)	Thermo Scientific/T87588	PCR ve PFGE analizi, plazmid ekstraksiyon
Santrifüj	Hettich Zentrifugen/1204	DNA ve plazmid ekstraksiyonu, faz ayrıştırma
Isıtıcı blok	Major Science /MC-01N	DNA ekstraksiyonu
Thermal cycler	Techne/FFG02HSD	DNA amplifikasyonu
Elektroforez	Thermo Scientific/EC300XL2	PCR ürünlerinin ve plazmidlerin yürütülmesi
Jel Tankı	Thermo Scientific/OWL EASYCAST^{TM} B2	Kalıp jelin oluşturulması, elektroforez
Su banyosu	Nüve/NB 5	Hücre lizisi, DNA restriksiyonu
PFGE cihazı	BIORAD/CHEF-DR®-III Systems	Farklı uzunluktaki nükleik asitlerin yürütülmesi, elektroforez
Etüv	Elktro-mag/M420B	Bakterilerin in vitro üreme ortamı
Otoklav	Nüve/NC 90M	Sterilizasyon, besiyeri hazırlığı
Derin dondurucu	Uğur /UDD200BK	Bakterilerin stoklanması

3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışma kapsamında örnek toplama merkezi olarak sadece Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı seçilmiş ve

sadece kan kültürlerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatları çalışmaya dahil edilmiştir. Bu nedenle sadece on hipermukoviskoz fenotip gösteren *K. pneumoniae* izolatı elde edilmiştir. Çok merkezli bir çalışma olmadığından çalışmada ülkemizde hipermukoviskoz *K. pneumoniae* prevalansı gösterilememiştir.

Bu çalışma kapsamında sınırlı sayıda izolatın tüm genom dizi analizi yapılmış ve tüm genom dizi analizine sadece hipermukoviskoz fenotip gösteren *K. pneumoniae* izolatları dahil edilmiştir. Bu nedenle bu fenotipe sahip olan ve olmayan izolatların virülans genleri, kapsül tipleri, O antijen tipi ve sekans tipleri karşılaştırılamamıştır. Tüm genom dizi analizi yapılan örnek sayısı az olduğundan hipermukoviskoz fenotipe neden olabilecek olası genler tanımlanamamıştır.

3.5. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için 19.02.2019 tarihinde 2019/15-11 Karar Numarası'yla, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

3.6. Örneklerin Toplanması ve Tanımlanması

Çalışmaya Ocak 2018-Aralık 2020 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole edilen 244 *K. pneumoniae* dahil edildi. Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gelen ve hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonu tanısı konulan hastalardan steril yöntemlerle alınan kan örnekleri hem aerobik hem de anaerobik sıvı kültür ortamlarında inoküle edildi (BACTEC PLUS, BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Pozitif sinyal alındıktan sonra yapılan Gram boyamada Gram negatif olarak tanımlanan kültürler, kanlı agara ekilerek bir gecelik inkübasyona bırakıldı ve VITEK-2 otomotize sistem ile tür tayini yapıldı. Hipermukoviskoz fenotipe sahip *K. pneumoniae* izolatlar MALDI-TOF-MS ile doğrulandı. *K. pneumoniae* olarak tanımlanan saf kültürler %5 oranında gliserol içeren brain heart infusion sıvı besiyerinin bulduğu tüplerde -40ºC'de saklandı (96). Her bir hastaya ait tek bir izolat çalışmaya dahil edildi.

3.7. String Testi

Hipermukoviskoz fenotip gösteren *K. pneumoniae* izolatlarını belirlemek amacıyla string testi yapıldı. Brain heart infusion sıvı besiyerinde -40^{o}C'de saklanan *K. pneumoniae* izolatları kanlı agara ekilerek 37˚C'de bir gecelik inkübasyonda bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra string test uygulandı. 5 mm'den fazla uzayan bakteri kolonisi string testi pozitif olarak tanımlandı. String testi pozitif izolatlar hipermukoviskoz *K. pneumoniae* olarak adlandırıldı (97).

3.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testi Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve sonuçlar EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirildi. Bakteri yoğunluğu McFarland 0.5 (10^{8} mikroorganizma / ml)'e göre ayarlanarak Mueller-Hinton agara ekim yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirilerek 37°C'de bir gecelik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra antibiyotik diskleri etrafında oluşan zon çapı ölçüldü ve EUCAST standart zon çapı tablosu ile karşılaştırıldı. EUCAST'taki tabloya uygun olarak her bir bakterinin duyarlılık-dirençlilik durumu belirlendi. Kullanılan antibiyotik diskleri; imipenem (IMP), meropenem (MEM), ertapenem (ETP), amikasin (AN), trimetoprim sulfametoksazol (SXT), siprofloksasin (CIP), gentamisin (GM), amoksisilin klavulanik asit (AMC), ampisilin (AM), piperasilin tazobaktam (TPZ), sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ) şeklindedir.

3.9. PCR Yöntemiyle *rmpA/rmpA2* ve Karbapenem Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Hipermukovizkoz fenotip gösteren *K. pneumoniae* izolatlarında *rmpA/rmpA2* virülans genleri ve OXA-48, NDM, KPC, IMP ve VIM karbepenemaz genleri PCR yöntemi ile araştırıldı. Her bir gen bölgesi için özgün primerler kullanıldı. Karbapenemaz genlerini belirlemek için yapılan PCR'da, OXA-48, NDM, KPC, IMP ve VIM gen bölgeleri sekans ile doğrulanmış beş farklı pozitif kontrol kullanıldı.

PCR yapmak amacıyla %5 gliserol içeren brain heart infusion sıvı besiyerinde -40°C'de saklanan izolatlar canlandırıldı. Kanlı besiyerine ekilen

izolatlar 37°C'de bir gecelik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kaynatma yöntemi ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Kaynatma yöntemi aşağıdaki aşamalara uygun olarak yapıldı.

- Numaralandırılan steril 1,5 ml kapasiteli mikrosantifüj tüplerine 300 µl steril distile su dağıtıldı.
- Canlandırılan izolatlara ait iki-üç saf koloni alınarak mikrosantifüj tüplerinde homojenize edildi.
- Homojenize edilen bakteri hücreleri 100°C'de 10 dk bekletilerek parçalandı.
- Parçalanma işleminden sonra tüpler 10000 Rate Per Minute'de (RPM) 5 dk santrifüj edildi ve üst faz kalıp DNA olarak kullanıldı.

PCR'da *rmpA* ve *rmpA2* gen primerlerinden 25 pmol, *bla*$_{\text{OXA-48}}$, *bla*$_{\text{NDM}}$, *bla*$_{\text{KPC}}$, *bla*$_{\text{VIM}}$, *bla*$_{\text{IMP}}$ gen primerlerinden 20 pmol kullanılarak her bir gen bölgesi için ayrı bir karışım hazırlandı. PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. PCR tepkimesinde kullanılan malzemeler ve karışım oranları

PCR Karışımı	**Bir örnek için alınması gereken miktarlar (µl)**			
	rmpA/ rmpA2	*bla*$_{\text{OXA-48}}$/*bla*$_{\text{KPC}}$/ *bla*$_{\text{IMP}}$	*bla*$_{\text{NDM}}$	*bla*$_{\text{VIM}}$
Steril Distile Su	27.5	27.5	28.5	29.5
10X Taq Buffer	5	5	5	5
25 mM $MgCl_2$	5	5	5	3
10 mM dNTP	5	5	4	5
Primer Forward(F)	1	1	1	1
Primer Reverse(R)	1	1	1	1
5U/µl polimeraz	0.5	0.5	0.5	0.5
Kalıp DNA	5	5	5	5
Toplam Hacim	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

PCR döngüsü tamamlandıktan sonra oluşan PCR ürünleri hazırlanan %2'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütüldü. 100 ml 1XTBE ölçülerek üzerine 2 gr agaroz eklendi. Karışım homojenize edilerek mikrodalga fırında eritildi. Agaroz tamamen eritildi ve üzerine 5 µl güvenli jel boyası eklendi. Agaroz jel tarakların yerleştirildiği yürütme tankına döküldü ve yaklaşık 40 dk oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Agaroz jel katılaştıktan sonra PCR ürünleri yükleme tamponu boyası ile boyanarak yüklendi ve 120 Volt'da (V) 40 dk yürütüldü. Kullanılan özgün primeler, ürün uzunlukları ve döngü koşulları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Gene özgün primeler, hedef uzunlukları ve döngü koşulları (Y: C veya T, M: A veya C)

Genler	Primerler	Gen Uzunluğu	Döngü Koşulları	Kaynak
rmpA	F:5'-ACT GGG CTA CCT CTG CTT CA-3' R:5'-CTT GCA TGA GCC ATC TTT CA-3'	516bp	94 °C→5 dk ilk denatürasyon 10 Döngü [94 °C→30 s, 52 °C→1 dk, 72°C→1 dk] 10 Döngü [94 °C→30 s, 48 °C→1 dk, 72 °C→1 dk] 10 Döngü [94 °C→30 s, 46 °C→1 dk, 72 °C→1 dk] 72 °C→5 dk son uzama	(19)
rmpA2	F:5'CTTAATCACACAGGGAAATGC-3' R:5'CCGGCTATCAACCAATACTC-3'	405bp		(98)
***bla*$_{OXA-48}$**	A:5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG-3' B:5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3'	438 bp	94 °C→5 dk ilk denatürasyon 30 Döngü [94 °C→1 dk, 55 °C→1 dk, 72 °C→1,5 dk] 72 °C→5 dk son uzama	(45)
***bla*$_{NDM}$**	F:5'- CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3' R:5'- ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3'	826 bp		(99)
***bla*$_{KPC}$**	F: 5'-TGT CAC TGT ATC GCC GTC-3' R: 5'-TAT TTT TCC GAG ATG GGT GAC-3'	331 bp	94 °C→5 dk ilk denatürasyon 30 Döngü [94 °C→1 dk, 54 °C→1 dk, 72 °C→1 dk] 72 °C→5 dk son uzama	(100)
***bla*$_{IMP}$**	A: 5'-GAA GGY GTT TAT GTT CAT AC-3' B: 5'-GTA MGT TTC AAG AGT GAT GC-3'	586 bp	94 °C→5 dk ilk denatürasyon 30 Döngü [94 °C→1 dk, 53 °C→1 dk, 72 °C→1 dk] 72 °C→5 dk son uzama	(101)
***bla*$_{VIM}$**	A: 5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' B: 5'- TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3'	388 bp	94 °C→5 dk ilk denatürasyon 30 Döngü [94 °C→1 dk, 57 °C→1 dk, 72 °C→1 dk] 72 °C→5 dk son uzama	(101)

3.10. PFGE Yöntemi ile Faklı Klonların Belirlenmesi

On hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatı için PFGE, PulseNet protokolüne uygun olarak aşağıdaki şekilde yapıldı (102).

- Bakteri süspansiyon tamponu hazırlandı (0.5 M EDTA, 1 M Tris ve Steril distile su) ve her bir örnek için steril mikrosantrifüj tüplere 200 µl dağıtıldı.
- İki-üç saf bakteri kolonisi tampon içinde homojenize edildi ve 37°C'de 5 dk bekletildi.
- Her bir tüpe 25 µl proteinaz K eklendi.
- Blok kalıplar için jel hazırlandı. 1XTE ile %3'lük düşük erime ısılı agaroz (Prona agarose reducta nu) hazırlandı. 50°C'deki su banyosuna konuldu.
- Daha önce su banyosuna konulan %20'lik sodyum dodesil sülfattan (SDS) 250 µl alınarak hazırlanan jelin üzerine eklendi ve 50°C'de su banyosunda bekletildi.
- %1'lik SDS içeren düşük erime ısılı agarozdan 200 µl alınarak mikrosantrifüj tüplerde bulunan bakteri süspansiyonuna eklendi ve pipetaj yapılarak blok kalıplara döküldü, her izolat için iki jel blok kalıpları hazırlandı ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Bu işlem her izolat için ayrı ayrı yapıldı.
- Lizis tamponu hazırlandı (0.5 M EDTA, 1 M Tris, %10 Sarcosyl, Proteinaz K ve steril distile su)
- Her bir örnek için steril cam tüp numaralandırıldı ve 5 ml lizis tamponu eklendi.
- Katılaşan jel blok kalıplar, cam tüplerde bulunan lizis tamponuna konuldu ve 54°C'de 2 saat su banyosunda bekletildi.
- 2 saatlik bekletme süresinden sonra yıkama işlemi gerçekleştirildi. Her yıkamadan sonra tüpler 50°C'de 10 dk su banyosunda bekletilmek üzere iki kez steril distile su üç kez de 1X TE ile yıkandı.
- Restriksiyon enzim karışımı (Steril distile su, enzim tamponu, Xba1 enzimi) *K. pneumoniae* izolatları için XbaI enzimi kullanılarak hazırlandı.

- Uygun boyutta kesilen kalıp jeller her bir örnek için hazırlanan restriksiyon enzim karışımına eklendi ve 37°C'ye ayarlanan su banyosuna konularak 2 saat bekletildi.
- Yürütme jeli için %1'lik agaroz (0,5XTBE, Prona agarose plus) hazırlandı ve yürütme tankına dökülerek oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı.
- Cihazdaki akımı sağlamak amacıyla 0,5X TBE'ye 150 µl Thiovire eklenerek cihaza döküldü ve 14°C'de soğumaya bırakıldı.
- Restriksiyon aşamasından sonra uygun boyutta kesilen kalıp jeller katılaşan yürütme jeline yüklendi
- Üst jel için %2'lik jel (1XTE, Düşük erime ısılı agaroz) hazırlandı ve jel blokların yerleştirildiği kuyucukların üstü kapanacak şekilde döküldü.
- Üst jel katılaştıktan sonra yürütme jeli uygun yürütme şartlarına ayarlanan cihaza (BIORAD-CHEF-DR®-III Systems) yerleştirildi.
- Yürütme şartları

    - Isı:14°C
    - Yürütme Zamanı:19,5 saat
    - İlk Sinyal:2,2 s
    - Son Sinyal: 54,2 s
    - Volt/cm: 6,0

- Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel 100 µl güvenli jel boyası (400 ml distile su ve jel boyası) ile 30 dk boyandı ve görüntülendi.
- Elde edilen jel görüntüsü Tenover kriterlerine göre analiz edildi (103).

3.11. Plazmid Ekstraksiyonu

Hipermukoviskoz fenotipe sahip on *K. pneumoniae* izolatları için plazmid ekstraksiyonu yapıldı. Plazmid ekstraksiyonu protokole uygun olarak aşağıdaki aşamalar takip edilerek gerçekleştirildi.

- *K. pneumoniae* izolatları 5 ml brain heart infusion sıvı besiyerine ekilerek 37°C'de bir gecelik inkübasyona bırakıldı.
- Üreme kontrolü yapıldıktan sonra her bir örnekten 2 ml alınarak farklı mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 11,000 gravitede (g), 30 s santrifüj edildi.
- Üst faz uzaklaştırıldı ve üzerine daha önce RNase ile karıştırılan A1 solüsyonundan 250 µl eklendi ve pellet iyice dağıtıldı.
- Üzerine 250 µl A2 solüsyonu eklendi yavaşça 6-8 kez altüst edilerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 300 µl A3 solüsyonu eklendi yavaşça 6-8 kez altüst edildi.
- 11,000 x g'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi.
- Üst fazdan 750 µl alınarak tüpe yerleştirilen NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) üzerine eklendi ve 11,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi alt faz uzaklaştırıldı
- Daha önce 50°C'ye ısıtılan AW solüsyonundan 500 µl NucleoSpin'e eklendi ve 11,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Alt faz uzaklaştırıldı
- 600 µl A4 solüsyonu eklendi 11,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi alt faz uzaklaştırıldı ve 11,000 x g'de 2 dk daha santrifüj edildi, alt faz uzaklaştırıldı.
- NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) Column mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 50 µl Buffer AE eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 11,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Alt faz 1XTBE ile hazırlanan %1'lik agaroz da 120 V'de 90 dk yürütüldü.

3.12. Tüm Genom Dizileme

3.12.1. DNA Ekstraksiyonu

Tüm genom dizi analizi yapılacak olan beş hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatı Mueller-Hinton agara ekildi ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. DNA ekstraksiyonu için "Qiagen PowerFecal DNA isolation" kiti kullanılarak protokole uygun olarak aşağıdaki şekilde yapıldı.

- Yoğun miktarda alınan bakteri kolonisi steril mikrosantrifüj tüplerine konulan 750 µl PowerBead solüsyonu içinde homojenize edildi ve boncuk bulunan tüplere aktarıldı.
- Her bir tüpe 60 µl C1 solüsyonu eklendi, vorteks aracılığı ile karıştırıldı ve 65°C'de 10 dk inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra 10 dk vorteks ile karıştırıldı.
- 13.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Üst faz 2 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplere aktarıldı (Her bir örnek için 400-500 µl üst faz alındı).
- Her bir tüpe 250 µl C2 solüsyonu eklendi, vorteks aracılığıyla homojenize edildi ve 4°C'de 5 dk bekletildi.
- 13.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 600 µl üst faz 2 ml'lik steril tüplere aktarıldı.
- Her bir tüpe 200 µl C3 solüsyonu eklendi, vorteks ile karıştırıldı ve 4°C'de 5 dk bekletildi.
- 13.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Üst faz 2 ml'lik steril tüplere aktarıldı (Üst faz 750 µl'den az alındı).
- Her bir tüpe 1200 µl C4 solüsyonu eklendi, 5 s vorteks ile karıştırıldı.
- Her bir örnekten 650 µl üst faz alınarak MB Spin Column tüplere aktarıldı.
- 13.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Üst faz atıldı ve tekrar 13.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- MB Spin Column tüplere 500 µl C5 solüsyonu eklendi.
- 13.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Üst faz atıldı ve tekrar 13.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi (MB Spin kolonda herhangi bir solüsyonunun kalmadığından emin olunmalıdır).
- MB Spin kolon yavaşça tüplerden uzaklaştırıldı ve 2 ml'lik tüplere yerleştirildi.
- 100 µl C6 solüsyonu filtrenin her tarafına değecek şekilde döküldü.
- 13.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- MB Spin kolon tüpten uzaklaştırıldı.

- DNA konsantrasyonu Qubit 3.0 fluorometer ile ölçüldü ve DNA'lar kütüphane hazırlığında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.12.2. Qubit 3.0 fluorometer ile Ölçüm

- Kit içerisinde bulunan Standart 1 ve Standart 2'den 10 µl alınarak ayrı ayrı steril mikrosantrifüj tüplere konuldu ve toplam hacim iQuantReagent solüsyonu ile 200 µl'ye tamamlandı.
- Karışım vorteks ile karıştırıldı ve Standartlar Qubit 3.0 fluorometer ile ölçüldü.
- Standartlar 1 ve Standart 2'nin ölçümü yapıldıktan sonra örneklerin DNA konsantrasyonu ölçüldü. Her bir örnekten 10 µl, iQuantReagent solüsyonundan toplam hacim 200 µl olacak şekilde farklı mikrosantrifüj tüplere konuldu.
- Örnekler birkaç s vorteks ile karıştırılarak Qubit cihazına yerleştirildi ve ölçüm yapıldı.
- Qubit 3.0 fluorometer ile ölçümde bütün DNA konsantrasyonları "too high" olarak ölçüldü. Bir örnekten 10 µl alınarak 1/3 oranında seyreltildi.

  Bu örnek için 8883. 13 Raw Fluorescence Units'de (RFU) DNA konsantrasyonu 59.4 ng/µl olarak ölçüldü. Buna göre diğer bütün örnekler için aşağıdaki şekilde DNA konsantrasyonu hesaplandı (Formül 1). Her bir örnek için Qubit 3.0 fluorometer ile ölçülen DNA konsantrasyonu Tablo 8'de verilmiştir.

  Her bir örneğin DNA konsantrasyonu formül 1'e göre;

$$DNA\ konsantrasyonu(\frac{ng}{\mu l}) = \frac{59.4\frac{ng}{\mu l} \times İlk\ ölçülen\ RFU}{8883.13}$$

Tablo 8. Her bir örnek için Qubit 3.0 fluorometer ile ölçülen DNA konsantrasyonu

Örnek Sırası	Örnek Numarası	DNA Konsantrasyonu
1.	9961	164,4 ng/µl
2.	1212	171,14 ng/µl
3.	4822	187,4 ng/µl
4.	6718	135,6 ng/µl
5.	5889	147,55 ng/µl

3.12.3. Kütüphane Hazırlığı

Tüm genom dizileme için Oxford Nanopore (MinION) kullanıldı. Kütüphane hazırlığı için "Native Barcoding Genomic DNA" kiti kullanıldı. Kütüphane hazırlığı kit protokolüne uygun aşağıdaki şekilde yapıldı.

DNA Tamiri

- Her bir örnek için 1 µg (1000 ng) DNA alındı. Her bir örnekten alınması gereken hacim hesaplandı (Formül 2). Son hacim steril distile su ile 48 µl'ye tamamlandı (Formül 3).

  DNA hacmi (µl) formül 2'ye göre;

$$DNA\ miktarı\ (\mu l) = \frac{1000\ ng}{\text{Ölçü}len\ DNA\ miktarı\ ng/\mu l}$$

$$1.\text{Ö}rnek = \frac{1000\ ng}{164.4\frac{ng}{\mu l}} = 6.08\ \mu l$$

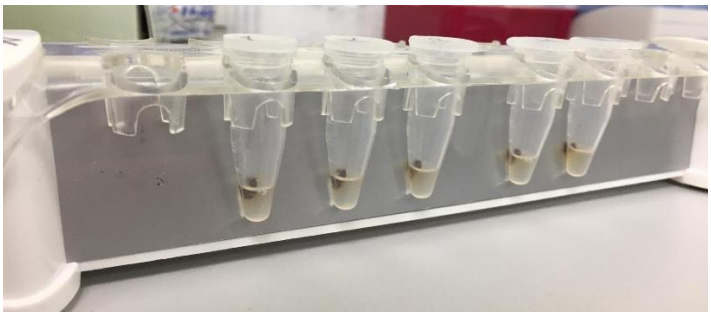
  Süspansiyon için gerekli steril distile su, formül 3'e göre;

$$48\ \mu l - 6.08 = 41.9\ \mu l\ (Steril\ Distile\ Su)$$

- Bütün örnekler için yukarıdaki hesaplamalar yapılarak her örnek için DNA konsantrasyonuna göre belli hacimlerde alındı ve steril distile su ile sulandırıldı.
- Aşağıdaki karışım belirtilen oranlarda 0,2 ml'lik PCR tüplerinde hazırlandı. Yavaşça karıştırılarak homojenize edildi ve hızlı çevirme ile çöktürüldü.

    - 48 µl DNA
    - 3,5 µl NEBNext FFPE DNA Repair Buffer
    - 3,5 µl Ultra II End-prep Reaktion Buffer
    - 3 µl Ultra End-prep Enzyme Mix
    - 2 µl NEBNext FFPE DNA Repair Mix

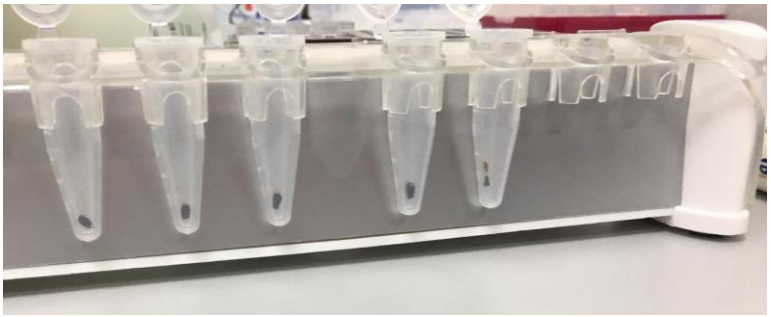
- Thermal Cycler cihazında ilk önce 20°C'de 5 dk, daha sonra 65°C'de 5 dk bekletildi.
- Karışım 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplere aktarıldı ve her bir tüpe 60 µl AMPure XP Bead eklendi, yavaşça karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüpler manyetik ayırıcıya yerleştirildi. Boncuklar tamamen manyetik alanın olduğu yüzeye yapışınca üst faz uzaklaştırıldı.



Şekil 3. Manyetik ayırıcıya yerleştirilen mikrosantrifüj tüpleri

- Manyetik ayırıcıda bekletilen tüplere yeni hazırlanan %70'lik etanolden 200 µl konuldu ve uzaklaştırıldı. Bu adım tekrarlandı ve tüplerde etanol

kalmamasına dikkat edilerek tüplerdeki etanolün tamamen kuruması için 30 s tüplerin kapağı açık bırakıldı.



Şekil 4. Üst fazı uzaklaştırılan mikrosantrifüj tüpleri

- Tüpler manyetik ayırıcıdan uzaklaştırıldı ve her bir örneğe 26 µl distile su eklendi, homojenize edildi ve 2 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüpler manyetik ayırıcıya yerleştirildi, tamamen renksizleşen üst fazdan 25 µl alınarak 1,5 ml'lik tüplere konuldu.
- İçindeki DNA konsantrasyonu Qubit 3.0 ile ölçüldü. Örneklere göre DNA konsantrasyonu aşağıdaki gibiydi.

1. Örnek 68,4 ng/µl
2. Örnek 91,8 ng/µl
3. Örnek 75,6 ng/µl
4. Örnek 102 ng/µl
5. Örnek 71,8 ng/µl

Barkod Ligasyonu

Her bir örnek için farklı bir barkod numarası seçildi. Barkodlar kullanılmadan önce homojenize edildi ve kullanım süresi boyunca buz aküsünde bekletildi.

- Her bir örnek için 500 ng DNA alındı, son hacim steril distile su 22,5 µl'ye tamamlandı. Aşağıdaki karışım hazırlandı ve homojenize edildi.

  - 22,5 µl DNA

- 2,5 µl Native Barcod
- 25 µl Blunt/TA Ligase Master Mix

- 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Önceden vorteks ile karıştırılan 50 µl AMPure XP Bead karışıma eklendi ve homojenize edildi.
- 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüpler hızlı çevirme ile çöktürüldü ve manyetik ayırıcıya yerleştirildi. Tamamen şeffaflaşan üst faz atıldı.
- Manyetik ayırıcıda bekletilen tüpler, pellete zarar vermeden 200 µl %70'lik etanol ile yıkandı. Bu adım tekrarlandı. Tüplerde etanol kalmamasına dikkat edildi.
- Tüpler manyetik ayırıcıdan uzaklaştırıldı. 26 µl steril distile su eklendi ve homojenize edilerek 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Tüpler tekrar manyetik ayırıcıya yerleştirildi. Renksizleşen üst fazdan 25 µl alınarak başka bir tüpe aktarıldı.
- DNA konsantrasyonu Qubit 3.0 ile ölçüldü. Örneklere ait DNA konsantrasyonu aşağıdaki gibiydi.

1. Örnek 12,7 ng/µl
2. Örnek 14,1 ng/µl
3. Örnek 14,5 ng/µl
4. Örnek 16,4 ng/µl
5. Örnek 13,3 ng/µl

Adaptör Ligasyonu

- Örnek başına 200 ng DNA alınarak toplam 1000 ng DNA, ligasyon için hazırlandı. Böylece her bir örnekten alınması gereken hacim hesaplandı. Toplam DNA 48 µl olarak hesaplandı ve son hacim steril distile su ile 65 µl'ye tamamlandı. Aşağıdaki şekilde karışım hazırlandı, yavaşça karıştırıldı ve hızlı çevirme ile çöktürüldü.

- 65 µl 1000 ng barkodlanmış DNA
- 5 µl Adaptor Mix II
- 20 µl NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)
- 10 µl Quick T4 DNA Ligase

- Karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Önceden vorteks ile karıştırılan AMPure XP Bead'den 50 µl karışıma eklendi ve homojenize edildi.
- 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüp manyetik ayırıcıya yerleştirildi ve tamamen renksizleşince üst faz atıldı.
- Tüp manyetik ayırıcıdan uzaklaştırıldı ve 250 µl Long Fragment Buffer homojenize edilerek yıkandı.
- Tüp tekrar manyetik ayırıcıya yerleştirildi ve üst faz uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi tekrarlandı.
- Tüp manyetik ayırıcıdan uzaklaştırıldı ve 15 µl Elution Buffer ile homojenize edildi.
- 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Tüp tekrar manyetik ayırıcıya yerleştirildi. DNA içeren üst fazdan 15 µl alınarak başka bir tüpe aktarıldı.

Priming Port Karışımı

- 30 µl Flush Tether, Flush Buffer üzerine eklendi ve oda sıcaklığında vorteks ile karıştırıldı.
- Priming Portta baloncuk kontrolü yapıldı.
- 800 µl Priming Mix, Priming Port aracılığıyla Flow Cell'e yüklendi. Yükleme esnasında karışımla birlikte baloncuk geçmemesine dikkat edildi.
- 5 dk beklendi.

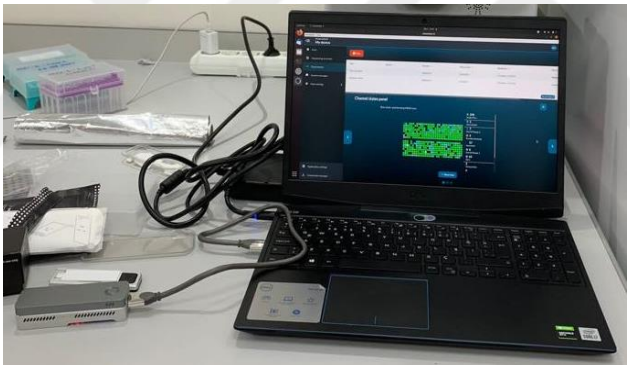
DNA'ların Yüklenmesi

Bu aşamada toplam DNA 50 fmol olmalıdır.

- Qubit 3.0 ile DNA konsantrasyonu ölçüldü. Toplam DNA'dan 9,1 µl alındı ve Elution Buffer ile 12 µl tamamlandı. Yükleme için aşağıdaki karışım hazırlandı.

    - 12 µl DNA Library
    - 37,5 µl Sequencing Buffer
    - 25,5 µl Loading

- Toplam 75 µl karışım SpotON Sample Porttan yüklendi.
- Okuma derinliği 500x olarak seçildi ve cihaz çalıştırıldı.
- Flow Cell'deki akış 48-72 saat olarak ayarlandı.
- Flow Cell'deki akış başladıktan sonra, bilgisayardan Oxford Nanopore cihazındaki aktif membran sayısı takip edildi. Bilgisayara bağlanan Oxford Nanopore (MinION) cihazı Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Bilgisayara bağlanan Oxford Nanopore (MinION) cihazı

3.13. Biyoinformatik Analizler

3.13.1. Base Calling, Kalite Kontrolü ve Referans Genomla Hizalama

Dizileme işlemi tamamlandıktan sonra "guppy basecaller" ile fast5 formatı fastq formatına dönüştürüldü. Geneious Prime platformunda bulunan Flye aracı ile *De novo* birleştirme yöntemi kullanılarak hizalandı (104). İzolatlar ile en iyi eşleşen türleri bulmak için, *De novo* hizalama ile her bir örneğin konsensus genomu "local Blast version 2.12.0+ versiyonu kullanılarak arandı (105). Her beş izolata en yakın

tür *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia HS11286* olarak belirlendi. Suşun referans genomu NCBI'dan indirildi.

Kalite kontrolü için ham veriler minimap2 version 2.17 kullanılarak "reference-to-map method" ile *Klebsiella pneumoniae strain FDAARGOS_445, Klebsiella pneumoniae strain KPC 160117, Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain TGH10, Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae KPR0928, Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286, Klebsiella pneumoniae strain JS187* referans genomlarına hizalanarak yapıldı (106). Kalite kontrolünden sonra eşleşen en iyi referans genom *Klebsiella pneumoniae* strain JS187 olarak belirlendi. Elde edilen genom sekanslarını ve Genbank'taki genomların karşılaştırması "Microbial Genome Blast" ile yapıldı. Seçilen genom dizilerinin dairesel karşılaştırmaları "BLAST ring image generator (BRIG)" kullanılarak yapıldı (107). Karşılaştırmalı analizler Geneious Prime'da bulunan "LASTZ" ve "Mauve" araçları kullanılarak yapıldı (108,109).

3.13.2. Kapsül Tipilerinin Belirlenmesi

Tüm genom dizisi belirlenen beş hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatının kapsül tipi dış membran proteinini kodlayan *wzi* gen dizisi referans alınarak Pasteur Enstitüsü veri tabanı kullanılarak belirlendi (http://bigsdb.web.pasteur.fr).

3.13.3. O Antijen Tiplerinin Belirlenmesi

K. pneumoniae izolatların ait O antijen tipi *wzm* ve *wzt* gen bölgelerinin dizi analizi yapılarak Kaptive veri tabanı aracılığıyla belirlendi (110). Bu veri tabanında *Klebsiella* ve *A. baumannii* bakterilerine ait kapsül tipleri ve O antijen tipleri belirlenebilmektedir.

3.13.4. ST'lerin Belirlenmesi

ST'ler Center For Genomic Epimemiology (CGE) ve Pasteur Enstitüsü'nün veri tabanı kullanılarak belirlendi. CGE veri tabanında bulunan MLST 2.0 aracı ile *K. pneumoniae* ve diğer birçok bakteri türünün ST'ler belirlenebilmektedir (111).

Veri tabanında yer alan bakteri türleri arasından *K. pneumoniae* seçilerek ham datalar yüklendi ve ST sonuçları elde edildi. Pasteur Enstitüsü veri tabanında analiz yapmak için çeşitli bakteriler arasında *K. pneumoniae* seçildi ve ham veriler yüklendi, sonuçlar değerlendirildi (66).

3.13.5. Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Direnç genleri; ResFinder 4.1, The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) BacWGSTdb (Bacterial Whole Genome Sequence Typing Database) veri tabanları kullanılarak belirlendi. ResFinder 4.1 veri tabanı aracılığıyla aralarında *Klebsiella*'nın da bulunduğu 12 farklı bakterinin direnç genleri analiz edilmektedir. Bu bakteriler arasından *Klebsiella* seçildi ve ham veriler yüklenerek antimikrobiyallere dirence neden olacak gen bölgeleri elde edildi. Minimum benzerlik için %95, "minimum coverage" için %60 seçilerek veriler analiz edildi (112,113). CARD veri tabanı ile çeşitli bakterilere ait geniş bir antimikrobiyal ontoloji tablosu elde edilmektedir. Bu nedenle çalışma izolatlarımızın dizisi ile eşleşen bölgenin dizi benzerliği %95'in üzerinde olan direnç genlerine yer verildi (114). BacWGSTdb veri tabanında *K. pneumoniae* dahil olmak üzere 20 farklı bakteri için analiz yapılabilmektedir. Çalışma izolatlarımıza ait ham datalar, veri tabanına yüklenerek analiz edildi (115,116,117).

3.13.6. Virülans Genlerinin Belirlenmesi

Virülans genleri, Virulence Factor Database (VFDB), VirulenceFinder ve BacWGSTdb veri tabanları kullanılarak analiz edildi (118). VFDB veri tabanı ile 32 farklı bakteriye ait virülans genleri belirlenebilmektedir. Bu bakteriler arasında *K. pneumoniae* seçildi ham datalar yüklendi (http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi). VirulenceFinder veri tabanında *Listeria, S. aureus, E. coli, Enterococcus* olmak üzere sınırlı sayıda bakterileri için virülans genleri belirlenebilmektedir. Virülans genlerini bulabilmek için *Klebsiella* gibi *Enterobacterales* üyesi olan *E. coli* şeçildi ve ham datalar yüklendi. *E. coli* ve *K. pneumoniae* ile ortak virülans genleri elde edildi. Minimum benzerlik için %95,

“minimum coverage” için %60 seçilerek veriler analiz edildi (113,119,120). BacWGSTdb veri tabanı ile farklı 20 bakteri türüne ait virülans genleri elde edilmektedir. Çalışma izolatlarımıza ait ham datalar, veri tabanına yüklenerek virülans gen analizi yapıldı (115,116,117).

3.13.7. Plazmidlerin Bulunması, Plazmid Üzerindeki Virülans ve Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Plazmidler PLSDB (Plasmid Database) veri tabanı kullanılarak seçildi (121,122). Plazmidlerin replikon grupları PlasmidFinder veri tabanı ile belirlendi. PlasmidFinder veri tabanında Gram pozitif ve *Enterobacterales* olmak üzere iki gruba ait bakterilerin Plazmidleri analiz edilmektedir (113,123). *K. pneumoniae* suşları için *Enterobacterales* seçildi ve ham datalar yüklendi. Minimum benzerlik için %80, “minimum coverage” için %60 seçilerek veriler analiz edildi. Plazmid üzerindeki direnç genleri ResFinder veri tabanı ile virülans genleri ise VFDB ve BacWGSTdb ile belirlendi.

3.13.8. VFDB’de Karşılığı Olmayan Açık Okuma Çerçevelerinin Araştırılması

VFDB’de elde edilen fakat herhangi bir virülans geni atanmayan Açık Okuma Çerçeveleri’ne (ORF- Open Reading Frame) ait nükleotid dizileri Pasteur Enstitüsü’nün veri tabanına yüklendi. Yüklenen bu ORF dizilerine karşılık gelen gen bölgeleri ve bu gen bölgeleri tarafından kodlanan enzim ve proteinler belirlendi.

3.13.9. Filogenetik Ağacın Oluşturulması

Filogenetik ağaç Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) bilgisayar programı kullanılarak elde edildi. MEGA programında yer alan “Neighbor joining” ağacı oluşturuldu. Filogenetik ağaca ait şekil ve renkler için Interactive Tree Of Life (ITOL) programı kullanılandı. Çalışma izolatlarına ait tüm genom dizilerin “Fasta” formatları kullanıldı. Dış grup olarak kullanılan hipervirülan NTUH-K2044 *K. pneumoniae* standart suşun tüm genom dizisi NCBI’dan indirildi.

3.13.10. Ham Okuma Verilerinin Açık Veri Tabanlarında Yayınlanması

Tüm genom dizisi belirlenen izolatların "Fasta" verileri GenBank'a ve Pasteur Enstitüsü veri tabanına yüklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin Toplanması ve Tanımlanması

Ocak 2018-Aralık 2020 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji birimine çeşitli klinikler tarafından gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen toplam 244 *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edildi.

4.2. String Testi

Kanlı agara ekimi yapılan 244 izolattan on izolat string pozitif olarak değerlendirildi. String pozitif olan bu izolatlar hipermukoviskoz *K. pneumoniae* olarak tanımlandı. Şekil 6'da string testi pozitif örneklerin koloni fenotipi gösterilmiştir.



Şekil 6. String testi pozitif koloni fenotipi

4.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

String testi pozitif izolatların oluşturdukları zon çapları ve EUSCAST kriterlerine göre belirlenen direnç profili Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının zon çapları ve direnç profili ((R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Artmış dozda duyarlı *: Zon içi üreme)

Örnek	IMP (10µg)	MEM (10µg)	ERT (10µg)	AN (30µg)	SXT (1,25 µg)	CIP (5µg)	GM (10µg)	AMC (20/10µg)	AM (10µg)	TPZ (30/6 µg)	CTX (5µg)	CAZ (10µg)	FOS (200µg)
5317	26 (S)	24 (S)	26 (S)	20 (S)	26 (S)	27 (S)	20 (S)	19 (S)	10 (R)	20 (S)	20 (S)	22 (S)	16
7274	24 (S)	24 (S)	26 (S)	20 (S)	25 (S)	30 (S)	20 (S)	20 (S)	0 (R)	22 (S)	22 (S)	22 (S)	16
9961	23 (S)	22 (S)	25 (S)	20 (S)	19 (S)	27 (S)	19 (S)	21 (S)	0 (R)	20 (S)	20 (S)	22 (S)	19
1786	25 (S)	22 (S)	25 (S)	22 (S)	23 (S)	25 (S)	20 (S)	0 (R)	0 (R)	10 (R)	20 (S)	22 (S)	15
1212	20 (I)	18 (I)	22 (I)	22 (S)	0 (R)	20 (I)	0 (R)	15 (R)	0 (R)	20 (S)	0 (R)	7 (R)	17*
8560	22 (S)	25 (S)	25 (S)	22 (S)	20 (S)	26 (S)	20 (S)	20 (S)	12 (R)	22 (S)	20 (S)	22 (S)	17
4822	26 (S)	23 (S)	25 (S)	23 (S)	25 (S)	28 (S)	20 (S)	20 (S)	0 (R)	20 (S)	22 (S)	23 (S)	16
6940	24 (S)	22 (S)	30 (S)	20 (S)	0 (R)	15 (R)	21 (S)	20 (S)	0 (R)	20 (S)	20 (S)	22 (S)	16
6718	12 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	22 (S)	17*
5889	26 (S)	25 (S)	25 (S)	20 (S)	20 (S)	28 (S)	21 (S)	20 (S)	12 (R)	20 (S)	20 (S)	23 (S)	12

4.4. PCR ile *rmpA/rmpA2* ve Karbapenem Direnç Genlerinin Belirlenmesi

String testi sonucunda elde edilen on hipermuoviskoz *K. pneumoniae* izolatları için yapılan PCR'da izolatlardan ikisinin *rmpA/rmpA2* genlerini taşıdığı görüldü.

Hipermukoviskoz fenotip gösteren on *K. pneumoniae* izolattan biri karbapeneme dirençli iken dokuzu duyarlı olarak tanımlandı. Karbapenem direnç genlerini belirlemek üzere yapılan PCR'da karbapenem dirençli bu hipermukoviskoz izolatta OXA-48 karbapenemazını kodlayan gen saptandı.

4.5. PFGE Yöntemi ile Faklı Klonların Belirlenmesi

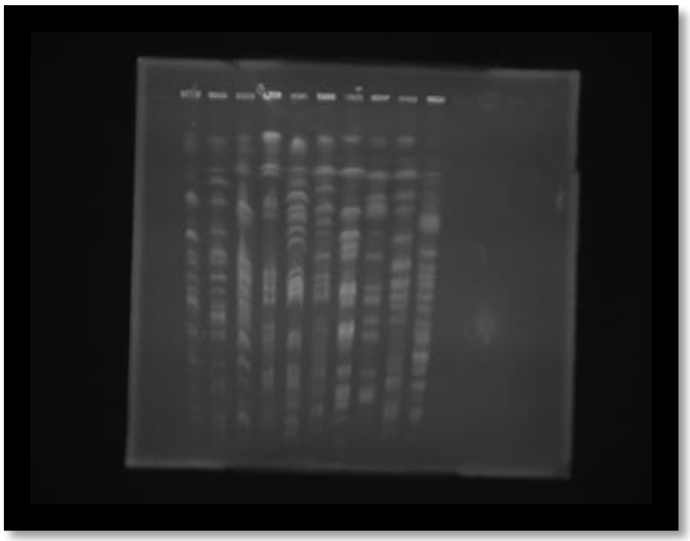
İzole edilen on hipermukoviskoz *K. pneumoniae* arasındaki klonal ilişkiyi göstermek amacıyla PFGE yapıldı. PFGE jel görüntüsü Tenover kriterlerine göre değerlendirildi. Tenover kriterlerine göre izolatlar arasında hiçbir bant farkının olmaması bu izolatların aynı kökene ait olduğunu göstermektedir. İzolatlar arasında iki-üç bant farkı bu izolatların "yakın ilişkili" olduğunu göstermektedir. İki-üç bant farkının mutasyon, insersiyon veya delesyondan kaynaklamış olabileceği bu yüzden "yakın ilişkili" olarak değerlendirilmesi gerektiği ifade edilmektedir. İzolatlar arası bant farkı dört-altı arasında ise bu izolatlar arasındaki yakınlık "muhtemel ilişkili" olarak tanımlanmaktadır. Bant farkı yedi ve üzerinde belirlenir ise "ilişkisiz" olarak adlandırılmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda; 2018 yılında izole edilen bir ve iki numaralı izolatlar yakın ilişkili üç numaralı izolat ise bunlarla muhtemel ilişkili olarak değerlendirildi. Bunun yanında 2019 ve 2020 yılında izole edilen izolatların kendi içinde ilişkisiz izolatlar olduğu görüldü.

İzolatların klonal ilişkisi, izole edildiği yıl, karbapenem direnç durumu ve *rmpA/rmpA2* gen pozitifliği göz önünde bulundurularak değerlendirilirdi ve bu değerlendirme sonucunda tüm genom dizi analizi yapılacak beş izolat seçildi. Buna göre 2018 yılında ait üç numaralı izolat, 2019 yılına ait beş ve on numaralı izolatlar (bir izolat β- laktam direncine sahip, diğer izolat *rmpA/rmpA2* pozitif), 2020 yılına

ait yedi ve dokuz numaralı izolatlar (izolatlardan biri hem karbapenem dirençli, hem de *rmpA/rmpA2* pozitif) olmak üzere toplam beş hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatı tüm genom dizileme çalışması için seçildi. İzolatların jel yükleme sırası, izole edildiği yıl, karbapenem direnç profili ve *rmpA/rmpA2* gen pozitifliği Tablo 10'da gösterilmiştir. Hipermukoviskoz fenotip gösteren on *K. pneumoniae* izolatına ait PFGE görüntüsü Şekil 7'de gösterilmiştir.

Tablo 10. PFGE sırası, örnek numarası, izole edildiği yıl, karbapenem direnç profili ve *rmpA/rmpA2* gen pozitifliği (Koyu renkli sütunlarda yer alan örnekler tüm genom analizi için seçilmiştir)

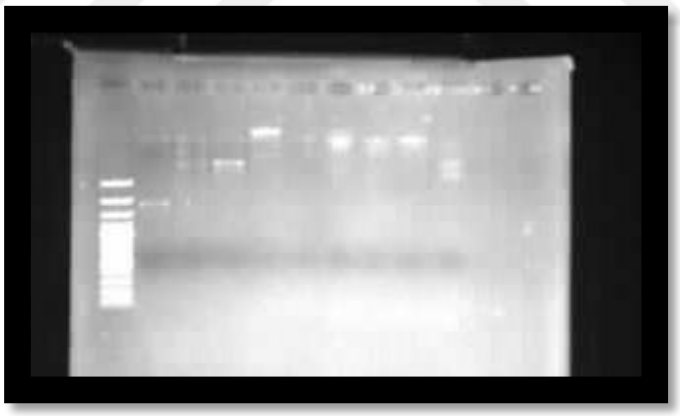
PFGE Sırası	**Örnek Numarası**	**İzole Edildiği Yıl**	**Karbapenem Direnci**	***rmpA/rmpA2***
1	5317	2018	S	Negatif
2	7274	2018	S	Negatif
3	9961	2018	S	Negatif
4	1786	2019	S	Negatif
5	1212	2019	I	Negatif
6	8560	2020	S	Negatif
7	4822	2020	S	Negatif
8	6940	2020	S	Negatif
9	6718	2020	R	Pozitif
10	5889	2019	S	Pozitif



Şekil 7. PFGE jel görüntüsü

4.6. Plazmid Ekstraksiyonu

Ekstrakte edilen plazmidler jelde yürütüldü. Elde edilen jel görüntüsünde on hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatının en az bir plazmid taşıdığı görüldü.

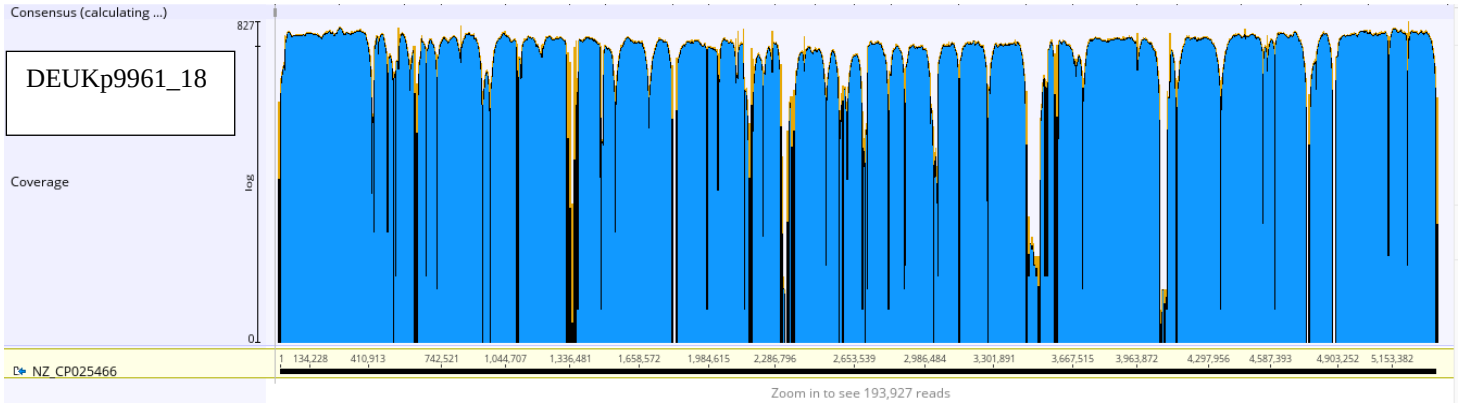


Şekil 8. Plazmid ekstraksiyonu jel görüntüsü

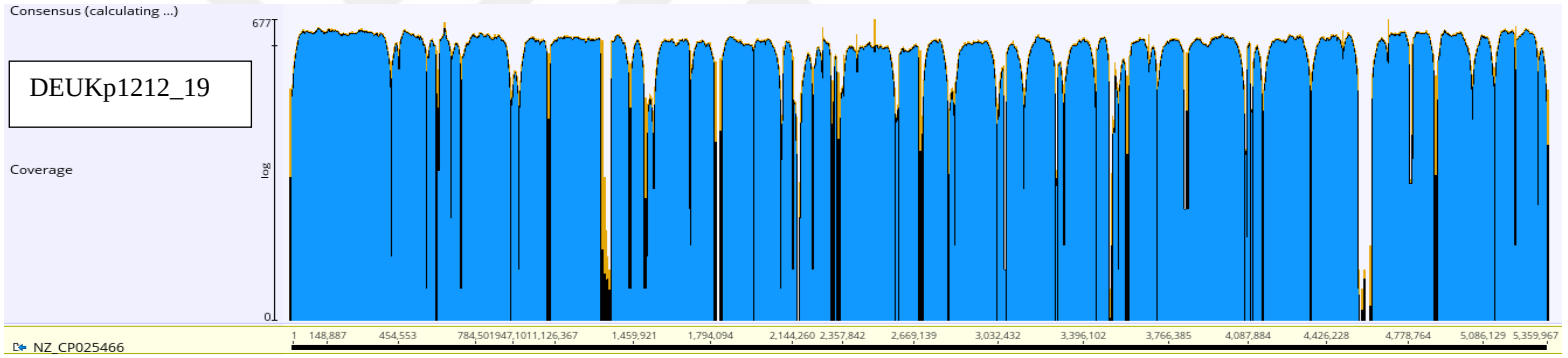
4.7. Biyoinformatik Analizler

4.7.1. Base Calling, Kalite Kontrolü ve Referans Genomla Hizalama

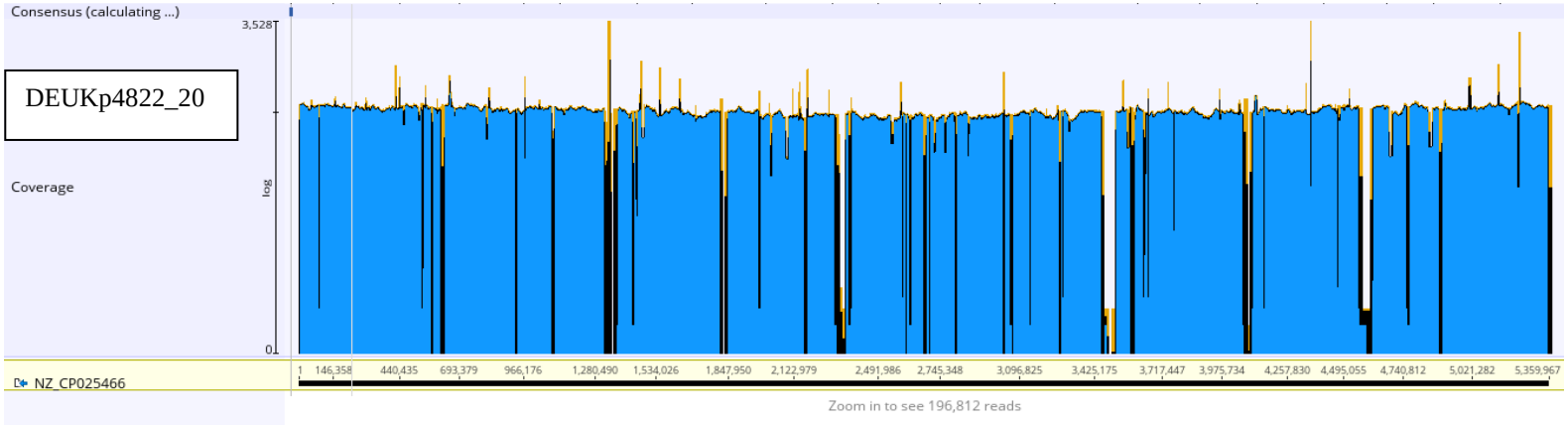
Her bir *K. pneumoniae* izolatına ait okuma derinliği aşağıda gösterilmiştir. Mavi rengin yoğun olduğu kısımlarda okuma derinliği ve kalitesi yüksek kabul edilmektedir. Beyaz rengin yoğun olduğu bölgelerde düşük okuma derinliği temsül etmektedir . Örneklere ait okuma derinliği aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 9a, 9b, 9c, 9d ve 9e).



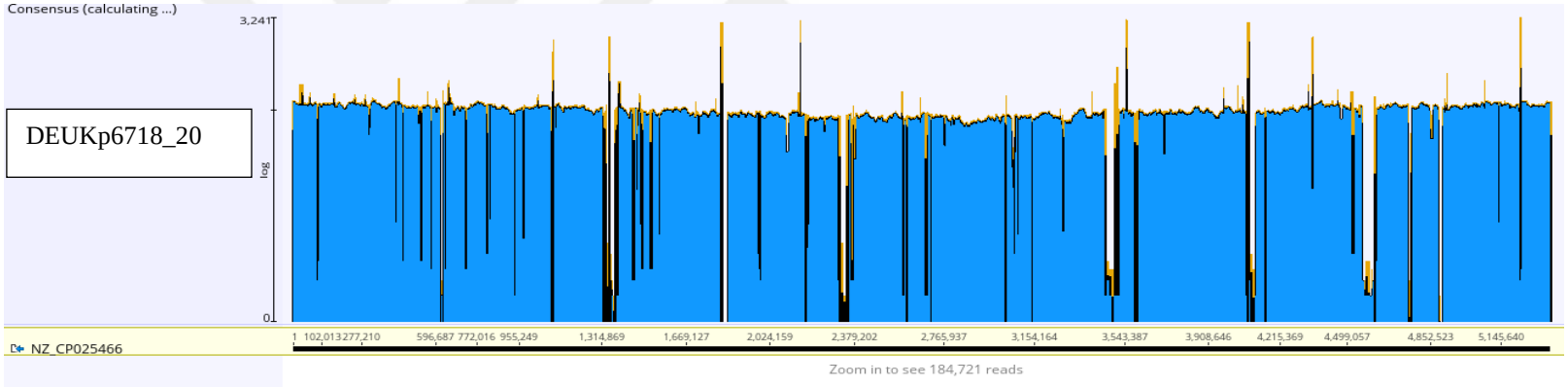
Şekil 9a. DEUKp9961_18 örneğine ait okuma derinliği



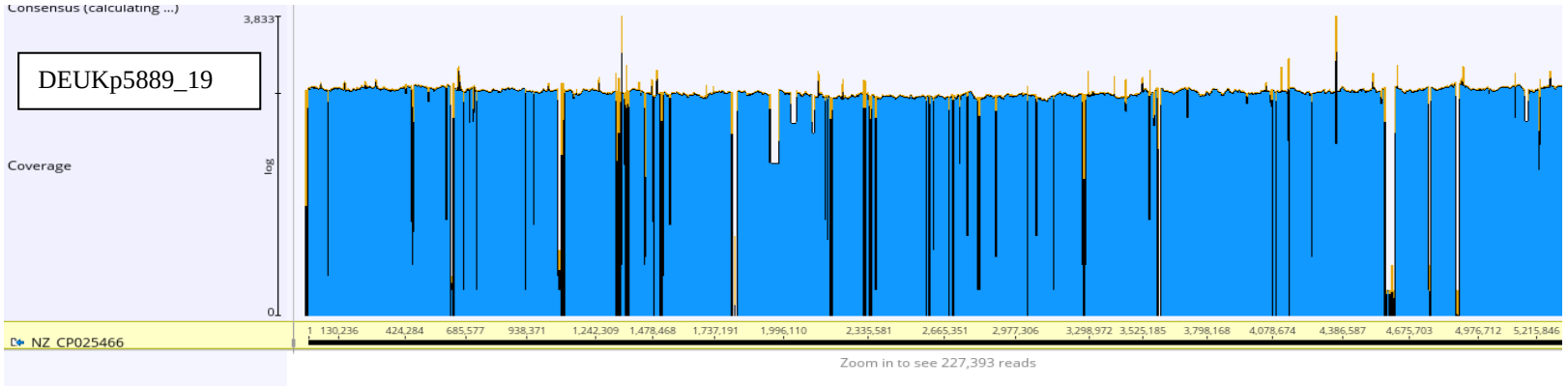
Şekil 9b. DEUKp1212_19 örneğine ait okuma derinliği



Şekil 9c. DEUKp4822_20 örneğine ait okuma derinliği

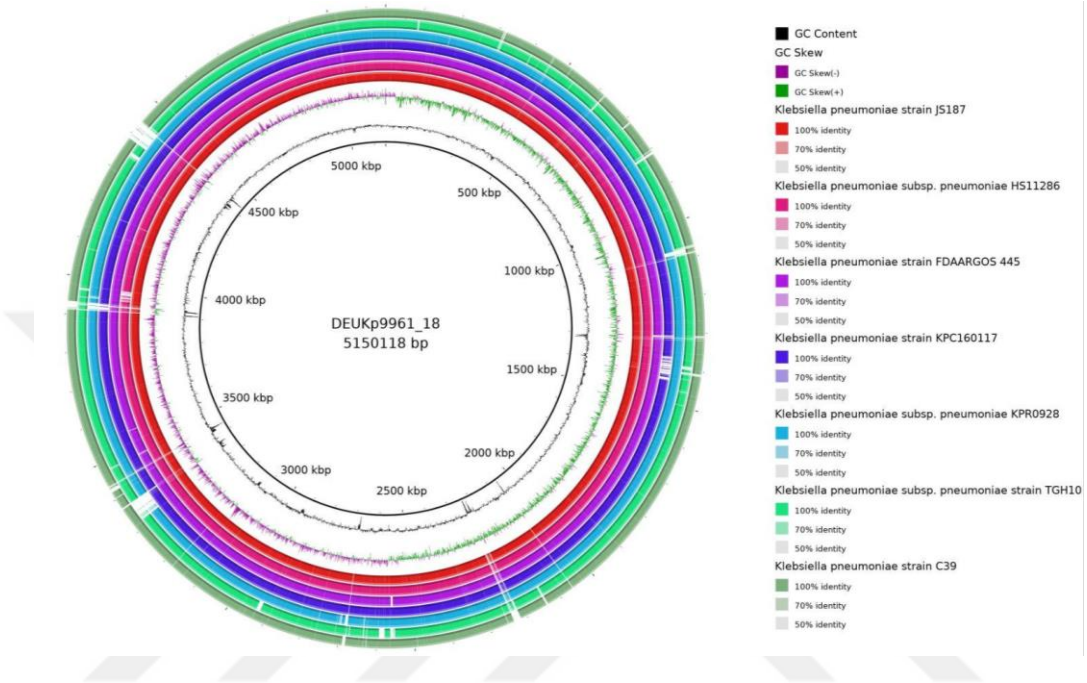


Şekil 9d. DEUKp6718_20 örneğine ait okuma derinliği

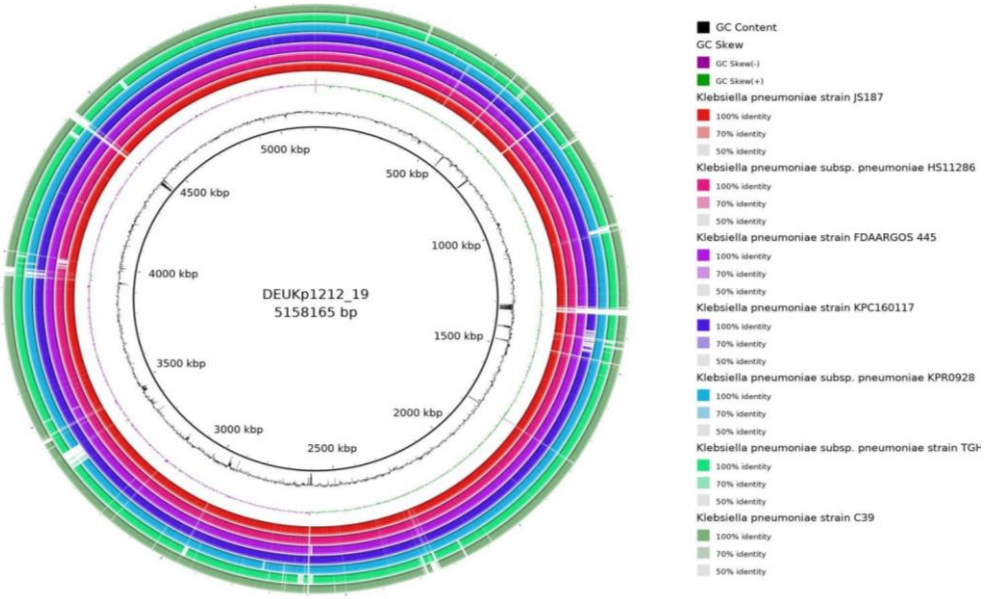


Şekil 9e. DEUKp5889_19 örneğine ait okuma derinliği

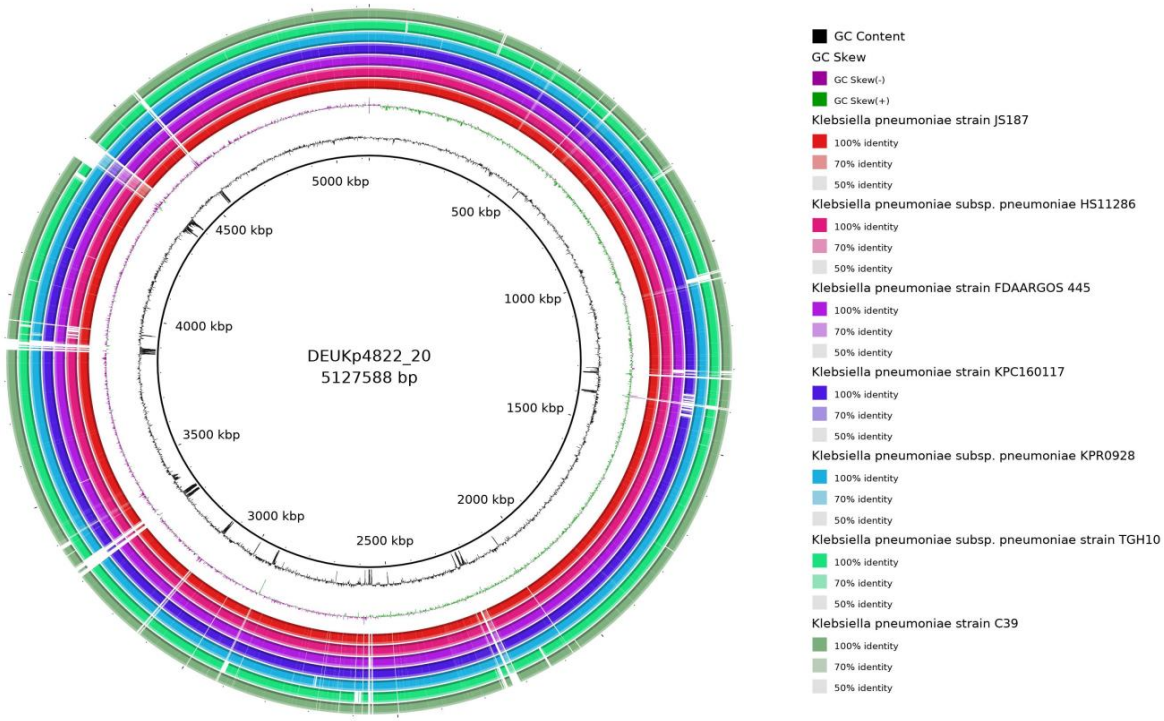
Her bir suşa ait genom uzunluğu, GC (Guanine-Cytosine) içeriği ve referans genomla karşılaştırmaları dairesel şekillerle aşağıdaki gibi gösterilmiştir (Şekil 10a, 10b, 10c, 10d ve 10e). Renksiz kısımlar referans suşların genomlarıyla uyuşmayan dizileri temsil etmektedir.



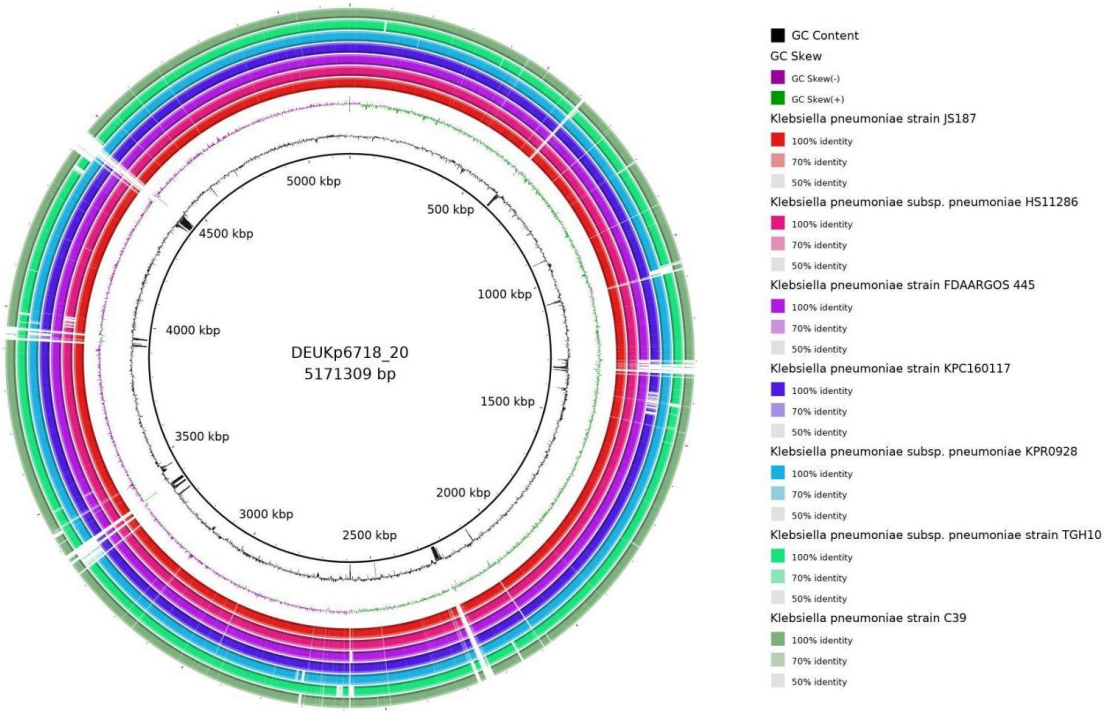
Şekil 10a. DEU9961_18'in genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom



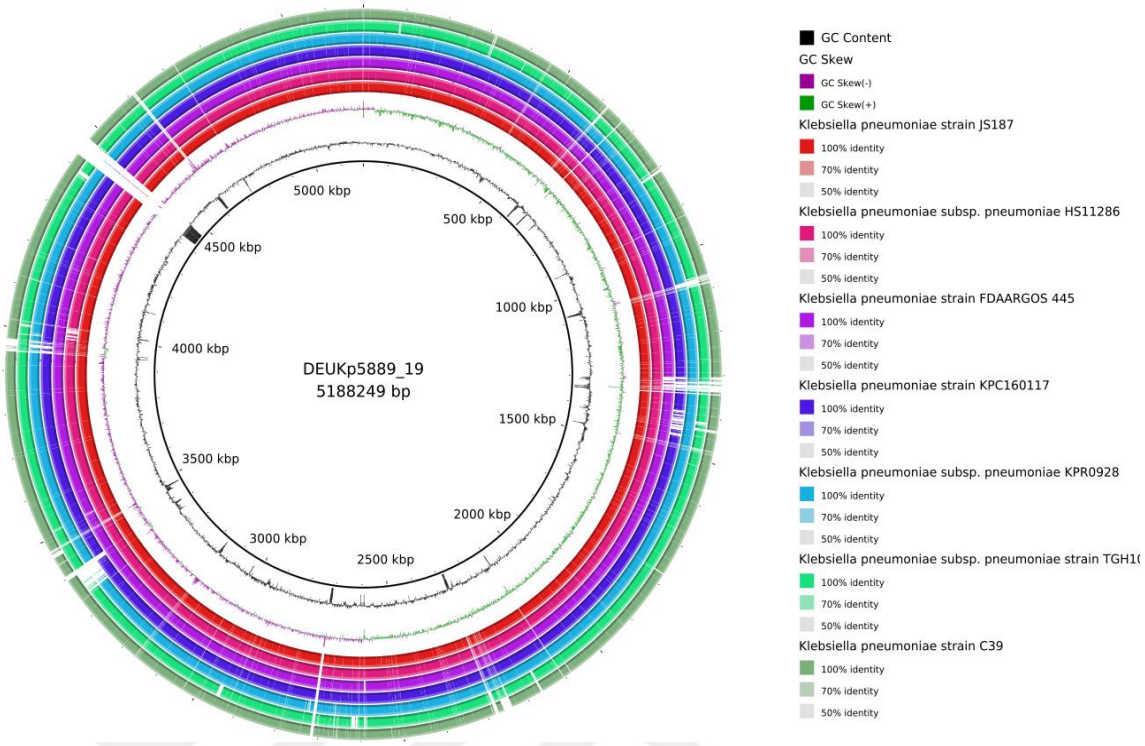
Şekil 10b. DEUKp1212_19'un genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom



Şekil 10c. DEUKp4822_20'nin genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom



Şekil 10d. DEUKp6718_20'nin genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom



Şekil 10e. DEUKp5889_19'un genom uzunluğu, GC içeriği ve referans genom

4.7.2. Kapsül Tipilerinin Belirlenmesi

Tüm genom dizi analizi yapılan beş örneğe ait kapsül tipleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Örneklerin kapsül tipleri

Örnek	**Kapsül Tipi**
DEUKp9961_18	KL139
DEUKp1212_19	K20
DEUKp4822_20	K62
DEUKp6718_20	K2
DEUKp5889_19	K54

4.7.3. O Antijen Tiplerinin Belirlenmesi

Tüm genom dizi analizi yapılan beş örneğe ait O antijen tipleri, eşleşen lokus ve eşleşme yüzdesi Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Örneklerin O antijen tipleri, en iyi eşleşen lokus ve eşleme yüzdesi

Örnek	En iyi eşleşen lokus	O Antijen tipi	Eşleşme yüzdesi
DEUKp9961_18	O1/O2v1	O2a	%100
DEUKp1212_19	O1/O2v1	O2a	%100
DEUKp4822_20	O1/O2v1	O2a	%94
DEUKp6718_20	O1/O2v1	O2a	%100
DEUKp5889_19	O1/O2v1	O2a	%93,39

4.7.4. Sekans Tiplerinin Belirlenmesi

K. pneumoniae'nın "Hausekeeping" genleri, gen uzunlukları, Pasteur Enstitüsü ve CGE (MLST) veri tabanlarına göre örneklerin taşıdığı alleller ve ST'leri Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Hausekeeping genler, gen uzunlukları, örnekleri taşıdığı alleller ve veri tabanlarına göre ST sonuçları

Gen Bölgesi	***gapA***		***infB***		***mdh***		***pgi***		***phoE***		***rpoB***		***tonB***		Pasteur Enstitüsü	CGE MLST
Gen Uzunluğu (bp)	450		318		477		432		420		501		414			
DEUKp9961_18	2	2	5	5	121	121	8	8	180	180	1	1	6	6	ST1322	ST1322
DEUKp1212_19	2	2	1	1	2	2	1	1	7	7	1	1	81	81	ST268	ST268
DEUKp4822_20	3	3	1	1	13	13	34	34	63	63	1	1	64	64	ST461	ST461
DEUKp6718_20	-	1 (%99)	6	6	-	1 (%99)	1	1	1	1	1	1	1	1	ST?	ST14
DEUKp5889_19	2	2	3	3	2	2	2	2	6	6	4	4	4	4	ST29	ST29

4.7.5. Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Direnç genleri ResFinder, CARD ve veri tabanları kullanılarak belirlendi. ResFinder veri tabanı sonuçları Tablo 14'te, CARD veri tabanı sonuçları Tablo 15'te, BacWGSTdb veri tabanı sonuçları ise Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 14. ResFinder veri tabanı ile belirlenen direnç genleri

Antibiyotik	DEUKp9961_18	DEUKp1212_19	DEUKp4822_20	DEUKp6718_20	DEUKp5889_19
Ampisilin	-	*bla*$_{\text{SHV-11}}$ *bla*$_{\text{SHV-13}}$ *bla*$_{\text{SHV-70}}$ *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$	-	*bla*$_{\text{SHV-106}}$	-
Trimetoprim	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*
Seftriakson		*bla*$_{\text{SHV-13}}$ *bla*$_{\text{SHV-70}}$ *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$		*bla*$_{\text{SHV-106}}$	
Sefalotin		*bla*$_{\text{SHV-11}}$		-	
Piperasilin		*bla*$_{\text{SHV-11}}$ *bla*$_{\text{SHV-13}}$ *bla*$_{\text{SHV-70}}$ *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$		*bla*$_{\text{SHV-106}}$	

Tablo 14 (Devam). ResFinder veri tabanı ile belirlenen direnç genleri

Amoksisilin		*bla*$_{SHV-11}$ *bla*$_{SHV-13}$ *bla*$_{SHV-70}$ *bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{SHV-106}$	
Sefepim		*bla*$_{SHV-13}$ *bla*$_{SHV-70}$ *bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{SHV-106}$	
Seftazidim		*bla*$_{SHV-13}$ *bla*$_{SHV-70}$ *bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{SHV-106}$	
Tikarsilin		*bla*$_{SHV-11}$ *bla*$_{SHV-13}$ *bla*$_{SHV-70}$ *bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{SHV-106}$	
Sefotaksim		*bla*$_{SHV-13}$ *bla*$_{SHV-70}$ *bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{SHV-106}$	
Aztreoman		*bla*$_{SHV-13}$ *bla*$_{SHV-70}$ *bla*$_{CTX-M-15}$		*bla*$_{SHV-106}$	
Fosfomisin	*fosA*	*fosA5*	*fosA*	*fosA*	*fosA*
Siprofloksasin	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*

Tablo 14 (Devam). ResFinder veri tabanı ile belirlenen direnç genleri

Nalikdisik asid	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*
Benzilkonyum klorür	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*
Kloramfenikol	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*
Setilpiridinyum klorür	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*	*oqxB, oqxA*
Bilinmeyen β-laktam	$bla_{\text{SHV-204}}$	-	$bla_{\text{SHV-187}}$	$bla_{\text{SHV-28}}$	$bla_{\text{SHV-187}}$

Tablo 15. CARD veri tabanı ile belirlenen gen ailesi, dirence neden oldukları antimikrobiyaller ve antimikrobiyal direnç ontolojisi (Tabloda, eşleşen bölgenin benzerliği %95'in üzerinde olan direnç gen ailesine ve klinikte kullanılan antimikrobiyallere yer verilmiştir).

Gen Ailesi	**Antimikrobiyaller**	**DEUKp9961_18**	**DEUKp1212_19**	**DEUKp4822_20**	**DEUKp6718_20**	**DEUKp5889_19**
ABC dışa atım pompası	Karbapenem Rifamisin	LptD	LptD	-	LptD	LptD
MFS dışa atım pompası	Makrolid, Aminoglikozid Sefalosporin, Tetrasiklin, Rifamisin	Klebsiella pneumoniae KpnF, Klebsiella pneumoniae KpnE	Klebsiella pneumoniae KpnF, Klebsiella pneumoniae KpnE	Klebsiella pneumoniae KpnF, Klebsiella pneumoniae KpnE	Klebsiella pneumoniae KpnF, Klebsiella pneumoniae KpnE	Klebsiella pneumoniae KpnF, Klebsiella pneumoniae KpnE
SHV -laktamaz	Karbapenem, Sefalosporin	SHV-204	SHV-11	SHV-1	SHV-28	SHV-187
RND dışa atım pompası	Florokinolon, Glisilsiklin, Tetrasiklin, Diaminopirimidin, Nitrofuran	oqxA	oqxA	oqxA	oqxA	oqxA

Tablo 15 (Devam). CARD veri tabanı ile belirlenen gen ailesi, dirence neden oldukları antimikrobiyaller ve antimikrobiyal direnç ontolojisi

MFS dışa atım pompası	Makrolid, Florokinolon, Aminoglikozid, Karbapenem, Sefalosporin	Klebsiella pneumoniae KpnG	Klebsiella pneumoniae KpnG	Klebsiella pneumoniae KpnG	-	-
Düşük geçirgenliğe sahip bakteriyel porin β-laktamlar için	Monobaktam, Karbapenem, Sefalosporin, Sefamisin	OmpA, Klebsiella pneumoniae OmpK37	OmpA, Klebsiella pneumoniae OmpK37	OmpA, Klebsiella pneumoniae OmpK37	OmpA, Klebsiella pneumoniae OmpK37	OmpA, Klebsiella pneumoniae OmpK37
RND dışa atım pompası	Makrolid, Florokinolon	Cyclic AMP Receptor Protein (CRP)	Cyclic AMP Receptor Protein (CRP)	Cyclic AMP Receptor Protein (CRP)	Cyclic AMP Receptor Protein (CRP)	Cyclic AMP Receptor Protein (CRP)
Fosfomisin tiyol transferaz	Fosfomisin	FosA6	FosA5	FosA6	FosA6	FosA6

Tablo 16. BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen direnç genleri

Antimikrobiyaller	**DEUKp9961_18**	**DEUKp1212_19**	**DEUKp4822_20**	**DEUKp6718_20**	**DEUKp5889_19**
β-laktam	*bla*$_{\text{SHV-204}}$	*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ *bla*$_{\text{SHV-11}}$	*bla*$_{\text{SHV-187}}$	*bla*$_{\text{SHV-106}}$	*bla*$_{\text{SHV-132}}$
Kinolon	*oqxA , oqxB*	*oqxA, oqxB*	*oqxA, oqxB*	*oqxA, oqxB*	*oqxA, oqxB*
Fosfomisin	*fosA*	-	*fosA*	*fosA*	*fosA*

4.7.6. Virülans Genlerinin Belirlenmesi

Virülans genlerini belirlemek için üç farklı veri tabanı kullanılmıştır. VFDB veri tabanı sonuçları Tablo 17'de, VirulenceFinder veritabanı sonuçları Tablo 18'de, BacWGSTdb veri tabanı sonuçları tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo17. VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

Virülansı	Virülans Faktörü	Virülans Geni	DEUKp9961_18	DEUKp1212_19	DEUKp4822_20	DEUKp6718_20	DEUKp5889_19
Adezyon	**Tip 3 fimbria**	*mrkA*	orf04551	orf04545	orf04434	orf04528	orf04582
		mrkB	orf04550	orf04544	orf04433	orf04527	orf04581
		mrkC	orf04548	orf04542	orf04432	orf04525	orf04579
		mrkD	orf04547	orf04541	orf04431	orf04524	orf04578
		mrkF	orf04546	orf04540	orf04430	orf04523	orf04577
		mrkH	orf04543	orf04537	orf04427	orf04520	orf04574
		mrkI	orf04544	orf04538	orf04428	orf04521	orf04575
		mrkJ	orf04545	orf04539	orf04429	orf04522	orf04576

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

Tip I fimbria	*fimA*	orf04559	orf04552	orf04443	orf04536	orf04591
	fimB	orf04556	orf04550	orf04440	orf04533	orf04587
	fimC	orf04561	orf04554	orf04445	orf04538	orf04593
	fimD	orf04563	orf04556	orf04446	orf04539	orf04594
	fimE	orf04557	orf04551	orf04441	orf04534	orf04589
	fimF	orf04564	orf04557	orf04447	orf04540	orf04595
	fimG	orf04565	orf04558	orf04448	orf04541	orf04596
	fimH	orf04566	orf04559	orf04449	orf04542	orf04597
	fimI	orf04560	orf04553	orf04444	orf04537	orf04592
	fimK	orf04567; orf04568	orf04560; orf04561	orf04450; orf04451	orf04543	orf04598

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

Antifagositoz	**Kapsül**	**-**	orf00179; orf03676; orf03678; orf03679; orf03680; orf03681; orf03682	orf00182; orf03665; orf03666; orf03668; orf03671; orf03672	orf00188; orf03586; orf03587; orf03588; orf03594; orf03595	orf00180; orf03643; orf03644; orf03646; orf03648; orf03649; orf03651; orf03652	orf00191; orf03704; orf03705; orf03714; orf03715
Dışa atım pompası	**AcrAB**	*acrA*	orf01302	orf01315	orf01310	orf01275	orf01318
		acrB	orf01301	orf01314	orf01309	orf01274	orf01317
Demir Alımı	**Aerobaktin**	*iucA*	-	-	-	-	-
		iucB	-	-	-	-	-
		iucC	-	-	-	-	-
		iucD	-	-	-	-	-
		iutA	orf02084	orf02093	orf02074	orf02072	orf02132

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

Enterobaktin	*entA*	orf01542	orf01556	orf01536	orf01530	orf01594
	entB	orf01540	orf01555	orf01535	orf01529	orf01593
	entC	orf01538	orf01553	orf01533	orf01527	orf01591
	entD	orf01526	orf01541	-	orf01514	orf01580
	entE	orf01539	orf01554	orf01534	orf01528	orf01592
	entF	orf01531; orf01532	orf01546	orf01526; orf01527	orf01520	orf01585
	entS	orf01536	orf01551	orf01531	orf01525	orf01589
	fepA	orf01527	orf01542	orf01523	orf01515	orf01581
	fepB	orf01537	orf01552	orf01532	orf01526	orf01590
	fepC	orf01533	orf01547	orf01528	orf01521	orf01586
	fepD	orf01535	orf01550	orf01530	orf01524	orf01588
	fepG	orf01534	orf01549	orf01529	orf01523	orf01587
	fes	orf01529	orf01545	orf01525	orf01517; orf01518	orf01583

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

Salmochelin	*iroB*	-	-	-	-	-
	iroC	-	-	-	orf01237	orf01279
	iroD	-	-	-	-	-
	iroE	orf02674	orf02704	orf02667	orf02664	orf02731
	iroN	orf02231	orf02236	orf02222	orf02221	orf02282
Yersiniabaktin	*fyuA*	orf03591; orf03592	orf03585	-	-	orf03612
	irp1	orf03584	orf03580	-	orf03547; orf03548; orf03556	orf03606; orf03607
	irp2	orf03574; orf03577; orf03578	orf03573; orf03576	orf03521	orf03542	orf03601; orf03604
	ybtA	orf03573	orf03572	-	-	orf03599
	ybtE	orf03589	orf03584	-	-	orf03611
	ybtP	orf03571	orf03571	-	-	orf03598
	ybtQ	orf03570	orf03570	-	-	orf03597

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

	Yersiniabaktin	*ybtS*	orf03567	orf03568	-	-	orf03595
		ybtT	-	-	-	-	-
		ybtU	-	orf03581	-	orf03558	orf03608
		ybtX	orf03568	orf03569	-	-	orf03596
Beslenme Faktörü	**Allantoin Kullanımı**	*allA*	-	-	-	-	-
		allB	-	-	-	-	-
		allC	-	-	-	-	-
		allD	-	-	-	-	-
		allR	-	-	-	-	-
		allS	-	-	-	-	-
Regülatör (Düzenleme)	**RcsAB**	*rcsA*	orf03546	orf03546	orf03497	orf03506	orf03573
		rcsB	orf03827	orf03818	orf03733	orf03799	orf03859

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

	RmpA	*rmpA*	-	-	-	-	-
Sekresyon Sistemi	**T6SS-I**	-	-	orf02379	-	-	-
		-	-	orf02391	-	-	-
		-	-	orf02392	-	-	-
		clpV/tssH	orf02369; orf02370	orf02376; orf02377	orf02345	orf02342	orf02420
		dotU/tssL	orf02366	orf02373	orf02342	orf02338	orf02417
		hcp/tssD	orf02368	orf02375	orf02344	orf02340	orf02419
		icmF/tssM	orf02372	orf02393	orf02354	orf02349	-
		impA/tssA	-	-	-	orf02350	-
		ompA	orf02367	orf02374	orf02343	orf02339	orf02418
		sciN/tssJ	orf02377	orf02398	orf02360	orf02355	-
		tle1	-	orf02389	orf02351	orf02344	-

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

T6SS-I	*tli1*	-	orf02384	orf02348	-	-
	tssF	orf02374	orf02395	orf02356	orf02352	orf02428
	tssG	orf02376	orf02397	orf02359	orf02354	orf02430
	vasE/tssK	orf02365	orf02372	orf02341	orf02337	orf02416
	vgrG/tssI	orf02371	orf02378	orf02346	orf02343	orf02421
	vipA/tssB	orf02363	orf02370	orf02339	orf02335	orf02414
	vipB/tssC	orf02364	orf02371	orf02340	orf02336	orf02415
T6SS-II	*clpV*	orf04136	orf04133	orf04049	orf04119	orf04169
	dotU	-	-	-	-	-
	icmF	-	-	-	-	-
	impF	-	-	-	-	-
	impH	-	-	-	-	-
	impJ	-	-	-	-	-
	ompA	-	-	-	-	-
	sciN	-	-	-	-	-
	vasA/impG	-	-	-	-	-
	vgrG	-	-	-	-	-

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

T6SS-III	-	-	-	-	-	-
	-	-	orf03374	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	orf03345	orf03352	orf03304	orf03304	orf03373
	-	orf03344	orf03351	orf03303	orf03303	orf03372
	dotU	orf03377	orf03377	orf03322	orf03330	orf03402
	icmF	orf03353	orf03360	orf03311	-	orf03379
	impA	orf03346	-	orf03305	orf03305	orf03374
	impF	orf03347	orf03355	orf03306	orf03306	orf03375
	impG	-	-	orf03309	-	orf03378
	impH	orf03349	orf03357	orf03308	orf03308	orf03377
	impJ	orf03379	orf03379	orf03324	-	orf03404
	lysM	-	-	-	-	-
	ompA	-	-	-	-	-
	sciN	orf03348	orf03356	orf03307	orf03307	orf03376
	vgrG	-	-	orf03318	orf03326	-

Tablo17 (Devam). VFDB veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve ORF'ler

Serum Direnci	**LPS rfb locus**	-	orf03668; orf03669; orf03670; orf03671; orf03672; orf03673	orf03655; orf03658; orf03659; orf03660	orf03577; orf03578; orf03579; orf03580; orf03581; orf03582	orf03635; orf03636; orf03637; orf03638; orf03639; orf03640	orf03694; orf03695; orf03696; orf03697; orf03698; orf03700
Toksin	**Kolibaktin**	*clbA*	-	-	-	-	-
		clbB	-	-	-	-	-
		clbC	-	-	-	-	-
		clbD	-	-	-	-	-
		clbE	-	-	-	-	-
		clbF	-	-	-	-	-
		clbG	-	-	-	-	-
		clbH	-	-	-	-	-
		clbI	-	-	-	-	-
		clbJ	-	-	-	-	-
		clbK	-	-	-	-	-
		clbL	-	-	-	-	-
		clbM	-	-	-	-	-
		clbN	-	-	-	-	-
		clbO	-	-	-	-	-
		clbP	-	-	-	-	-
		clbQ	-	-	-	-	-
		clbS	-	-	-	-	-

Tablo 18. VirulenceFinder veri tabanı ile belirlenen virülans genleri, görevleri ve örneklerdeki gen bölgesiyle benzerlik yüzdesi

Virülans Geni	**Virülans Genlerinin Görevi**	**DEUKp9961_18**	**DEUKp1212_19**	**DEUKp4822_20**	**DEUKp6718_20**	**DEUKp5889_19**
fyuA	Siderofor reseptörü	%99,85	%100	-	%94,41	%100
irp2	Yüksek molekül ağırlıklı protein 2 ribozomal olmayan peptit sentetaz	%99,65	%99,82	-	%95,41	%99,92
iutA	Aerobaktin reseptörü	%99,5	%99,22	%99,02	%99,27	%99,54

Tablo 19. BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri

Virülans Genleri	Virülans Genlerinin Görevi	DEUKp9961_18	DEUKp1212_19	DEUKp4822_20	DEUKp6718_20	DEUKp5889_19
acrB	Akriflavin direnç proteini B	+	+	+	+	+
acrA	Akriflavin direnç proteini A	+	+	+	+	+
entD	Enterochelin sentetaz bileşeni D	-	+	+	+	+
fepA	Dış membran proteini fepA	+	+	+	+	+
fes	Enterobaktin/ferrik enterobaktin esteraz	+	+	+	+	+
entF	Enterobaktin sentaz alt birimi F	+	+	+	+	+
fepC	Demir-enterobaktin taşıyıcı ATP bağlayıcı protein	+	+	+	+	+
fepG	Demir-enterobaktin taşıyıcı permeaz	+	+	+	+	+

Tablo 19 (Devam). BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri

fepD	Demir-enterobaktin taşıyıcı membran proteini	+	+	+	+	+
ybdA	Enterobaktin dışa atım elemanı EntS	+	+	+	+	+
fepB	Demir-enterobaktin taşıyıcı periplazmik bağlayıcı protein	+	+	+	+	+
entC	İzokorizmat sentaz	+	+	+	+	+
entE	Enterobaktin sentaz alt birimi E	+	+	+	+	+
entB	2,3-dihidro-2,3-dihidroksibenzoat sentetaz, izokroizmataz	+	+	+	+	+
entA	2,3-dihidroksibenzoat-2,3-dehidrojenaz	+	+	+	+	+
vipA/tssB	Tip VI salgılama sistemi kontraktil kılıf küçük alt birim VipA	+	+	+	+	+
vipB/tssC	Tip VI salgılama sistemi kontraktil kılıf büyük alt birim VipB	+	+	+	+	+

Tablo 19 (Devam). BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri

vasE/tssK	Tip VI salgılama sistemi taban plakası alt birimi TssK	+	+	+	+	+
dotU/tssL	Tip VI sekresyon sistemi proteini, DotU/TssL ailesi	+	+	+	+	+
hcp/tssD	Tip VI salgılama sistemi proteini, Hcp ailesi	+	+	+	+	+
clpV/tssH	Tip VI salgılama sistemi ATPase TssH	+	+	+	+	+
vgrG/tssI	Tip VI salgılama sistemi uç proteini VgrG	-	+	-	+	-
tli1	Tip VI salgılama sistemi bağışıklık proteini	-	+	-	-	-
KPHS_23120	PaaR tekrar içeren protein	-	+	+	-	-
icmF/tssM	Tip VI salgı proteini TssM	+	+	+	+	+
impA/tssA	Tip VI salgılama sistemi proteini TssA	+	+	+	+	+
tssF	Tip VI salgılama sistemi taban plakası alt birimi TssF	+	+	+	+	+

Tablo 19 (Devam). BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri

tssG	Tip VI salgılama sistemi taban plakası alt birimi TssG	+	+	+	+	+
sciN/tssJ	Tip VI salgılama sistemi lipoprotein TssJ	+	+	+	+	+
iroE	Siderofor esteraz IroE	+	+	+	+	+
rcsA	Kapsül biyosentezi için transkripsiyonel aktivatör	+	+	+	+	+
ybtS	Salisilat sentaz Irp9	+	+	-	-	+
ybtX	Varsayılan sinyal dönüştürücü	+	+	-	-	+
ybtQ	Yersiniabaktin ABC taşıyıcı ATP-bağlayıcı/geçirgenlik proteini	+	+	-	-	+
ybtP	Yersiniabaktin ABC taşıyıcı ATP-bağlayıcı/geçirgenlik proteini	+	+	-	+	+
ybtA	Transkripsiyonel düzenleyici	+	+	-	+	+

Tablo 19 (Devam). BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri

irp2	Yersiniabaktin biyosentetik protein	+	+	-	+	+
irp1	Yersiniabaktin biyosentetik protein	+	+	-	-	+
ybtU	Yersiniabaktin biyosentetik protein	+	+	-	+	+
ybtT	Tip II tiyoesteraz	+	+	-	+	+
ybtE	Yersiniabaktin siderofor biyosentetik protein	+	+	-	+	+
fyuA	Pestisin/yersiniabaktin reseptör proteini	+	+	-	+	+
kfoC	Glikoziltransferaz ailesi 2 proteini	-	-	+	-	+
wbbO	Glikoziltransferaz ailesi 1 proteini	+	+	+	+	+
wbbN	Glikoziltransferaz	+	+	+	+	+
glf	UDP-galaktopiranoz mutaz	+	+	+	+	+
wbbM	Glikoziltransferaz	+	+	+	+	+

Tablo 19 (Devam). BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri

wzt	Lipopolisakkarit O-antijen ABC taşıma sistemi ATP bağlayıcı bileşen	+	+	+	+	+
wzm	Lipopolisakkarit O-antijen ABC taşıma sistemi transmembran bileşeni	+	+	+	+	+
ugd	UDP-glukoz 6-dehidrojenaz	+	+	+	+	+
gnd	6-fosfoglukonat dehidrojenaz	+	+	+	+	+
cpsACP	Fosfataz PAP2 ailesi proteini	+	+	+	+	+
galF	UTP-glukoz-1-fosfat uridililtransferaz alt birimi GalF	+	+	+	+	+
rcsB	Transkripsiyonel düzenleyici	+	+	+	+	+
mrkH	Transkripsiyonel aktivatör	+	+	+	+	+
mrkI	LuxR ailesi düzenleyici protein	+	+	+	+	+

Tablo 19 (Devam). BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri

mrkJ	Fosfodiesteraz	+	+	+	+	+
mrkF	Tip 3 fimbrial minör pilin alt birimi	+	+	+	+	+
mrkD	Fimbrial adezin protein öncüsü	+	+	+	+	+
mrkC	Fimbrial biyogenez dış zar öncü protein	+	+	+	+	+
mrkB	fimbrial şaperon proteini	+	+	+	+	+
mrkA	Tip 3 fimbrial majör pilin alt birimi MrkA	+	+	+	+	+
fimB	Tirozin rekombinaz	+	+	+	+	+
fimE	Tirozin rekombinaz	+	+	+	+	+
fimA	Tip 1 majör fimbrial alt birim öncüsü	+	+	+	+	+
fimI	Tip 1 pilus biyosentezi fimbrial protein	+	+	+	+	+
fimC	Periplazmik şaperon	+	+	+	+	+

Tablo 19 (Devam). BacWGSTdb veri tabanı ile belirlenen virülans genleri ve bu genlerin görevleri

fimD	Dış zar öncü proteini	+	+	+	+	+
fimF	Tip 1 fibrial minör bileşen	+	+	+	+	+
fimG	Tip 1 fibrial minör bileşen	+	+	+	+	+
fimH	tip 1 fimbrial adezin öncüsü	+	+	+	+	+
fimK	transkripsiyonel düzenleyici	+	+	+	+	+

4.7.7. Plazmidlerin Bulunması, Plazmid Üzerindeki Virülans ve Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Örneklerin taşıdıkları plazmidler, bu plazmidler üzerinde bulunan direnç ve virülans genleri Tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20. PlasmidFinder veri tabanı ile belirlenen plazmid tipleri, bu plazmidler üzerinde bulunan direnç ve virülans genleri

Örnekler	**NCBI Adı**	**Plazmidler**	**Benzerlik Yüzdesi (%)**	**Direnç Genleri**	**Virülans Genleri**	
				ResFinder	VFDB	BacWGSTdb
DEUKp9961_18	NZ_CP061702	IncFIB (K) pCAV1099-14	100	-	-	-
	LR890253	Col(pHAD28)	94	-	-	-
DEUKp1212_19	NZ_AP021911	IncFIA (HI1)- IncR	98 100	*aac(3)-IId, aph(6)-Id, aph(3")-Ib* *qnrB1*, *sul2*, *dfrA14*, *bla*$_{\text{TEM-1A}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$	-	-
	LR890253	Col(pHAD28)	93	-	-	-
DEUKp4822_20	NZ_CP033759	Col(pHAD28)	92	-	-	-
	NZ_LR890495	ColI440I	93,69	-	-	-

Tablo 20 (Devam). PlasmidFinder veri tabanı ile belirlenen plazmid tipleri, bu plazmidler üzerinde bulunan direnç ve virülans genleri

DEUKp6718_20	CP031372	IncFIB(pNDM_Mar)- IncHI1(pNDM_MAR)	99,5 99,3	*armA, msrE, mphE*	-	-
	NZ_CP018315	IncL	99,8	*bla*$_{OXA-48}$	-	-
	NZ_KT203286	IncFIB(K)-IncHI1(K)	100-97,9	*catA1*	-	-
	NZ_AP018749	IncFIB(K)	99	-	-	-
	NZ_AP018752	IncR	100	-	-	-
	MW911670.1	IncFIB(pNDM_Mar)- IncHI1(pNDM_MAR)- IncR	97 99 100	*armA, msr(E), mph(E), sul2, catB3, bla*$_{OXA-1}$, *aac(6')-Ib-cr*	*iucABCD* *iutA*	*iucABCD* *iutA* *rmpA* *rmpA2*
	LR890593.1	Col(pHAD28)	93	-	-	-
DEUKp5889_19	NZ_MK715436	repB	100	-	*iucABCD* *iutA* *iroBCDN* *rmpA*	*iucABCD* *iutA* *iroBCDN* *rmpA* *rmpA2*

4.7.8. VFDB'de Karşılığı Olmayan Açık Okuma Çerçevelerinin Araştırılması

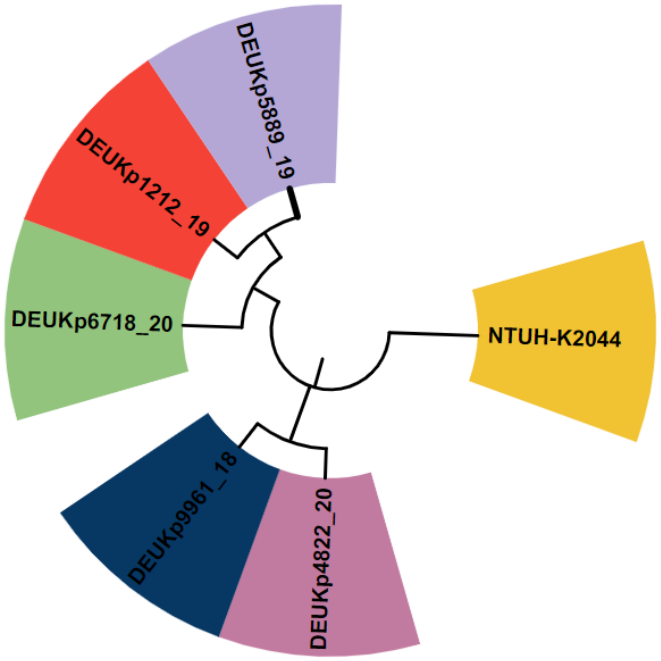
VFDB veri tabanında aracılığıyla elde edilen ORF dizileri, Pasteur Enstitüsü veri tabanı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucundan elde edilen protein ve enzimler Tablo 21'de gösterilmiştir.

Tablo 21. ORF'lere karşılık gelen enzim ve proteinler

İlişkili Bölge	Ürün	DEUKp9961_18	DEUKp1212_19	DEUKp4822_20	DEUKp6718_20	DEUKp5889_19
Kapsül	dTDP-glukoz 4,6-dehidrataz	orf00179	orf00182	orf00188	orf00180	orf00191
Kapsül	UTP--glukoz-1-fosfat uridililtransferaz	orf03681	orf03672	orf03595	orf03652	orf03715
T6SS	Rizopin bağlayıcı protein	orf03345	orf03352	orf03304	orf03304	orf03373
T6SS	Hipotetik protein	orf03344	orf02391 orf03351	orf03303	orf03303	orf03372

4.7.9. Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Tüm genom dizi alanizi yapılan beş çalışma izolatımız ve hipervirülan NTUH-K2044 standart suş için oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Çalışma izolatları ve standart suş arasındaki klonal ilişki

4.7.10. Ham Okuma Verilerinin Açık Veri Tabanlarında Yayınlanması

Tüm genom dizisi belirlenen örneklerin "Fasta" verileri NCBI-Genbank'a ve Pasteur Enstitüsü veri tabanına yüklenmiştir. Her bir örneğin Erişim Numarası, Bioproject ID (Identification) ve ID numaraları aşağıdaki gibidir.

Tablo 22. Ham Verilerin Erişim ve ID Numaraları

Örnekler	**GenBank**		**Pasteur Enstitüsü**
	Erişim Numarası	**Bioproject ID**	**ID Numarası**
DEUKp9961_18	CP112987	PRJNA886739	23331
DEUKp1212_19	CP110642	PRJNA894530	23332
DEUKp4822_20	CP113838	PRJNA904700	23333
DEUKp6718_20	CP113839	PRJNA904340	23334
DEUKp5889_19	CP113840	PRJNA904690	23335

5. TARTIŞMA

Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar halen dünyada önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelmekte ve *K. pneumoniae* bu enfeksiyonlarda en sık izole edilen bakteriler arasında yer almaktadır (6). Kan dolaşım enfeksiyonu gibi önemli sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlara neden olabilen bu bakteri, hem hastanede yatış süresini hem de mortaliteyi belirgin olarak artırmaktadır (9). Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonların ortaya çıkmasında sağlık kuruluşuna başvuru sıklığı ve/veya bu kuruluşlarda yatış süresi temel rol oynamaktadır. Sağlık kuruluşuna başvuru sonrasında bağırsakta gelişen patojen kolonizasyonu sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonların gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Kolonizasyondan sonra vücudun farklı bölgelerine yerleşen patojenler bu tip enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bağırsakta kolonize olabilen ve fırsatçı bir patojen olan *K. pneumoniae* hastaneye yatıştan sonra çeşitli enfeksiyonların gelişmesinde rol oynamaktadır. Avustralya'da yapılan bir çalışmada hastaneye başvurunun ilk üç gününde alınan rektal sürüntü örneklerinde, hastaların %5,9'unda *K. pneumoniae* kolonizasyonu görülürken, yoğun bakıma yatıştan üç gün sonra alınan rektal sürüntü örneklerinde hastaların %19'unda *K. pneumomiae* kolonizasyonu tespit edilmiştir (124). Yapılan diğer bir çalışmada sağlık kuruluşuna başvuran hastaların %23'ünün bağırsak sisteminde *K. pneumoniae* kolonizasyonu görülmüştür. Bu hastaların %5,2'sinde bağırsak dışı enfeksiyon gelişmiştir. Bağırsak sisteminde *K. pneumoniae* kolonizasyonu olmayan hastaların ise %1,8'inde *K. pneumoniae* kaynaklı enfeksiyon görülmüştür (125). Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlara neden olan diğer bir önemli faktör ise hastaneye yatıştan sonra tedavi sırasında yapılan invaziv işlemlerdir. İnvaziv işlemler sonucunda sağlık hizmeti ile ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu, cerrahi alan enfeksiyonu, üriner sistem enfeksiyonu ve pnömoni görülmektedir (126). Hastanelerde *K. pneumoniae*'nın yayılmasının ve salgınların ortaya çıkmasının diğer bir nedeni ise sağlık çalışanı ve hasta arasındaki temastır. Sağlık çalışanının *K. pneumoniae* ile kontamine olan elleri, temas ettiği yüzeyler ve ekipmanlar bakterinin yayılmasında kaynak görevi görmektedir (13). Sağlık hizmeti

ile ilişkili oluşan bu enfeksiyonlar, hastanın yatış nedeninin yanı sıra antimikrobiyal tedavi almasını zorunlu hale getirmektedir.

K. pneumoniae'nın önemli bir patojen olmasının temel sebebi, sahip olduğu virülans faktörleri ve horizontal gen transferi ile direnç genlerini kazanabilme özelliğidir (11,16,34). 1980'li yılların ortalarından bu yana *K. pneumoniae* kökenleri sahip oldukları virülans genlerine göre hipervirülan ve klasik *K. pneumoniae* olarak ikiye ayrılmaktadır (71). Taşıdığı direnç genlerinden dolayı neden olduğu enfeksiyonlarda sınırlı tedavi seçeneği olan klasik *K. pneumoniae*'lar genellikle sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlara neden olmaktadır. Son dönemlere kadar virülans özelliği ile ön plana çıkan hipervirülan *K. pneumoniae*'lar daha çok toplum kökenli enfeksiyonlara neden olmaktayken günümüzde sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlardan sorumlu kökenler arasında yer almaya başlamıştır (69).

Sağlık hizmeti ile ilişkili bir salgını ortaya çıkarmak ve/veya bakteriler arasındaki klonal yakınlığı belirlemek için sıklıkla kullanılan PFGE yöntemi, çalışmamızda on hipermukoviskoz *K. pneumoniae* arasındaki klonal ilişkiyi göstermek amacıyla kullanılmış ve birbirinden farklı beş klon tüm genom dizisi belirlenmek üzere seçilmiştir. Farklı klon olmalarının yanında örneklerin izole edildiği yıl, antimikrobiyal direnç profili ve *rpmA/rmpA2* gen varlığı da bu izolatların seçilmesinde dikkate alınmıştır. Böylece yapılan biyoinformatik analizler ile daha çeşitli virülans ve direnç genleri gösterilmiştir. Beş izolatın tüm genom dizisi Oxford Nanopore (MinION) platformu ile belirlenmiştir. Tüm genom dizisi belirlendikten sonra çeşitli veri tabanları kullanılarak izolatların kapsül tipleri, O antijen tipleri, sekans tipleri, virülans genleri, direnç genleri, taşıdıkları plazmidler, bu plazmidler üzerindeki virülans ve direnç genleri araştırılmış, bu izolatlar arasındaki klonal yakınlık gösterilmiştir.

Hipervirülan terimi kırk yılı aşkın bir süredir ortaya çıkmış olmasına rağmen hipervirülan *K. pneumoniae* için ortak bir tanım geliştirilememiştir. Hipervirülan *K. pneumoniae* her çalışmada ve coğrafi bölgede farklı tanımlanmıştır. Çin'de yapılan bir çalışmada pLVPK plazmidi taşıyan izolatlar hipervirülan olarak tanımlanırken

(127), yine Çin'de yapılan diğer bir çalışmada string test ve aerobaktin pozitif izolatlar hipervirülan olarak tanımlanmıştır (128). Fransa'da yapılan çalışmada ise string pozitif olan izolatlar hipervirülan olarak değerlendirilmiştir (129). Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *rmpA* ve *iucA* virülans genlerini taşıyan *K. pneumoniae* hipervirülan olarak tanımlanmıştır (130). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise *rmpA, rmpA2, iucA* ve *iroN* gibi daha çeşitli virülans genlerinin varlığı hipervirülan için referans alınmış, bu virülans genlerinin enfeksiyonun gelişmesi ve ilerlemesindeki rolünü ortaya koymak için daha ileri deneyler yapılmıştır. Yapılan deneylerde bu genleri taşıyan izolatların virülansı, yüksek virülansa sahip NTUH-K2044 *K. pneumoniae* kontrol suşu ile karşılaştırılmıştır. Hipervirülan olarak tanımlanan izolatların çoğunun NTUH-K2044 kontrol suşuna göre daha virülan olduğu ve seruma orta duyarlı ya da dirençli olduğu gösterilmiştir (131). Çalışmamızda sağlık hizmeti ile ilişkili kan dolaşım enfeksiyon etkeni *K. pneumoniae* izolatlarına string testi yapılmış ve yukardaki tanımlar doğrultusunda string pozitif izolatların hipervirülan özelliği araştırılmıştır.

Genellikle hipervirülan özellik ile ilişkilendirilen hipermukoviskoz fenotip, *K. pneumoniae*'nın virülans özelliği hakkında bilgi veren önemli bir belirteçtir. Çalışmamızda yer alan ve kan kültüründen izole edilen 244 *K. pneumonia* izolatı için yapılan string testinde on (%4,09) *K. pneumoniae* hipermukoviskoz olarak tanımlanmıştır. İlgili literatür ışığında seçilen spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizinde bu on hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatından sadece ikisinin *rmpA/rmpA2* genlerini taşıdığı görülmüştür (19,98). Türkiye'de 53 *K. pneumoniae* izolatının dahil edildiği bir çalışmada hipermukoviskoz fenotip gösteren sadece bir (%1,8) izolat tanımlanmış ve hiçbir izolatta *rmpA* geni tanımlanmamıştır (132). Ülkemizde hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı olup, virülansı arttıran bu fenotipin henüz yaygın olmadığı düşünülmektedir. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarındaki hipermukoviskoz fenotip oranı ve bu fenotipe sahip izolatlardaki *rmpA* ve/veya *rmpA2* pozitifliği Kore, Singapur, Çin, Tayvan, Rusya gibi Asya ülkelerinde daha fazla görülmektedir (8,83,85,128,133-135). İspanya'dan bildirilen

bir olgu raporunda; toplum kökenli karaciğer apsesi ve bakteriyemi görülen dört hastadan, hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izole edilmiş ve bu fenotipin ülkede yayın olmadığı ifade edilmiştir (136). Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* dağılımı coğrafi bölgeye ve yapılan çalışmaya göre değişkenlik göstermektedir. *K. pneumoniae* izolatlarında hipermukoviskoz fenotipin ülkemizde ve Asya dışındaki diğer dünya ülkelerinde henüz yaygın olmadı görülmektedir (137-140). Bunun yanında günümüzde hipermukoviskoz fenotipi belirlemek üzere yaygın olarak kullanılan test string testi olsa da, bu testin kantitatif bir analiz olmadığı, kültür koşullarından ve koloni yaşından etkilendiği, testi yapan kişinin tekniğine göre sonuçların değişkenlik gösterebileceği vurgulanmaktadır (141).

Kapsüler polisakkaritin aşırı ekspresyonu ile ortaya çıkan hipermukoviskoz fenotip, *rmpA* ve *rmpA2* gibi gen regülatörleri ile ilişkilendirilse de çalışmamızda hipermuviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının sadece %20'sinde *rmpA/rmpA2* genleri tanımlanmıştır. Tüm genom dizisi belirlenen hipermukoviskoz izolatların tamamında kromozom üzerinde bulunan, kapsül sentez regülatörü olan *rcsA* ve *rcsB* genleri saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, çalışmamıza benzer olarak hipermukoviskoz fenotip gösteren bir *K. pneumoniae* izolatının tüm genom dizisi belirlenmiş ve kapsül regülatörlerinden *rmpA* geninin olmadığı fakat izolatın *rcsAB* genlerini taşıdığı ifade edilmiştir (142). Daha önce mukoid olmayan *E. coli* ve *Salmonella* gibi bakterilerde tanımlanan ve pozitif regülatör olan *rcsA* geni, daha sonraki yıllarda bazı *Klebsiella* türlerinde de tanımlanmıştır. *rcsA* geni bir polisakkarit olan kolanik asit sentezinden sorumludur. Bazı *Klebsiella* türlerinde *rscA* geninin kolanik asit sentezini aktive ederek mukoid fenotipe neden olduğu gösterilmiştir (143). Yine diğer bir kapsül sentez regülatörü olan *rcsB* geninin gen ekspresyonunu arttırdığı ve *rmpA, rcsB* genlerinin hipermukoviskoz fenotipe katkı sağladığı ifade edilmiştir. *rcsB* ve *rmpA* genlerindeki mutasyonun hipermukoviskoz fenotipi etkilediği ve kapsül gen ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (144). Yapılan bir çalışmada *rmpA* geninin *rcsB* varlığında kapsüler polisakkarit sentezini aktive ettiği ifade edilmiştir (65)**.** Yaptığımız literatür taramasında *rcsAB* genlerinin kapsüler polisakkarit sentezine katkı sağladığı ifade edilse de, hipermukoviskoz fenotipe

neden olduğu konusunda kanıt değeri yüksek bir veri yer almamaktadır. Bu nedenle *rcsAB* gen varlığının ve aşırı ekspresyonunun bu fenotip üzerindeki etkisi üzerine yeni çalışmalara ve verilere gereksinim vardır. Ayrıca hipermukoviskoz fenotip gösteren izolatlardaki düşük *rmpA, rmpA2, magA* gen pozitifliği, bu izolatlarda hipermukoviskoz fenotipe neden olabilecek başka gen bölgelerinin varlığını düşündürmektedir.

Tüm genom dizisi belirlenen beş *K. pneumoniae* izolatının *wzi* gen dizi analizi ile Pasteur Enstitüsü veri tabanı kullanılarak kapsül tipleri belirlenmiştir. Çalışma izolatı DEUKp9961_18'in KL139, DEUKp1212_19'un K20, DEUKp4822_20'nin K62, DEUKp6718_20'nin K2, DEUKp5889_19'un ise K54 kapsül tipine sahip olduğu görülmüştür. Literatürde şimdiye dek yapılan çalışmalarda K2, K20 ve K54 kapsül tiplerinin hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları arasında yaygın olan kapsül tipleri olduğu görülmüştür (83-85,97,128,130,145,146). Özellikle çalışma izolatlarımızdan DEUKp6718_20'nin taşıdığı K2 kapsül tipine sahip izolatların daha virülan olduğu ve hastalığın şiddetini arttırdığı ifade edilmiştir (59,62,147). Yaptığımız literatür taramasında hipermukoviskoz köken fenotiplerinde ilk defa KL139 ve K62 kapsül tipleri bu çalışmada gösterilmiştir. Sahip olduğu kapsül tipine göre virülansı değişen *K. pneumoniae*, neden olduğu enfeksiyonlarda hastalığın şiddetini etkileyebilmektedir. Bu nedenle bu bakterilerin virülansı ile ilgili yapılan çalışmalarda kapsül tiplerini belirlemek ve hastanın prognozu ile ilişkisini takip etmek önemlidir.

Virülansa katkı sağlayan O antijenleri; serumdaki antibakteriyel proteinlere karşı (kompleman vb.) dirence neden olan, böylece bakterinin kolonize olmasını ve yayılmasını kolaylaştıran diğer önemli bir virülans faktörüdür (148-150). Bu çalışmada, izolatların O antijeni ile ilişkilendirilen *wzm* ve *wzt* gen dizi analizi Kaptive veri tabanı kullanılarak yapılmış ve O antijen tipleri belirlenmiştir. Çalışma izolatlarımızın hepsinin iyi, yüksek ve çok iyi benzerlikle O1/O2v1 lokusuna sahip O2 antijen alt türü olan O2a antijen tipine sahip olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada kan kültüründen izole edilen dokuz hipervirülan ve çoklu ilaç

direncine sahip *K. pneumoniae* izolatının Illumina Miseq ile tüm genom dizi analizi yapılmış ve bütün izolatların O1v1 lokusuna sahip olduğu görülmüştür (151). Eger ve arkadaşlarının yaptığı tüm genom analizi çalışmasında iki *K. pneumoniae* izolatının O antijen tipi Kleborate veri tabanı ile analiz edilmiş ve O1v1 lokusu (%98,60 benzerlik ile) taşıdığı gösterilmiştir (152). Kapsüler polisakkarit ve lipopolisakkarit, gün geçtikçe antimikrobiyallere direnci artan *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek önemli yüzey antijenleridir. Bu antijenlerin aşı ve faj tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabileceği ve alternatif bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (153). Bu nedenle bakterinin yüzey antijen tiplerini belirlemek, çeşitliliği ve çoğrafi dağılımını ortaya çıkarmak önem taşımaktadır.

Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ile ilgili yapılan çalışmalarda bu bakterilerin belli sekans tiplerinde yer aldığı görülmektedir. Hipermukoviskoz fenotip gösteren ve tüm genom dizisi belirlenen beş *K. pneumoniae*'nin hangi sekans tipine ait olduğunu belirlemek amacıyla Pasteur Enstitüsü ve CGE (MLST) veri tabanları kullanılmıştır. Yapılan PFGE'de uzak ilişkili bulunan çalışma izolatlarımızın biyoinformatik analizde de farklı sekans tipine ait olduğu görülmüştür. Pasteur Enstitüsü veri tabanında DEUKp9961_18, DEUKp1212_19, DEUKp4822_20, DEUKp5889_19 izolatları sırasıyla ST1322'de, ST268'de, ST461'de, ST29'da saptanırken, DEUKp6718_20 izolatı için herhangi bir ST saptanmamıştır. CGE (MLST) veri tabanı ile yapılan analizde ise bütün izolatlar için ST belirlenmiştir. CGE (MLST) veri tabanı ilk dört izolat için Pasteur Enstitüsü ile aynı sonuçları vermiş, bunun yanı sıra Pasteur Enstitüsü'nün belirleyemediği DEUKp6718_20 izolatı için ST14 (%99,9 benzerlik ile) sonucunu vermiştir. Literatürde sıklıkla görülen ve genellikle K2 kapsül tipine sahip izolatların bulunduğu ST65, ST86 ve ST375'e ait izolatlar, çalışmamızda saptanmamıştır (127,128,130,136,154,155). Hipermukoviskoz ile ilgili yapılan literatür taramasında çalışmamıza benzer olarak K2 kapsül tipine sahip izolatların ST14'e, K20 kapsül tipine sahip izolatların ST268'de, K54 kapsül tipine sahip izolatların ST29'da yer aldığı görülmüştür (85,129,145). Hem hipervirülan hem de KPC karbapenemazı

taşıyan ve birçok çalışmada tanımlanan ST11'de hiçbir çalışma izolatlarımızın yer almadığı görülmüştür (127,130,145). Karbapenem dirençli ve OXA-48 karbapenemaz geni taşıyan DEUKp6718_20 çalışma izolatımız ST14'te bulunmuştur. Türkiye'de kolistin dirençli *K. pneumoniae* ile ilgili yapılan bir çalışmada, çalışma izolatlarımızdan DEUKp5889_19'un bulunduğu ST29'da bulunan bir izolat kolistin dirençli olarak tanımlanmış, fakat çalışmada izolatın mukoid fenotipi ile ilgili bilgi verilmemiştir (156). ST29'un hem virülansı yüksek hem de kolistin dirençli kökenler taşıdığı görülmektedir. Bu ve benzeri kökenlerin neden olacağı sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyon ve salgınlara karşı önlem alınması gerekmektedir. Çalışma izolatlarımızdan birinin bulunduğu ST461'de daha önce klasik *K. pneumoniae* izolatları tanımlanmıştır (128). Yapılan literatür taramasında ST461 ve ST1322'e ait hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. Bu durum hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının yer aldığı grupların coğrafi bölgeye göre değiştiğini ve farklı gruplar arasında yayıldığını göstermektedir.

Hastalığın süresini ve şiddetini etkileyen, yüksek mortalite ile ilişkilendirilen bakteri virülansı çeşitli genler tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle bakterinin taşıdığı virülans genlerinin ve neden olduğu enfeksiyonların belirlenmesi önemlidir. *rmpA* ve *rmpA2* regülatör genlerini ve aerobaktin, salmochelin gibi sideroforları taşıyan hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae*'lar genellikle invaziv enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (136,157). Özellikle karaciğer apsesi ve vücudun diğer bölgelerinde görülen apselerden sonra ortaya çıkan enfeksiyonlarda hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae*'nin önemli rol oynadığı düşünülmektedir (128). Bu nedenle virülansı yüksek olduğu bilinen hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarının virülans genlerini belirlemek önem teşkil etmektedir. Bu amaçla Oxford Nanopore (MinION) platformu ile tüm genom dizisi belirlenen beş hipermukoviskoz *K. pneumoniae* virülans geni VirulenceFinder, VFDB ve BacWGSTdb gibi veri tabanlarıyla araştırılmış ve söz konusu veri tabanlarının performansları karşılaştırılmıştır. VirulenceFinder *Listeria, S. aureus, E. coli, Enterococcus* gibi bakterilerin virülans genlerini belirlemek için tasarlanmış bir veri

tabanıdır. *K. pneumoniae* virülans genlerinin analizi için *E. coli* seçilmiş ve sonuç olarak sadece *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da ortak bulunan siderofor reseptörü (*fyuA*), peptit sentetaz (*irp2*) ve aerobaktin reseptörü (*iutA*) virülans genleri tanımlanmıştır. Çeşitli bakteriler için geniş bir veriye sahip VFDB veri tabanı aracılığıyla *K. pneumoniae* ile ilişkili birçok virülans geni tanımlanmıştır. Bu veri tabanıyla Tip 3 fimbria ile ilişkili genler (*mrkABCDFHIJ)*, Tip I fimbria ile ilişkili genler (*fimABCDEFGHIK)*, siderofor ile ilişkili aerobaktin genleri (*iucABCD* ve iutA), enterobaktin genleri (*entABCDEFS*, *febABCDG* ve *fes*), salmochelin genleri (*iroBCDEN*) ve yersiniabaktin genleri (*fyuA, irp1, irp2, ybtAEPQSTUX*), allantoin kullanımı ile ilişkili genler (*allABCDRS*), kapsül regülatör genleri (*rscAB*), T6SS-I sekresyon sistemi ile ilişkili genler, (*clpV/tssH, dotU/tssL, hcp/tssD, icmF/tssM, impA/tssA, ompA, sciN/tssJ, tle1, tli1, tssF, tssG, vasE/tssK, vgrG/tssI, vipA/tssB, vipB/tssC*), T6SS-II sekresyon sistemi ile ilişkili gen (*clpV)*, T6SS-III sekresyon sistemi ile ilişkili genler (*dotU, icmF, impAFGHJ, sciN, vgrG*) tanımlanmıştır. Kolibaktin toksini kodlayan genler çalışma izolatlarımızın hiçbirinde saptanmamıştır. BacWGSTdb veri tabanı kullanılarak yapılan analizde VFDB ile elde edilen virülans genlerinin yanı sıra O antijeni ile ilişkilendirilen *wzt* ve *wzm* genleri belirlenmiş ve her beş izolatta bu genlerin varlığı tespit edilmiştir. Bu iki veri tabanının virülans genleri ile ilgili verdiği sonuçlar karşılaştırıldığında; siderofor ile ilişkili bazı genlerde (yersiniabaktin ile ilişkili genler; *fyuA, ybtE, ybtT, ybtA, ybtP, irp1* ve *irp2, ybtU* enterobaktin ile ilişkili genler; *entD* ve *ybdA*, aerobaktin ile ilişki gen; *iutA*) ve T6SS ile ilişkili bazı genlerde (*gsciN/tssJ ve icmF/tssM, tle1, vgrG/tssI, impA/tssA, vgrG/tssI*) uyumsuz sonuçlar saptanmıştır.

Sahip oldukları virülans genleri nedeniyle hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* kökenleri son yıllarda ön plana çıkmaktadır. Bu tip kökenler ile ilgili yapılan çalışmalarda, ilişkili genler hem PCR hem de tüm genom dizileme yöntemi ile araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kapsüler polisakkarit sentezinin artışından sorumlu genler (*magA, rmpA, rmpA2*) siderofor ile ilişkili genler (*iutA, iroN, ybtS, entB),* fimbrialar (*fimH, mrkD*) ve lipopolisakkarit sentezi ile ilişkili genler (*wabG, uge, ycfM*) araştırılmış ve hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* örneklerinin

çoğunda *wabG, entB, fimH, uge, mrkD* ve *ybtS* gibi virülans genleri saptanmıştır (127,130). Vargas ve arkadaşlarının çeşitli klinik örneklerden izole edilen 35 hipermukoviskoz karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı için yaptığı çalışmada adezyon ile ilişkili *mrkD, kpn* genleri izolatların %97,1'inde ve siderofor sentezi ile ilişkili *entB, iroN* genleri ise izolatların %94,3'ünde tanımlanırken, lipopolisakkarit ile ilişkili *wabG, uge* ve *ycfM* genleri sırasıyla izolatların %57,1 %48,5 ve %80'ninde tanımlanmıştır (158). Zhan ve arkadaşlarının karbapenem dirençli 21 hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatını dahil ettiği çalışmada, izolatların %100'ünde *ureA* ve *wabG* genleri, %95,2'sinde *fimH, entB, ycf, ybtS* genleri ve %90,5'inde *iutA* geni tespit edilmiştir. *rmpA* geni ise izolatların %57,1'inde tanımlanmıştır (88). Kong ve arkadaşları karbapenem dirençli K64 kapsül tipine sahip 16 *K. pneumoniae* izolatının Illumina platformu ile tüm genom dizi analizini yapmış ve VFDB veri tabanı kullanılarak virülans genleri tespit etmiştir. İzolatların %100'ünde aerobaktin (*iucABCD* ve *iutA*), %75'inde ise *rmpA2* virülans geni tanımlanmıştır (159). Çalışmamızda, tüm genom dizisi belirlenen beş hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatının ikisinde (%40) hipermukoviskoz fenotip ile ilişkili *rmpA* geni, izolatların üçünde (%60) yersiniabaktin ile ilişkili gen olan *ybtS* (%60), izolatların beşinde (%100) adezyon ile ilişkili *fimH, mrkD* ve siderofor ile ilişkili genler olan *iutA, iroN, entB* saptanmıştır. Diğer virülans genlerinden lipopolisakkarit ile ilişkili *wabG, uge* ve *ycfM* genleri, kapsül ile ilişkili *k2A, wcaG* genleri, hipermukoviskoz fenotip ile ilişkili diğer bir gen olan *magA*, adezyon ile ilişkili *kpn* geni ve yine virülansla ilişkilendirilen *allS, hly, cnf-1* genleri ise tüm genom dizisi belirlenen çalışma izolatlarımızın hiçbirinde saptanmamıştır.

Tip 1 ve Tip 3 fimbriaları kodlayan, adezyondan sorumlu *fimH, mrkD* genleri bakterinin canlı yüzeylerde kolonize olmasını, cansız yüzeylerde ise biyofilm oluşturmasını kolaylaştırmaktadır. *iutA, iroN, entB* genleri aracılığıyla aerobaktin, salmochelin, enterobaktin gibi sideroforlar sentezlenmekte ve bu sideroforlar aracılığıyla bakteri demir ihtiyacını konaktan karşılayarak kendine fayda sağlarken konağa zarar vermektedir. Tüm genom dizisi analizi yapılan her beş izolatımızda tanımlanan bu genler bakterinin virülansına doğrudan katkı sağlamaktadır.

Antimikrobiyallere duyarlı olsalar bile bu bakteriler ile enfekte hastaların iyileşme süresi uzamakta ve hatta immünsüpresif hasta için mortalite ile sonuçlanabilmektedir.

Direnç genlerinin yayılmasıyla birlikte gün geçtikçe bakterilerde antimikrobiyal direnç artmakta ve tedavi seçenekleri azalmaktadır. Artan antimikrobiyal direnç ile birlikte hasta başı maliyette, morbidite ve mortalitede de artış meydana gelmektedir. Tedavi öncesi antibiyogram yapılması ve direnç genlerinin belirlenmesi uygun tedavinin verilmesi açısından zorunlu hale gelmektedir. Direnç genlerinin araştırılması ve dirençli bakterilerin ortaya çıkarılması hem uygun tedaviyi belirlemek hem de direncin yayılmasını önlemek amacıyla önem taşımaktadır. Bu çalışmada on hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatının antimikrobiyal direnç profili disk-diffüzyon yöntemi ile araştırılmış ve sonuçlar EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda her on hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatta doğal direnç olan ampisilin direnci görülmüştür. On izolattan sekizinin imipenem, meropenem, ertapenem, amikasin, trimetoprim sulfametoksazol, siprofloksasin, gentamisin, amoksisilin klavulanik asit, piperasilin tazobaktam, sefotaksim, seftazidim gibi antimikrobiyallere duyarlı olduğu görülmüştür. β-laktam direnci olan izolatın imipenem, meropenem, ertapenem ve siprofloksasine artmış dozda duyarlılık gösterdiği, trimetoprim sulfametoksazol, gentamisin, amoksisilin klavulanik asit, sefotaksim ve seftazidime dirençli olduğu görülmüştür. Karbapenem direnci olan çalışma izolatımızın seftazidim hariç antibiyogramı yapılan bütün antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli olduğu görülmüştür. Yapılan PCR ve tüm genom dizi analizinde bu izolatın OXA-48 karbapenemazı taşıdığı tespit edilmiştir. İlk defa Türkiye'de bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanan OXA-48 karbapenemazı (40), ülkede endemik olup karbapenem direncine neden olan ve hala en sık rastlanan enzimdir (4,160-162). 2018 yılında izole edilen hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları birçok antimikrobiyale duyarlı iken, 2019 yılında izole edilen örneklerden birinde β-laktam direnci, 2020 yılında izole edilen örneklerden birinde ise karbapenem direnci olduğu

görülmüştür. Yukardaki veriler doğrultusunda hipermukoviskoz fenotip gösteren çalışma izolatlarımız arasında direncin yıllar içinde arttığı görülmektedir.

Bu çalışmada Oxford Nanopore (MinION) platformu ile tüm genom dizileri belirlenen beş izolatın direnç genleri ResFinder, CARD ve BacWGSTdb veri tabanları ile tanımlanmış, kromozom ve plazmid üzerinde taşınan direnç genleri ayrı ayrı analiz edilmiştir. ResFinder veri tabanları ile yapılan analizde *oqxB, oqxA* genleri, bla_{SHV} tipi β-laktamaz genleri ve *fosA* tipi direnç geni her beş izolatta tanımlanmıştır. CARD veri tabanları ile yapılan analizde, elde edilen antimikrobiyal direnç ontolojisine göre oqxA dışa atım pompası, fosA-tipi enzim ve SHV tipi β-laktamazlar tüm izolatlarda tanımlanmıştır. BacWGSTdb veri tabanı ile yapılan analizde ise her beş izolatta *oqxB, oqxA* genleri, bla_{SHV} β-laktamaz genleri saptanırken sadece DEUKp1212_19 izolatında *fosA* tipi geni saptanmamıştır. Bu veri tabanları ile belirlenen bu genlerin kromozom üzerinde taşındığı görülmüştür.

SHV β-laktamaz tipleri, dışa atım pompaları ve *fosA* geni ile ilgili her üç veri tabanı sonuçları arasında bazı farklılıklar olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, direnç genlerini belirlemek için yapılan analizlerde ResFinder veri tabanının SHV enzimini kodlayan gen tipleri açısından daha zengin ve çeşitliliği yüksek sonuçlar verdiği görülmektedir. CARD veri tabanı ise antimikrobiyal dirence neden olan dışa atım pompaları açısından daha çeşitli sonuçlar vermiştir. CARD veri tabanı diğer veri tabanlarından farklı olarak oqxA dışa atım pompasının bulunduğu RND grubunun yanı sıra MFS ve ABC grubuna ait bazı dışa atım pompaları için de sonuç vermiştir.

Virülans ve antimikrobiyal direnç genleri ile ilgili yapılan biyoinformatik analizlerde kullanılan veri tabanı sonuçlarında bazı farklılıklar belirlenmiştir. Her veri tabanının diğerine göre çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu veri tabanlarının güçlü yönleri ve sınırlılıkları kullanılan teknolojiden, seçilen referans genomdan etkilenebilmekte ve değerlendirmede farklılıklar ortaya çıkabilmektedir (163). Fenotipik duyarlılık yöntemleri ile karşılaştırılan veri tabanlarının duyarlılık ve özgüllüğü değişkenlik gösterebilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda direnç genlerini belirlemek üzere kullanılan ResFinder ve CARD veri tabanı sonuçları disk

difüzyon ve mikrodilüsyon sonuçları ile uyumlu bulunmuş olsa da çalışmamızda bazı farlılıklar saptanmıştır (164,165). Tüm genom dizisi belirlenen beş çalışma izolatımızdan üçü disk difüzyon yöntemi ile sadece ampisiline dirençli olarak belirlenmiş fakat, ResFinder veri tabanı bu izolatları sahip oldukları *oqxA* ve *oqxB* genlerinden dolayı trimetoprim, siprofloksasin, naliksik asid, kloramfenikol gibi antimikrobiyallere dirençli tanımlamıştır. CARD veri tabanı ise ABC, MFS ve RND grubuna ait dışa atım pompalarından kaynaklı bakterileri karbapenem, rifamisin, makrolid, aminoglikozid, sefalosporin, florokinolon, glisilsiklin, tetrasiklin gibi antimikrobiyallere dirençli tanımlamıştır. Bunun yanında CARD veri tabanı çalışma izolatlarımızda OmpA, OmpK37 gibi porinleri belirlemiş ve bu porinlerden kaynaklı izolatları monobaktam, karbapenem, sefalosporin, sefamisin gibi antimikrobiyallere dirençli tanımlamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda dışa atım pompalarını kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu ve/veya porinlerde oluşacak mutasyonların çeşitli antimikrobiyallere dirence neden olabileceği görülmektedir. Veri tabanları ile yapılan biyoinformatik analizler aracılığıyla sadece direnç genleri değil, bakterinin sahip olduğu ve hasta için risk oluşturabilecek genler de tanımlanmaktadır.

Hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ile ilgili yapılan çalışmalarda SHV tipi β-laktamazlar sıklıkla bildirilmektedir (84,127,128,158). Karbapenem dirençli 21 hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ile ilgili yapılan bir çalışmada izolatların %95'inin $bla_{\text{SHV-11}}$ geni taşıdığı görülmüştür (88). Tüm genom dizileme yöntemi ile yapılan çalışmalarda ise bla_{SHV} gen tiplerinin yanı sıra dışa atım pompasını kodlayan *oqxAB* genleri ve fosfomisin direnç geni *fosA* çalışmamız ile benzer olarak sıklıkla tanımlanmıştır. Illumina MiSeq platformu ile tüm genom dizisi belirlenen üç hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatının birinde β-laktamaz geni olan $bla_{\text{SHV-75}}$ ve *oqxAB* genleri, diğer bir izolatta $bla_{\text{SHV-11}}$ ve *oqxAB* genleri, üçüncü izolatta ise $bla_{\text{SHV-36}}$ ve $bla_{\text{CTX-M-15}}$, *oqxAB* genleri tanımlanmıştır (146). Başka bir çalışmada string testi pozitif olan yedi *K. pneumoniae* izolatının Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine) platformu ile tüm genom dizi analizi yapılmıştır. Bütün izolatlar bütün antimikrobiyallere duyarlı olmasına rağmen *oqxAB* genleri ve bla_{SHV} gen tipleri olan $bla_{\text{SHV-26}}$, $bla_{\text{SHV-75}}$ tanımlanmıştır (166). Karbapenem dirençli 107 *K.*

pneumoniae'nın Illumina Miseq ile tüm genom dizi analizinin yapıldığı bir çalışmada kromozomal β- laktamaz olarak *bla*$_{\text{SHV-1,11,12,28,77}}$ genleri tanımlanmıştır (167). Yapılan bazı çalışmalarda çalışmamıza benzer olarak *bla*$_{\text{SHV}}$ *oqxA, oqxB* ve *fosA* direnç genleri kromozom üzerinde tanımlanmıştır. (151,168).

Tüm genom dizi analizi yapılan her beş çalışma izolatımızda *fosA* geni tanımlanmış ve *fosA* geninin fosfomisin direncine etkisinin araştırıldığı çalışmalar incelenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, *fosA* geni taşıyan bütün izolatların fosfomisine dirençli olmadığı görülmüştür. KPC-2 karbapenemazı taşıyan ve PFGE ile aynı klonal gruba ait 16 *K. pneumoniae* izolatının Illumina platformu ile tüm genom dizisi belirlenmiş, direnç genleri ResFinder 4.1 ile tanımlanmış ve bütün izolatlarda *fosA* direnç geni saptanmıştır. Yapılan sıvı mikrodilüsyon sonucuna göre izolatların sadece dördü (%25) fosfomisine dirençli olarak belirlenmiştir (159). Elliott ve arkadaşlarının karbapenem dirençli 70 bakteriyi dahil ettiği bir çalışmada ise tüm genom dizileme analizinde bu bakterilerde *fosA* geni saptanmıştır. Fosfomisin direnci agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmış ve bu bakterilerin %16'si fosfomisine dirençli bulunmuştur (169). EUCAST rehberinde disk difüzyon yöntemiyle fosfomisine ait sınır değerler sadece üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* için verilmektedir. Buna göre *E. coli* kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan fosfomisin için <24 mm zon çapına veya diskin hemen etrafından başlayan yoğun zon içi üremeye sahip *E. coli* izolatları dirençli kabul edilmektedir. Diğer etken ve enfeksiyonlar için agar dilüsyon yöntemi önerilmektedir. Çalışmamızda veri tabanları ile yapılan analizde fosfomisini modifiye eden *fosA* direnç geni her beş izolatta tanımlanmıştır. Çalışmamızda yapılan disk difüzyon yönteminde bütün bakterilerin fosfomisin diski etrafında zon açtığı fakat, β-laktam ve karbapenem direnci olan iki izolatın zon içinde yoğun bir üreme gösterdiği görülmüştür. Yapılan bir çalışmada *fosA* geni taşıyan karbapemen dirençli izolatların fosfomisine dirençli olabileceği vurgulanmıştır (168). Çalışma izolatlarımız arasında fosfomisin diski etrafında yoğun zon içi üreme gösteren, β-laktam ve karbapenem direnci olan iki izolatın *fosA* gen ekspresyonuna sahip olduğu bu nedenle fosfomisine dirençli olduğu düşünülmektedir. *fosA* gen ekspresyonu

çeşitli bakterilerde fosfomisin direncine veya azalmış duyarlılığa neden olmaktadır. Çalışmamızda *fosA* tipi direnç genleri kromozom üzerinde tanımlanmış olsa da daha önce yapılan bazı çalışmalarda *fosA* geni transpozon ve/veya plazmid üzerinde de tanımlanmıştır. Bu nedenle *fosA* tipi direnç genlerini taşıyan izolatların bu geni diğer gram negatif bakteriler arasında yayılabileceği unutulmamalıdır (170).

Kromozom üzerinde bulunmayan, kromozomdan bağımsız çoğalabilen, çeşitli virülans ve direnç genlerini taşıyan plazmidler horizontal geçiş yolu ile bakteriler arasında yayılabilmektedir. Çalışmada hipermukoviskoz fenotip gösteren on *K. pneumoniae* izolatı için plazmid ekstraksiyonu yapılmış ve bütün izolatların plazmid taşıdığı görülmüştür. Tüm genom dizisi belirlenen beş izolatın taşıdığı plazmidlerin replikon grupları PlasmidFinder veri tabanı ile belirlenmiştir (151,171). DEUKp9961_18 izolatında IncFIB(K)pCAV1099-14 ve Col(pHAD28) plazmidleri DEUKp4822_20 izolatında ise Col(pHAD28) ve ColI440I plazmidleri tanımlanmıştır. β-laktam direnci olan DEUKp1212_19 izolatında bir plazmid dizisi üzerinde iki replikon grubu belirlenmiş hibrid plazmid olan IncFIA (HI1)/IncR plazmidi tanımlanmıştır. Bu izolatta tanımlanan diğer bir plazmid Col(pHAD28) plazmidi olmuştur. İlk defa NDM-1 taşıyan ST15'e ait *K. pneumoniae* izolatında tanımlanan 267242 bp uzunluğundaki IncH plazmid ailesine ait pNDM-MAR plazmidi çalışma izolatlarımızdan DEUKp6718_20'de saptanmıştır (172). DEUKp6718_20 izolatında IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR) plazmidinin yanı sıra, IncFIB(K)-IncHI1(K), IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR)-IncR, IncL, IncFIB(K), IncR, Col(pHAD28) gibi plazmidler tanımlanmıştır. DEUKp5889_19 izolatı için PlasmidFinder ile yapılan analizde replikon grubu olarak repB tanımlanırken, BacWGSTdb veri tabanı ile yapılan analizde IncFIB(K)(pCAV1099-114) sonucu alınmıştır. Çalışmamıza benzer olarak daha önce yapılan çalışmada *K. pneumonia* izolatlarında hibrit plazmidler tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, *K. pneumonia* üzerinde IncFII(K)/IncR, IncFII(K)/IncQ1, IncFIB(K)/IncFII(K)/IncQ1, IncHI1B(pNDM-MAR)/repB ve IncFIB(K)(pCAV1099- 114)/IncHI1B(pNDM-MAR)/IncQ1 gibi çoklu replikon gruplarına sahip plazmidler tanımlanmıştır (173). Shankar ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada kan kültüründen izole edilen hipervirülan ve çoklu ilaç direncine sahip *K. pneumoniae* izolatının tüm genom dizi analizi yapılmış ColKP3, IncFII plazmidleri ve IncFIB(K)-IncFII(K), IncHI1B/IncFIB (pNDM-MAR) hibrid plazmidleri tanımlanmıştır (151).

Belirlenen plazmidler üzerindeki direnç genleri ResFinder veri tabanları ile analiz edilmiştir. β-laktam direnci olan DEUKp1212_19 izolatında bulunan IncFIA (HI1)/IncR plazmidi üzerinde β-laktamaz genleri *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{TEM-1}}$, trimetoprim direnç geni *dfrA14*, florokinolon direnç geni *qnrB17*, sulfonamid direnç geni *sul2*, aminoglokozid direnç genleri *aac(3)-IId*, *aph(6)-Id*, *aph(3")-Ib* tanımlanmıştır. Karbapenem dirençli DEUKp6718_20 izolatında bulunan IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR) plazmidi üzerinde *armA, msrE, mphE* genleri, IncL plazmidi üzerinde *bla*$_{\text{OXA-48}}$, IncFIB(K)-IncHI1(K) plazmidi üzerinde *catA1* geni, IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR)- IncR plazmidi üzerinde ise, *armA msr(E), mph(E), sul2, catB3, OXA-1, aac(6')-Ib-cr* direnç genleri saptanmıştır.

Daha önce yapılan tüm genom dizi analizi çalışmalarında çalışmamıza benzer olarak çeşitli β-laktam direnç genleri (*bla*$_{\text{CTX-M}}$, *bla*$_{\text{KPC}}$, *bla*$_{\text{LEN}}$, *bla*$_{\text{TEM}}$) aminoglikozid direnç genleri (*aac(3)-IId, rmtB, aac3'-IIa*, *armA*) kloromfenikol (*catA1, catA2*), trimetoprim (*dfrA1, dfrA17*) ve florokinolon (*qnrS1*), sulfonamid (*sul1, sul2*), makrolid (*mphE, msrE*), tetrasiklin (*tetD*) gibi direnç genleri plazmid üzerinde tanımlanmıştır (151,159,168,174). Yapılan bir çalışmada kan kültüründen izole edilen hipervirülan ve çoklu ilaç direncine sahip *K. pneumoniae* izolatının tüm genom dizi analizi yapılmış ve IncHI1B/IncFIB (pNDM-MAR) plazmidi üzerinde *aadA2, armA, aac(6')-Ib-cr*, *bla*$_{\text{TEM-1A}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{OXA-1}}$, *mphE, msrE, sul1*, *tetD* direnç genleri saptanmıştır (151). Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çoklu replikon gruplarına sahip plazmidler üzerinde *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-55}}$, *bla*$_{\text{OXA-1}}$ ve *bla*$_{\text{TEM-1}}$, *aac (6')–Ib cr*, *aph (6)–Id ve aph (3')–Ib* genleri belirlenmiş, bazı plazmidlerin *sul1, sul2, sul3, tetA, tetG, qnr* ve *floR* taşıdığı görülmüştür (173). Bazı çalışmalarda SHV tipi beta laktamaz genleri plazmid üzerinde tanımlanmış olsa da çalışma izolatlarımızda SHV tipi beta laktamazları kodlayan genler sadece

kromozom üzerinde tanımlanmıştır (159,174). Karbapenem dirençli hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatları ile ilgili yapılan çalışmalarda karbapenemaz olarak genellikle KPC-2 karbapenemazı tanımlanmıştır, fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda bu fenotipi gösteren *K. pneumoniae* izolatlarında NDM, OXA-48 gibi karbapenemazlar da tanımlanmaktadır (87,88,137,158,159). Tüm genom dizisi belirlenen karbapenem dirençli çalışma izolatımız DEUKp6718_20'de ise OXA-48 karbapenemazı saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, çalışmamıza benzer olarak hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatında tanımlanan $bla_{\text{OXA-48}}$ geni IncL plazmidi üzerinde saptanmıştır (137). Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ile ilgili yapılan ve tüm genom dizisi Illumina Miseq platformu ile belirlenen diğer bir çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarında $bla_{\text{OXA-48}}$ IncL/M plazmidi üzerinde belirlenmiş ve direnç genlerinin bu plazmid aracılığıyla yayıldığı ifade edilmiştir (167).

Belirlenen plazmidlerin virülans genleri VFDB ve BacWGSTdb veri tabanları ile analiz edilmiştir. DEUKp6718_20 izolatında bulunan IncFIB(pNDM_Mar)-IncHI1(pNDM_MAR)-IncR hibrid plazmidi üzerinde çeşitli virülans genleri saptanmıştır. VFDB ile yapılan analizde *iucABCD* ve *iutA* gibi virülans genleri belirlenmiştir. BacWGSTdb veri tabanı ile yapılan analizde ise bu genlere ek olarak *rmpA* ve *rmpA2* genleri de tanımlanmıştır. DEUKp5889_19 izolatında plasmidFinder ile repB replikon grubunu taşıyan plazmid üzerinde VFDB veri tabanı ile *iucABCD, iutA, iroBCDN* ve *rmpA* virülans genleri saptanmıştır. BacWGSTdb veri tabanı ile bu genlerin yanı sıra *rmpA2* geni de tanımlanmıştır. Diğer plazmidler üzerinde herhangi bir virülans geni saptanmamıştır. Hipervirülan *K. pneumoniae* ile ilgili yapılan çalışmalarda virülans genleri genellikle pLVPK plazmidi ile yüksek benzerlik gösteren plazmidler üzerinde tanımlanmıştır. Bu plazmidlerin çalışmamıza benzer olarak aerobaktin ile ilişkili *iucABCD/iutA*, salmochelin ile ilişkili *iroBCDN* ve *rmpA/ rmpA2* virülans genlerini taşıdığı görülmüştür (174,175). Çalışmamızda BacWGSTdb veri tabanı ile yapılan analizde çalışma izolatlarımızdan DEUKp5889_19 numaralı izolatın taşıdığı plazmidin pLVPK plazmidi ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Yapılan diğer bir çalışmada IncFIB(K)-IncFII(K), ColKP3,

IncFII plazmidleri virülans plazmid olarak tanımlanmış ve bu plazmidlerin *iucABCD, iutA, rmpA2* virülans genlerini taşıdığı görülmüştür (151).

Bu çalışmada VFDB veri tabanı ile yapılan analizde bazı ORF bölgeleri için herhangi bir virülans geni tanımlanmamıştır. VFDB veri tabanı ile elde edilen bu ORF'lere ait nükleotid dizileri Pasteur Enstitüsü veri tabanı ile analiz edilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda bazı ORF bölgeleri ile ilişkili genler tanımlanmıştır. Tüm genom dizisi belirlenen her beş çalışma izolatımızda dTDP-glukoz 4,6-dehidrataz, UTP--glukoz-1-fosfat uridililtransferaz enzimleri, rizopin bağlayıcı protein ve hipotetik protein tanımlanmıştır. *K. pneumoniae* virülansı üzerine etkisi henüz belirlenemeyen bu enzim ve proteinler ile ilgili literatürde sınırlı çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanında moleküler işlevi henüz bilinmeyen ve önemli metabolik görevlerde yer aldığı düşünülen hipotetik proteinlerin, *Klebsiella* kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için geliştirilecek olan yeni ilaç ve aşıların hedefi olabileceği vurgulanmaktadır (176).

MEGA programı kullanılarak elde edilen filogenetik ağaçta DEUKp1212_19 ve DEUKp5889_19 izolatlarının birbirine daha yakın türler olduğu, DEUKp9961_18 ve DEUKp4889_20 izolatlarının ise birbirine daha yakın türler olduğu görülmüştür. Karbapenem dirençli DEUKp6718_20 izolatının DEUKp1212_19 ve DEUKp5889_19 izolatlarının bulunduğu gruba daha yakın bir tür olduğu görülmüştür. Hipervirülan ve ST23'te olduğu bilinen *K. pneumoniae* NTUH-K2044 standart suşunun çalışma izolatlarımızdan herhangi biri ile ortak atadan gelmediği ve uzak ilişkili bir tür olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada kan kültüründen izole edilen hipermukoviskoz fenotipe sahip *K. pneumoniae* izolatlarının elde edildiği on hastanın demografik verileri incelemiştir. Bu hastaların altısında primer kan dolaşım enfeksiyonu tanımlanırken dördünde sekonder kan dolaşım enfeksiyonu tanımlanmıştır. Hipermukoviskoz fenotipin sekonder bakteriyemiyle ilişkilendirildiği çalışmaya benzer olarak, bu çalışmada primer tanısı, idrar yolu enfeksiyonu (3 hasta) ve pnömoni (1 hasta) olan toplam dört hastada sekonder kan dolaşım enfeksiyonu görülmüştür (19).

Hipermukoviskoz *K. pneumoniae* kaynaklı kan dolaşım enfeksiyonu olan on hastadan sekizi seftriakson, sefepim, piperasilin-tazobaktam, siprofloksasin, ertapenem gibi antimikrobiyaller ile tedavi edilmiştir. Birçok antimikrobiyale duyarlı KL139 kapsül tipine sahip DEUKp9961_18 izolatı ile enfekte ve diyabet, periferik arter hastalığı, pankreas kanseri, tüberküloz öyküsü olan hasta seftriakson ile tedavi edilmeye çalışmış, fakat hasta hayatını kaybetmiştir. Primer enfeksiyonu pnömoni olan ve yüksek virülansla ilişkili K2 kapsül tipine sahip, karbapenem dirençli DEUKp6718_20 hipermukoviskoz *K. pneumoniae* ile enfekte hasta meropenem ile tedavi edilmeye çalışılmış, hasta hiçbir altta yatan hastalığı olmamasına rağmen hayatını kaybetmiştir. Literatürdeki çalışmalarda hipervirülan/hipermukoviskoz *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenem direncinin arttığı ve neden olduğu enfeksiyonların yüksek mortalite ile sonuçlandığı bildirilmiştir (97,177).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

K. pneumoniae ile ilişkili sekonder enfeksiyonların ortaya çıkmasında hastanın immün sisteminin yanı sıra bakterinin virülansı da önemli rol oynamaktadır. Çalışma evrenini oluşturan ve hipermukoviskoz fenotip gösteren on *K. pneumoniae* izolatının ikisinde *rmpA/rmpA2* genleri, aerobaktin kodlayan genler belirlenmiş ve her iki hipermukoviskoz *K. pneumoniae* hipervirülan olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında hipervirülan *K. pneumoniae* olarak tanımlanan bir çalışma izolatımızın OXA-48 enzimi taşıdığı ve karbapenem direncine sahip olduğu görülmüştür. Son yıllarda ön plana çıkan ve çeşitli direnç genlerini de kazanarak salgınlara neden olan hipervirülan *K. pneumonia* izolatlarının takibi için rutinde string testinin yapılması önerilmektedir.

Çalışma izolatlarımızın hepsinde dışa atım pompalarını kodlayan genler ve fosfomisini modifiye eden enzimi kodlayan genler saptanmıştır. Bu genlerin ekspresyonundaki artıştan kaynaklı oluşabilecek antimikrobiyal direnç göz önünde bulundurulmalı ve başta fosfomisin olmak üzere *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak antimikrobiyallerin direnç profili takip edilmelidir

Tüm genom dizileme teknolojisi kapsamında yapılan biyoinformatik analizler ile bakterinin taşıdığı plazmidler, virülans ve direnç genleri hızlı bir şekilde tanımlanabilmekte ve raporlanabilmektedir. Elde edilen bu veriler klinik takip açısından avantaj sağlamakta ve sağlık hizmeti ile ilişkili salgınlar sınırlanabilmektedir.

Klinik Mikrobiyoloji alanında yapılacak tüm genom dizileme çalışmaları bu teknolojiye katkı sağlayacaktır. Biyoinformatik analizlerde kullanılan veri tabanlarına yapılacak olan gerekli güncellemeler ile veri tabanları ve fenotipik duyarlılık yöntemleri arasındaki uyum artacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Moghadampour M, Salari-Jazi A, Faghri J. High rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* detected from hospital equipments in Iran. Acta Microbiol Immunol Hung. 2018; 65(4):529–38.
2. Sevinç C, Şahbaz S, Uysal Ü, Kilinç O, Ellidokuz H, İtil O, et al. Hastane kökenli pnömoni olgularında etken dağılımı ve prognoza etkili faktörler. Tüberküloz ve Toraks. 2007; 55(2):153–9.
3. Yiş R, Demiray Gündüz E, Sarı AN, Gülay Z. Spread of Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Our Hospital: Investigation of Molecular Typing and Clonal Relationship. Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg. 2021; 51(1):33–41.
4. Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir SŞ, Limoncu MH. Klinik *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Üretiminin Saptanmasinda Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Fenotipik Yöntemlerin Karşilaştirilmasi. Mikrobiyol Bul. 2017; 51(3):269–76.
5. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiology. 2014; 9(9):1071–81.
6. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae.* Nature Reviews Microbiology. 2020; 18(6): 344–59.
7. Taşbakan MI, Pullukçu H, Sipahi OR, Aydemir Ş, Arda B, Yamazhan T, et al. Hastane Kökenli Bakteriyemi Etkeni Olan *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Direnç Paternleri vee Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretimi: 2001-2005 Yıllarının Değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2008;42:1–7.
8. Kim D, Park BY, Choi MH, Yoon EJ, Lee H, Lee KJ, et al. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* affecting 30 day mortality in patients with bloodstream infection. J Antimicrob Chemother. 2019; 74(1):190–9.
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of healthcare-associated infections in intensive care units : HAI-Net ICU protocol, version 2.2. [Erişim Tarihi 29 Ocak 2022]. Erişim adresi: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/HAI-Net-ICU-protocol-v2.2_0.pdf
10. Zhang Y, Zeng J, Liu W, Zhao F, Hu Z, Zhao C, et al. Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China. J Infect. 2015; 71(5):553–60.
11. 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(17):1–17.

12. Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum SAFT, Huynen MA, Melchers WJG, van Schaik W, et al. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: The future of nosocomial outbreak analysis. Clinical Microbiology Reviews. 2017; 30(4): 1015–63.

13. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2018; 8(4):1-15.

14. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. Virulence. 2013; 4(2):107–18.

15. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae:* Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016; 80(3):629–61.

16. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems. Frontiers in Microbiology. 2019; 10(1100):1-14

17. Shu HY, Fung CP, Liu YM, Wu KM, Chen YT, Li LH, et al. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. Microbiology. 2009; 155(12):4170–83.

18. Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT. The role of *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. Microbiology. 2011; 157(12):3446–57.

19. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC, 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.

20. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun. 2004; 72(12):7107–14.

21. Hansen DS, Mestre F, Sebastia´ S, Alberti´, S, Alberti´, A, Herna´ndez S, et al. *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide O Typing: Revision of Prototype Strains and O-Group Distribution among Clinical Isolates from Different Sources and Countries. J Clin Microbiol. 1999; 37(1):56-62.

22. Regué M, Izquierdo L, Fresno S, Piqué N, Corsaro MM, Naldi T, et al. A second outer-core region in *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. J Bacteriol. 2005; 187(12):4198–206.

23. Clements A, Tull D, Jenney AW, Farn JL, Kim SH, Bishop RE, et al. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. J Biol Chem. 2007; 282(21):15569–77.

24. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. Infect Immun. 2008; 76(9):4055–65.

25. Wu CC, Huang YJ, Fung CP, Peng HL. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. Microbiology. 2010; 156(7):1983–92.

26. Di Martino P, Livrelli R, Sirot D, Joly B, Darfeuille-Michaud A. A New Fimbrial Antigen Harbored by CAZ-5/SHV-4-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Involved in Nosocomial Infections. Infect Immun. 1996 Jun;64(6):2266-73.

27. Hsieh PF, Liu JY, Pan YJ, Wu MC, Lin TL, Huang Y Te, et al. *Klebsiella pneumoniae* peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation. J Infect Dis. 2013; 208(10):1580–9.

28. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae* Outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(4):1485–93.

29. Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lépine F, Dozois CM, et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. Infect Immun. 2011; 79(8):3309–16.

30. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. Microbiol Mol Biol Rev. 2014; 78(3):510–43.

31. Zheng JX, Lin ZW, Chen C, Chen Z, Lin FJ, Wu Y, et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8(21):1-9.

32. Zhou M, Lan Y, Wang S, Liu Q, Jian Z, Li Y, et al. Epidemiology and molecular characteristics of the type VI secretion system in *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infections. J Clin Lab Anal. 2020; 34(11):1-8.

33. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. Infect Immun. 2009; 77(11):5016–24.

34. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews. 2017; 41(3):252–75.

35. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections. Antibiotics. 2019; 8(3):122

36. Aygül A. The importance of efflux systems in antibiotic resistance and efflux pump inhibitors in the management of resistance. Mikrobiyol Bul. 2015; 49(2):278-91.

37. BioRender. [Erişim Tarihi 28 Şubat 2022]. Erişim adresi: BioRender.com.

38. Bush K, Bradford PA. β-lactams and β-lactamase inhibitors: An overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016; 6(8):1-22.

39. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1985; 28(2):302-7.

40. Bamngartner JD, Glauser MP. Comparative study of imipenem in severe infections. J Antimicrob Chemother. 1983; 12: 141-8.

41. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae:* Here is the storm! Trends Mol Med. 2012; 18(5):263-72.

42. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae.* Emerg Infect Dis. 2011; 17(10):1791–8.

43. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β-lactamase bla_{KPC} gene. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(4):1257–63.

44. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009; 9(4):228-3.

45. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(1):15–22.

46. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. Microbiol Rev. 1993; 57(1):138-63.

47. Yiş R, Sarı Kaygısız AN, Gülay Z. Investigation of Plasmid-mediated High-level Aminoglycoside Resistance in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. Flora J Infect Dis Clin Microbiol. 2020; 25(3):423–32.

48. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(8):2565–71.

49. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(1):177–83.

50. Lesher GY, Froelich EJ, Gruett MD, Hays J, And B, Brundage RP. A New Class of Chemotherapeutic Agents. J Med Pharm Chem. 1962; 91:1063-5.

51. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase gyrB Gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(8):1647-50.

52. Pan X, Mark Fisher L. DNA Gyrase and Topoisomerase IV Are Dual Targets of Clinafloxacin Action in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(11):2810-6.

53. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends Microbiol. 2014; 22(8):438-45.

54. Wong MHY, Chan EWC, Chen S. Evolution and dissemination of OqxAB-like efflux pumps, an emerging quinolone resistance determinant among members of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(6):3290–7.

55. Livermore DM. Tigecycline: What is it, and where should it be used? J Antimicrob Chemother. 2005; 56(4):611–4.

56. Osei Sekyere J, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. J Appl Microbiol. 2016; 121(3):601-17.

57. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(9):4449–62.

58. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016; 16(2):161–8.

59. Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, et al. Finding order in the chaos: Outstanding questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. Infect Immun. 2021; 89(4):1-17.

60. Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, et al. Interleukin-17 and Lung Host Defense against *Klebsiella pneumoniae* Infection. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 25(3):335-40.

61. Moore TA, Moore BB, Newstead MW, Standiford TJ. γδ-T Cells Are Critical for Survival and Early Proinflammatory Cytokine Gene Expression During Murine *Klebsiella pneumonia* . J Immunol. 2000; 165(5):2643–50.

62. Wang L, Shen D, Wu H, Ma Y. Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils. PLoS One. 2017; 12(3):1-10.

63. Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae:* a review. Ann N Y Acad Sci. 2019 ; 1457(1):61-91.

64. Gülay Z. *Enterobacteriaceae* Moleküler epidemiyolojisi. Ankem Derg. 2014; 28:73–6.

65. Cheng HY, Chen YS, Wu CY, Chang HY, Lai YC, Peng HL. *RmpA* regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. J Bacteriol. 2010; 192(12):3144–58.

66. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43(8):4178–82.

67. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for *Klebsiella* strains. J Clin Microbiol. 2013; 51(12):4073–8.

68. Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. Infect Genet Evol. 2019; 74:103935

69. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Müdürlüğü. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Rehberi. [Erişim Tarihi: 16 Şubat 2022]. Erişim adresi: https://www.antalyasm.gov.tr/Duyuru/DuyuruDetay/698?page=blog#

70. World Health Organization. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide Clean Care is Safer Care. [Erişim Tarihi 29 Ocak 2022]. Erişim adresi: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf

71. Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? Virulence. 2017; 8(7):1111-1123.

72. Lee HC, Chuang YC, Yu WL, Lee NY, Chang CM, Ko NY, et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: Association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. J Intern Med. 2006; 259(6):606–14.

73. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang 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.

74. Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae:* Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7:483.

75. Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. Lancet Infect Dis. 2012; 12(11):881-7.

76. Russo TA, Shon AS, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Pomakov AO, et al. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than "classical" *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. PLoS One. 2011; 6(10).

77. Russo TA, Olson R, MacDonald U, Metzger D, Maltese LM, Drake EJ, et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2014; 82(6):2356–67.

78. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 2019; 32(3):1–42.

79. Yeh K, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung C, Lin J, 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.

80. Kabha K, Nissimov L, Athamna A, Keisari Y, Parolis H, Parolis LAS, et al. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 1995 ;63(3):847–52.

81. Lee CH, Chang CC, Liu JW, Chen RF, Yang KD. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. Virulence. 2014 ;5(6):673–9.

82. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. Microb genomics. 2016; 2(8):e000073.

83. 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.

84. Liu YM, Li B Bin, Zhang YY, Zhang W, Shen H, Li H, et al. Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in mainland China. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(9):5379–85.

85. Chen Q, Zhou J wei, Qiu C ning, Wang M min, Wang X jun, Ruan Z, et al. Antimicrobial susceptibility and microbiological and epidemiological characteristics of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains in a tertiary hospital in Hangzhou, China. J Glob Antimicrob Resist. 2018;15:61–4.

86. Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, et al. Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. 2015; 6(4):e00630.

87. Scaltriti E, Piccinelli G, Corbellini S, Caruso A, Latronico N, De Francesco MA. Detection of a hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-5 and OXA-48 carbapenemases with sequence type 383, Brescia, Italy. Int J Antimicrob Agents. 2020; 56(4):4–6.

88. Zhan L, Wang S, Guo Y, Jin Y, Duan J, Hao Z, et al. Outbreak by Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates with Carbapenem Resistance in a Tertiary Hospital in China. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7(182):1-9.

89. Sanikhani R, Moeinirad M, Shahcheraghi F, Lari A, Fereshteh S, Sepehr A, et al. Molecular epidemiology of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae:* a systematic review and meta-analysis. Iran J Microbiol. 2021; 13(3):257-265.

90. Guo Y, Wang S, Zhan L, Jin Y, Duan J, Hao Z. Microbiological and Clinical Characteristics of Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* Isolates Associated with Invasive Infections in China. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7(24):1-9.

91. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science. 1995; 269(5223):496-512.

92. Tagini F, Greub G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017; 36(11):2007-2020.

93. Makałowski W, Shabardina V. Bioinformatics of nanopore sequencing. J Hum Genet. 2020; 65(1):61-67.

94. Akyol, I., Yildiz, M.A., & Tutar, E. Yeni Nesil Nükleotid Dizileme Metotlarının Biyokimyasal Temelleri. 2017; 20(1):1–15.

95. Waseem H, Williams MR, Stedtfeld T, Chai B, Stedtfeld RD, Cole JR, et al. Virulence factor activity relationships (VFARs): a bioinformatics perspective. Environ Sci Process Impacts. 2017; 19(3):247–60.

96. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Moller N, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. J Clin Microbiol. 2014; 52(1):139–46.

97. Li W, Sun G, Yu Y, Li N, Chen M, Jin R, et al. Increasing Occurrence of Antimicrobial- Resistant Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Isolates in China. Clin Infect Dis. 2014;58:225–32.

98. Turton JF, Payne Z, Coward A, Hopkins KL, Turton JA, Doumith M, et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-st23 and 'non-hypervirulent' types ST147, ST15 and ST383. J Med Microbiol. 2018; 67(1):118–28.

99. Samuelsen Ø, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümmel A, Sundsfjord A. Identification of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Norway. J Antimicrob Chemother. 2011 Mar;66(3):670-2.

100. Kamel NA, El-tayeb WN, El-Ansary MR, Mansour MT, Aboshanab KM. Phenotypic screening and molecular characterization of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli recovered from febrile neutropenic pediatric cancer patients in Egypt. PLoS One. 2018; 13(8): e0202119.

101. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-β-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 2005; 43(7):3129–35.

102. Center for Disease Control and Prevention. Standard Operating Procedure For Pulsenet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. [Erişim Tarihi 27 Şubat 2022] Erişim adresi: https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf.

103. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33(9):2233–9.

104. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. Nat Biotechnol. 2019; 37(5):540–6.

105. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215(3):403–10.

106. Li H. Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics. 2018; 34(18):3094–100.

107. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. BMC Genomics. 2011; 12(1):402.

108. Harris RS. Improved Pairwise Alignment of Genomic DNA [doktora tezi]. Pennsylvania: The Pennsylvania State University; 2007.

109. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 2004; 14(7):1394-403.

110. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive web: User-Friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. J Clin Microbiol. 2018; 56(6):e00197-18.

111. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol. 2012; 50(4):1355–61.

112. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother. 2020; 75(12):3491–500.

113. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: Architecture and applications. BMC Bioinformatics. 2009; 10(421):1–9.

114. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(7):3348–57.

115. Ruan Z, Feng Y. BacWGSTdb, a database for genotyping and source tracking bacterial pathogens. Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D682–7.

116. Ruan Z, Yu Y, Feng Y. The global dissemination of bacterial infections necessitates the study of reverse genomic epidemiology. Brief Bioinform. 2020;21(2):741–50.

117. Feng Y, Zou S, Chen H, Yu Y, Ruan Z. BacWGSTdb 2.0: A one-stop repository for bacterial whole-genome sequence typing and source tracking. Nucleic Acids Res. 2021; 49(D1):D644–50.

118. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res. 2005;33(Database issue):325–8.

119. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2014; 52(5):1501–10.

120. Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutzd F. In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Sequencing Data. Jorunal Clin Microbiol. 2020; 58(10):e01269-20.

121. Galata V, Fehlmann T, Backes C, Keller A. PLSDB: A resource of complete bacterial plasmids. Nucleic Acids Res. 2019; 47(D1):D195–202.

122. Schmartz GP, Hartung A, Hirsch P, Kern F, Fehlmann T, Müller R, et al. PLSDB: Advancing a comprehensive database of bacterial plasmids. Nucleic Acids Res. 2022; 50(D1):D273–8.

123. Carattoli A, Zankari E, Garciá-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(7):3895–903.

124. Gorrie CL, Mirc Eta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. Clin Infect Dis. 2017; 65(2):208–15.

125. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, et al. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. mSphere. 2016; 1(5):e00261-16.

126. Masoudifar M, Gouya MM, Pezeshki Z, Eshrati B, Afhami S, Farzami MR, et al. Health care-associated infections, including device-associated infections, and antimicrobial resistance in Iran: The national update for 2018. J Prev Med Hyg. 2021; 62(4):E943–9.

127. Xu M, Fu Y, Fang Y, Xu H, Kong H, Liu Y, et al. High prevalence of KPC-2-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing meningitis in Eastern China. Infect Drug Resist. 2019; 12:641–53.

128. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China : antimicrobial resistance patterns , molecular epidemiology and risk factor. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2019; 9:1–11.

129. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F. Multiplex PCR for Detection of Seven Virulence Factors and K1 / K2 Capsular Serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. 2014; 52(12):4377–80.

130. Li J, Ren J. Risk factors and clinical outcomes of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced bloodstream infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018; 37(4):679-689.

131. Zhang Y, Jin L, Ouyang P, Wang Q, Wang R, Wang J, et al. Evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A multicentre, molecular epidemiological analysis. J Antimicrob Chemother. 2020; 75(2):327–36.

132. Kus H, Arslan U, Dagi HT, Findik D. Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2017; 51(4):329–39.

133. Tan TY, Ong M, Cheng Y, Ng LSY. Hypermucoviscosity, *rmpA*, and aerobactin are associated with community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore. J Microbiol Immunol Infect. 2019; 52(1):30–4.

134. Lee CH, Liu JW, Su LH, Chien CC, Li CC, Yang KD. Hypermucoviscosity associated with *Klebsiella pneumoniae*-mediated invasive syndrome: A prospective cross-sectional study in Taiwan. Int J Infect Dis. 2010; 14(8):e688–92.

135. Khaertynov KS, Anokhin VA, Rizvanov AA, Davidyuk YN. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis. Front Med (Lausanne). 2018; 5(225):1-9.

136. Sánchez-lópez J, García-caballero A, Francisco CN, Quereda C, Ruiz-garbajosa P, Navas E, et al. Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* : A challenge in community acquired infection. IDCases. 2019; 17:e00547.

137. Beyrouthy R, Dalmasso G, Birer A, Robin F, Bonnet R. Carbapenem Resistance Conferred by OXA-48 in K2-ST86 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, France. Emerg Infect Dis. 2020; 26(7):1529–33.

138. Klaper K, Wendt S, Lübbert C, Lippmann N, Pfeifer Y, Werner G. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of lineage st66-k2 caused tonsillopharyngitis in a german patient. Microorganisms. 2021; 9(1):1–6.

139. Alsaedi A, Janower A, Wang J, Nichol K. Hypermucoviscous *Klebsiella* Syndrome Without Liver Abscess in a Patient With Immunoglobulin G2 Immune Deficiency. Open Forum Infect Dis. 2014; 1(2):ofu080.

140. Caro C, Lincopan N, Esposito F, Illesca V, Rioseco ML, Lima CA, et al. Hypervirulent and hypermucoviscous extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* in Chile. Virulence. 2020; 12(1):35–44.

141. Walker KA, Miller VL. The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae.* Curr Opin Microbiol. 2020; 54:95-102.

142. Altayb HN, Elbadawi HS, Baothman O, Kazmi I, Alzahrani FA, Nadeem MS, Hosawi S, Chaieb K. Genomic Analysis of Multidrug-Resistant Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Strain Lacking the Hypermucoviscous Regulators (*rmpA*/*rmpA2*). Antibiotics (Basel). 2022; 11(596):1-18.

143. McCallum KL, Whitfield C. The rcsA gene of *Klebsiella pneumoniae* O1:K20 is involved in expression of the serotype-specific K (capsular) antigen. Infect Immun. 1991; 59(2):494–502.

144. Walker KA, Miner TA, Palacios M, Trzilova D, Frederick DR, Broberg CA, et al. A *Klebsiella pneumoniae* regulatory mutant has reduced capsule expression but retains hypermucoviscosity. MBio. 2019; 10(2):1–16.

145. Xu M, Fu Y, Kong H, Chen X, Chen Y, Li L, et al. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence of bla KPC, virulence factors and their impacts on clinical outcome. BMC Infect Dis. 2018; 18(1):1–9.

146. Kislichkina AA, Lev AI, Komisarova E V., Fursova NK, Myakinina VP, Mukhina TN, et al. Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous Klebsiella pneumoniae strains isolated in Russia. Pathog Dis. 2017;75(4):1–5.

147. Yu VL, Hansen DS, Wen CK, Sagnimeni A, Klugman KP, Von Gottberg A, et al. Virulence characteristics of Klebsiella and clinical manifestations of K. pneumoniae bloodstream infections. Emerg Infect Dis. 2007;13(7):986–93.

148. Merino S, Altarriba M, Izquierdo L, Nogueras MM, Regué M, Tomás JM. Cloning and sequencing of the Klebsiella pneumoniae O5 wb gene cluster and its role in pathogenesis. Infect Immun. 2000;68(5):2435–40.

149. Sahly H, Aucken H, Benedí VJ, Forestier C, Fussing V, Hansen DS, et al. Increased Serum Resistance in Klebsiella pneumoniae Strains Producing Extended-Spectrum -Lactamases †. 2004;48(9):3477–82.

150. Hsieh PF, Lin TL, Yang FL, Wu MC, Pan YJ, Wu SH, et al. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in Klebsiella pneumoniae causing pyogenic liver abscess. PLoS One. 2012;7(3).

151. Shankar C, Vasudevan K, Jacob JJ, Baker S, Isaac BJ, Neeravi AR, et al. Hybrid Plasmids Encoding Antimicrobial Resistance and Virulence Traits Among Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST2096 in India. Front Cell Infect Microbiol. 2022; 12(875116):1–13.

152. Eger E, Heiden SE, Becker K, Rau A, Geisenhainer K, Idelevich EA, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 420 with a chromosomally inserted virulence plasmid. Int J Mol Sci. 2021; 22(17):1–14.

153. Lam MMC, Wick RR, Judd LM, Holt KE, Wyres KL. Kaptive 2 . 0 : updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the *Klebsiella pneumoniae* species complex. 2022; 8(3):1–12.

154. Yu F, Lv J, Niu S, Du H, Tang YW, Pitout JDD, Bonomo RA, Kreiswirth BN, Chen L. Multiplex PCR Analysis for Rapid Detection of Klebsiella pneumoniae Carbapenem-Resistant (Sequence Type 258 [ST258] and ST11) and Hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) Strains. J Clin Microbiol. 2018; 56(9):e00731-18.

155. Kudo M, Matono T, Morita M, Izumiya H, Ohnishi M, Hasegawa J, et al. Molecular analysis of virulence factors of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* in a diabetes patient with multifocal intramuscular and musculoskeletal abscesses. J Infect Chemother. 2020; 26(1):110–4.

156. Can F, Menekse S, Ispir P, Atac N, Albayrak O, Demir T, et al. Impact of the ST101 clone on fatality among patients with colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. J Antimicrob Chemother. 2018; 73(5):1235-1241.

157. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D. 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.

158. Vargas JM, Moreno Mochi MP, Nuñez JM, Cáceres M, Mochi S, del Campo Moreno R, et al. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae.* Heliyon. 2019; 5(6):23–8.

159. Kong Y, Sun Q, Chen H, Draz MS, Xie X, Zhang J, et al. Transmission Dynamics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11 Strains Carrying Capsular Loci KL64 and *rmpA/rmpA2* Genes. Front Microbiol. 2021; 12(736896):1-12.

160. Ciftci IH, Karakece E, Asik G, Demiray T, Er H. An Investigation on the Presence of OXA-48 and KPC in Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae Strains*. Ankem Derg. 2013; 27(2):49–54.

161. Süzük Yildiz S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, Numanoğlu Çevik Y, Hekimoğlu CH, Kiliç S, et al. The epidemiology of carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in 2019 in Turkey. Mikrobiyol Bul. 2021; 55(1):1–16.

162. Okalin ŞŞ, Sarı Kaygısız AN, Ergon MC, Öktem İMA. Investigation of Carbapenemase Genes in Carbapenem Resistant Enterobacterales Isolates: First KPC Report From Dokuz Eylul University Hospital. Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg. 2021; 51(4):375–81.

163. Hendriksen RS, Bortolaia V, Tate H, Tyson GH, Aarestrup FM, McDermott PF. Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. Front Public Health. 2019; 7(242):1-17.

164. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(11):2640–4.

165. Shelburne SA, Kim J, Munita JM, Sahasrabhojane P, Shields RK, Press EG, et al. Whole-genome sequencing accurately identifies resistance to extended-spectrum β-lactams for major gram-negative bacterial pathogens. Clin Infect Dis. 2017; 65(5):738–45.

166. Shankar C, Veeraraghavan B, Nabarro LEB, Ravi R, Ragupathi NKD, Rupali P. Whole genome analysis of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates from community and hospital acquired bloodstream infection. BMC Microbiol. 2018; 18(1):1–9.

167. Becker L, Kaase M, Pfeifer Y, Fuchs S, Reuss A, von Laer A, et al. Genome-based analysis of Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from German hospital patients, 2008-2014. Antimicrob Resist Infect Control. 2018; 7(1):1–12.

168. Yu X, Zhang W, Zhao Z, Ye C, Zhou S, Wu S, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates with focus on antimicrobial resistance. BMC Genomics. 2019; 20(1):1–10.

169. Elliott ZS, Barry KE, Cox HL, Stoesser N, Carroll J, Vegesana K, et al. The Role of *fosA* in challenges with fosfomycin susceptibility testing of multispecies *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing clinical isolates. J Clin Microbiol. 2019; 57(10):1–8.

170. Yang T, Lu P, Tseng S. Update on fosfomycin-modified genes in *Enterobacteriaceae.* J Microbiol Immunol Infect. 2019; 52(1):9–21.

171. Lemon JK, Khil PP, Frank KM, Dekker JP. Rapid nanopore sequencing of plasmids and resistance gene detection in clinical isolates. J Clin Microbiol. 2017; 55(12):3530–43.

172. Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carta C, Carattoli A. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla*$_{\text{NDM-1}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ and *qnrB1* genes. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(7):1645–50.

173. Wang X, Zhao J, Ji F, Chang H, Qin J, Zhang C, et al. Multiple-Replicon Resistance Plasmids of *Klebsiella* Mediate Extensive Dissemination of Antimicrobial Genes. Front Microbiol. 2021; 12(754931):1–12.

174. Lam MMC, Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Fostervold A, Holt KE, et al. Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR *Klebsiella pneumoniae* ST15. J Antimicrob Chemother. 2019; 74(5):1218–22.

175. Wang X, Xie Y, Li G, Liu J, Li X, Tian L, et al. Whole-Genome-Sequencing characterization of bloodstream infection-causing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST374. Virulence. 2018; 9(1):510–21.

176. Pranavathiyani G, Prava J, Rajeev AC, Pan A. Novel Target Exploration from Hypothetical Proteins of *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 Reveals a Protein Involved in Host-Pathogen Interaction. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10(109):1–13.

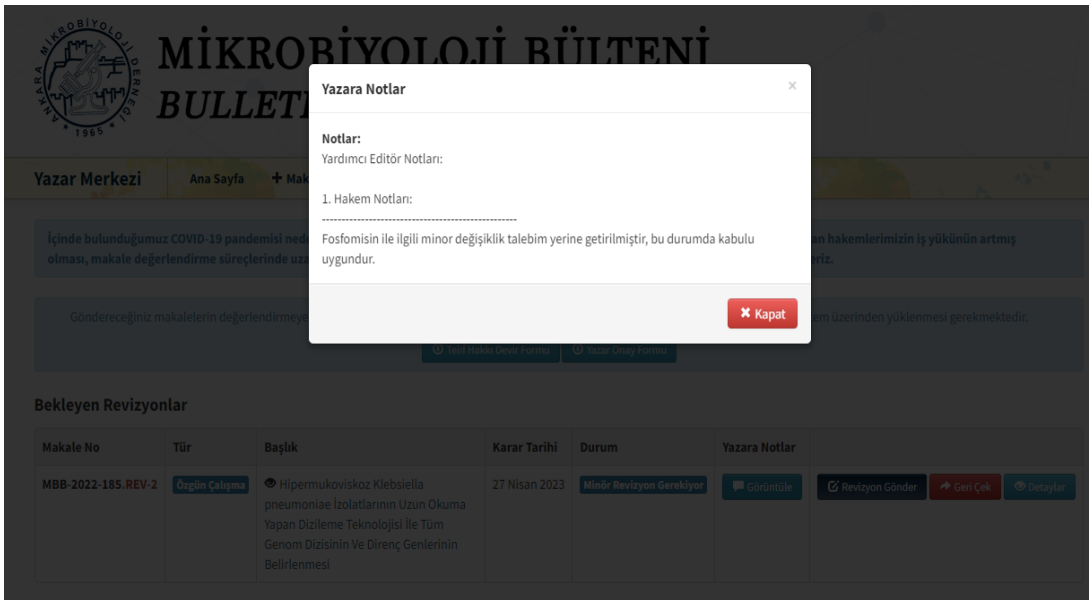
177. Liu Z, Gu Y, Li X, Liu Y, Ye Y, Guan S, et al. Identification and characterization of NDM-1-producing hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* in China. Ann Lab Med. 2019; 39(2):167–75.

8. EKLER

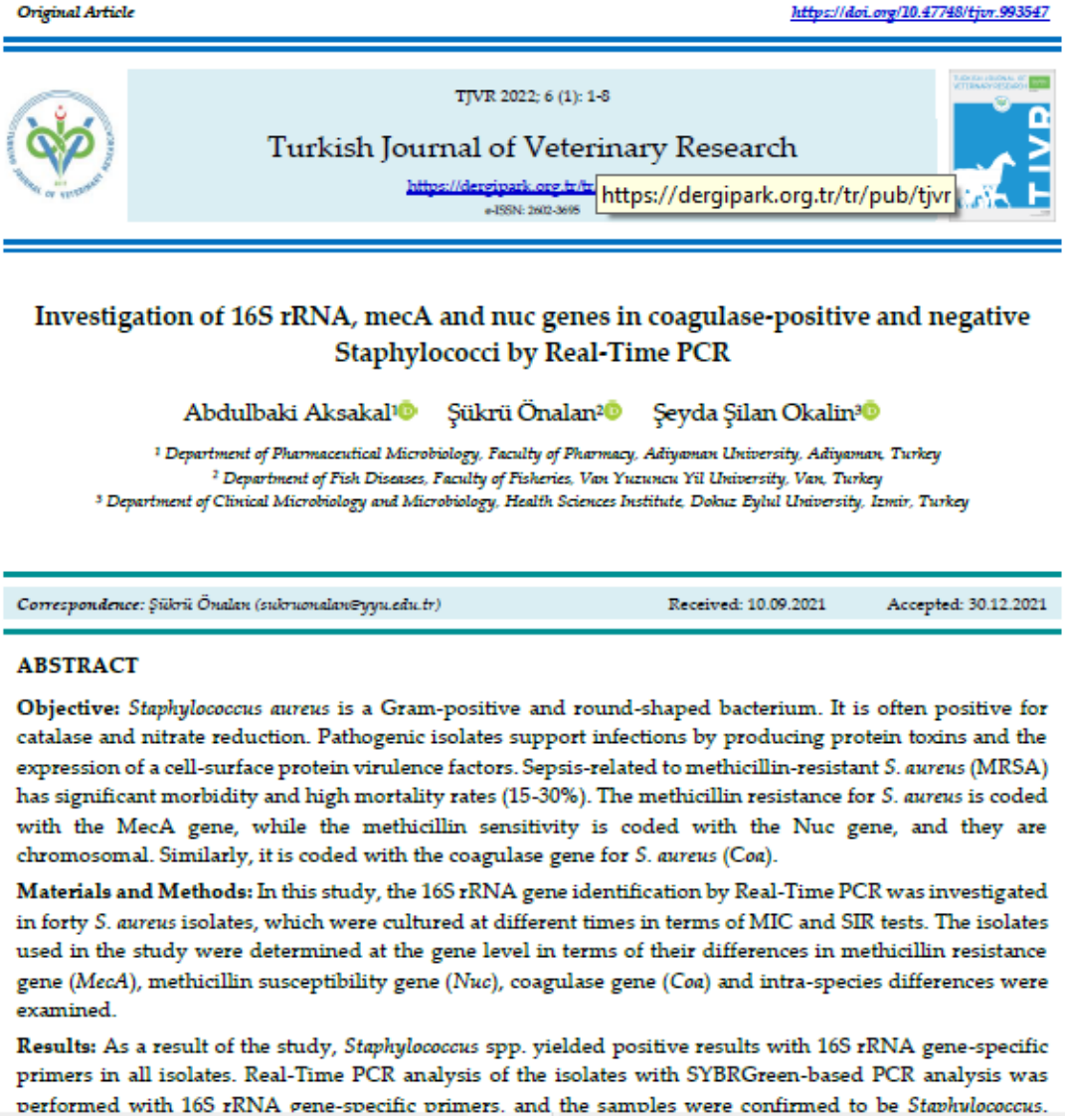
EK-1: TEZ İLE İLİŞKİLİ YAYINLAR

1. **Okalin ŞŞ,** Sarı Kaygısız AN, Öktem İMA. Hipermukoviskoz *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Uzun Okuma Yapan Dizileme Teknolojisi İle Tüm Genom Dizisinin Ve Direnç Genlerinin Belirlenmesi. Mikrobiyoloji Bülteni (Bu araştırma makalesi yayınlanmak üzere kabul edilmiştir).





2. Aksakal A, Önalan Ş, **Okalin ŞŞ.** Investigation of 16S rRNA, mecA and nuc genes in coagulase-positive and negative Staphylococci by Real-Time PCR. Turkish Journal of Veterinary Research. 2022; 6(1):1-8.



Original Article https://doi.org/10.47748/tjvr.993547

TJVR 2022; 6 (1): 1-8

Turkish Journal of Veterinary Research

https://dergipark.org.tr/tr/pub/tjvr

e-ISSN: 2602-3695

Investigation of 16S rRNA, mecA and nuc genes in coagulase-positive and negative Staphylococci by Real-Time PCR

Abdulbaki Aksakal[1] Şükrü Önalan[2] Şeyda Şilan Okalin[3]

[1] *Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Adiyaman University, Adiyaman, Turkey*
[2] *Department of Fish Diseases, Faculty of Fisheries, Van Yuzuncu Yil University, Van, Turkey*
[3] *Department of Clinical Microbiology and Microbiology, Health Sciences Institute, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey*

Correspondence: Şükrü Önalan (sukruonalan@yyu.edu.tr)

Received: 10.09.2021 Accepted: 30.12.2021

ABSTRACT

Objective: *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive and round-shaped bacterium. It is often positive for catalase and nitrate reduction. Pathogenic isolates support infections by producing protein toxins and the expression of a cell-surface protein virulence factors. Sepsis-related to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has significant morbidity and high mortality rates (15-30%). The methicillin resistance for *S. aureus* is coded with the MecA gene, while the methicillin sensitivity is coded with the Nuc gene, and they are chromosomal. Similarly, it is coded with the coagulase gene for *S. aureus* (Coa).

Materials and Methods: In this study, the 16S rRNA gene identification by Real-Time PCR was investigated in forty *S. aureus* isolates, which were cultured at different times in terms of MIC and SIR tests. The isolates used in the study were determined at the gene level in terms of their differences in methicillin resistance gene (*MecA*), methicillin susceptibility gene (*Nuc*), coagulase gene (*Coa*) and intra-species differences were examined.

Results: As a result of the study, *Staphylococcus* spp. yielded positive results with 16S rRNA gene-specific primers in all isolates. Real-Time PCR analysis of the isolates with SYBRGreen-based PCR analysis was performed with 16S rRNA gene-specific primers, and the samples were confirmed to be *Staphylococcus*.

3. **Okalin ŞŞ,** Sarı Kaygısız AN, Ergon MC, Öktem İMA. Investigation of Carbapenemase Genes in Carbapenem Resistant Enterobacterales Isolates: First KPC Report From Dokuz Eylul University Hospital. Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg. 2021; 51(4):375–81.

Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2021;51(4):375-81
doi:10.5222/TMCD.2021.94899

Araştırma / *Research Article*

Karbapenem Dirençli *Enterobacterales* İzolatlarında Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden İlk KPC Bildirimi

Investigation of Carbapenemase Genes in Carbapenem Resistant Enterobacterales Isolates: First KPC Report From Dokuz Eylul University Hospital

Şeyda Şilan Okalin*, Ayşe Nur Sarı Kaygısız*, Mahmut Cem Ergon, İbrahim Mehmet Ali Öktem****

* Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
** Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atıf/Cite as: Okalin ŞŞ, Sarı Kaygısız AN, Ergon MC, Öktem İMA. Karbapenem dirençli enterobacterales izolatlarında karbapenemaz genlerinin araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden ilk KPC bildirimi, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):375-81.

Öz

Amaç: *Son yıllarda Enterobacterales bakterileri arasında artan karbapenem direnci tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır. Bu direncin temel mekanizması karbapenemaz enzimlerinin üretimidir. Bu çalışmanın amacı; hastanemizde yatan hastalardan izole edilen karbapeneme dirençli Enterobacterales izolatlarının karbapenemaz gen çeşitliliğinin araştırılması ve KPC geni bulunan izolatların klonal ilişkilerinin değerlendirilmesidir.*

Yöntem: *Ocak 2019-Mart 2019 tarihleri arasında; idrar, kan, trakeal aspirat, yara ve balgam örneklerinden izole edilmiş olan ve karbapenem grubundaki antibiyotiklerden en az birine dirençli, 48 Enterobacterales izolatı çalışmaya dâhil edilmiştir. Enterobacterales izolatlarının; üçü Escherichia coli ve 45'i Klebsiella pneumoniae'dir. Bu izolatlarda; OXA-48, NDM, KPC, IMP ve VIM karbapenemaz gen varlığı özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir tepkimesi yöntemi ile araştırılmıştır. KPC geni taşıyan K. pneumoniae izolatları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla PFGE yöntemi kullanılmıştır.*

Bulgular: *Çalışma bulgularına göre üç E. coli izolatının ikisi blaOXA-48, biri blaKPC pozitif olarak tanımlanmıştır. Kırk beş K. pneumoniae izolatının ise 30'u yalnızca blaOXA-48, ikisi yalnızca blaNDM pozitif olarak bulunmuştur. K. pneumoniae izolatının yedisinde hem OXA-48 hem de NDM genleri tanımlanırken, geriye kalan altı K. pneumoniae izolatında yalnızca KPC gen pozitifliği bulunmuştur. IMP ve VIM karbapenemaz genleri çalışma izolatlarının hiçbirinde saptanmamıştır. KPC geni taşıyan K. pneumoniae izolatları arasındaki klonal ilişkinin araştırılması amacıyla yapılan PFGE analizinde dört izolatın aynı pulsotipe (A), diğer iki izolatın ise farklı pulsotiplere (B-C) ait olduğu görülmüştür.*

Sonuç: *Bu çalışma, yapılan literatür taramasından elde edilen verilere göre KPC karbapenemaz geninin, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden bildirildiği ilk çalışmadır.*

Anahtar kelimeler: *Karbapenemaz, Enterobacterales, KPC*

ABSTRACT

Objective: *In recent years, increasing carbapenem resistance of Enterobacterales bacteria limits treatment options, considerably. The main mechanism of this resistance is the production of carbapenemase enzymes. The aim of this study is to determine carbapenemase gene types in Enterobacterales isolates from our hospitalized patients and assess the clonal associations of the isolates with KPC gene*

Alındığı tarih / Received:
21.06.2021 / 21.June.2021

Kabul tarihi / Accepted:
27.07.2021 / 27 July 2021

EK-2:ETİK KURUL

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. İ.Mehmet Ali Öktem

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4827-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☒	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Hastane Kaynaklı Kan Dolaşımı Enfeksiyon Etkeni Klebsiella Pneumoniae Virülans Genlerinin Tüm Genom Dizileme Yöntemi İle Değerlendirilmesi**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. İ.Mehmet Ali Öktem Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji A.D.	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ☒

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2019/15-11**	**Tarih:19.06.2019**
	Prof.Dr. İ.Mehmet Ali Öktem 'in sorumlusu olduğu **"Hastane Kaynaklı Kan Dolaşımı Enfeksiyon Etkeni Klebsiella Pneumoniae Virülans Genlerinin Tüm Genom Dizileme Yöntemi İle Değerlendirilmesi"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER (Başkan Yardımcısı)	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

EK-3: ÖZGEÇMİŞ

ŞEYDA ŞİLAN OKALİN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi	Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Telefon	
E-posta	
İnternet Sayfası	

Öğrenim Bilgileri

25 Ağustos 2017 - Şu Anda (5 yıl 3 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MİKROBİYOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.66 / 4.0

12 Eylül 2014 - 27 Ocak 2017 (2 yıl 5 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: 2016008
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 90.5 / 100.0

01 Eylül 2009 - 03 Temmuz 2014 (4 yıl 11 ay)
Lisans, Anadolu/Normal Öğretim, YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
KİMYA-METALURJİ FAKÜLTESİ, BİYOMÜHENDİSLİK PR.
Diploma Numarası: 2014-L-2452
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.07 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Nisan 2020 - 01 Haziran 2022 (2 yıl 3 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMACI, TÜRKİYE SAĞLIK ENSTİTÜLERİ BAŞKANLIĞI

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Sağlık Bilimleri -- Eczacılık -- Temel Eczacılık Bilimleri -- Farmasötik Mikrobiyoloji

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Mikrobiyoloji -- Bakteriyoloji

Anahtar Kelimeler

Virülans

Antimikrobiyal Direnç

Tüm Genom Dizilema

Hastane Enfeksiyonları

Bivoinformatik

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

A. AKSAKAL, Ş. ÖNALAN & Ş. Ş. OKALİN, Investigation of 16S rRNA, mecA and nuc genes in coagulase-positive and negative Staphylococci by Real-Time PCR, Turkish Journal of Veterinary Research, 2021, 2602-3695, 6, 1, 1-8.

Ş. Ş. OKALİN, A. N. SARI KAYGISIZ, M. C. ERGON & İ. M. A. ÖKTEM, Karbapenem Dirençli Enterobacterales İzolatlarında Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi?nden İlk KPC Bildirimi, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2021, 0258-2171, 51, 4, 375-381.

Ş. Ş. OKALİN & A. AKSAKAL, Kronik Süpüratif Otitis Medialı Hastalardan Staphylococcus aureus Suşlarının İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2020, 0258-2171, Cilt 50, Sayı 3, 148-55.

Bildiriler

A. AKSAKAL, Ş. ÖNALAN & Ş. Ş. OKALİN, Koagulaz Pozitif ve Negatif Stafilokoklarda 16S rRNA, mecA and nuc Genlerinin Real-Time PCR ile Araştırılması, Özet Bildiri, Uluslararası Tıp, Yaşam Bilimleri ve Sağlık Hizmetleri Kongresi (UTYAB), 21 Şubat 2022, 23 Şubat 2022.

Ş. Ş. OKALİN, A. N. SARI KAYGISIZ & İ. M. A. ÖKTEM, Hipermukoviskoz K. pneumoniae İzolatlarının Belirlenmesi ve Direnç Genlerinin Araştırılması, Sözlü Sunum, TMC 2020 Çevrim İçi Mikrobiyoloji Sempozyumu , 25 Aralık 2020, 27 Aralık 2020.

Ş. Ş. OKALİN, A. N. SARI KAYGISIZ, M. C. ERGON & İ. M. A. ÖKTEM, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Karbapenem Dirençli Enterobacterales İzolatlarında Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması: İzmir?den İlk KPC Bildirimi, Sözlü Sunum, I. Ulusal Tek Sağlık Sempozyumu, 21 Kasım 2019, 23 Kasım 2019.

R. YİŞ, A. N. SARI KAYGISIZ, Ş. Ş. OKALİN & İ. M. A. ÖKTEM, KARBAPENEMAZ ÜRETEN K. PNEUMONİAE İZOLATLARININ SAPTANMASINDA BD PHOENİX CPO EMERGE KİT?İN POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ İLE UYUMUNUN ARAŞTIRILMASI, Sözlü Sunum, 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Ekim 2019, 01 Kasım 2019.

A. N. SARI KAYGISIZ, Ş. Ş. OKALİN & Z. GÜLAY, Hızlı karbapenemaz saptama kiti BIO-RAD ? CARBA Test? testinin etkinliğinin araştırılması, Sözlü Sunum, Uluslararası XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 04 Kasım 2018, 08 Kasım 2018.

A. AKSAKAL & Ş. Ş. OKALİN, Kronik Süpüratif Otitis Medial Hastalardan İzole edilen Staphylococcus aureus İzolasyonu ve İn Vitro Antibiyotik Duyarlığnn Araştırılması, Poster Sunumu, Uluslararası 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi, 26 Nisan 2017, 29 Nisan 2017.

Yönetilen Tezler

Ş. Ş. OKALİN (Tez Yazarı) , A. AKSAKAL (Tez Danışmanı) , Kronik Süpüratif Otitis Medialı Hastalardan Staphylococcus aureus Suşlarının İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması, ECZACILIK TEMEL BİLİMLER (YL) (TEZLİ), SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 2017.