T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HASTANE İNFEKSİYONU ETKENİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE* SUŞLARINDA ÇEŞİTLİ VİRULANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Halit KUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç.Dr. Uğur ARSLAN

KONYA-2015

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HASTANE İNFEKSİYONU ETKENİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE* SUŞLARINDA ÇEŞİTLİ VİRULANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Halit KUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç.Dr. Uğur ARSLAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11202035 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Hastane Kaynaklı *Klebsiella pneumoniae* suşlarında virulans faktörlerinin genotipik ve fenotipik araştırılması adlıçalışmamda her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Uğur ARSLAN, tezin tüm aşamalarında yardımlarını gördüğüm TıbbiMikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, Prof. Dr. E. İnci TUNCER, ve Yrd. Doç. Dr. Hatice TÜRK DAĞI'na, Yüksek lisans Öğrencisi Şerafettin KEYİK'e, dönem arkadaşım ve Mikrobiyoloji çalışanlarından Tuba SEYHAN'a en içten şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca tezimin her kademesinde şahsıma gösterdikleri iyi niyet, yakın arkadaşlık ve yardımları için Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı asistan ve çalışanlarına minnet, sevgi ve saygılarımı sunar, beni destekleyen iş arkadaşlarıma ve canım aileme teşekkür ederim.

Halit KUŞ

KONYA-2015

İÇİNDEKİLER Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR İV

1 GİRİŞ 1

1.1 *Enterobacteriaceae* Ailesi : 1

1.1.1 *Enterobacteriaceae* Ailesinin Genel Özellikleri ve Morfolojileri : 1

1.1.2 *Enterobacteriaceae* Ailesinin Biyokimyasal Özellikleri: 1

1.1.3 *Enterobacteriaceae* Ailesinin Antijenik Yapıları: 1

1.1.4 *Enterobacteriaceae* Ailesinin Patogenezi ve Yaptığı Hastalıklar: 2

1.2 *Klebsiella* Türleri: 3

1.2.1 *Klebsiella* Türlerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri: 3

1.2.2 *Klebsiella* Genusunun Taksonomisi: 3

1.2.3 *Klebsiella* Türlerinin Ayırımı: 5

1.2.4 *Klebsiella pneumoniae*'nin Virulans Faktörleri 6

1.2.5 *Klebsiella pneumoniae*'nin Yaptığı Hastalıklar: 23

1.2.6 *Klebsiella pneumoniae* ve Hastane Enfeksiyonları: 24

1.2.7 *Klebsiella pneumoniae* ve Antibiyotiklere Karşı Direnç 26

2 GEREÇ VE YÖNTEM 28

2.1 *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Tanımlanması 30

2.2 Alfa Hemoliz Oluşumunun Araştırılması 30

2.2.1 %5 Koyun Kanlı Agar'da Alfa Hemoliz Oluşumunun Araştırılması 30

2.2.2 Triptik Soy Broth'da Alfa Hemoliz Oluşumunun Araştırılması 31

2.3 Kapsül Varlığının Araştırılması 31

2.4 Hipermukoviskosite Varlığının Araştırılması 31

2.5 Biyofilm Oluşumunun Araştırılması 32

2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *K. pneumoniae* Suşlarında Virulans Genlerinin Gösterilmesi 32

2.6.1 DNA izolasyonu 32

2.6.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu 33

3 BULGULAR 37

4 TARTIŞMA 43

5 SONUÇ ve ÖNERİLER 47

6 KAYNAKLAR 49

7 EKLER 59

Ek A: Etik Kurul Kararı 59
8 ÖZGEÇMİŞ 60

SİMGELER VE KISALTMALAR

β	**:**	Beta
BAL	**:**	Bronkoalveolar Lavaj
BOS	**:**	Beyin Omirlik Sıvısı
°C	**:**	Celsius
CPS	**:**	Kapsüler Polisakkkarit Sentezi
DNA	**:**	Deoksiribonükleik Asit
ECA	**:**	*Enterobacteriaceae* Common Antigen
EDTA	**:**	Etilen Diamin Tetra asetik Asit
EMB	**:**	Eozin Metilen Blue
EPS	**:**	Ekzopolisakkarit
GSBL	**:**	Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
GİS	**:**	Gastrointestinal Sistem
H antijen	**:**	KirpikAntijen
H_2S	**:**	Hidrojen Sülfür
IMVIC	**:**	İndol, Metil Red, Voges Proskauer, Sitrat
K antijen	**:**	Kapsül antijen
LB	**:**	Luria Broth
LPS	**:**	Lipopolisakkarit
µm	**:**	Mikrometre
µl	**:**	Mikrolitre
mg	**:**	Miligram
MHA	**:**	Mueller Hinton Agar
MİK	**:**	Minimum İnhibitor Konsantrasyonu
ml	**:**	Mililitre
mm	**:**	Milimetre
MRHA	**:**	Mannoz Dirençli Hemaglütinasyon
MSHA	**:**	Mannoz Duyarlı Hemaglütinasyon
nm	**:**	Nanometre
O antijen	**:**	SomatikAntijen
PBS	**:**	Fosfat Buffer Salin
PCR	**:**	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pH	**:**	Hidrojen Potansiyeli
rpm	**:**	Dakikadaki Devir Sayısı
TBE	**:**	Tris/Borik Asit/EDTA Tampon Çözeltisi
TSI	**:**	Three Sugar Iron
ÜSİ	**:**	Üriner Sistem İnfeksiyonu

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Çeşitli Virulans Faktörlerinin Araştırılması

Halit KUŞ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2015

Klebsiella pneumoniae genellikle immünsüpresif hastaları etkileyen fırsatçı bir patojendir ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olur. *K. pneumoniae* özellikle kapsül polisakkariti, hipermukoviskozite, fimbria, toksinler ve demir alım determinantları gibi pek çok virulans faktörüne sahiptir. Bu çalışmanın amacı iki yıl içerisinde hastane kaynaklı enfeksiyonlardanizole edilen*K. pneumoniae* suşlarında çeşitli virulans faktörlerini belirlemektir.

İzolatların tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testleri VITEK 2 otomatik sistemi ile yapıldı. Biyofilm yapabilme yetenekleri, alfa hemolizin üretimi, kapsül ve hipermukoviskoziteözelliklerifenotipik yöntemlerle araştırıldı. Adezin kodlayan virulans genleri (*fimH-1*, *mrkD, kpn, ycfM*), siderefor genleri (*entB*: enterobactin, *iutA*: aerobactin, *irp-1, irp-2, ybtS, fyuA*: yersiniabactin*, iroN*: catechols receptor) protektin veya invazin (*rmpA, magA, traT*), toksin (*hlyA, cnf-1*) virulans genlerinin varlığıpolimeraz zincir reaksiyonu ile araştırıldı.

Çalışmada 2011-2013 yılları arasında hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen 53 *K. pneumoniae* suşu çalışmaya alınmıştır. Örneklere göre izolatların dağılımı şu şekildedir: 14'ü (%26,4) idrar, 13'ü (%24,5) kan,10'u (%18,9) drenaj sıvısı, 8'i (%15,1) yara, 7'si (%13,2) bronko-alveolar lavaj ve 1'i (%19) beyin-omurilik sıvısından üretilmiştir. Kapsül, biyofilm formasyonu ve hipermukoviskozite sırası ile %100, %79,2, ve %1,9 olarak pozitif görülmüştür. Alfa hemolizin tespit edilmemiştir.*entB* (%96,2), *ycfM* (%86,8), ve *mrkD* (%83,0) genleri en yüksek oranda belirlenenler olmuştur. Diğerleri *fimH-1* (%64.2),*fyuA* (%54.7),*kpn* (%49.1), *ybtS* (%41,5), *irp-1*(%41,5), *irp-2* (%37,7),*traT* (%11,3) ve *iutA* (%5,7%) oranı ile farklı sıklıklarda saptanmıştır. *iroN*, *rmpA*, *magA*, *hlyA* ve *cnf-1* genleri tespit edilmemiştir.

Enterobaktin, sidereforlar arasında, *ycfM* ve *mrkD* genleri adezinler arasında en sık belirlenen virulans genleri olmuştur. Kapsül ve biyofilm oluşumu suşlarda sıklıkla belirlenmiştir. Hipermukoviskozite yalnızca bir suşta belirlenmiş ancak ilişkili genler tespit edilmemiştir. Alfa hemolizin üretimi,*hlyA* ve *cnf-1* genleri hiçbir suşta gözlenmemiştir.Hastane enfeksiyonu etkeni *K.pneumoniae*izolatlarında kapsül, adezinler, enterobaktin ve biyofilm oluşturma patojenitelerinin temelini oluşturmaktadır. Ancak toksijenite ve hipermukoviskozite invazivliği arttıran güçlü virulans faktörleri olarak bilinmektedir.

Anahtar Sözcükler: Hastane enfeksiyonu, *Klebsiella pneumoniae,* Virulans

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation Of Various Virulence Factors Of*Klebsiella pneumoniae* strains İsolated From Nosocomial İnfections

Halit KUŞ

Department of Microbiology

MASTER THESIS / KONYA-2015

Klebsiellapneumoniae is an opportunistic pathogen that commonly affects immunosuppressed patients and causes nosocomial infections. *K. pneumoniae* harbours a variety of virulence factors, especially capsule polysaccharide, hypermucoviscosity, fimbriae, toxins and determinants for iron acquisition. The aim of this study, to detect virulence factors in*K.pneumoniae*strains isolated from nosocomial infections in two years.

The identifications andantimicrobial susceptibilities of isolates were performed by VITEK 2 automatic system. The abilities to form biofilm, α-hemolysin, capsule and hypermucoviscosity were investigated by phenotypic assays. Polymerase chain reaction was used to detect virulence genes encoding adhesins (*fimH-1*, *mrkD, kpn, ycfM*), siderophores (*entB*: enterobactin, *iutA*: aerobactin, *irp-1, irp-2, ybtS, fyuA*: yersiniabactin, *iroN*: catechols receptor), protectines or invasins (*rmpA, magA, traT*) and toxins (*hlyA, cnf-1*).

53 *K.pneumoniae* strains were isolated from nosocomial infections between 2011 and 2013. The distribution of isolates according to the samples was as follows: urine (14), blood (13), wound (eight), drainage fluid (ten),broncho-alveolar lavage (seven), and cerebrospinal fluid (one).The capsule, biofilm formation,and hypermucoviscosity were observed in 100%, 79,2%, and 1,9% of the isolates respectively. α-hemolysinwas not detected.*entB* (96,2%), *ycfM* (86,8%), and *mrkD* (83,0%) genes showed high prevalence. The other genes were detected at different rates: *fimH-1* (64.2%),*fyuA* (54,7%),*kpn* (49,1%), *ybtS* (41,5%), *irp-1*(41,5%), *irp-2* (37,7%),*traT* (11,3%) and *iutA* (5,7%). *iroN*, *rmpA*, *magA*, *hlyA* and *cnf-1* genes were not determined.

Enterobactin had the highest rate amongsiderophores, and *ycfM*and *mrkD*in adhesins.The capsule andbiofilm formation were commonly found in the isolates.Hypermucoviscosity was only found one isolate but associated genes were not detected.α-hemolysin production and *hlyA* gene were not determined. It sems that the basis of clasical pathogenity of *K. pneumoniae* strains isolated from nosocomial infections are capsule, adhesins, enterobactin and ability of biofilm formation. On the other hand, toxigenity and hypermucoviscosity are know to be strong virulance factors that enhanceinvasiveness, these virulance factors may create a real menace for vulnerable hosts and together with antimicrobial resistance, they may be more endangeringfor these people.

Key Words: Hospital infection, *Klebsiella pneumoniae*, Virulence

1 GİRİŞ

1.1 *Enterobacteriaceae*Ailesi :

*Enterobactericeae*üyesi bakteriler gram negatif, çoğu hareketli ve fakültatif anaerop basillerdir. Bu aile şu an yaklaşık 100 tür içermektedir (Forbes ve ark 2002).

1.1.1 *Enterobacteriaceae* Ailesinin Genel Özellikleri ve Morfolojileri :

*Enterobactericeae*ailesi küçük 0,5-3 µm eninde ve 1-6 µm boyunda, gram-negatif, sporsuz basillerdir. *Enterobactericeae* ailesindeki bakterilerdebelirgin bir kapsül veya slime tabakası denen ince bir kılıf hücreyi sarabilir (Bilgehan 1992). *Enterobacteriaceae*türleri Mac Conkey, Eozin Metilen Blue(EMB) ve ENDO gibi seçici besiyerinde kolay üreyen basillerdir. Bazıları peritriş kirpiklerle hareketli veya bazıları hareketsiz, DNA'da Guanin+Sitozin (G+C) oranı %39-59 arasındadır. Bu ailede yer alan *Klebsiellapneumoniae*yaşadığımız çevrede çok yaygındır. *K.pneumoniae*insanların bağırsaklarında, üriner sistem ve solunum sisteminde belirtisiz yerleşim gösterebildiği gibi, ölüme kadar giden ağır enfeksiyonlar da meydana getirebilir (Erdem 1999).

1.1.2 *Enterobacteriaceae* Ailesinin Biyokimyasal Özellikleri:

Bu ailedeki bakteriler, glikozu fermente eden, nitratı redüksiyona uğratabilen, oksidaz negatif,katalaz pozitif, özelliğe sahiptirler.*Klebsiella*, *Enterobacter*ve*Serratia*cinsleri glikoz fermentasyonunda farklı olarak butanediol fermantasyonu yapabilirler ve son ürün olarak asetoin oluştururlar. Bu nedenle *Klebsiella*, *Enterobacter*ve *Serratia* cinslerinin Voges-Proskauer reaksiyonu pozitif olup, IMVC testi (--++) dır.

1.1.3 *Enterobacteriaceae* Ailesinin Antijenik Yapıları:

Somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenleri, ailenin serolojik tiplendirmesinde kullanılan ana antijenlerdir. Bunlar dışında ortak bir antijen, bakteri

hücresinin dış yüzeyinde bulunan*Enterobacteriaceae*Common Antigen (ECA) tüm enterobakterilerde bulunur. O antijeninin birinci bölgesi (region I) tekrarlayan oligasakkarit parçalarından oluşur. İkinci bölge (region II) kor polisakkaritinden oluşur. Lipit A bölümü yani üçüncü bölge (regionIII) beş altı yağ asidine tutunmuş bir disakkarittir. O antijenleri ısıya (110^{o}C'ye 2,5 saat), alkole (%96'lık, 4 saat) ve asitlere dayanıklıdır, formaldehit karşısında etkinliği kaybolur. Kirpik (H) antijenleri; protein yapıdadır, hareketli suşlarda bulunur, formole dirençlidir. K (kapsül) antijeni; polisakkarit yapıda olup, antijenik özellik taşır(Bilgehan 1992).

1.1.4 *Enterobacteriaceae* Ailesinin Patogenezi ve Yaptığı Hastalıklar:

Protein yapıda adezinlerin görevi, bakterinin mukozalara tutunmalarını sağlamaktır. Bakterinin Lipid A bölümü toksik aktiviteden sorumludur. Enterotoksinleri ise genellikle ince bağırsakları etkileyip diyareye neden olan toksinlerdir. Enterobakteriler demir sağlamak için, siderofor denilen bileşikleri kullanarak konak organizmada transferrin veya laktoferrin gibi moleküllerden demir kazanırlar. Bunlara ek olarak shigatoksin ve shigatoksin benzeri toksinler, hemolizinler, kapsül maddeleri, enzimler diğer virulans faktörleridir. Kolonizasyon faktörleri, enterotoksin, hemolizin gibi virulans faktörlerini ve ilaç direnci genlerini taşıyan plazmidler ve bakteriyosinler de bulunur.

*Enterobactericeae*ailesinin üyeleri gastrointestinal sistem (GİS) dışındaki yerleştiği yerlerde önemli enfeksiyonlaryapabilirler. En sık üriner sistem enfeksiyonları görülür. Bunun dışında pnömoni, septisemi, menenjit ve abselere neden olurlar (Bilgehan 1992, Erdem 1999).

Bu ailede tipik semptomlarla seyreden hastalıkların (tifo, basilli dizanteri, veba) etkeni olan cinsler ile, özellikle hastane enfeksiyonlarına (idrar yolu enfeksiyonu yara enfeksiyonları, pnömoniler, septisemiler) neden olan fırsatçı patojen olan cinsler bulunmaktadır (Erdem 1999,Bilgehan2000).

Aslında bugün enterobakteriler hastane enfeksiyonlarının en büyük sorumlularıdır. Hastane enfeksiyonlarına yol açan enterobakteriler; *E.coli*,

Enterobacter spp*, K.pneumoniae, Proteus mirabilis, Citrobacter*spp,ve*Serratia marcescens*türleridir (Erdem 1999).

1.2 *Klebsiella* Türleri:

1.2.1 *Klebsiella* Türlerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri:

Klebsiella'lar gram negatif, sporsuz, hareketsiz, kapsüllü basillerdir.*Klebsiella*cinsleri üreyi hidrolize ederler. Hidrojen sülfür (H_2S)yapmaz, fenilalanini deamine etmezler. İndol negatif (*Klebsiellaoxytoca*hariç) ve metil kırmızısı reaksiyonu negatif, Voges-Proskauer, sitrat testleri ve laktoz pozitiftir. *Klebsiella*diğer enterik bakterilerden farklı olarak belirgin bir kapsüle sahip olup, besiyerlerinde geniş, M tipi mukoid koloni yaparlar (Erdem 1999,Bilgehan2000).

1.2.2 *Klebsiella*Genusunun Taksonomisi:

*Klebsiella*cinsinin tıbbi öneme sahip üç alt tür bulunmaktadır:*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* ve *Klebsiella rhinoscleromatis*'tir. Numerikal taksonomi gibi yeni metotların gelişmesiyle, bu cinsteki türlerin sınıflandırılması devamlı olarak düzeltilmektedir. Günümüzde, Cowan, Bascomb ve Orskov'a ait üç ana sınıflama bulunmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri, Orskov'un sınıflandırmasını tercih ederken, İngiltere ve diğer eski İngiliz sömürge ülkeleri Cowan'ın sınıflandırmasına sadık kalması, tutarlı bir isimlendirmenin benimsenmesini daha da zorlaştırmıştır. Bu nedenle, aynı bakteri bir ülkede *K. pneumoniae*olarak isimlendirilirken, diğer ülkede *K. aerogenes*olarak isimlendirilebilmektedir. Birçok Avrupa ülkesi Amerikan örneğini takip ederek Orskov'un dünya çapındaki üstün sınıflandırmasını tanımaktadır.

Çizelge 1.1:*Klebsiella* Genusunun Farklı Taksonomik Sistemlere Göre Tür Sınıflandırılması (Podschunve Ullmann 1998)

Cowan	**Bascomb**	**Orskov**
K.aerogenes	*K.aerogenes/oxytoca/edwardsii*	*K.pneumoniae* *subsp. pneumoniae* *subsp. ozaenae* *subsp. rhinoscleromatis*
K.edwardsii *subsp. edwardsii* *subsp. atlantae*	*K.pneumoniae* *sensu stricto* *sensu lato*	*K.oxytoca*
K.pneumoniae		
K.ozaenae	*K.ozaenae*	*K.terrigana*
K.rhinoscleromatis	*K.rhinoscleromatis* *K. 'isimlendirilmeyen grup'* *Enterobacter aerogenes*	*K.planticola*

1980'lerin başında, çevreden izole edilen, öncesinde '*Klebsiella*benzeri organizmalar(J, K, L ve M grupları) olarak sınıflandırılan*Klebsiella*,geçici taksonomi içinde sınıflandırılmıştır (Gavini ve ark 1977). Bu gruplar 4 yeni türü ortaya çıkarmıştır: *Klebsiellaterrigena*(Izard ve ark 1981), *Klebsiellaornithinolytica*(Sakazaki ve ark 1989), *Klebsiellaplanticola*(Bagley ve ark 1981) ve *Klebsiellatrevisanii*(Ferragut ve ark 1983). 1986'da, son iki tür DNA zincir benzerliği nedeniyle *K. planticola*olarak tek bir türde birleştirilmiştir (Gavini ve ark 1986). Su, bitki ve toprak ortamlarının bulunan ve klinik önemi dışında başlangıçta göz önünde tutulan *K. terrigena*ve *K. planticola*'nın insan klinik örneklerinde de bulunduğu son zamanlarda rapor edilmiştir (Mori ve ark 1989, Podschun ve Ullmann 1992, Podschun ve Ullmann 1994). Bu bulgulara göre*K. planticola*, *Klebsiella*türlerinin klinik izolatları arasında, % 3,5-18,5 arasındaki dikkat çekici bir oranda yüksek sıklıkta, özellikle insan enfeksiyonlarından izole edilmiştir. Bu izolatların yarısından fazlası solunum sistemi salgılarından, daha sonra en yaygın olarak yara ve idrar izolatlarından izole edilmiştir (Podschun ve Ullmann 1994). Bununla birlikte izolatların çoğu polimikrobiyal örneklerden sağlandığı için, bu türlerin önemini hastalıklara sebep olan ajanlar olarak değerlendirmek güçtür. Bunun

sonucu olarak, gelecekte *Klebsiellapneumoniae*ve*Klebsiellaoxtoca*'nın yanı sıra, insan enfeksiyonuna yol açan üçüncü bir *Klebsiella*türünün bulunması muhtemel görünmektedir.

1.2.3 *Klebsiella* Türlerinin Ayırımı:

*Klebsiella*türleri lizin dekarboksilaz pozitifliği ve ornitin dekarboksilaz negatifliği ile diğer enterobakterilerden ayrılır. *Klebsiella*'ların biyotiplendirilmesi, klasik biyokimyasal testlerle (Çizelge 1.2) veyaticari sistemlerle (API 32E, VITEK veya Phoenix gibi) yapılabilir.

Çizelge 1.2: *Klebsiella* Türlerinin Biyokimyasal Reaksiyonları (Farmer JJ 1999)

Özellikler	*K.pneumoniae subsp.*			*K.oxytoca*	*K.terrigana*	*K.planticola*	*K.ornithinolytica*
	pneumoniae	*ozaneae*	*rhinoscleromatis*				
İndol	-	-	-	+	-	D	+
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	+
Lizin dekarboksilaz	+	D	-	+	+	+	+
Pektat degranülasyon	-	-	-	+	-	-	-
Laktozdan gaz oluşumu	+	-	-	-	-	-	-
10°C'de üreme	-	-	-	+	+	+	+
D- melezitozdan asit oluşumu	-	-	-	D	+	-	-
L-sorbozdan asit oluşumu	D			+	+	+	
m-hidroksibenzoat oluşumu	-	-	-	+	+	-	-
Hidroksi-L-prolin oluşumu	D			D	D	+	
Malonat oluşumu	+	-	+	+	+	+	+
Metil kırmızısı testi	-	+	+	-	+	D	+
Voges-Proskauer testi	+	-	-	+	+	+	+

(D) Değişken, (+) Pozitif, (-) Negatif

Serotiplendirme ise asıl olarak kapsül antijeninin tespitine dayanır. Genellikle iyi gelişmiş polisakkarid kapsülüne sahip olan *Klebsiella'*ların 82 tip kapsül antijeni

tanımlanmıştır. Bunlardan 77'si uluslararası kapsül antijen şemasının temelini oluşturmaktadır. Kapsül tip tayini, biyokimyasal ve bakteriyosin tiplendirme, moleküler ve faj tiplendirmelerinde her hangi birisi tek başına özel koşullar dışında epidemiyolojik araştırma için yeterli değildir. Biyotiplendirme ile kapsül tiplendirmenin kombine kullanımı, çok sayıda biyotipin ayrımını sağlamaktadır (Gouby 1994,Podscun ve Ullmann 1998,Aydoğan 2000).

1.2.4 *Klebsiellapneumoniae*'nin Virulans Faktörleri

Virulans, bir mikroorganizma grubu veya türü içerisinde hastalık oluşturma yeteneğinin (patojenitenin) derecesini tanımlamaktadır. Genel olarak iki özelliği kapsamaktadır: Mikroorganizmanın hastalık başlatabilme yeteneği (infektivite) ve ortaya çıkan hastalığın şiddeti (derecesi). 'Patojenikfaktör' ve 'virulans faktör' terimleri bazı yazarlar tarafından eşanlamlı olarak kullanılırken, bazıları bunlar arasında kesin ayırımı vurgular. 'Virulans' terimi bakteriyel türlerden birinin patojenite derecesini veya ölçüsünü tanımlarken, 'patojenite' terimi bakterinin hastalığa neden olma yeteneğini belirtir(Schaechter ve ark 1993).

Nozokomiyal *Klebsiella*enfeksiyonları en çok üriner sistem ve solunum sistemininde oluşur. Bu iki vücut bölümünde, konakçı savunma mekanizmalarınınfarklı olduğu düşünülürse, üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan *Klebsiella*türlerinde bulunan virulans faktörlerinin, pnömonili hastaların akciğerlerinden izole edilen türlerde gözlenenden farklı olmaları beklenebilir.

*Klebsiella*enfeksiyonlarının patojenitesinde çok sayıda virulans faktörünün yer aldığı gösterilmiştir. İn-vitro ve in-vivo çalışmalarda bakteri konakçı etkileşimleri araştırılmışve virulans faktörleri belirlenmiştir.

Kapsül yapısı

Kapsül, *Klebsiella*'nın en önemli virulans faktörüdür (Ehrenwort ve Baer 1956, Domenico ve ark 1982,Cryz ve ark 1984,Highsmith ve Jarvis 1985). Kapsül bakteriyi, bir taraftan polimorfonükleer granülositlerin yaptığı fagosittozdan korurken (Podschun ve ark 1992, Podschun ve Ullmann 1992), diğer taraftan

bakterisidal serum faktörleri tarafından ölmesini engeller (Williams ve ark 1983).Antifagositik fonksiyonlarından başka*Klebsiella*kapsül polisakkaritlerinin, in vitro olarak makrofajların farklılaşmasını ve fonksiyonel kapasitelerini engellediği rapor edilmiştir (Yokochi ve ark 1977, Yokochi ve ark 1979). Ayrıca, *Klebsiella*kapsüler polisakkaritinin yüksek dozu ile maruziyet, immünolojik paralizlere bile neden olabilir. Bu durum farelerde kanıtlanmıştır ve spesifik kapsüler antijenlere karşı oluşan antikorlar doza bağlı olarak azalma göstermiştir (Batshon ve ark 1963).

Klebsiella'da K antijenine ait virulans, mannoz içeren kapsüler polisakkaritlere bağlanabilir. K antijeni içinde yer alan mannoz veya L-ramnoz zincirlerinin tekrarı virulansı belirlemede önemlidir. K7 veya K21a antijenleri gibi düşük virulanslı kapsüler tipler, defalarca tekrarlanmış mannoz veya L-ramnoz zincirleri içerir(Podschun ve Ullmann 1992, Ofek ve ark 1993). Bu zincirler, lektinofagosit olarak bilinen opsonin-bağımsız (örn., kompleman ve antikor-bağımsız) fagositlere aracılık eden makrofajların yüzey lektinleri tarafından tanımlanmıştır (Athamna ve ark 1991). Lektinofagositler, bir hücredeki yüzey lektinleri ile karşı hücrenin yüzey karbonhidratları arasındaki ilişkiye dayanan nonopsonik fagositler olarak belirtilmiştir (Ofek ve ark 1995). Lektinofagositlere, fimbria gibi bakteriyel yüzey lektinleri veya reseptör gibi davranan fagosit lektinlerinden biri tarafından aracılık edilir. Mannoz-a-2/3-mannoz-spesifik lektinli veya mannoz reseptörünü tanıyan makrofajlar, tekrarlayan zincirlerdeki Man a2/3 Man veya L-Ra2/3L-Ra kapsüler polisakkariti içeren *Klebsiella*serotiplerini sindirir ve ardından öldürür. Buna karşılık, tekrarlayan zincirlerden yoksun olan türler makrofajlar tarafından tanımlanamaz ve bu nedenle fagositoz gerçekleşmez. Bu model, mannoz-a-2/3-mannoz yapısından tamamen yoksun olan K2'nin göze çarpan virulansına uygundur. Buna göre, bu mannoz veya ramnoz zincirlerinden yoksun olan kapsül tiplerini taşıyan *Klebsiella*türleri enfeksiyöz hastalık yapmaya daha yatkındır(Ofek ve ark 1993,Kabha ve ark 1995).

*Klebsiella*kapsüler polisakkaritlerinin farklı tipleri çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Serotipler arasında önemli virulans farklılıkları vardır. Bazı kapsül tipleri daha az virulan iken bazı kapsül tipleri daha virulan olarak belirlenmiştir. Örneğin, K1-K6 serotipleri, insanlarda ciddi solunum enfeksiyonları

ve septisemi ile alakalıdır (Simoons-Smit ve ark 1985, Kabha ve ark 1995). K1 ve daha az oranda K2serotipi, yüksek invaziv hastalıklarla ilgilidir (Fang ve ark 2004, 2007). K2 serotipi insanlardaki enfeksiyonlarda hakimdir, fakat doğal çevrede nadiren tanımlanmaktadır. Başka bir çalışmada ise K1 ve K2 kapsül antijeni taşıyan türler peritonitli farelerde özellikle virülan bulunmuştur (Kauffmann 1949, Mizuta ve ark 1983).K2, K5 ve K7 serotipleri, insanlar için en patojen tiplerolduğu, K1, K2, K4 ve K5 serotiplerinin ise fareler üzerindedeneysel olarak yapılan çalışmalardaderi lezyonlarına neden olduğu gözlenmiştir (Crouch ve ark 1972, Simoons-Smit ve ark 1984).

Her bir *Klebsiella* serotipi ile klinik semptomlar arasındaki ilişkiyi kurmak için yapılan araştırmalarda, çok çelişkili sonuçlar alınmıştır. Birçok çalışma, farklı kapsüler tipleri predominant olarak tanımlamıştır (Podschun ve ark 1986, Rennie ve Duncan 1974, Simoons-Smit ve ark 1985). Serotiplerdeki coğrafi farklılıkların bu değerlendirmede payı olabileceğini ifade etmişlerdir. Bununla beraber pekçok çalışma K2 serotipinin önemini vurgulamıştır. K2 serotipi,üriner sistem enfeksiyonu(ÜSE), pnömoni veya bakteremili hastalardan izole edilen suşlarda en yaygın kapsül tipler arasındadır. Çevrede az rastlandığı halde, dünyanın her yerinde insanlardan izole edilen serotipler arasında K2, predominant kabul edilebilir. Böylece *Klebsiella*enfeksiyonlarında K2 serotiplerinin gözlenen predominansı, lektinofagositozis kavramıyla oldukça uyumludur. Bu özel serotiplerin güvenilir tanımlamaları, insanlardaki invaziv serotip izolatlarının saptanması için oldukça değerlidir(Brown ve Seidler 1973, Matsen ve ark 1974, Edmondson ve ark 1980).

Konvansiyonel serotipleme, birçok açıdan dezavantajlıdır. Bazı serotipler, diğerleriyle geniş çapraz tepkimeler verirler. Antiserumun hazırlanması ve stabilitesi ve rutin serotipleme metodolojileri kullanışsız, iş gücü yoğunluklu ve yorumlanmasında subjektif olabilirler (Ayling-Smith ve Pitt, 1990). Bu nedenle DNA-temelli tiplendirme, artan bir şekilde kullanılmaktadır. Kapsüler polisakarid sentezi (CPS), genlerle beraber bir serotipe özgü bölgeden oluşur ve bunlar kısmen serotipler arasında muhafaza edilirler (Chuang ve ark, 2006). Brisse ve ark. (2004) kapsüler polisakaridyığılımı amplifikasyonu ve onu takip eden amplikonların sınırlamasından oluşan bir moleküler serotipleme şeması tanımladılar(Brisse ve ark.

2004). Serotip özgü K1 CPS bölgesi içindeki *magA* geni, bu önemli serotipin belirlenmesi için bir hedeftir (Struve ve ark. 2005).

Kapsüler polisakkaritler belli aşı adaylarıdır. Kapsül hemen hemen bütün *Klebsiella*türleri tarafından üretilmektedir; konakçı ortamı ile temaslarında yüzey yapılarının en dış katmanını gösterir ve bunun immunojenik ve nontoksik olduğu ispatlanmıştır (Cryz ve ark 1985). *Klebsiella*CPS aşısının ciddi bir dezavantajı çok sayıdaki K antijenleridir (77 farklı antijen). Bununla birlikte, bakteremik *Klebsiella*izolatları arasında kapsül tiplerinin oranı ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada Cryz ve ark.(1986)tüm bakteremik türlerin %70'ini yalnız 25 serotipin oluşturduğunu ve bunların seroepidemiyolojik bulgularına dayanarak, daha sonra güvenli ve immünojenik olduğu ispatlanan bir 24-valent *Klebsiella*CPS aşısı formüle etmişlerdir. Bu aşı, *Klebsiella*'nın neden olduğu sepsisi önlemek için en ümit verici yaklaşım olarak görülmektedir ve faz I insan üzerinde ki denemeleri devam etmektedir (Edelman ve ark 1994). 24-valent *Klebsiella*aşısı için yapılan en son çalışma, akut travmalı hastalarda aktif immünizasyondan sonra mükemmel antikor yanıtı gösterdiği bildirilmektedir (Campbell ve ark 1996).

Pilus (Fimbria)

Enfeksiyon oluşumundaki ilk kritik basamak,mikroorganizmaların konakçı mukoza yüzeyine olabildiğince yakınlaşmalı ve konakçı hücrelerine yapışarak (adezyon) bu yakınlığı sürdürmesi gerekmektedir. *Enterobacteriaceae*'daki adeziv özellik genellikle farklı pilus tipleri tarafından sağlanır. Piluslar 10 µm uzunluğunda 1-11 nm çapında ve 15-26 kDa arasında moleküler kütleli polimerik globüler protein alt ünitelerinden (pilin) oluşur (Jones ve Isaacson 1983,Ofek ve Doyle 1994).

Piluslar esas olarak, farklı hayvan türlerinde eritrositleri aglütine etme yeteneklerine dayanılarak gösterilmiştir. Reaksiyonun D-mannoz tarafından inhibe edilip edilmediğine bağlı olarak, bu adezinler mannoz duyarlı veya mannoz dirençli hemaglütininler (MSHA veya MRHA) olarak adlandırılır (Ottow 1975). *Enterobacteriaceae* ailesindetanımlanan farklı tiplerdeki piluslardan tip 1 ve tip 3 *Klebsiella*spp.'de bulunur (Old ve ark 1985, Podschun ve ark1987).

Tip 1 pilus

Tip 1 pilus, bakteriyel adezinlerden en iyi araştırılanıdır. Tip 1 pilus, kobay eritrositlerini aglütine eden MSHA'lardır. Bu pilus tipindeki adezyon proteini, fimbria üzerine yerleşir ve konakçı glikoproteinlerinin mannoz içeren trisakkaritlerine bağlanmaya yatkındır (Babu ve ark 1986, Fironve ark 1984). Şeker yapıları N-glikozidik bağlantılar aracılığıyla glikoproteinlere bağlanan oligomannoz zincirlerinden oluşur (Sharon ve Ofek 1986). Bu pilusların bakteriyel virulansla ilgisi bakterilerin ürogenital, solunum ve intestinal sistemlerin mukus veya epitel hücrelerine adezyona yatkınlığından ötürü ortaya çıktığı düşünülmüştür (Balish ve ark 1982, Ofek ve Beachey 1978). Üriner sistem enfeksiyonunun (ÜSE) patogenezindeki rolleri, çoğunlukla *E. coli*üzerine yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır. Fakat hayvan çalışmalarında*K. pneumoniae*için de tanımlanmıştır (Fader ve Davis 1982, Maayan ve ark 1985). Tip 1 pilusu öncelikle alt ÜSİ'nin patogeneziyle (Iwahi ve ark 1983) ilişkilendirildiği gibi, piyelonefrit patogenezi ile de ilişkiledirilmiştir (Fader ve Davis 1982). Buna göre, bu yapıların proksimal tubülüs hücrelerine bağlandığı gösterilmiştir (Virkola ve ark 1988).

Tip 1 fimbrialar, Tamm-Horsfall proteini (Reinhardt ve ark 1990) veya salyadaki (Babu ve ark 1986) gibi çözünür mannoz içeren idrardaki glikoproteinleri bağlayıcı yetenektedir. Bu bulgular tip 1 pilusun solunum sistemi ve ürogenital sistemindeki bakteriyel kolonizasyona yatkınlığına bir açıklık getirmektedir (Clegg ve Gerlach 1987). Bakterinin solunum sistemi hücrelerine tutunması (Ayars ve ark 1982) fakültatif patojenik bakterilerin sonradan ortaya çıkan proliferasyonuyla üst solunum yollarındaki kolonizayona karşı direncin zayıflamasına öncülük eder. Bu zayıflama, özellikle uzun süre mekanik solunum yapan hastalarda pnömoni gelişimiyle sonuçlanabilir (Williams ve Tomas 1990).

Tip 1 fimbriya *Enterobacteriaceae*ailesinin en sık çalışılanadezinorganeldir ve en yaygın olarak *E. coli*'de incelenmiştir. *K. pneumoniae* tip 1 fimbrial yapıları genetik kompozisyonu ve düzenlenmesi bakımından *E. coli*'deki tip 1 fimbria yapıları ile homologdur. Tip 1 fimbriya ve alt birimi *fimH*özellikle*K. pneumoniae* ve

*E. coli'*de üriner sistem infeksiyonu (ÜSİ)önemli bir rol oynar(Stahlhut ve ark 2009).

Tip 3 pilus

Diğer fimbrialardan farklı olarak tip 3 pilusu sadece tanen ile işlem görmüş eritrositleri aglütine eder. Mannoz dirençli, *Klebsiella*-benzeri hemaglutinasyon (MR/K-HA) adı, bu fimbrial tipin sadece *Klebsiella*tarafından sentezlendiği anlamına gelse de, sonraki çalışmalar tip 3 pilusun birçok enterik genusta bulunduğunu göstermiştir (Clegg ve Gerlach 1987). Üstelik serolojik çalışmalar önemli antijenik farklılıklar gösterdiği için, tip 3 pilus *Enterobacteriaceae*'nın her genusunda benzer değildir (Old ve Adegbola 1985).

Tip 3 pilusa sahip *K. pneumoniae*türleri, endotelyal hücrelere, solunum sisteminin epiteline ve üroepitelyal hücrelere yapışır (Hornick ve ark 1992). Böbreklerde bu piluslar, tübüler bazal membranlar, Bowman kapsülleri ve renal kanallara bakterinin yapışmasını sağlar (Tarkanken ve ark 1990). Tannik asitli eritrositlere tutunma, idrarda salgılanan bir poliamin olan spermidin tarafından inhibe edilir (Gerlach ve ark 1989). Spermidin, hasarlı eritrosit yüzeyinden açığa çıkarıldığı için, MR/K hemaglütinasyonun spermidin tarafından sağlandığı ileri sürülmüştür Bu, tip 3 pilusun neden tannik asit veya ısı ile muamele edilmeyen eritrositlere değil de, bunlarla muamele edilmiş eritrositlere tutunduğunu açıklayabilir(Gerlach ve ark 1989).

Bu fimbrial tipin patojenetik süreçteki rolü büyük ölçüde bilinmemektedir. Günümüze kadar, tip 3 *mrkD* hemaglütinin ve hastalık arasındaki ilişkinin tek ispatı, kateter kaynaklı bakteriüride bulunan*Providencia stuartif*'de, tip 3 pilusun ekspresyonunun gözlenmesi olmuştur. Bu türler, kısa dönem kateterize edilen veya kateterize edilmeyen kişilerde Üriner Sistem İnfeksiyonunun (ÜSİ) yaygın sebebi değildir, fakat uzun dönem kateterli hastaların idrarında daha yüksek prevalanstadır. Bu pilusların enfeksiyonlardaki rolünü araştırmak amacıyla henüz hiçbir deneysel hayvan modeli kullanılmamıştır. Uygun konakçı reseptörlerinin yapısı bilinmemektedir(Mobley ve ark 1988).

Tip 3piluslar, *Klebsiella*'yı çeşitli insan hücrelerine,örneğin solunum ve boşaltım sistemlerinin endeotelyal ve epitelyal hücrelerinebağlama yetisine sahiptir (Tarkkanen ve ark 1990, Würker ve ark 1990, Hornick ve ark 1991, Hornick ve ark 1992, Hornick ve ark 1995, Tarkkanen ve ark 1997,). Dahası inert yüzeylerde yapışma ve biyofilm oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Di Martino ve ark 2003).

Serum Direnci

Serum bakterisidal aktivitesi öncelikle kompleman proteinleri tarafından sağlanır. Kompleman proteinlerinin aktivasyonlarından sonra, bu proteinler mikroorganizmanın yüzeyinde membran atak kompleksişeklinde toplanır (Taylor 1983). Bu kompleks, C5b-C9 terminal kompleman proteinlerinden oluşur ve bunlar gram negatif bakterinin dış membranında transmembranöz gözenek oluştururlar (Ramm ve ark 1983). Membran atak kompleksi, sodyumun içeri girmesine ve bakterinin ozmotik lizisine yardım eder (Taylor ve Kroll 1985). Kompleman sistemi iki mekanizma ile aktive edilebilir: aktive olmak için tipik olarak spesifik antikorlar gerektiren klasik kompleman yolu ve antikorların yokluğunda bile aktive olabilen alternatif kompleman yolu. Alternatif yol, doğal bağışıklığın erken savunma sistemi gibi de görülür ve daha spesifik antikorlar şekillenmeden hücum eden mikroorganizmalara konakçının karşılık vermesini olanaklı kılar Her iki kompleman yolu, C3 aktivasyonu aracılığı ile en sonunda terminal C5b-C9 kompleksinin oluşmasıyla sonuçlanan ve böylece savunma sisteminde anahtar rolü oynayan opsonin C3b'nin oluşmasına rehberlik eder(Joiner 1988).

Bu konakçı savunmasına karşılık, patojenik mikroorganizmalar serum bakterisidal etkisine karşı stratejiler geliştirmiştir. Patojenik türler çoğu kez serum dirençli nitelikler gösterirken, birçok kommensal gram negatif bakteri insan serumunun bakterisidal etkisine duyarlıdır (Olling 1977). Bu sonuca göre, klinik olarak izole edilen *K. Pneumoniae*çoğu kez seruma direnç gösterir (Vosti ve Randall 1970) ve 'serum dirençlilik' özelliği, enfeksiyonun başlangıcı (Olling 1977, Roantree ve Rantz 1960) ve semptomların şiddeti ile ilişkilendirilmiştir (Björksten ve Kaijser 1978, Gower ve ark 1972).

Bugüne kadar, bakteriyel serum direncinin temelindeki tam mekanizma öğrenilememiştir. Dış membranın, *traT* lipoprotein veya porinler gibi çeşitli proteinlerinden başka (Alberti ve ark 1993), esas olarak CPS ve O antijenleri de bakteriyal serum direncinietkiler (Opal ve ark 1982, Williams ve ark 1983, Ciurana ve Tomas 1987). *Klebsiella*için iki hipotez ortaya atılmaktadır (Merino ve ark 1992). Birinci hipotez, kapsül polisakkaritleri temeldeki LPS'yi kaplayıp maskeleyebilir ve komplemanı aktive etmeyen bir yüzey yapısı sergileyebilir. İkinci hipotez, LPS'nin O kenar zincirleri belirli *Klebsiella*kapsül tiplerinde kapsül tabakası arasından uzanabilir ve dış ortama çıkarılabilir (Tomas ve ark 1988). LPS genellikle komplemanı aktive edebildiğinden, C3b molekülü LPS molekülleri üzerine depolanır. Bu nedenle, litik membran atak kompleksinin (C5b-C9) oluşumu engellenir ve sonraki membran hasarı ve hücre ölümü meydana gelmez. (Alberti ve ark 1996). Serum duyarlı türler klasik ve alternatif kompleman yollarının her ikisini de aktive ederken, serum-dirençli türlerin düz LPS'i yalnızca alternatif yolu aktive eder. Serum-duyarlı türler tarafından her iki kompleman yolunun aktivasyonu, büyük hasar ve bakteriyel ölüm ile sonuçlanan yüksek seviyelerde C3b'nin depolanmasına öncülük eder. Bu alanda yapılan önceki çalışmaların tümünün, O1 serotipini açığa vuran türlerle yapıldığı yine de unutulmamalıdır. Her ne kadar O1, klinik *Klebsiella*izolatları arasında en yaygın bulunan O antijeni olsa da, farklı O serotipleri içinden bir çoğunun nötral polisakkarit olduğu bilinmektedir. Aslında kimyasal olarak 12 farklı O tipi vardır, fakat yapısal araştırmaların sonucunda*Klebsiella*O antijenlerinin sayısı sonradan 8'e düşmüştür (Mizuta ve ark 1983). Bugüne kadar, serum direncinin sadece O1 antijeni tarafından sağlanıp sağlanmadığı ya da bu özelliğin genellikle *Klebsiella*LPS'si tarafından verilip verilmediği açığa kavuşmamıştır(Uzer 2012).

Son zamanlarda, farklı osmotik koşulların LPS üzerindeki etkisi *Aeromonas hydrophila* O:34 serotipinde gösterilmiştir (Aguilar ve ark 1997); düşük ozmolaritede gelişenler pürüzlü LPS ile sonuçlanırken, yüksek ozmolaritede gelişmiş hücreler düzgün LPS göstermiştir. Benzer olarak, düşük ozmolaritede gelişmiş bakteriler serum duyarlı çıkarken, yüksek ozmolaritede kültüre edilen hücreler normal insan serumuna dirençli bulunmuştur. Bu nedenle aynı bakteri türü, konakçı vücudunun üriner sistem gibi yüksek ozmolariteli ortamında bulunduğunda seruma dirençli

olabilirken, solunum sistemi gibi düşük ozmolariteli vücut bölgesinde bulunduğunda seruma duyarlı olabilmektedir (Uzer 2012).

Lipopolisakkaritler

Bakterinin lipopolisakkarit (LPS) tabakası endotoksik aktiviteye sahip olduğudan, septisemi patolojisinde önemlidir. LPS olarak ifade edilen yapılar içerisinde konak dokuda immün reaksiyonlara neden olan efektif molekül Lipid A'dır. LPS ise Lipid A taşıyıcısıdır. Gram pozitif bakterilerde LPS bulunmaz.

Endotoksin, bakterilerin dış yüzeyinde bulunur ve LPS'nin makromoleküler kompleksini, protein ve fosfolipitleri ifade eder. LPS temel olarakproteinden ibaret olan saflaştırılmış bakteriyel oluşumlardır(Siquera ve Roças 2007).

LPS'nin yapısı:

1. Hidrofilik polisakkarit
    - O-polisakkarit özel zinciri (O-antijen)
    - Oligosakkarit çekirdeği
2. Hidrofobik glikolipit kompenenti (Lipid A)

Lipid A, çekirdek ve O-antijen bakterinin yüzeyine yayılmadan önce, Gram negatif bakteri duvarının dış membranına gömülü halde bulunur (Siquera ve Roças 2007). Lipid A molekülü bakteriden bakteriye küçük değişimler gösterir. LPS'nin uzun polisakkarit zincirleri bakteri hücre zarının uzağında kompleman sisteminin fiksasyonuna izin verir ve bakteriyi konağın savunma sisteminin öldürücü litik etkisinden korur. LPS aslında bakteri dış duvarı içine dahil edildiğinde toksik değildir. Lipid A bakteri dış duvarında ölümle ya da çoğalma sırasında serbest kalır ve biyolojik olayların başlamasına neden olur. Konak LPS'ye ne kadar duyarlı ise doku yıkımı okadar sert ve hızlı olmaktadır. Konak doku immün toleransı gösterebildiğinde bu bölgede doku harabiyeti çok az olmaktadır.(Siquera ve Roças 2007)

Yakın zamana kadar *Klebsiella*LPS O antijenlerinin, kapsül polisakkaritleri tarafından gizlendiği düşünülmekteydi. LPS'ler yüzeyde açığa çıkmamakta, bu da

onu uygun olmayan aşı adayı olarak görülmekteydi. Son çalışmalar, belirli kapsüler serotipleri tanımlayan türlerde, O antijenlerinin yüzey açıklığını göstermektedir (Tomas ve ark 1988). Az sayıdaki farklı *Klebsiella*O-tipi, aşı olarak uygulanabilirliği ile ilgili olarak büyük yarar sağlamaktadır. K antijenlerine karşılık sadece sekiz O tipi bilinmektedir, O1 klinik izolatlarda en yaygın bulunan O tipidir. Bu sekiz O antijeninden oluşan multivalan LPS aşısı veya geniş spektrum kapsüler polisakkarit aşısında yaygın O1 antijenlerinin bulunması ümit verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. Son zamanlarda, *Klebsiella*O1 antijenlerine karşı monoklonal antikorlar verilmesinin, letal endotoksemili farelerde koruyucu olduğu bildirilmiştir (Mandine ve ark 1990). Ayrıca, bir multivalan *Klebsiella*aşı formulasyonunda O antijenlerinin bulunması, daha önce adjuvan etkisi olduğu gösterilen *Klebsiella*O3 lipopolisakkaritleri gibi, güçlü adjuvant etkisinden ötürü ek avantaj olabileceği ifade edilmektedir. LPS içeren aşılar ile aktif immunizasyonun büyük dezavantajı, endotoksin içeriğinden dolayı sanılan ters toksik reaksiyonlardır. Böylece, O antijeninden oluşan her *Klebsiella*aşısı LPS'in yeterli detoksifikasyonu ile güvenli kılınmalıdır.(Yokochi ve ark 1995)

Sideroforlar

Siderofordemir bağlama yeteneği olan düşük molekül ağırlıklı bileşiktir. Bağırsak bakterilerinde enterobaktin(fenolat) ve aerobaktin (hidroksamat) olmak üzere iki tipsiderofor tanımlanmıştır. *Klebsiella*türlerinin her ikitip sideroforu sentezledikleri gösterilmiştir (Kaleli ve ark 2006).

Konakçı dokusunda bakterinin gelişimi sadece konakçı savunma mekanizmalarıyla kısıtlanmamıştır, mevcut demirin teminiyle de kısıtlanmıştır. Demir, bakteriyel gelişimin esas etkenidir, oksijen ve elektron transport işlemindeki proteinlerin bulunmasında redoks katalizörü gibi görev yapar (Griffiths 1987). Konakçı ortamındaki bakteri için kullanılabilir serbest demirin temini son derece zordur. Çünkü bu element, intraselüler olarak hemoglobin, ferritin, hemosiderin ve miyoglobin gibi proteinleri ekstrasellüler olarak ise laktoferrin ve transferin gibi yüksek afinitedeki demir başlayıcı proteinler ile kuşatılır. Serbest biyoyararlı demirin düzeyi (10^{-18} M), normal bakteriyel gelişim için çok düşüktür (Bullen ve ark 1978). Patojenite için konakçı vücudunda demir temininin belirgin etkisi *Klebsiella*için

gösterilmiştir. Kobayda demirin parenteral verilmesinden sonra, *Klebsiella*enfeksiyonlarına olan duyarlılık önemli ölçüde artmıştır (Khimji ve Miles 1978).

Demir yetersizliği koşulu altında, örneğin konakçı ortamında, *Enterobactericeae*iki farklı kimyasal gruba ait olan çeşitli sideroforlar sentezler, biri fenolat tipi siderofordan oluşur, diğeri ise hidroksamat tipi siderofordanoluşur.(Khimji ve Miles 1978).

En çok rastlanılan grup fenolat tipi sideroforlardır. En iyi bilinen temsilcileri olan enterobaktin, 2,3-dihidroksil-benzol-serin'in periyodik trimeridir. Bu siderofor, *Enterobactericeae*'nın ana demir yükseltme sistemini kapsar gibi görünür ve hemen hemen*E. coli*ve *Salmonella* spp.'in bütün klinik izolatlarından sentezlenir (Griffiths 1987). *Enterobactericeae'*da sidereforların virulansa katkısı üzerine yapılan çalışmalarda birbirindenfarklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, Benjamin ve ark (1985) virulans ile enterobaktin sentezleme yeteneği arasında bir ilişki bulamazken, Yancey ve ark (1979) bu sideroforu üretemeyen *S. typhimurium*mutantlarının farelerde daha az virulan olduğunu rapor etmişlerdir. Bu güne kadar, enterobaktinin virulanstaki rolü şüpheli kalmıştır(Yancey ve ark 1979).

Hidroksamat tipi sideroforlar arasından, ferrikrom (sadece mantarlar tarafından sentezlenir), ferrioksamines ve aerobaktin en önemlileridir. Enterobaktine karşılık, aerobaktinin bakteriyel virulansa katkısı açık bir biçimde gösterilmiştir (de Lorenzo ve Martinez 1988). Ferrik enterobaktinin termodinamik denge sabitliği, Fe(III) için ferrik aerobaktinde olandan daha yüksek afinite gösterirken, stabilitesi ve daha iyi çözünebilirliğinden dolayı aerobaktin yine de enterobaktinden daha etkili gibi görünmektedir. Üstelik enterobaktin, demir dağıtımından sonra bir esteraz tarafından hidrolize edilirken, aerobaktin her demir transport döngüsünden sonra tekrar işleyebilir hale gelir(Wooldridge ve Williams 1993).

Martinez ve ark'nın (1987)aerobaktin salınımı ile ilgili yaptıkları çalışmada, *Enterobactericeae* cinslerini aerobaktin sentezi oranlarına göre iki gruba ayırmışlardır. Düşük oranda (<%20) aerobaktin üreten grup *Serratia*, *Proteus*ve

*Salmonella*gibi türleriniiçeriyor iken*Escherichia*türünü içeren ikinci grup yüksek oranda (>%40) aerobaktin sentezlemekteydi(Martinez ve ark1987).

*Klebsiella*cinsinde, sadece enterobaktinin değil, aerobaktinin de üretimi gösterilmiştir. Yine de, enterobaktin hemen hemen her tür tarafından sentezlenirken (Podschun ve ark 1992, Reissbrodt ve Rabsch 1988), aerobaktin-pozitif *Klebsiella,* türlere veya izolasyon kaynağına bakmaksızın nadiren gözlenmiştir (Martinez ve ark 1987, Podschun ve ark 1992). Hayvan örneklerindeki enterobaktin pozitif *Klebsiella*türleri, enterobaktin negatif türlerden daha virulan değildir (Miles ve Khimji 1975). Buna karşılık, *Klebsiella* türlerindeki aerobaktin sentezi ile virulans arasındaki ilişki Nassif ve Şansonetti (1986) tarafından net bir biçimde gösterilmiştir. Bu çalışmada, aerobaktin (*iutA*) geni K1 ve K2 serotipli bazı *K. pneumoniae*türlerinin plazmidlerinden klonlanmış ve nonvirülan (siderofor negatif) bir türe aktarılmıştır. Aktarma daha sonra, fare peritonit örneğinde belirgin şekilde artan bir virulans ile kendinigöstermiştir. Schubert ve ark'nın 2000 yılında yaptıkları çalışmada, yersiniabactin reseptörünü kodlayan *fyuA* geninin ifadesi, hücre dışı yersiniabactin biyosentez (*ybtS*) geninin varlığında düzenlenmiş ve gösterilmiştir (Schubert ve ark 2000).

Enterobaktinin aerobaktin üzerindeki büyük üstünlüğü ferik demir şelatörü için şimdiye kadar rapor edilen en yüksek demir affinitesidir. pH 7.4'te ferrik enterobaktin için sabit oluşum 10^{52} 'dir (Griffiths 1987). Enterobaktine karşılık aerobaktinin demire çok düşük affinitesinden dolayı, transferine bağlı demir için etkili bir rakip değildir. Brock ve ark (1991) yaptıkları çalışmada, aerobaktinin demir kaynağı olarak konakçı hücreleri kullandığını buna karşın enterobaktinin demiri baskın olarak transferrinden temin ettiğini göstermişlerdir (Brock ve ark 1991).

Biyofilm Oluşturma

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (Leone ve ark, 2006). Biyofilm oluşumu in vivo olarak canlı hücrelerde veya in vitro olarak cansız yüzeylerde meydana gelebilir. Nem miktarının fazlalılığı ve besin maddelerinin ortamda bulunması biyofilm oluşumunu

arttırmaktadır. Biyofilmin oluşumuna ve gelişmesine bakteri suşu (Boruckive ark. 2003, Chae ve Schraft 2000), yüzey özellikleri, pH, besin miktarı ve sıcaklık (Donlan 2002) gibi çeşitli çevresel faktörler etkili olmaktadır. Biyofilm hücreleri antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen ya da azaltan bariyere sahiptirler (O'Toole ve Kaplan 2000). Biyofilm tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerden oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur, bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığı ile ayrılmışlardır. Su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Bunlardan en yaygınları *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes, Staphylococcus*, *Bacillus* türleridir(Ölmez 2009). Biyofilm yapısında bulunan maddeler ekstraselüler matriks yapı ile birbirlerine tutunmaktadır. Su bakteriyel hücre kapsülleri içinde bulunmakta veya mikroorganizmaların monosakkaritlerden oluşturduğu yüksek molekül ağırlıklı polimerler olan ekzopolisakkarite (EPS) bağlanmaktadır (Ölmez 2009). EPS'ler biyofilm oluşturarak mikroorganizmaların koloni oluşturmasına ve yüzeye bağlanmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca organizmayı ozmotik strese, faj atıklarına, toksik bileşiklere ve antibiyotiklere karşı da koruyabilmektedir (Mıdık ve ark. 2011).

Biyofilm tabakası çok farklı çevrelerde oluşabilir ve en basit biyofilm tabakası bile karmaşık bir dinamiğesahiptir. Biyofilm gelişimi taze besiyeri sağlandıkça devam eder. Ancak,ortamdaki besin maddeleri tükeninceyüzey bağlantıları zayıflar ve hücreler planktonik modlarına geri döner (Gün ve Ekinci 2009).

Biyofilm oluşumu beş basamakta incelenebilir. Öncelikle hücreler yüzeye yakın mesafede etkileşerek yüzeyedönüşümlü olarak tutunur. Bakteriler konakçı hücre yüzeyine dönüşümlü olarak tutunurken o yüzeyde yaşamalarını sağlayacak besinmaddelerinin var olup olmadığını araştırır. Daha sonra yüzeyle kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipoletkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimlerisayesinde hücre organelleri ile yüzeye dönüşümsüz olarak tutunur. Yüzeye tutunan bakteri ürer ve koloni oluşturur. Bu aşamada olgun biyofilmoluşmuştur. Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma

evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilmtabakasından koparak ortama yayılır.(Gün ve Ekinci 2009).

Malzemelere yapışma ve biyofilm oluşturma yeteneğikateter ilişkili enfeksiyonlarile ilgili *Klebsiella* patogenezinde önemli bir özelliktir.(Gün ve Ekinci 2009).

İmplante yabancı polimer cisimler, modern tıbbi bakımın yaygın bir uygulaması haline gelmiştir. Yabancı materyal kullanımı beraberinde yeni sorunlar ortaya çıkarmıştır; çünkü, tıbbi cihazların yerleştirilmesi ya da implantasyonu genellikle mikrobik enfeksiyonlarla ilişkilendirilir. Cihaz kaynaklı enfeksiyonların artışı hastane enfeksiyonu ve mortalite oranlarında artış ile paralellik göstermektedir (National Nosocomial Surveillance System report 2000).

Tıbbi cihazlara bağlı kataterlerde oluşanenfeksiyonlar ile ilişkili bir ana problem, kullanılan antibiyotiklere karşı *K. pneumoniae*düşük duyarlılığıdır. Enfeksiyonları kontrol etmek ve ortadan kaldırmak için uygulanan antibiyotik konsantrasyonları, planktonik bakteriler ile kıyaslandığında 1000 kata kadar konsantrasyonlarda artmalıdır (Costerton JW ve ark 1993). Bu tarz enfeksiyonları kontrol etmek için yeni alternatifler önerilmiştir. Probiyotikler, özellikle *Lactobacillus*'un genus biyofilm oluşumunun önlenmesi için başarılı olduğu gösterilmiştir (Hawthorn ve Reid 1990, Reid and Tieszer 1993, Reid and Tieszer 1995). *Lactobacillus fermentum*RC 14, daha sonra mikroorganizmayı inhibe eden aygıt yüzeyine bu suşların yapışmasında rol oynayan biyo-yüzey-aktif maddeler üretmiştir (Reid ve ark 1995, Howard ve ark 2000). Bir çalışmada, *L. fermentum* CRL 1058'in farklı fraksiyonları*Klebsiella* tarafından biyofilm oluşumuna karşı önleyici potansiyelini incelemek için kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin bütün hücreleri ve ayrıca asit süpernatantlar hem biyofilm oluşumunu hem de *Klebsiella*'nın gelişimini önleyebilmiştir. Bütün hücrelerin etkisi, kullanılan laktik asit bakterilerinin suşunun yapışkan özelliği ile açıklanabilir, çünkü bu, yüksek derecede hidrofobik etki ile toplanan bir suştur (yapı) (Nader-Macias ve ark 1992, Silva ve ark 1996, Silvave ark 2001, Silva ve ark 2003). Bazı yazarlar, yapışma olgusuna karışan belirli laktik asit bakteri suşlarının yüzeyinde bir S-katmanının

varlığını savunmuşlardır (Schär-Zammaretti ve Ubbink 2003, Frece ve ark 2005, Chen ve ark 2007).

Asit süpernatanlar hem biyofilmin gelişimini hem de oluşumunu engellerler çünkü kullanılan *L. fermentum*, kültürlerinde *Klebsiella* çoğalmasını önleyebilir hem de yüksek laktik asit miktarı ve hidrojen peroksit üretir. Nötürleştirilen süpernatan, değerlendirilen diğer fraksiyonlara göre daha düşük bir derecede biyofilm oluşumunu engeller, ancak patojen büyümesini engelleyemez. Diğer bir hipotez, kültür ortamına farklı metabolitlerin serbest bırakılması olabilir örneğin bakterilerin çoğalmasını önlemek için yeterli miktarda üretilmeyen ve serbest bırakılmayan bio-yüzey-aktif maddeler ve diğer cisimler düşünülebilir. Birçok bilim insanı, *Klebsiella* tarafından biyofilm oluşumunu önlemek için kimyasal, anti biyofilm inhibitörleri (Burton E ve ark 2006), klorheksidin (Bahna ve ark 2007), antiseptikler (Chaiban ve ark 2005, Ewald ve ark 2006) veya metalik titanyum / gümüş sert kaplama gibi alternatif yöntemlerönerilmektedir.

Hipermukoviskosite

Hipermukoviskositeilk defa 1980'lerin ortalarında ve 1990'larda Tayvan'da toplum kökenli *K.pneumoniae*enfeksiyonlarının farklı bir klinik türü olarak tanımlanmıştır. Bu suşlar hepatobilier hastalık hikayesi olmayan hastalarda toplum kökenli piyojenik karaciğer abseleri ve uzak alanlara metastatik yayılım eğilimi ile ortaya çıkmıştır. Bu gözlemler ilk olarak Asya Pasifik ülkelerinde (Tayvan, Kore, Vietnam ve Japonya) ortaya çıkmasına rağmen Kuzey Amerika, Güney Amerika, Karaipler, Avrupa, Orta Doğu, Avustralya, Afrika ve Güney Afrika'da da artan sayılarda rapor edilmiştir. Hipermukovisköz'e sahip suşlar yeni bir hipervirulan *K.pneumoniae* varyantı ortaya çıkmıştır. Klinik izolatlarda serotip K1 ya da K2 kapsülleri ve / veya HMV(Hipermukoviskosite) fenotip olarak bilinen bir kapsül ile bağlantılı mukopolisakkarid ağ-yapı ile ilişkili genlerin sahip olduğubilinmektedir. Bu yeni *K.pneumoniae* varyantınınsağlıklı bireylerde ciddi enfeksiyonlara neden olma yeteneği ilk sırada gelmektedir. Endoftalmit ve menenjit gibi olağan dışı enfeksiyon bölgelerinde gözlenmiştir(Shon ve ark 2013).

Bu yeni *K.pneumoniae* varyantı invitro testler ile klasik *K.pneumoniae* suşlarından ayrılabilmektedir.24 saat inkübasyon sonrasında seçilen tek kolonistandart bir öze ile koloninin yüzeyine değdirilip yavaşça yükseltilerek koloni ile öze arasındaki koloninin mukoid yapısının uzunluğu 5mm'den büyük ise hipermukoviskozite testi pozitif olarak kabul edilir(Wiskur ve ark. 2008).

Genellikle *K. pneumoniae*'ninklinik izolatlarıile HMV fenotipi bakteriyemi,primer karaciğer apseleri, endoftalmit ve menenjit gibi farklı invaziv enfeksiyonlarla ile ilişkilidir.(Hartman ve ark 2009).

K. pneumoniae suşlarındaki mukoviskosite ilişkili (*magA*) ve mukoid fenotipi düzenleyici(*rmpA*)genler HMVfenotipi ile ilişkili bulunmuştur (Hartman ve ark 2009).*rmpA* geni kapsüler serotip K1, K2 ve diğer serotiplerde bulunmakla beraber, *magA* genikapsüler serotip K1ile sınırlıdır.Bu genlerin endoftalmit üzerindekispesifik rolü deneysel olarak analiz edilememiştir(Wiskur ve ark. 2008).*magA* geni beliri bir bölgedeki K1 CPS'yi serotiplendirmektedir ve önemli bir serotipin saptanması için iyi bir hedef olarak kabul edilmektedir (Turton ve ark 2008).*K. pneumoniae*'nın virulans faktörlerinden olan serotip K1/ K2 *magA* ve *rpmA* genleri karaciğer abselerin oluşumundan sorumlu tutulmuştur(Yeh ve ark 2007).

Alfa Hemolizin

Hemolizin; filtre edilebilen, ısıya dayanıksız, çok az bir fosfolipidveya lipopolisakkarid komponenti olan protein makromolekülüdür. Bakteri hemolizinleri, ekstraselüler sitotoksik polipeptidlerdir. Eritrosityanında polimorf nüveli lökosit, monosit ve fibroblast gibi hücrelere de in vitro toksik etki gösterirler. Mikroorganizmalar tarafından 4 tip hemolizin üretilir.Bunlar; alfa hemolizin, beta hemolizin, gama hemolizin ve enterohemolizindir(Kepekçi 2005).

Alfa hemolizin; ekstraselüler, hücreye bağlı olmayan, kültürsıvılarında bulunan, tripsine duyarlı, suda eriyebilen bir proteindir. Bakteriyemili ve piyelonefritli hastalardan izole edilen suşların alfa hemolizin üretimi, dışkıda ve asemptomatik bakteriüri tablosundakihastalardan izole edilen suşlardan daha fazladır (Kepekçi 2005).Alfa hemolizin memeli hücrelerine; özellikle tavşan eritrositlerine

karşı toksik olup, dermonekrotik ve nörotoksik özellikleri de bulunmaktadır(Müştak ve Esendal 2008).

Alfa hemolizini kodlayan gen (*hlyA*), ilk defa 1984 yılında Gray ve Kehoe tarafından *Staphylococcus aureus'*un kromozomundan klonlanmış ve dizin analizi yapılmıştır. Olgun protein 33000 moleküler ağırlığa sahiptir. Yapısında sistin bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarla bazı suşların *hlyA*genine sahip olmasına rağmen alfa toksin üretemedikleri anlaşılmıştır(Müştak ve Esendal 2008).

Alfa hemolizinin belirleyici özelliği eritrositleri lize etme kabiliyetidir Alfa hemolizin monomerleri bakteritarafından salgılanır. Daha sonra bu monomerler silindirik heptamerler yapmak üzere hedef hücrenin membranıyla birleşir. İşte bu oligomerik form ökaryotik hücreleri lize etme özelliğine sahiptir. Silindirik heptamer formu membranda oluşunca, membranda 1 ya da 2 nm'lik porlar şekillenir. Toksin monomeri hücre membranına iki farklı yolla bağlanır. Bunlardan ilki alfa hemolizinin düşük konsantrasyonlarında şekillenir. Bu durumda yapısı bilinmeyen özel bir hücre yüzey reseptörü proteini bağlarken; alfa toksinin yüksek konsantrasyonlarında toksin non-spesifik olarak hücre membranına kendi bağlanır. Monomer, lipid tabakasına penetre olma kabiliyetine sahiptir. Monomerlerin lipid tabakasını geçmesi heptamerik porların oluşumuyla sonuçlanır. Ancak bu porun oluşumunun nasıl şekillendiğine ait kesin bir bilgi yoktur. Ancak toksinin N-terminal bölgesinin hemolitik porun oluşumunda önemli olduğu ortaya konmuştur. Sonuçta oluşan por, K+ iyonları ile diğer küçük moleküllerin hızla efluksuna, Na^{+} ve Ca^{+2} ile moleküler ağırlığı 1000'den düşük olan moleküllerin influksuna ve sonuçta oluşan ozmotik basınç sonucu eritrositlerin yıkımına neden olur (Müştak ve Esendal 2008).

Hemolizin üretimi, demir fazlalığında baskılanır. Buna karşın,demir miktarının düşük olduğu durumlarda arttığı belirlenmiştir (Kepekçi 2005). Ekstraintestinal enfeksiyonlardanizole edilen bakteri suşlarının % 50'sinden daha çoğunda hemolizin saptanırken, dışkı suşlarının % 10'undan azı hemolizin oluşturma özelliğine sahiptir (İnan ve Gürler 2004).

1.2.5 *Klebsiella pneumoniae*'nin Yaptığı Hastalıklar:

Sağlıklı bireylerin solunum yolunda ve dışkıda %5-10 oranında *K.pneumoniae* bulunur. Friedlander basiliolarakta bilinen*K.pneumoniae*hem hastane ortamından hem de toplumdan kazanılan tipik lober pnömoni oluşturur. Bakteri bunun yanında fırsatçı infeksiyon etkeni olarakda değerlendirilir. Yenidoğan ünitelerinde plazmid aracılı çoklu antibiyotik dirençli *K.pneumoniae*'ye bağlı hastane infeksiyonları sık görülür.

K. pneumonie'ye bağlı lober pnömoni, alkoliklerde, diabetiklerde ve kronik obstruktif akciğer hastalığı olanlarda genellikle üst solunum yollarında kolonize olmuş bakterilerin aspirasyonu sonucu oluşur. Fakat olguların çoğu hastanede yatan, çeşitli predispozan faktörlere maruz kalan hastalardır. Hastada titreme ile ani yükselen ateş, şiddetli yan ağrıları, balgam çıkarma, dispne, taşikardi vardır. Akciğer filmleri tipik lober infiltrasyon gösterir. Lezyonlar nekrotik ve hemorajiktir. Bu nedenle balgam paslı veya "kuşüzümü peltesine" benzetilen özellikler içerir. Apse ve kavite oluşumu, ampiyem, plevra yapışıklıkları sıktır. *Klebsiella*pnömonisi gram negatif bakteri pnömonileri içinde daha seyrek görülenidir fakat ölüm oranı diğer gram negatif pnömonilerden iki kat fazladır. Bazen bronkopnömoni ve bronşit olarak seyreden akciğer infeksiyonlarına da rastlanır (Erdem 1999, Bilgehan 2000, Toreci 2002). Genellikle akciğer infeksiyonlarında K1, K3, K4 ve K5 antijenine sahip K tipleri izole edilmektedir (Akova ve ark 1993).

Klebsiella ile idrar yolu ve cerrahi yara infeksiyonları, bakteriyemi diğer gram negatif bakterilerle oluşan infeksiyonlardaki klinik belirtilere benzer seyreder. Nozokomiyal idrar yolu infeksiyonlarında*Klebsiella*'lar %9 dolayında bir pay alırlar ve çok defa ürolojik bir inceleme veya uygulama sonrası oluşur. Bakteriyemiye çok defa damar içi kateter uygulaması, bağırsaktan translokasyon veya akciğer infeksiyonu neden olur. *K.pneumoniae* ile menenjit, safra kesesi infeksiyonu, çeşitli organlarda abse oluşumu gibi enfeksiyonlar da meydana gelir ve organa özel klinik belirtiler verir (Eisenstein ve Zaleznik 2000,Toreci 2002, Akalın 2003).

1.2.6 *Klebsiella pneumoniae* ve Hastane Enfeksiyonları:

Hastane enfeksiyonları, hastaneye başvuru anında inkübasyon döneminde olmayan, hastaların hastaneye başvurularından 48-72 saat sonra gelişen ya da hastanede gelişmesine karşın, bazen hasta taburcu olduktan sonra 10 gün içinde ortaya çıkabilen infeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Değişik çalışmalarda, hastane infeksiyonlarının görülme sıklığının %3,1-14,1 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Hastane infeksiyonlarıetkenleri ve direnç profilleri ülkeler arasında, hastaneler arasında ve hatta aynı hastanenin değişik birimleri arasında bile farklılıklar gösterebilmektedir (Pekşen 1993, Ulutürk ve ark 2000, Akçam ve ark 2004).

Hastane enfeksiyonları arasıda üriner sistem enfeksiyonları %40 görülme sıklığı ile en sık görülen infeksiyon türüdür.(Köksal 2000).Hastane infeksiyonuna bağlı pnömoni, tüm hastane infeksiyonlarının %13-18'inden sorumludur (Yüce 2000).Hastane infeksiyonları arasında en ağır klinik tablolardan biri hastane infeksiyonuna bağlı bakteremilerdir. Özellikle fazla sayıda invaziv girişimlerin yapıldığı yoğun bakım birimlerinde görülme sıklığı daha fazladır. Bakteremi tanısı kan kültürü pozitifliğiyle konur (Doğanay 2000). Bu infeksiyonları diğer alt solunum yolu infeksiyonları ve cerrahi alan enfeksiyonları izler. Ülkemizde sürveyans yapılan az sayıda hastanede hastane infeksiyonları oranları %5 civarında saptanmıştır. Bu infeksiyonların kaynağı kişinin kendi kolon florası (endojen) ve hastane personelinin elleri (ekzojen) olabilmektedir (Ulutürk ve ark 2000).

Epidemik hastane infeksiyonları, hastane enfeksiyonlarının %10'unu oluşturmaktadır. Endemik hastane infeksiyonları ise, olguların %90'ını oluşturmakta ve sporadik olarak gözlenmektedir (Pekşen 2002). Hastane infeksiyonlarından izole edilen patojenlerin spektrumu süreç içinde değişmekle beraber gram-negatif bakteriler, hastanede sorun olan patojenler içindeki yerini korumaktadır (Öngen 2003).

Avrupa'da 1992'de 13 ülkede hematoloji/onkoloji ve yoğun bakım birimlerinde gerçekleştirilen bir çalışmada hastane infeksiyonlarından soyutlanan 8625 bakterinin %57'sini gram-negatif basillerin oluşturduğu görülmüştür (Verbist

1993).Ülkemizde 1994-1995 yıllarında 8 merkezde yoğun bakım birimlerinde gerçekleştirilen çalışmada izole edilen 981 gram-negatif bakterilerin dağılımı incelendiğinde ilk sırada *Pseudomonas* spp. (%30) saptanmış, onu *Klebsiella*spp. (%25), *E.coli* (%18), *Acinetobacter* spp. (%9), *Enterobacter* spp. (%9) izlemiştir (Gür ve Ünal S 1996).

*Klebsiella*fırsatçı patojenler olarak, özellikle hospitalize edilen ve diabetes mellitus veya kronik pulmoner obstruksiyon gibi altta yatan şiddetli hastalıkları olan immun sistemi zayıf bireylerde ortaya çıkar. Hastane infeksiyonlarında*Klebsiella*cinsi içerisinde en çok etken olarak karşımıza *K.pneumoniae*çıkmaktadır. *K.oxytoca*ise klinik örneklerden çok daha düşük oranda izole edilmektedir. ABD ve Avrupa'da hastane infeksiyonların %8'ine*Klebsiella*spp.'in neden olduğu tahmin edilmektedir. Çok büyük coğrafi varyasyon sıklığı kaydedilmemiştir. ABD'de*Klebsiella*tüm hastane enfeksiyonlarıbağlı bakteriyel infeksiyonlarının %3-7'si arasında rapor edilmiştir ve hastanelerde en önemli sekiz infeksiyöz patojen arasında yer almaktadır (Horan ve ark 1988, Schaberg ve ark 1991). İngiltere (Bergogne- Berezin 1995) ve Almanya'dan (Ullmann 1986) toplanan veriler, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkez'i tarafından rapor edilen verilere büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.

Antibakteriyel ilaç kullanımı ve hospitalizasyon *Klebsiella* taşıyıcılığını arttırmaktadır. *Klebsiella*infeksiyonlarına ortamda kolonize olmuş suşlar kaynak oluşturmaktadır. Florada sınırlı sayıda *Klebsiella* suşu bulunmasına karşılık hastanelerde yatarak tedavi alan hastalarda kolonizasyon oranlarının hızla arttığı bilinmektedir (Çetinkaya ve ark. 2005).Yapılan çalışmalarda hospitalize hastalardaki taşıyıcılık oranları, gaitada %77, farinkste %19, hastaların ellerinde ise %42 oranında bulunmuştur. Yüksek orandaki hastane infeksiyonları*Klebsiella* kolonizasyonunun daha çok antibiyotik kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Başka bir çalışmada hastanede iki haftalık bir kalış süresinden sonra *Klebsiella* kolonizasyon oranında 2-4 kat artış saptanmıştır (Aydoğan ve ark. 2000). *Klebsiella*kolonizasyonun artışı ve hastanedeki *Klebsiella* suşlarında çoklu antibiyotik direncin görülmesi, özellikle uzun süreli, çoklu veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlanmaktadır(Wiener ve ark. 1999). Kontrollü antibiyotik kullanımı ile bu tür istenmeyen etkiler azalacağından profilaksi ve ampirik tedavi

amaçlı yanlış antibiyotik kullanımını engelleyecek yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekir. Kan ürünleri, medikal aletlerin kontaminasyonu, hastaların GİS'leri ile hastane personelinin elleri enfeksiyonun yayılmasında önemli kaynaklardır (Aydoğan ve ark. 2000).

1.2.7 *Klebsiella pneumoniae* veAntibiyotiklere Karşı Direnç

Bakteri ve diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen, mikroorganizmaların veya başka canlıların gelişmesini durduran ve öldüren doğal ya da kimyevi maddelere "antibiyotik" denir (Öner 1992).

Antibiyotikler tıpta kullanılan tüm ilaçlar içinde "mucize ilaç" olarak isimlendirilmektedirler. Kullanıma girmelerinden günümüze kadar uzun bir süreç geçmemesine rağmen bu ilaçlar ile ilgili gelişmeler hızla artmış aynı zamanda kullanımları sırasında ve sonrasında ortaya çıkan önemli sorunlar da gündeme gelmiştir. Bu sorunların başında ise antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direnç yer almaktadır (Akalın 1994).

Klebsiella'ların klinik açıdan önemli özellikleri Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL)üretmeleri ve çoklu antibiyotik direncine sahip olmalarıdır. (Bilgehan 1992).Antibiyotiklere dirençli, özellikle GSBL üreten türlerin geniş dağılımından ötürü, *Klebsiella*infeksiyonları yeniden ilgi çekmiştir.1970'lerde aminoglikozidlere dirençli*Klebsiella*türleri görülmekteydi (Martin ve ark 1971, Christensen ve Korner 1972, Cruie ve ark 1978). 1982'den bu yana GSBL üreten ve onları geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı dirençli kılan türler gelişmiştir (De Champs ve ark 1991, Coovadia ve ark 1992, Gür ve ark 1992, Bauernfeind ve ark 1993, French ve ark 1996,). Genellikle plazmid kaynaklı olan GSBL'ler, *Enterobacteriaceae*'nin farklı üyeleri arasında kolaylıkla taşındığı için, direnç genlerinin birikimi çoklu direnç plazmidleri içeren türlerle ortaya çıkar. Bu nedenle, GSBL üreten izolatlar çeşitli sınıflardaki antibiyotiklere karşı dirençlidirler. GSBL üretimi sıklıkla antibiyotiklere karşı çoklu direnç ile ilişkilendirildiğinden, terapötik seçenekler sınırlı hale gelmiştir.Amerikada GSBL üreten*Klebsiella*izolatlarının % 5'inin, Ulusal Nozokomiyal İnfeksiyon Çalışma Sistemi'nde test edilen *K. pneumoniae*olduğu rapor edilmiştir (Jacoby 1996). Avrupa'da bu gibi türlerin

görülme sıklığı da yüksektir. Fransa ve İngiltere'de klinik *Klebsiella*izolatları arasından GSBL üretenlerin oranı %14-16 arasında rapor edilmiştir (Sirot 1995). Özel bölgelerde ve hastanelerde bu oran % 25-40 arasında görülmektedir (Burwen ve ark 1994). Bununla beraber *K. pneumoniae* türleri içerisindeki GSBL üretim oranının ABD'de %12, Batı Pasifik'te %28 ve Latin Amerika'da %52 olduğu tahmin edilmektedir (Jones ve ark 2005).

Bununla birlikte, GSBL üreten *Klebsiella* suşlarının karbapenemlere duyarlı olduğu görülmektedir. Ancak imipeneme direnç gösteren GSBL pozitif *K.pneumoniae* suşlarıda izole edilmiştir. Bu suşların plazmid kaynaklı AmpC türü β-laktamaza sahip oldukları bilinmektedir (Bradford ve ark 1997).Üstelik çoklu direnç gösteren *Klebsiella*türlerinin ortaya çıkması, ne yazık ki GSBL'leri kodlayan plazmidlerin oldukça yüksek stabilitesini de beraberinde getirmiştir. Seftazidim ve diğer geniş spektrumlu sefalosporinlerin kesilmesinden sonraki yıllarda bile, GSBL üreten *Klebsiella*türleri tarafından kolonize hastalar gözlemlenmiştir (Hibbertrogers ve ark 1995). Bu türlerin alınmasındaki risk faktörleri, hastanede kalma uzunluğuyla ve infeksiyon kontrol önlemlerinin yerine getirilmemesi ile ilişkilidir. (Lucet ve ark 1996).

2 GEREÇ VE YÖNTEM

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2011 - 2013 yılları arasında çeşitli kliniklerde hastane enfeksiyonu tanısı almış hastalara ait örneklerden üretilen 53 adet*K. pneumoniae* izolatı çalışmaya alındı. Aynı hastadan birkaç kez *K. pneumoniae* izole edilmiş olsa bile bu suşların sadece biri çalışmaya dahil edildi. Tüm testlerdekontrol için ATCC 700603 *K.pneumoniae* standart suşu kullanıldı.

Kullanılan besiyeri ve solüsyonlar

Koyun Kanlı Agar (BD)

Kullanıma hazır temin edildi. İçeriği: 1 litre saf su için yaklaşık formül; kazeinin pankreatik dijesti 12,0 gr, hayvan dokularının peptik dijesti 5,0 gr, maya ekstraktı 3,0 gr, sışır eti ekstraktı 3,0 gr, mısır nişastası 1,0 gr, sodyum klorür 5,0 gr, agar 13,5 gr, defibrinleştirilmiş koyun kanı 5 %, ph 7,3 ± 0,2.

Eosin Methylene-blue (EMB)(BD)

Kullanıma hazır temin edildi. İçeriği: 1 litre saf su için yaklaşık formül; jelatinin pankreatik dijesti 10,0 gr, laktoz 5,0 gr, sükroz 5,0 gr, dipotasyum fosfat 2,0 g, agar 13,5 gr, eosin y 0,4 gr, metilen mavisi 0,065 gr, ph 7,2 +/- 0,2.

Triptik Soy Broth (BD)

Ticari Olarak Temin Edildi. İçeriği: 1 Litre Saf Su İçin Yaklaşık Formül; Kazeinin Pankreatik Dijesti 17,0 Gr, Soya Fasulyesi Yemeşi Papaik Dijesti 3,0gr, Sodyum Klorür 5,0 Gr, Dipotasyum Fosfat 2,5 Gr, Dekstroz 2,5 Gr.

Brain Heart İnfüzyon Agar (BD)

Ticari olarak temin edildi. İçeriği: 1 litre saf su için yaklaşık formül; beyin kalp infüzyonu 6,0 gr, hayvan dokularının peptik dijesti 6,0 gr, sodyum klorür 5,0 gr, dekstroz 3,0 gr, jelatinin pankreatik dijesti 14,5 gr, disodyum fosfat 2,5 gr.

Luria Broth (Miller's LB Broth)

Ticari olarak temin edildi. İçeriği: 1 litre saf su için formül; tripton 10 gr, sodyum klorür10 gr, maya özü 5 gr, ph 7,0 +/- 0,2.

Fosfat Buffer Salin

Ticari kit olarak temin edildi. İçeriği: 1 litre saf su için formüller;

BD phosphate buffered saline (ph 7.2)
Dipotasyum hidrojen fosfat 1,1 gr, potasyum dihidrojen fosfat 0,32gr, sodyum klorür 8,5 gr, ph 7,2 +/- 0,1.

BD saline solution (0.9%)
1 litre saf su için formüller; sodyum klorür 9,0 gr,

1XTBE hazırlanışı:

Trizma base (Sigma) 10.8 gr, Borik asit (Merck) 5,5 gr, EDTA (Merck) 0,744 gr, Distile su ile 1000 ml ye tamamlandı.

0,5'lik TBE için; 1000 ml distile su üzerine hazırlanan 1X TBE ilave edilip 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi.

Agaroz Jel Hazırlanışı

Agaroz (Biomax) 1,5 veya 2 gr, TBE (0,5X) 100 ml.

2.1 *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Tanımlanması

Klebsiella spp. olarak saklamaya alınan suşlardan EMB besiyerine pasaja alınan ve üreyen bakteri kolonilerinin Gram boyanma özelliklerinin incelenmesi sonucunda gram-negatif olanların, katalaz ve oksidaz özelliğine bakıldı. Bunlara ek olarak; hareket özelliği, Triple Sugar Iron (TSI) besiyerinde laktoza etkisi, sitrat ütilizasyonu, indol varlığı, üreaz aktivitesi gibi klasik biyokimyasal yöntemler uygulandıktan sonra *Klebsiella*genusuna dahil edilen suşlar çalışmaya alındı. Konvansiyonel yöntemlerle cins düzeyinde *Klebsiella* olarak tanımlanan suşların tür düzeyinde ayrımı VITEK 2mikrobiyal identifikasyon sistem(bioMerieux, Fransa) kitleri ile çalışıldı ve VITEK 2 mikrobiyal identifikasyon cihazında *K. pneumoniae* olarak belirlendi.

K. pneumoniae olarak tanımlanan suşlar diğer çalışmalar için saklamak amacı ile cryobank (Mast diagnostics, İngiltere) boncukları içine alınarak -20ºC'de stoklandı.

Saklamada tutulan (-20ºC) *K.pneumoniae* suşlarıcanlandırılmak amacı ile Eosin Methylene-blue Agar(EMB) (Oxoid, ABD) besiyerine pasaja alındı. 35ºC'de 18-24 saat inkübe edildi.

2.2 Alfa Hemoliz Oluşumunun Araştırılması

Alfa hemolizin testi iki farklı yöntemle yapıldı.

2.2.1 %5 Koyun Kanlı Agar'da Alfa Hemoliz Oluşumunun Araştırılması

K. pneumoniae suşları %5'lik koyun kanlı agara ekildi. Yaklaşık 18-24 saat 37^{o}C'deinkübe edildi. Süre sonunda alfa hemoliz oluşumu varlığı gözle değerlendirildi. Üreyen kolonilerin etrafında oluşan yeşil renkli hemoliz varlığı alfa hemoliz açısından pozitif olarak kabul edildi.(Fertas-Aissani ve ark. 2012)

2.2.2 Triptik Soy Broth'da Alfa Hemoliz Oluşumunun Araştırılması

K. pneumoniae suşları 2 ml triptik soy broth'da 37^{o}C etüvde bir gece inkübe edildi. Daha sonra tüpler 4000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatan kısımdan 1 ml alınıp cam tüpe konuldu ve üzerine %2'lik koyun eritrosit süspansiyonundan 1 ml ilave edildikten sonra 39^{o}C'de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda tekrar santrifüj edilerek süpernatan kısımda kırmızı renk varlığı alfa hemoliz açısından pozitif olarak kabul edildi.(Fertas-Aissani ve ark. 2012)

2.3 Kapsül Varlığının Araştırılması

Kapsül varlığı negatif bir boyama yöntemi olan çini mürekkebi boyama tekniği ile araştırıldı. *K. pneumoniae* suşları kanlı agar besiyerinde 37^{o}C etüvde bir gece bekletildi. Lam üzerinde damlatılan çini mürekkebinin içinde öze ile alınan örnek karıştırıldı. Lam üzerindeki bakteri+çini mürekkebi karışımı bir lamel yardımı ile ince yayama yapıldı. Oda sıcaklığında kuruyan lamlar el yardımı ile tespit için alevden geçirildi. Mikroskop altında 40x objektifle direkt inceleme yapıldı. Bakteri etrafında görülen beyaz boşluklar kapsül varlığı açısından pozitif olarak değerlendirildi. Daha sonra lamlar sulu fuksin boyası ile boyama yapılarak mikroskop altında ikinci bir inceleme yapıldı. İnceleme sonucunda kapsül olarak tanımlanan beyaz alanların renk alıp almadığı değerlendirildi.(Fertas-Aissani ve ark. 2012)

2.4 HipermukoviskositeVarlığının Araştırılması

Hipermukoviskosite varlığını araştırmak için *K. pneumoniae* suşları Brain Heart infüzyon agara ekimi yapıldıktan sonra 37^{o}C etüvde bir gece inkübasyona bırakılarak üremesi sağlandı. Daha sonra elde edilen bakteriye ait tek koloniler standart öze ile koloninin yüzeyine değdirilip yavaşça yükseltilerek koloni ile öze arasındaki bakteri yapısının boyu incelendi. Bu yapı 5mm'den büyük ise hipermukoviskozite testi pozitif olarak kabul edildi.(Fertas-Aissani ve ark. 2012)

2.5 Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

K. pneumoniae suşları Luria Broth'da (LB) 3 gün arka arkaya 3 defa subkültüre edildi.Daha sonra 3. subkültürü yapılan örnekler optik dansitesi Boeco(Almanya) S-22 UV/Vis. Spektrofotometrecihazında 540nm'de 0,56-0,64 absorbans olacak şekilde ayarlandı. Absorbansı ayarlanan örneklerin 200 mikrolitresi 96 kuyucuklu mikroplate'e aktarıldı.Kontrol kuyucuğu olarak kuyucuklardan iki tanesine bakterisiz sadece LB besiyeri konuldu. Mikroplate daha sonra 25°C'de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda her kuyucuğa 25 mikrolitre kristalviyole eklendi. Mikroplate çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İçindeki besiyeriBioTek(ABD) ELx 50cihazındançıkarıldıktan ve sonra mikroplate fosfat buffer salin (PBS) ile 3 kere yıkandıktansonra %96 etanol ilave edildi. Mikroplatede hazırlanan kuyucuklardaki örnekler590nm dalga boyunda BioTek(ABD) ELx800cihazındaabsorbans ölçüldü. Ölçüm sonucunda bakterili kuyucuklardan elde edilen değelerden kontrol kuyucuğundan elde edilen değer çıkarıldı. Oluşan yeni değer 0,1'in üstünde ise pozitif 0,1'in altında ise negatif olarak kabul edildi.(Fertas-Aissani ve ark. 2012)

Örneğe ait absorbans- Kontrol kuyucuğu (LB Broth) absorbans= 0,1> POZİTİF
Örneğe ait absorbans- Kontrol kuyucuğu (LB Broth) absorbans= <0,1 NEGATİF

2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *K. pneumoniae* Suşlarında Virulans Genlerinin Gösterilmesi

2.6.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için bakteriler koyun kanlı besiyerinde 37°C'de 24 saaat inkübe edildi. DNA izolasyonu için ticari bir kit olan Qiagen Minikit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. İzolasyon üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı.

Bakteriyel Genomik DNA Ekstraksiyonu

DNA izolasyonu firma önerileri doğrultusunda (Qiagen, Almanya) yapıldı.

1) İlk aşamada bakteri örnekleri ve herbiri 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Üzerine 180 µl "ATL buffer"solüsyonu pipetlendi.

2) Her bir tüpe 20 µl "proteinaz K" solüsyonu ilave edildi ve vortekslendi. Tüpler 56°C' de 1-3 saate kadar inkübasyon yapıldı

3) İnkübasyon sonrasında kısa bir santrifüj (8000 rpm- 15 sn.) yapıldı.

4) Tüplere 200 µl "AL buffer" solüsyonu ilave edildi ve ardından 15 saniye vorteks yapıldı.

5)Daha sonra 70°C' de 10 dakika inkübasyon yapıldı ve yine kısa santrifüj yapıldı.

6) Tüplere 200 µl %96 etil alkol pipetlendi ve 15 saniye vortekslendi.

7) Tüplerdeki sıvı kolonlara aktarıldı. Kolonlar ise 2 ml' lik toplama tüplerine yerleştirildi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj yapıldı.

8) Kolon üzerine 500 µl "AW1 buffer" solüsyonu pipetlendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjedildi. Bu işlemden kolon altındaki toplama tüpler atıldı.

9) Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerine 500 µl "AW2 buffer" solüsyonu pipetlendi. Ardından 13000 rpm' de 3 dakika santrifüjedildi.

10) Kolon yeni bir tüpe yerleştirildi ve 13000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı.

11) Kolonlar 1.5'ml lik temiz tüplere aktarıldı ve 200 µl "AE buffer" pipetlendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilikten sonra 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapılarak DNA tüplere toplandı.

2.6.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

K. pneumoniae suşlarınında daha önceden tanımlanmış olan virulans genlerinden tip 1 ve tip 3 adezin (*fimH-1*, *mrkD*), FimH-like adezin (*kpn*), dış membran lipoprotein (*ycfM*), catecholate siderofor reseptör (*iroN*), enterobaktin biyosentez (*entB*), aerobaktin reseptör (*iutA*), yersiniabaktin reseptör (*fyuA*), yersiniabaktin biyosentez (*irp-1, irp-2, ybtS*), serum direnci ile ilişkili dış membran lipoprotein (*traT*), mukoid düzenleyici fenotip A (*rmpA*), mukoviskosite-ilişkili gen A (*magA*), hemolizin A (*hlyA*) ve sitotoksik nekrotizan faktör-1 (*cnf-1*) araştılması polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yapıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonuçalışması için gerekli bütün primerler üretici firma (İntronsağlık, İzmir) tarafından sentezlenmiştir. Primer dizileri ve çoğaltılan baz çifti uzunlukları çizelge 2.1'de yer almaktadır (Fertas-Aissani R.E veark 2012).

Çizelge 2.1: Çalışmamızda araştırılan virulans genleri

Primer	Primer dizisi (5'-3')	Bağlanma ısısı (°C)	Çoğaltılan baz çifti (bç)	Kaynak
fimH-1-F	ATGAACGCCTGGTCCTTTGC	55	688	Fertas-Aissani veark 2012
fimH-1-R	GCTGAACGCCTATCCCCTGC			
mrkD-F	CCACCAACTATTCCCTCGAA	52	240	Sahly ve ark 2008
mrkD-R	ATGGAACCCACATCGACATT			
Kpn-F	GTATGACTCGGGGAAGATTA	55	626	Fertas-Aissani ve ark 2008
Kpn-R	CAGAAGCAGCCACCACACG			
ycfM-F	ATCAGCAGTCGGGTCAGC	55	160	Fertas-Aissani veark 2008
ycfM-R	CTTCTCCAGCATTCAGCG			
entB-F	ATTTCCTCAACTTCTGGGGC	57	371	Fertas-Aissani ve ark 2008
entB-R	AGCATCGGTGGCGGTGGTCA			
iutA-F	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	63	300	Mamlouk ve ark 2006
iutA-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
irp-1-F	TGAATCGCGGGTGTCTTATGC	57	238	Schubert veark 2000
irp-1-R	TCCCTCAATAAAGCCCACGCT			
irp-2-F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	57	287	Schubert veark 2000
irp-2-R	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT			
ybtS-F	AGTGGTGCGTTCTGCGTC	50	477	Fertas-Aissani ve ark 2008
ybtS-R	ATTTCTACATCTGGCGTTA			
fyuA-F	GCGACGGGAAGCGATGATTTA	56	547	Schubert ve ark 2000
fyuA-R	TAAATGCCAGGTCAGGTCACT			
iroN-F	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	63	665	Mamlouk veark 2006
iroN-R	GACGCCGACATTAAGACGCAG			
traT-F	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	63	290	Mamlouk ve ark 2006
traT-R	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG			
rmpA-F	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	50	535	Yeh ve ark 2007
rmpA-R	CTTGCATGAGCCATCTTTCA			
magA-F	GGTGCTCTTTACATCATTGC	59	1282	Turton ve ark 2008
magA-R	GCAATGGCCATTTGCGTTAG			
hlyA-F	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	63	1177	Mamlouk ve ark 2006
hlyA-R	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA			
cnf-1-F	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	56	498	Mamlouk veark 2006
cnf-1-R	CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT			
Int-F	TGCGCCATGCGGTCCATC	55	714	Bach ve ark 2000
Int-R	GGTGCATAAGATTCTCGG			
asnT-int-F	ATCGCTTTGCGGGCTTCTAGGT	55	1393	Bach ve ark 2000
asnT-int-R	GAACGGCGGACTGTTAAT			

Polimeraz zincir reaksiyonuiçeriği her örnek için 50 µl olacak şekilde çizelgedeki 2.2'deki gibi hazırlandı. Bu elde edilen PCR içerikleri ile hedeflenen DNA parçalarını çoğaltmak için Sensoquest (Labcycler, Germany) PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıda belirtilen döngü siklusları uygulandı(Fertas-Aissani ve ark.2012).(Çizelge 2.3)

Çizelge 2.2 Polimeraz zincir reaksiyonureaksiyonu için gereken kimyasallar ve miktarı

Reaksiyon İçeriği	**Volüm**
10X PCR Buffer	5 µl
$MgCl_2$	2 µl
dNTP miks (10 nm)	1 µl
TaqDNA polimeraz	0,5 µl
Primer F (10 pmol)	1 µl
Primer R (10 pmol)	1 µl
DNA	3 µl
ddH_2O	36,5 µl
TOPLAM Volüm	**50 µl**

Çizelge 2.3: Polimeraz zincir reaksiyonucihazının döngü siklusları

Basamak	**Döngü Sayısı**	**Sıcaklık**	**Süre**
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	4 dk
Denatürasyon	30	94°C	30 sn
Bağlanma		Bkz.Çizelge 2.1	40 sn
Uzama		72°C	60 sn
Son Uzama	1	72°C	10 dk
Bekletme	1	4°C	∞

Agaroz jelin hazırlanması ve elektroforez

Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin gözlenmesi için jel elektroforez yapıldı. Bunun için aşağıda işlemler sıra ile yapıldı.

- 1,5 gr. agaroz 150 ml 0,5X TBE (pH 8.3) tamponu içeren erlen içerisinde çözüldü ve mikrodalga fırında ısıtılarak (4-6 dakika) agarozun tamamen erimesi sağlandı.
- Agaroz eridikten sonra eli yakmayacak sıcaklığa gelinceye dek soğumaya bırakıldı.
- Çözelti içerisine jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmek için 12µl syber green eklendi (stok solüsyon: 10 mg/ml) ve tamamen karışması sağlandı.
- Jel tankına taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan agaroz çözeltisi döküldü ve oda sıcaklığında 30-45 dakika katılaşmaya bırakıldı.
- Daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel havuzuna jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE tamponu eklendi.
- Kuyucuklara, 6µl amplifikasyon ürünü, 2µl bromfenol mavisi (6XLoading Dye Solution, Fermentas) karıştırılarak mikropipet yardımıyla yüklendi. Ayrıca DNA örnekleri ile beraber bir adet marker (Gene Ruler^{TM} 100bp DNA Ladder) ve OXA pozitif kontrol jel kuyucuklarına aynı şekilde yüklendi.
- 100 V'da 1 saat elektroforez yapıldı.
- Süre sonunda ethidyum bromid içeren jel, tanktan alınarak jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak) bantların varlığı gözlendi.
- Pozitif PCR ürünlerinin karşısına denk gelen ve moleküler stadart ile uyumlu baz çiftine sahip olan örneklerin, genomu taşıdığı kabul edildi.

3 BULGULAR

Hastane enfeksiyonu tanısı almış hastalara ait toplam 53 *K.pneumoniae* suşunun 12'si (%22.6) Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi, 8'i (%15.1) Tıbbi Onkoloji Servisi, 7'si (%13.2) Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi ve 26'sı (%49) diğer kliniklerde yatan hastalara ait idi. (Çizelge 3.1) Suşların 14'ü (%26.4) idrardan, 13'ü (%24.5) kandan,10'u (%18.9) drenaj sıvısından, 8'i (%15.1) yara örneklerinden, 7'si (%13.2) bronkoalveolar lavaj (BAL)'dan ve 1'i (%1.9) beyin-omurilik sıvısı (BOS)'dan üretilmiştir.(Çizelge 3.2)

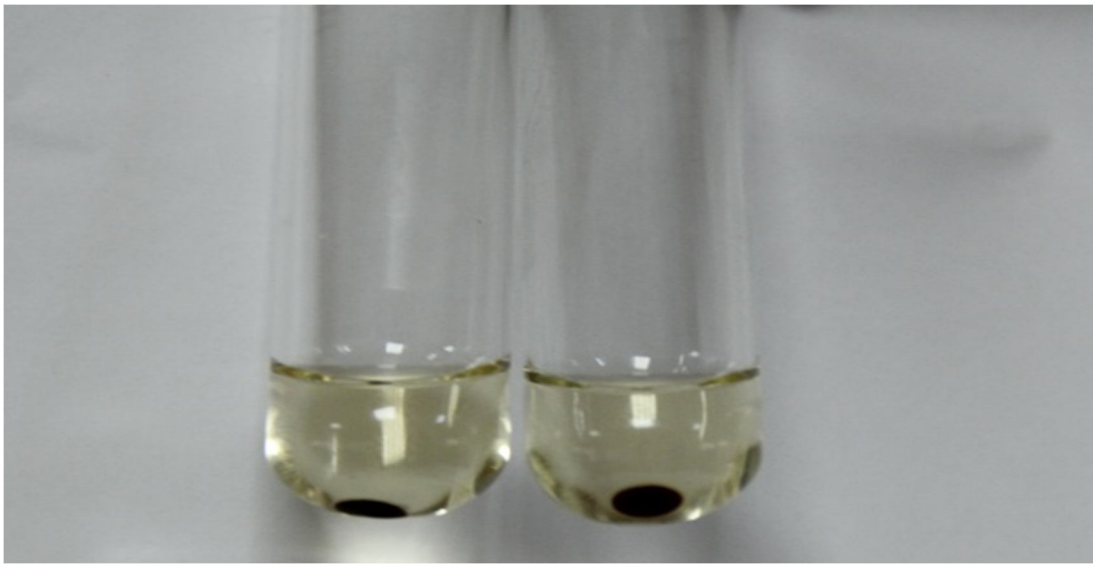
Çizelge 3.1:*K.pneumoniae* suşların kliniklere göre dağılımı

Örneğin Geldiği Servis	**Kadın**	**Erkek**	**Toplam**	**%**
Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi	3	9	12	22,6
Tıbbi Onkoloji Servisi	3	5	8	15,1
Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi	3	4	7	13,2
Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	4	1	5	9,4
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi	4	---	4	7,5
Nöroloji Servisi	3	1	4	7,5
Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi	2	2	4	7,5
Nefroloji Servisi	1	1	2	3,8
Gögüs Cerrahi Servisi	1	1	2	3,8
Plastik Cerrahi Servisi	---	2	2	3,8
Çocuk Onkolojisi Servisi	---	1	1	1,9
Genel Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi	1	---	1	1,9
Kardiyoloji Yoğun Bakım Ünitesi	1	---	1	1,9
Toplam	**26**	**27**	**53**	**100,0**

Çizelge 3.2: *K.pneumoniae* suşlarının örneklere göre dağılımı

Örnek Türü	**Kadın**	**Erkek**	**Toplam**	**%**
İdrar	9	5	14	26,4
Kan	5	8	13	24,5
Drenaj Mayii	7	3	10	18,9
Yara	4	4	8	15,1
BAL	---	7	7	13,2
BOS	1	---	1	1,9
Toplam	**26**	**27**	**53**	**100,0**

Triptik soy broth ve%5 koyun kanlı agar yöntemi ile alfa hemoliz yada hemolizin varlığı araştırılan hastane enfeksiyonu etkeni 53 *K.pneumoniae* suşunun hiçbirindeher iki yöntemlede alfa hemolizinüretimi belirlenmemiştir. Triptik soy broth yöntemi ile alfa hemolizin negatif bir suş Şekil 3.1'de ve %5 KKA yöntemi ile negatif örnek Şekil 3.2'de gösterilmiştir

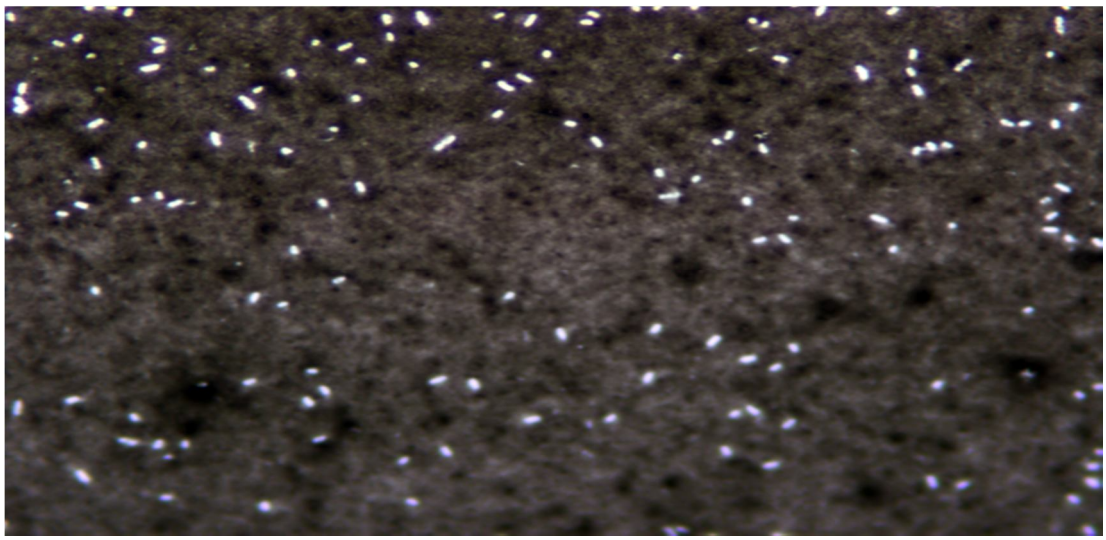


Şekil 3.1: Çalışmamızdatriptik soy broth yöntemi ile alfa hemolizin üretimi negatif bir izolat



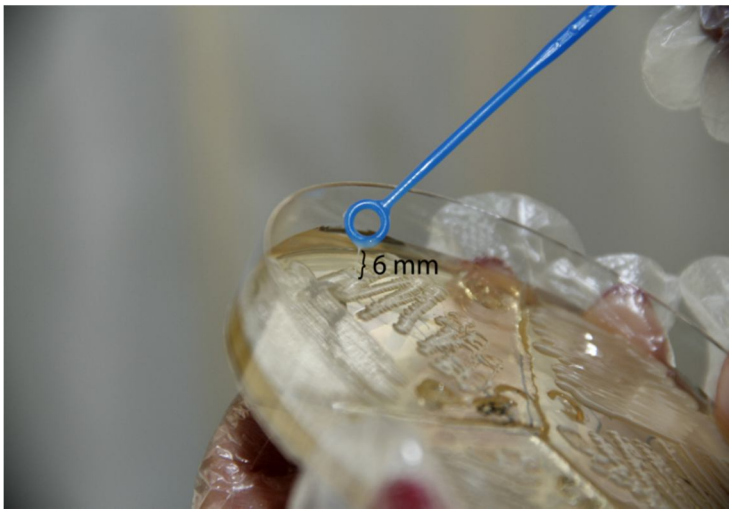
Şekil 3.2:%5 KKA yöntemi ile negatif suş

Çalışmaya aldığımız 53 *K.pneumoniae* suşunun hepsindeçini mürekkebi yöntemi ile kapsül varlığı görülmüştür. (Şekil 3.3)



Şekil 3.3: Çini mürekkebi yöntemi ile kapsül pozitif bir suş.(100X) (Çalışmamızdan)

Hipermukoviskosite testi sonucunda sadece onkoloji servisinden gelen yara örneğinden izole edilen bir suşta pozitif olarak (%1,9)belirlenmiş, diğer suşların hepsi negatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda hipermukoviskosite testi pozitif suş Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Hipermukoviskosite testi pozitif saptanan suş

Biyofilm oluşumu 53 *K.pneumoniae* suşunun 43'ünde (%81,1) pozitif olarak, 10'unda (%8,9) negatif olarak tespit edilmştir. (Şekil3.5)



Şekil 3.5: Biyofilm çalışmamıza ait mikroplate resmi

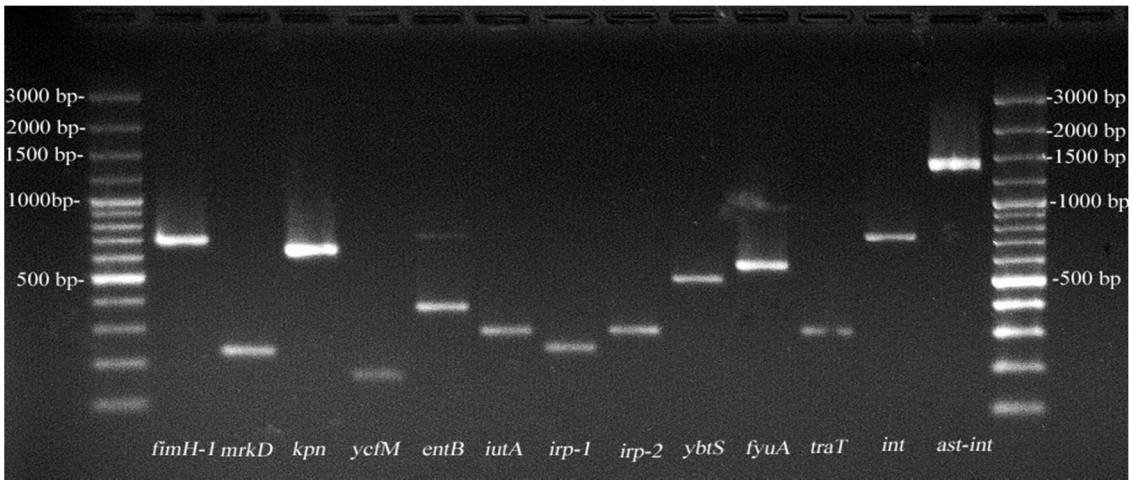
Hastane enfeksiyonu etkeni53*K.pneumoniae* suşunda araştırılan virulans genlerindenen sık enterobaktin biyosentez (*entB*) geni %96,2, siderofor genleri ise sırasıyla *fyuA* %54,7, *irp-1* %41,5, *ybtS* %41,5, *irp-2* %37,7 ve*iutA* %5,7 oranlarında bulunurken *iroN* suşların hiçbirinde belirlenmemiştir.

Çalışmamızda dış membran lipoprotein geni olan *ycfM* geni(%86.8) ile ikinci sırada yer alan ensık saptanan virulans geni olmuştur.Adezin genlerinden*mrkD*%83,*fimH-1* %64,2 ve *kpn* %49,1 oranında pozitif olarak belirlenmiştir.

Serum direnci ile ilişkili dış membran lipoprotein geni *traT* geni invazin genleri arasında saptanan tek gendi. Çalışmamızda suşların %11,3'ünde bu gen tespit edilmiştir. Diğer invazin genleri *magA* ve *rmpA* çalışmaya alınan suşların hiç birinde belirlenmemiştir. Aynı şekilde toksin varlığını gösteren *hlyA* ve *cnf-1* geni suşların hiç birinde saptanmamıştır.Çalışmada incelemeye aldığımız virulans genlerinin klinik örneklere göre dağılımı ve yüzdeleri çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3: Bu çalışmada saptanan virulans genlerinin klinik örneklere göre dağılımı ve yüzdeleri.

Virulans faktörleri	**Adezinler**			**İnvazinler**				**Siderefor**							**Toksinler**	
								ENT	AER	CR	YEB					
Örnek (n)	***ycfM***	***mrkD***	***fimH-1***	***kpn***	***traT***	***rmpA***	***magA***	***entB***	***iutA***	***iroN***	***fyuA***	***irp-1***	***ybtS***	***irp-2***	***hlyA***	***cnf-1***
İdrar (n:14)	11	11	10	7	0	0	0	13	1	0	8	7	7	7	0	0
Kan (n:13)	13	12	8	7	0	0	0	13	0	0	7	6	6	5	0	0
Drenaj Sıvısı(n:10)	9	9	5	5	3	0	0	10	0	0	7	5	5	4	0	0
Yara (n:8)	7	7	4	6	1	0	0	8	0	0	1	1	1	1	0	0
BAL(n:7)	5	4	6	0	2	0	0	6	2	0	5	2	2	2	0	0
BOS(n:1)	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
Toplam (n:53)	46	44	34	26	6	0	0	51	3	0	29	22	22	20	0	0
Toplam (%)	86,8	83	64,2	49,1	11,3	0	0	96,2	5,7	0	54,7	41,5	41,5	37,7	0	0



Şekil 3.6: Pozitif virulans genlerinin PCR işlemi sonucu jelde görünümü ve genlerin beklenen büyüklükte baz çiftleri (bp) şu şekildedir: *fimh-1*(688 bp), *mrkD*(240 bp), *Kpn*(626 bp), *ycfM*(160 bp), *entB*(371 bp), *iutA*(300 bp), *irp-1*(238 bp), *irp-2*(287 bp), *ybtS*(477 bp), *fyuA*(547 bp),*traT*(290 bp), *int*(714 bp), *asnt-int*(1393 bp).

Çalışmada incelemeye aldığımız klinik örneklerin virulans genlerine göre dağılımı çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4:Örneklerin virulans genlerine göre dağılımı

	Virulans faktörleri	Adezinler			İnvazinler				Siderefor							Toksinler	
									ENT	AER	CR	YEB					
Örnek no	**Örnek türü**	***ycfM***	***mrkD***	**fimH-1**	***kpn***	***traT***	***rmpA***	***magA***	***entB***	***iutA***	***iroN***	***fyuA***	***irp-1***	***ybtS***	***irp-2***	***hlyA***	***cnf-1***
1	BOS	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
2	Kan	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
3	Kan	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
4	Yara	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	İdrar	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
6	Kan	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
7	İdrar	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
8	Kan	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
9	Kan	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
10	Kan	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
11	Yara	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	İdrar	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
13	Kan	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
14	D.S	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
15	İdrar	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
16	İdrar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
17	BAL	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
18	BAL	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
19	BAL	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
20	BAL	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Yara	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	İdrar	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
23	BAL	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Kan	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25	İdrar	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
26	İdrar	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
27	İdrar	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Kan	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Kan	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
30	İdrar	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Yara	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
32	İdrar	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Kan	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Yara	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35	D.S	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
36	Yara	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
37	BAL	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
38	D.S	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
39	İdrar	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
40	İdrar	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
41	İdrar	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
42	Yara	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
43	Kan	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Yara	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
45	D.S	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
46	D.S	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
47	D.S	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
48	Kan	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
49	D.S	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
50	D.S	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
51	D.S	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
52	D.S	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
53	BAL	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-

BAL: Bronkoalveolar lavaj, BOS: Beyin-omurilik sıvısı, D.S: Drenaaj sıvısı.

4 TARTIŞMA

*Klebsiella*türleri fırsatçı patojenlerdir ve septisemi, pnömoni, üriner sistem ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi birçok hastalığa yol açabilmektedirler. Altta yatan başka hastalığı olan ve immün sistemi baskılanmış hastalar, bu bakterinin esas hedefidir. *Klebsiella*'nın tüm hastane kaynaklı enfeksiyonlar içindeki % 5-7'lik oranı, önemli nozokomiyalpatojenler arasında sınıflandırılmasına yol açmıştır.Nozokomiyal *Klebsiella*enfeksiyonları, gelişmiş ülkelerde hastaların ortalama ömürleri veekonomi üzerinde ağır bir yük olmayı sürdürmektedir.

Biyofilm, birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterinin organik bir polimer matriks içine gömülmesidir.Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerin ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği diğer avantajlardır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve humoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur.Biyofilm pek çok soruna neden olduğu için ve onların oluşumu ve gelişimini daha iyi anlayabilmek için dünya genelinde çok sayıda çalışma yapılmaktadır(Gün ve Ekinci 2009).*Klebsiella* patogenezinde biyofilm oluşumu ve gelişiminin önemli bir rolü olduğu ileri sürülmüştür.İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), gebelik, kateter ilişkili enfeksiyonlar (KİE) ile biyofilm oluşumun arasındaki ilişkinin olup olmadığı en çok çalışılan konulardır. İdrar yolu içinde biyofilm oluşumu, tekrarlayan ve kronik enfeksiyonların en iyi açıklamasıdır. Fertas-Aissani ve ark. (2012)54 *K.pneumoniae* suşunda biyofilm oluşumunumikroplate yöntemi ile incelediği çalışmada, izolatların48'inde (%88,8) pozitif olduğunu saptamışlardır. Ayrıca moleküler yöntemle biyofilm varlığını belirlemek için yaptıkları PCR çalışmasında adezingenlerinden *fimH-1* genini %100 oranında pozitif belirlemişlerdir. Diğer adezin genlerinden *ycfM*, *mrkD vekpn* genlerini sırasıyla %96,3, %96,3 ve % 63 oranında pozitif bulmuşlardır. Alcántar-Curiel ve ark. (2013)tip 1, tip 3 adezin ve biyofilm varlığının araştırılması ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, 69 *K.pneumoniae*suşun 55'inde (%79,7) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Suşların 52'sinde (%75,4) tip 1'in ve 38'inde (%55,1) tip 3 adezin pozitif olarak belirlenmiştir. Ayrıca PCR çalışmada suşların 14'ünde (%20,3)

*mrkD*geni pozitif bulunmuştur.Stahlhut ve ark.'nın (2008) yaptıkları tip 1 adezin varlığının genotipik araştırmasına yönelik çalışmalarında, 65 *K.pneumoniae*suşunun 57'sinde (%87,5) *fimH-1* geni pozitif çıkmıştır.Kore'de CTX-M üreten 33 *K.pneumoniae*izolatı ile GSBL negatif olan 65 *K.pneumoniae*izolatında virulans faktörlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada suşların tamamında *fimH-1* geni pozitif çıkmıştır (Shin ve Soo Ko, 2014).Fransa'da Brisse ve ark. (2009) *K.pneumoniae*'nın virulans genleri ile klonal ilişkiyi inceledikleri çalışmada 79 *K.pneumoniae* suşunda 77'sinde (%97,5) *fimH-1*genini, 52'sinde (%65,8) *mrkD* genini pozitif belirlemişlerdir. Çalışmamızda biyofilm oluşumu mikroplate yöntemi ile incelenmiş; 53 hastane enfeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* suşunun 43'ünde (% 81,1) biyofilm oluşumu pozitif olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızın PCR aşamasındadış membran lipoprotein geni olan *ycfM* suşların %86,8'inde pozitif bulunmuştur. Adezin genlerinden *ycfM*'nin ardından en sık saptanan gen *mrkD*'dir (%83). Bu gruba ait diğer adezin genleri *fimH-1* %64,2 ve *kpn* %49,1 oranında pozitif olarak belirlenmiştir.

Bakteri hemolizinleri, ekstraselüler sitotoksik polipeptidlerdir. Eritrosit yanında polimorf nüveli lökosit, monosit ve fibroblast gibi hücrelere de*in vitro* toksik etki gösterirler. Hemolizinler alfa, beta ve gama hemolizin olarak üç farklı grupta incelenir. Bakteriyemili ve piyelonefritli hastalardan izole edilen suşların alfa hemolizin üretimi, dışkıda ve asemptomatik bakteriüri tablosundakihastalardan izole edilen suşlardan daha fazladır (Kepekçi 2005).Çalışmamızda %5 koyun kanlı agar ve triptik soy broth yöntemi ile alfa hemolizin varlığını araştırdığımız hastane enfeksiyonu*K.pneumoniae* suşunun hiçbirinde her iki yöntemlede alfa hemolizin üretemi gözlenmemiştir.Genotipik çalışmalarda suşların hiç birinde alfa hemolizin ilişkili *hlyA* ve *cnf-1* geni saptanmamıştır. Amerika'da Fertas-Aissani ve ark. (2012) 54*K.pneumoniae* suşunda alfa hemolizin varlığını araştırdıkları benzer çalışmada fenotipik yöntemle suşların hiçbirinde hemolitik aktivite saptamamış ve izolatlarda *hlyA* ve *cnf-1* genleri negatif bulunmuştur.

Klebsiella izolatlarındakompleks asidik polisakkaritlerden oluşan önemli kapsüler yapılar bulunur. Bugüne kadar, tanımlanan 82 kapsüler antijenin 77 tanesi uluslararası tanınan serotip şemasının temelidir.Kapsüler alt ünitelerin tekrarlaması, 4-6 şeker ve çok sık olarak üronik asitten ibarettir.Kapsül, *Klebsiella*'nın en önemli

virulans faktörüdür. Kapsüler materyal, bakteriyel yüzeyi iri tabakalarla örten fibriler yapıların kalın bağlarıyla şekillendirir. Bu da bakteriyi, bir taraftan polimorf nüveli lökositlerin yaptığı fagositten korurken, diğer taraftan bakterisidal serum faktörleri tarafından ölmesini engeller.Klinik izolatların serotip K1 ya da K2 kapsülleri ve/veya hipermukovisköz (HMV) fenotip olarak bilinen bir kapsül ile bağlantılı mukopolisakkarid ağ-yapı ile ilişkili genlere sahip olduğubilinmektedir. Singapur ve Taiwan'lı araştırıcıların yaptıkları çok merkezli çalışmada karaciğer apselerinden izole edilen 73*K.pneumoniae* izolatında kapsüler serotipler, *magA* ve *rpmA'*nın ilişkisi araştırılmıştır(Yeh ve ark 2007). Hastalardan izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında; 34 K1 serotipinin tamamında *magA* ve *rpmA* geni pozitif bulunmuş; 15 K2 serotipinin tamamında *rpmA* geni pozitif bulunmuş ancak *magA* genine rastlanmamıştır. K1 ve K2 serotipine rastlanmayan diğer 24 suşun 16'sında (%66,7) *rpmA* geni pozitif bulunmuş ancak *magA* genine rastlanmamıştır. Yazarlar *K. pneumoniae'*yebağlı karaciğer apselerinde K1 ve K2 kapsüler serotiplerinin virulansı belirlemede *magA* ve *rpmA* genlerinden daha önemli rol oynadığını ifade etmişlerdir.(Yeh ve ark 2007). Chang ve ark.'nın(2012) Haziran 2010 ile Temmuz 2011 tarihleri arasında bakteremi etkeni 31 *K.pneumoniae* suşu ile yaptıkları çalışmada 3 izolatta HMV testini ve*magA* genini pozitif belirlemiş, *rmpA* genini ise iki izolatta pozitif saptamışlardır.Hartman ve ark.(2009) Afrika Yeşil Maymun'larının oral ve rektal bölgelerinden izole ettikleri 177 *K.pneumoniae* suşunun 64'ünde (%36,2) HMV fenotip testi pozitif çıkmıştır. Genotipik çalışmada ise suşların 42'sinde (%23,7) *rmpA*, 15'inde (%8,5) *magA* geni pozitif bulunmuştur. HMV pozitif, fakat *magA* geni ve *rmpA* geni negatif olan *K.pneumoniae* suşlarının sayısı 7 (%4) olarak belirlenmiştir.

Sağlıklı ve hasta izolatları ile karşılaştırmalı yapılan çalışmada Lin ve ark. (2013) 13 peritonitli, 54 üriner sistem enfeksiyonu olan hastalar ile 76 sağlıklı yetişkinden izole ettikleri *K.pneumoniae* suşlarını karşılaştırmışlar ve peritonitli hastaların hiç birinde HMV fenotipi ve *rmpA* genini saptamamışlardır. Üriner sistem enfeksiyonu olan hastalara ait izolatların15'inde (%27,8) HMV fenotipi ve 16'sında (%29,6) *rmpA* geni belirlenirken sağlıklı yetişkinlerin 2'sinde (%2,6) HMV fenotipi ve 9'unda (%11,8) *rmpA* geni tespit etmişlerdir.Fertas-Aissani ve ark.(2012) 54 *K.pneumoniae* suşunda yaptıkları fenotipik çalışmada suşların tamamında kapsül varlığı belirlenmiş ve hipermukoviskosite testinde suşların 5'inde (%9,2) pozitif

bulunmuştur. Hipermukoviskosite ile ilgili virulans genlerinden *rmpA* suşların 2'sinde (%3,7) pozitif çıkmış, *magA* suşların tümünde negatif bulunmuştur.

Serum direnci ile ilişkili dış membran lipoprotein geni olan *traT* geni suşların 1'inde (1,8) pozitif bulunmuştur. Bizim çalışmamızda *traT* geni invazin genleri arasında saptanan tek gendi ve suşların %11,3'ünde tespit edilmiştir. Çalışmamızda 53*K.pneumoniae* suşunun tamamında çini mürekkebi boyama tekniği ile kapsül varlığı gösterilmiştir. Hipermukoviskosite testinde suşların 1'inde pozitif bulunmuş olup *magA* ve *rmpA* genleri çalışmaya alınan suşların hiç birinde belirlenmemiştir.

Birçok bakteri konakçıda siderefordenilen yüksek affiniteli düşük molekül ağırlıklı şelatlar salgılayarak demir sağlamaya çalışır. Bu sideroforlar rekabet edecek şekilde konakçı proteinlerine sarılmış demiri alma yeteneğindedir (Griffiths ve ark 1988).En çok rastlanılan grup fenolat tipi sideroforlardır. En iyi bilinen temsilcileri olan enterobaktin, 2,3-dihidroksil-benzol-serin'in periyodik trimeridir. Bu siderofor, *Enterobactericeae*'nın ana demir yükseltme sistemini kapsar gibi görünür ve hemen hemen *E. coli* ve *Salmonella* spp.'nin bütün klinik izolatlarından sentezlenir (Griffiths 1987). Yapılan çalışmalarda *K.pneumoniae*suşlarında enterobaktin varlığını gösteren enterobactin biyosentez geni(*entB*) %99-100 oranında belirlenmiştir (Fertas-Aissani ve ark. 2012, Podschunve ark 2000,Bachman ve ark. 2011). Buna karşın çalışmalarda aerobactin biyosentez geni (*iutA*) daha düşük oranlarda (%5,5-29,5) bulunmuştur. (Fertas-Aissani, Shin ve Soo Ko , Podschunve ark 2000). Çalışmamızda*entB* ve *iutA* genleri %96,2 ve %5,7 olarak tespit edilmiştir. Diğer siderofor genlerinden sırasıyla *fyuA* %54,7, *irp-1* %41,5, *ybtS* %41,5, *irp-2* %37,7 ve *iutA*%5,7oranlarında bulunurken, *iroN* suşların hiçbirinde belirlenememiştir.

5 SONUÇ ve ÖNERİLER

K. pneumoniae, morbidite ve mortaliteden en çok sorumlu tutulan ve aynı zamanda hastane infeksiyonlarından en sık izole edilen *Klebsiella* türüdür. Erişkin ve pediyatri yoğun bakım ünitelerinde(YBÜ) yatan hastalar, diyabet ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi hastalıkların eşlik ettiği immün sistemi baskılanmış hastalar, damar içi katater ve idrar sondası uygulananlar ile geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalar *K.pneumoniae*'ya bağlı infeksiyonlarıngelişimi açısından risk altındadırlar. *K.pneumoniae*'nın bu kadar infeksiyon yapabilme kapasitesinin altında yatan en önemli neden bakteriye ait virulans faktörleridir.

Çalışmaya aldığımız hastane infeksiyonu etkeni 53 *K.pneumoniae* izolatındanyapılan in vitro testler sonucunda; %100'nün kapsül oluşturuduğu, %81,1'nin biyofilm yapabildiği, %1,9'unda hipermukoviskosite gösterdiği saptanmıştır. İzolatların hiçbiri hemolizin tespit edilmemiştir.

Yapılan PCR çalışması sonucunda en sık saptanan virulans genisidereforgenlerinden*entB* geni %96,2 oranında saptanmıştır. Bunu adezin genlerinden dış membran lipoprotein geni olan *ycfM* (%86,8) ve *mrkD*(%83) izlemiştir. Serum direnci ile ilişkili dış membran lipoprotein geni olan *traT* geni ve suşların %11,3'ünde tespit edilmiştir. Toksin varlığını gösteren *hlyA* ve *cnf-1* geni suşların hiç birinde saptanmamıştır.Yine bu suşların büyük bir çoğunluğunun (%49,1-86,8)adezyon genlerine sahip olduğu belirlenmiştir.

Hastane enfeksiyonu etkeni53*K.pneumoniae* suşunda araştırılan virulans genlerindenenterobaktin biyosentez (*entB*) geni kan, drenaj sıvısı, yara ve BOS örneklerinin tamamında, idrar örneklerinde isetamamına yakın oranında tespit edilmiştir. Siderofor genleri ise sırasıyla *irp-1,irp-2*, *ybtS*BOS örneğinde ve idrar örneklerinde ise yarısında belirlenmiştir.Bir diğer siderefot geni *fyuA*BOS örneğinde ve drenaj sıvısındabüyük bölümünde gözlenmiştir.*iutA*geniBAL örneklerinin yarısından azında görülmüştür. Adezin genlerinden dış membran lipoprotein geni olan *ycfM*kan ve BOS örneğinde, *mrkD*geni ise BOS örneğinde ve kan örneklerinin büyük kısmında de gözlenmiştir.Bu gruba ait diğer adezin genleri *fimH-1*BOS

örneğinde ve BAL örneklerinde büyük bölümünde bulunmuştur.*kpn*geni BOS örneklerinin tamamında yara örneklerinin yarısından fazlasındapozitif olarak belirlenmiştir.Serum direnci ile ilişkili dış membran lipoprotein geni *traT* geni BAL örneklerin yarısından azında tespit edilmiştir.

Hastane enfeksiyonu etkeni *K.pneumoniae*izolatlarında kapsül, adezinler, enterobaktin ve biyofilm oluşturma patojenitelerinin temelini oluşturuyor görünmektedir. Ancak toksijenite ve hipermukoviskozite invazivliği arttıran güçlü virulans faktörleri olarak bilinmektedir. Bu virulans faktörleri yatkınlığı olan kişilerde gerçek bir tehdit oluşturmaktadır. Antibiyotik direnci ile ortaya çıktığında ise daha tehlikeli olacaktır. Hastane enfeksiyonunun kontrolünde antibiyotik direncinin yanı sıra toksin ve invazyon yeteneğinin sürekli takip edileceği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6 KAYNAKLAR

Aguilar A, Merino S, Rubires X, Tomas JM. 1997. Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37°C. Infect. Immun; 65: 1245-50.

Akalın H. 2003."Coğul Direncli Gram Negatif Bakteriler" Doğanay M, Unal S. Hastane İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara:: sayfa 269-87

Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. 2004 Hastane enfeksiyonu etkeni enterobakterilerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi; 11: 6–9.

Akova M, Unal S, Akalın HE 1993 "Bakteriyel Pnomoniler" Prof. Dr. Guler Kanra, Prof. Dr. H. Erdal Akalın, İnfeksiyon hastalıkları, Guneş Kitapevleri yayınları, , 2. baskı: sayfa 92-109

Alberti S, Marques G, Camprubi S, Merino S, Tomas JM, Vivanco F, Benedi VJ. 1993 C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins, Infect. Immun,; 61: 852-60.

Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine N, De la Cruz M A ve Girón J. A. (2013). Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation.Virulence, 4(2), 129-138.

Amako K, Meno Y, Takade A. 1988 Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and Escherichia coli K1. J Bacteriol, ; 170: 4960- 2.

Athamna A, Ofek I, Keisari Y, Markowitz S, 1991 DGGS, Sharon N Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte- derived macrophages. Infect. Immun,; 59: 1673-82.

Ayars GH, Altman LC, Fretwell MD. 2000; Effect of decreased salivation and pH on the adherence of *Klebsiella* species to human buccal epithelial cells.Infect. Immun, 1982; 38: 179-82.

Aydoğan H, Başustaoğlu A. Nozokomiyal patojen olarak *Klebsiella*türlerinin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. Hastan İnfeks Derg. 4: 135-43.

Ayling-Smith B, Pitt TL. 1990; State of the art in typing: *Klebsiella* spp. J Hosp Infect, 16: 287-95.

Babu JP, Abraham SN, Dabbous MK, Beachey EH. 1986; Interaction of a 60-Kilodalton D-mannose-containing salivary glycoprotein with type 1 fimbriae of *Escherichia coli*.Infect. Immun, 54: 104-8.

Bach S, de Almeida A, Carniel E. The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiol Lett 2000;183:289–94.

Bachman MA, Oyler JE, BurnsSH, Caza M, Lépine F, Dozois CM, & Weiser JN (2011). Klebsiella pneumoniae yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. Infect. Immun, 79(8), 3309-3316.

Bagley S, Seidler RJ, Brenner DJ. 1981; *Klebsiella* planticola sp. nov.: a new species of Enterobacteriaceae found primarily in nonclinical enviroNments. Curr Microbiol, 6: 105-9.

Balish MJ, Jensen J, Uehling DT. 1982; Bladder mucin: a scanning electron microscopy study in experimental cystitis. J Urology, 128: 1060-3.

Batshon BA, Baer H, Shaffer MF. 1963; Immunologic paralysis produced in mice by *Klebsiella pneumoniae* type2 polysaccharide. J Immunol, 90: 121-6.

Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. 1993; Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. Infection, 21: 18-22.

Benjamin WH, Turnbough CL, Posey BS, Briles DE. 1985; The ability of Salmonella typhimurium to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. Infect. Immun, 50: 392-7.

Bergogne-Berezin E. 1995; Nosocomial pathogens: new pathogens, incidence, prevention.Presse Med, 24: 89-97.

Bilgehan H 2000, "*Klebsiella*" Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, Klinik mikrobiyoloji- Ozel Bakteriyoloji veBakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 10. baskı: sayfa 59-68

Bilgehan H. 1992; *Enterobacteriaceae.* Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Barış Yayınları. Fakülteler Kitabevi 425-51.

Björksten B, Kaijser B. 1978; Interaction of human serum and neutrophils with Escherichia coli strains: differences between strains isolated from urine of patients with pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria. Infect. Immun, 22: 308-11.

Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, & Call DR (2003). Variation in biofilm formation among strains of Listeria monocytogenes. Appl Environ Microb, 69(12), 7336-42.

Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. 1997; Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC b-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Ch, 41: 563-9.

Brisse S, Issenhuth-Jeanjean S & Grimont PAD (2004) Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. J Clin Microbiol 42: 3388–98.

Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, & Grimont P (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. PloS one, 4(3), e4982.

Brock JH, Williams PH, Liceaga J, Wooldridge KG 1991; Relative availability of transferrin-bound iroN and cell-derived iroN to aerobactin- producing and enterobactin-producing strains of Escherichia coli and to other microorganisms. Infect. Immun, 59: 3185-90.

Brown C, Seidler RJ 1973; Potential pathogens in the environment: *Klebsiellapneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. Appl Microbiol, 25: 900-4.

Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. 1978; Role of iron in bacterial infection, Curr Top Microbiol, 80: 1-35.

Burwen DR, Banerjee SN, Gaynes RP. 1994; Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram-negative bacilli in the United States, J Infect Dis, 170: 16221625.

Campbell WN, Hendrix E, Cryz S, Cross AS. 1996; Immunogenicity of a 24-valent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine and an eightvalent Pseudomonas O-polysaccharide conjugate vaccine administered to victims of acute trauma. Clin Infect Dis, 23: 179-81.

Çetinkaya Z, Çiftçi İ. H, Aktepe O. C, Şafak B, Altındiş M. 2005; Klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg 19: 1- 4.

Chae MS, and Schraft H (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. Int J Food Microbiol, 62(1), 103-111.

Chaiban G, Hanna H, Dvorak T, & Raad I (2005). A rapid method of impregnating endotracheal tubes and urinary catheters with gendine: a novel antiseptic agent. J Antimicrobial Che, 55(1), 51-56.

Chang FY, Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. The Lancet infectious diseases, *12*(11), 881-887.

Christensen SC, Korner B. 1972; An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. ScandJ Urology and Nephrol, 6: 232-8.

Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC & Wang JT (2006) Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. J Infect Dis 193: 645–4.

Ciurana B, Tomas JM. 1987; Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum, Infect. Immun, 55: 2741-6.

Clegg S, Gerlach GF. 1987; Enterobacterial fimbriae.J Bacteriol, 169: 934938.

Coovadia YM, Johnson AP, Bhana RH, Hutchinson GR, George RC, Hafferjee IE. 1992; Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of

infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. J Hosp Infect, 22: 197- 205.

Crouch JR, Atherton JG & Platt H (1972) Venereal transmission of *Klebsiellaaerogenes* in a thoroughbred stud from a persistently infected stallion. Vet Rec 90: 21–4.

Cryz SJ, Fürer E, Germanier R. 1984; Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. Infect. Immun, 43: 440-1.

Cryz SJ, Jr, Fürer E, Germanier R. 1985; Safety and immunogenicity of *Klebsiella pneumoniae* K1 capsular polysaccharide vaccine in humans. J Infect Dis, 151: 665-71.

Cryz SJ, Jr, Mortimer P, Cross AS, Fürer E, 1986; Germanier R. Safety and immunogenicity of a polyvalent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine in humans.Vaccine, 4: 15-20.

Curie K, Speller DCE, Simpson RA, Stephens M, & Cooke P I (1978). A hospital epidemic caused by a gentamicin-resistant *Klebsiella* aerogenes. J Hygiene, 80(01), 115-23.

De Champs C, Rouby D, Guelon D, Sirot J, Sirot D, Beytout D, Gourgand JM. 1991;A case-control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) betalactamase. J Hosp Infect, 18: 5-13.

De Lorenzo V, Martinez JL. 1988; Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. European J. Clin. Microbiol Infect Diseas, 7: 621- 9.

Di Martino P, N. Cafferini, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud. 2003. *Klebsiella pneumoniae* type-3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. Res. Microbiol. 154:9–16.

Doğanay M. 2000; Nozokomiyal bakteriyemilerde tedavi. Klimik Derg. 13 (Özel Sayı): 16–8.

Domenico P, Johanson WG, Straus DC. 1982; Lobar pneumonia in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella* pneumoniae, Infect. Immun, 37: 327-35.

Donlan RM, and J. William Costerton. (2002): "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin microbiol rev 15.2 167-93.

Edelman R, Taylor DN, Wasserman SS, Mcclain JB, Cross AS, Sadoff JC, Que JU, Cryz SJ. 1994; Phase 1 trial of a 24-valent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine and an eight-valent Pseudomonas O-polysaccharide conjugate vaccine administered simultaneously. Vaccine, 12: 1288-94.

Edmondson AS, Cooke EM, Wilcock APD, Shinebaum R.A 1980; Comparison of the properties of *Klebsiella* strains isolated from different sources.J Med Microbiology , 13: 541-50.

Ehrenwort L, Baer H. 1956; The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* for mice: the relationship to the quantity and rate of production of type-specific capsular polysaccharide, J Bacteriol, 72: 713-17.

Eisenstein IB, Zaleznik FD,Mandell GL, Benett JE, Dolin R 2000, "Enterobacteriaceae", Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, fifth edition, volume 2: page 2294-310

El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, & Bakour R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. Pathol Biol, 61(5), 209-216.

Erdem B 1999, "*Enterobacteriaceae*" Prof. Dr. Şemsettin Ustacelebi, Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 1. baskı: sayfa 471-515

Ewald A, Glückermann SK, Thull R, & Gbureck U. (2006). Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. Biomedical engineering online, 5(1), 22.

Fader RC, Davis CP. 1982; *Klebsiella* pneumoniae-induced experimental pyelitis: the effect of piliation on infectivity. J Urology, 128: 197-201.

Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL & Chang SC (2007) *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. Clin Infect Dis 45: 284–93.

Farmer JJ. 1999:*Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds). M Clin Microbiol. 7th ed, Washington DC: ASM Press, 442-58.

Favre-Bonte S, B Joly, and C Forestier. 1999. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interaction of this bacterium with epithelial cells. Infect. Immun. 67:554–61.

Ferragut C, Izard D, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. 1983; *Klebsiellatrevisani*i: a new species from water and soil, Int J System Evo Bacteriol, 33: 133-42.

Fironn, Ofek I, Sharon N. 1984; Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria.Infect. Immun, 43: 1088-90.

Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrša V, & Šušković J. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of Lactobacillus acidophilus M92. J Appl Microbiol, 98(2), 285-92.

French GL, Shannon KP, Simmons N. 1996; Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and b-lactam-b-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 b-lactamase.J. Clin. Microbiol, 34: 358-63.

Fumagalli O, B Tall, C Schipper, and T A Oelschlaeger. 1997. N-glycosylated proteins are involved in efficient internalization of *Klebsiella pneumoniae* by cultured human epithelial cells. Infect. Immun. 65:4445–51.

Gavini F, Izard D, Grimont PAD, Beji A, Ageron E, Leclerc H. 1986; Priority of *Klebsiella* planticola Bagley, Seidler, and Brenner 1982 over *Klebsiella* trevisanii Ferragut, Izard, Gavini, Kersters, DeLey, and Leclerc 1983,IntJ System Evo Bacteriol, 36: 486-8.

Gavini F, Leclerc H, Lefebvre B, Ferragut C, Izard D. 1977;Etude taxonomique d'enterobacteries appartenant ou apparentees au genre *Klebsiella*. Ann Microbiol (Inst Pasteur),128B: 45-49.

Gerlach GF, Allen BL, Clegg S. 1989; Type 3 fimbriae among enterobacteria and the ability of spermidine to inhibit MR/Khemagglutination.Infect. Immun, 57: 219-24.

Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carlesnurit MJ, Despaux E, Ramuz M. 1994; Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital, J. Clin. Microbiol, 32: 301-5.

Gower PE, Taylor PW, Koutsaimanis KG, Roberts AP. 1972; Serum bactericidal activity in patients with upper and lower urinary tract infections, Clin Sci., 43: 13-22.

Griffiths E, Chart H, Stevenson P. 1988.High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence, Roth JA (eds), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology,p. 121-37, Washington.

Griffiths E. 1987.The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, J. J. Bullen and E. Griffiths (eds), iron and infection. John Wiley& Sons, Inc,p. 69- 137. New York.

Gün İ, Ekinci FY veGün, İ, (2009). Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. GIDA 34 (3): 165-73

Gür D, Pitt TL, Hall LMC, Akalın EH, Livermore DM. Diversity of *Klebsiella*e with extended-spectrum b-lactamases at a turkish university hospital, J Hosp Infect, 1992; 22: 163-78.

Gür D, Ünal S. 1996; Yoğun bakım ünitelerinde izole edilen gram-negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. Flora 1: 153-9.

Hartman LJ, Selby EB, Whitehouse CA, Coyne SR, Jaissle JG, Twenhafel NA, ... & Kulesh DA. (2009). Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the rmpA or magA genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: screening of nonhuman primates. J Mol Di, 11(5), 464-471.

Hibbertrogers LCF, Heritage J, Gascoynebinzi DM, Hawkey PM, Todd N, Lewis IJ, Bailey C. 1995; Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward, J Antimicrobial Che, 36: 65-82.

Highsmith AK, Jarvis WR. 1985; *Klebsiellapneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity, Infect Control, 6: 75-7.

Horan T, Culver D, Jarvis W, Emori G, Banerjee S, Martone W, Thornsberry C. 1988; Pathogens causing nosocomial infections, Antimicrobic Newsletter, 5: 65-7.

Hornick DB, Allen BL, Horn MA, Clegg S. 1992; Adherence to respiratory epithelia by recombinant Escherichia coli expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products, Infect. Immun, 60: 1577-88.

Hornick DB, BL Allen, MA Horn, and S Clegg. 1991. Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 29:1795–1800.

Hornick DB, J Thommandru, W Smits, and S Clegg. 1995. Adherence properties of an mrkD-negative mutant of *Klebsiellapneumoniae*. Infect. Immun. 63:2026–32.

Iwahi T, Abe Y, Nakao M, Imada A, Tsuchiya K. 1983; Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli*, Infect. Immun, 39: 1307-15.

Izard D, Ferragut C, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. 1981; *Klebsiellaterrigena*, a new species from soil and water, Int J System Evo Bacteriol, 31: 116-27.

Jacoby GA. 1996; Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s,Annual Review of Medicine, 47: 169-79.

Joiner KA. 1988; Complement evasion by bacteria and parasites. Ann Re Microbiol, 42: 201-30.

Jones GW, Isaacson RE. 1983; Proteinaceous bacterial adezins and their receptors.Crit Rev Microbiol, 10: 229-60.

Jones RN, C Mendes, PJ Turner, and R Masterton. 2005. An overview of the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program: 1997–2004. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 53:247–56.

Kabha K, Nissimov L, Athamna A, Keisari Y, Parolis H, Parolis LAS, Grue RM, Schlepper-Shafer J,1995; Ezekowitz ARB, Ohman DE, Ofek I. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiellapneumoniae*. Infect. Immun, 63: 847-852.

Kauffmann, F. (1949): "On the serology of the *Klebsiella* group." Acta Pathol Microbiol Scand 26.3 381-406.

Kepekçi, P. (2005). İdrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Suşlarında Fosfomisin Trometamol Duyarlılığı. Uzmanlık Tezi. Okmeydanı eğitim ve araştırma hastanesi enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji kliniği.

Khimji PL, Miles AA. 1978; Microbial iron-chelators and their action on *Klebsiella* infections in the skin of guinea-pigs.British J Exp Pathol, 59: 137-47.

Köksal İ. 2000; Nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi. Klimik Derg. 13 (Özel Sayı): 21 – 2.

Lin WH, Tseng CC, Wu AB, Yang DC, Cheng SW, Wang MC, & Wu JJ. (2013). Clinical and microbiological characteristics of peritoneal dialysis-related peritonitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in southern Taiwan. J Microbiol, Immun and Infect.

Lock R, Dahlgren C, Linden M, Stendahl O, Svensbergh A,Öhman L. 1990; Neutrophil killing of two type 1 fimbria-bearing *Escherichia coli* strains: dependence on respiratory burst activation, Infect. Immun, 58: 37-42.

Lucet JC, Chevret S, Decre D, Vanjak D, Macrez A, Bedos JP, Wolff M, Regnier B. 1996; Outbreak of multiply resistant Enterobacteriaceae in an intensive care unit: Epidemiology and risk factors for acquisition. Clin Infect Dis, 22: 430-36.

Maayan MC, Ofek I, Medalia O, Aronson M. 1985; Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice.Infect. Immun, 49: 785-9.

Mamlouk K, Boubaker IBB, Gautier V, Vimont S, Picard B, Redjeb SB, & Arlet G. (2006). Emergence and outbreaks of CTX-M β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. J. Clin. Microbiol, 44(11), 4049-4056.

Mandine E, Salles MF, Zalisz R, Guenounou M, Smets P. 1990; Murine monoclonal antibodies to *Klebsiella pneumoniae* protect against lethal endotoxemia and experimental infection with capsulated *K. pneumoniae*. Infect. Immun, 58: 2828-33.

Mangan DF, Snyder IS. 1979; Mannose-sensitive stimulation of human leucocyte chemiluminescence by *Escherichia coli*, Infect. Immun, 26: 1014-9.

Martin CM, Ikari NS, Zimmerman J, Waitz JA. 1971;A virulent nosocomial *Klebsiella* with a transferable R factor for gentamicin: emergence and suppression. J Infect Dis,124(Suppl.): S24-S29.

Martinez JL, Cercenado E, Baquero F, Perez-Diaz JC, Delgado- Iribarren A. 1987; Incidence of aerobactin production in gram-negative hospital isolates, FEMS Microbiology Letters, 43: 351-3.

Matsen JM, Spindler JA, Blosser RO. 1974; Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates, Applied Microbiology, 28: 672678.

Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. 1992; Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing.Infect. Immun, 60: 2529-35.

Mıdık F., Tokatlı M., Özçelik F. (2011). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve üretimini etkileyen faktörler. Syf: 106.

Miles AA, Khimji PL. 1975; Enterobacterial chelators of iron: their occurrence, detection, and relation to pathogenicity. J Med Microbiology , 8: 477-90.

Mizuta K, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I, Kato N. 1983; Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the 01 group: relationship to their capsule (K) types, Infect. Immun, 40: 56-61.

Mobley HLT, Chippendale GR, Tenney JH, Mayrer AR, Crisp LJ, Penner JL, Warren JW1988;.MR/K hemagglutination of Providencia stuartii correlates with adherence to catheters and with persistence in catheter-associated bacteriuria, J Infect Dis, 157: 264-71.

Mori M, Ohta M, Agata N, Kido N, Arakawa Y, Ito H, Komatsu T, Kato N. 1989; Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiellaplanticola*. Microbiology and Immunology, 33: 887-95.

Müştak HK ve Esendal ÖM. 2010; *Staphylococcus aureus* Ekzotoksinleri. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 69.

Nassif X, Sansonetti PJ. 1986; Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin.Infect. Immun, 54: 603608.

OelschlaegerT,ve B Tall. 1997. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. Infect. Immun. 65:2950–58.

Ofek I, Beachey EH.1978; Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*, Infect. Immun, 22: 247-54.

Ofek I, Doyle RJ. 1994.Bacterial adhesion to cells and tissues.Chapman and Hall, Ltd, London, United Kingdom.

Ofek I, Goldhar J, Keisari Y. 1995; Nonopsonic phagocytosis of microorganisms, Annual Review of Microbiology, 49: 239-76.

Ofek I, Kabha K, Athamna A, Frankel G, Wozniak DJ, Hasty DL, Ohman DE. 1993; Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a, Infect. Immun. 61: 4208-16.

Öhman L, Magnusson KE, Stendahl O. 1985; Mannose-specific and hydrophobic interaction between Escherichia coli and polymorphonuclear leucocytes influence of bacterial culture period. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica Sect B, 93: 125-31.

Old DC, Adegbola RA. 1985; Antigenic relationships among type-3 fimbriae of Enterobacteriaceae revealed by immunoelectronmicroscopy.J Med Microbiology , 20: 113-21.

Old DC, Tavendale A, Senior BW.1985; A comparative study of the type-3 fimbriae of *Klebsiella* species.J Med Microbiology , 20: 203-14.

Olling S. 1977; Sensitivity of gram-negative bacilli to the serum bactericidal activity: a marker of the host parasite relationship in acute and persisting infections. Scandinavian J Infect Dis, 10(Suppl.): 1-40.

Ölmez, T. (2009). The optimization of Cr (VI) reduction and removal by electrocoagulation using response surface methodology. Journal of Hazardous Materials, 162(2), 1371-78.

Öngen B. 2003: Hastanede sorunlu mikroorganizmalar. Gram-negatif bakteriler. 3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi Samsun 1-9.

Opal S, Cross A, Gemski P. 1982; K antigen and serum sensitivity of rough *Escherichia coli*.Infectious Immunology, 37: 956-60.

Orskov I, Fife-Asbury MA. 1977; New *Klebsiella* capsular antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology, 27: 386-87.

O'Toole G, Kaplan HB ve Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology, 54(1), 49-79.

Ottow JCG. 1975; Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili.Annual Review of Microbiology, 29: 79-108.

Parsek MR ve Singh PK. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annual Reviews in Microbiology, 57(1), 677-701.

Pekşen Y. 1993; Hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisi.Klimik Derg. 6: 100-1.

Pekşen Y. 2002 Hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi. Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları. Samsun İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Araştırmaları Derneği Simad Yayınları No:1.

Podschun R, Fischer A, Ullmann U. 1992; Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different source.,Zentral Bakteriol, 276: 481-6.

Podschun R, Heineken P, Sonntag HG. 1987; Hemagglutinins and adherence properties to HeLa and Intestine 407 cells of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella* oxytoca isolates.Zentral Bakteriol, 263: 585-93.

Podschun R, Heineken P, Ullmann U, Sonntag HG. 1986; Comparative investigations of *Klebsiella* species of clinical origin: plasmid patterns, biochemical reactions, antibiotic resistances and serotypes. Zentral Bakteriol, 262: 335-45.

Podschun R, Penner I, Ullmann U. 1992; Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes.Microbial Pathology, 13: 371-9.

Podschun R, Ullmann U. 1992; Isolation of *Klebsiellaterrigena* from clinical specimens.European J. Clin. Microbiol Infectious Diseases, 11: 349-52.

Podschun R, Ullmann U. 1992; *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum.J Med Microbiology , 36: 250-4.

Podschun R, Ullmann U. 1994; Incidence of *Klebsiella* planticola among clinical *Klebsiella* isolates.Med Microbiol Let., 3: 90-5.

Podschun R ve U. Ullmann. (1998): "*Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors." Clin microbiol re. 11.4 589-603.

Podschun R, Fischer A ve Ullman U. (2000). Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. J Med Microbiology , 49(2), 115-119.

Ramm LE, Whitlow MB, 1983; Mayer MM. Size distribution and stability of the trans-membrane channels formed by complement complex C5b-9, Mol Immun, 20: 155-60.

Reinhardt HH, Obedeanu N, Sobel JD. 1990; Quantitation of Tamm-Horsfall protein binding to uropathogenic *Escherichia coli* and lectins, J Infect Dis, 162: 133540.

Reissbrodt R, Rabsch W. 1988; Further differentiation of *Enterobacteriaceae* by means of siderophore-pattern analysis.Zentral Bakteriol, 268: 306-17.

Rennie RP, Duncan IBR. 1974; Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of *Klebsiella*.Appl Microbiol, 28: 534-9.

Roantree RJ, Rantz LA. 1960; A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infection.Journal of Clinical Investigation, 39: 72-81.

Rodriguez-Ortega M, Ofek I, Sharon N. 1987; Membrane glycoproteins of human polymorphonuclear leucocytes that act as receptors for mannose-specific Escherichia coli.Infect. Immun, 55: 968-73.

Sahly H, R Podschun, TA Oelschlaeger, M Greiwe, H Parolis, D Hastey, J Kekow, U Ullmann, IOfek,ve S Sela. 2000. Capsule impedes adhesion and invasion of epithelial cells by *Klebsiellapneumoniae*. Infect. Immun. 68:6744–49.

Sakazaki R, Tamura K, Kosako Y, Yoshizaki E. 1989; *Klebsiella* ornithinolytica sp. nov., formerly known as ornithine-positive *Klebsiella* oxytoca. Curr Microbiol, 18:201-6.

Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. 1991; Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection.American Journal of Medicine, 91: 72S-5S.

Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI. 1993.Mechanisms of microbial disease.2nd ed. The Williams and Wilkins Co, Baltimore.

Schär-Zammaretti P ve Ubbink J. (2003). The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. Biophysical J,85(6), 4076-92.

Schubert S, Cuenca S, Fischer D, and Heesemann J. 2000;Max von Pettenkofer-Institut fu¨r Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU Mu¨nchen, Munich, Germany JID 182:1268-71

Schubert S, Cuenca S, Fischer D, Heesemann J. 2000;High-pathogenicity island of Yersinia pestis in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. J Infect Dis 182: 1268–71.

Sharon N, Ofek I. 1986 Mannose specific bacterial surface lectins. D. Mirelman (eds), Microbial lectins and agglutinins. John Wiley and Sons, Inc,.p. 55-81, New York.

Shin J ve Ko KS. (2014). Comparative study of genotype and virulence in CTX-M-producing and non-extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumo*niae isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy, 58(4), 2463-2467.

Shon AS,Bajwa RPS and Russo TA. 2013; Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* A new and dangerous breed. Virulence 4:2, 107–18; February 15, © 2013 Landes Bioscience

Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AMJJ, Kanis IYR, MacLaren DM. 1985; Biochemical and serological investigations on clinical isolates of *Klebsiella*. J Hygiene Camb, 95: 265-76.

Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AMJJ, MacLaren DM. 1984; Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the Mouse. J Med Microbiology , 17: 67-77.

Siquera J, Roças I. 2007; Bacterial Pathogenesis and in apical Peridontitis. Braz Dent J 18: 267-280

Sirot D. 1995; Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases.J Antimicrobial Che, 36: 19-34.

Stahlhut SG, Chattopadhyay S, Struve C, Weissman SJ, Aprikian P, Libby SJ, ... ve Sokurenko EV. (2009). Population variability of the *fimH* type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol,191(6), 1941-1950.

Struve C, Bojer M, Nielsen EM, Hansen DS, Krogfelt KA. 2005;Investigation of putative virulence gene magA in a worldwide collection of 495 *Klebsiella*isolates: *magA*is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1. J Med Microbiol 54(11):1111–3.

Tarkkanen AM, Allen B, Westerlund B, Holthöfer H, Kuusela P, Risteli L, Clegg S, Korhonen TK. 1990; Type V collagen as target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. Mol Microbiol, 4: 1353-61.

Tarkkanen AM, R Virkola, S Clegg ve TK Korhonen. 1997. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. Infect. Immun. 65:1546–49.

Taylor PW, Kroll HP. 1985; Effect of lethal doses of complement on the functional integrity of target enterobacteria.Curr Top Microbiol, 121: 135-58.

Taylor PW. 1983; Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria.Microbiology Reviews, 47: 46-83.

Tomas JM, Camprubi S, Williams P. 1988; 5Surface exposure of the O-antigen in *Klebsiella pneumoniae* 01:K1 serotype strains. Microbial Patho,: 141-47.

Toreci K. Ayşe Willke Topcu, Guner Soyletir, Mehmet Doğanay, 2002, "*Klebsiella* türleri" İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapevleri, cilt 2,: sayfa 1575-1608

Turton JF, Baklan H, Siu LK, Kaufmann ME ve Pitt TL. (2008). Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes. FEMS microbiology letters, 284(2), 247-52.

Ullmann U. 1986;Pattern of microbial isolates in hospitalized patients. Zentral Bakteriol, 183: 103-13.

Ulutürk R, Soysal HF, Boztaş Z, Ünlüer E, Toktaş G, Gürbüz C. 2000; Multirezistan *Klebsiella pneumoniae* suşunun neden olduğu hastane enfeksiyonu. Klimik Derg. 3: 91-3.

Uzer G. 2012 Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi,23(2):64-9

Verbist L. 1993; Epidemiology and sensitivity of 8625 ICU and hematology/oncology bacterial isolates in Europe. Scand J Infect Dis 91(Suppl): 14-24.

Virkola R, Westerlund B, Holthöfer H, Parkkinen J, Kekomaki M, Korhonen TK. 1988; Binding characteristics of Escherichia coli adezins in human urinary bladder. Infect. Immun, 56: 2615-22.

Wiener J, Quin JP, Bradford PA. 1999; Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and*E.c*oli in nursing homes. JAMA 281(6): 517-23.

Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, Goering RV, Nathan C, Bush K ve Weinstein RA. (1999). Multiple antibiotic–resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. Jama, 281(6), 517-23.

Williams P, Lambert PA, Brown MRW, Jones RJ. 1983; The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiellaaerogenes* to serum killing and phagocytosis.J Gen Microbiol, 129: 2181- 91.

Williams P, Tomas JM. 1990; The pathogenicity of *Klebsiellapneumoniae.*Re Med Microbiol, 1: 196-204.

Williams P, Chart H, Griffiths E ve Stevenson P. (1987). Expression of high affinity iron uptake systems by clinical isolates of *Klebsiella.* FEMS microbiol let, 44(3), 407-412.

Wiskur BJ, Hunt JJ ve Callegan MC. (2008). Hypermucoviscosity as a virulence factor in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis.Investigative ophthalmology & visual science, 49(11), 4931.

Wooldridge KG, Williams PH. 1993; iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria.FEMS Microbiol Re, 12: 325-48.

Würker M, J Beuth, HL Ko, A Przondo-Mordarska, and G Pulverer. 1990. Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella*bacteria to human epithelial cells. Zentralbl. Bakteriol. 274:239–45.

Yancey RJ, Breeding SAL, Lankford CE. 1979; Enterochelin (enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun, 24: 174-80.

Yeh KM, Karup A, Siu LK, Koh YL, Fung CP, Lin JC, Chen TL, Chang FY, Koh TH. 2007;Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulece determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. J Clin Microbiol 45(2):466–71. [PubMed: 17151209]

Yokochi T, Inoue Y, Kato Y, Sugiyama T, Jiang GZ, Kawai M, Fukada M, Takahashi K. 1995; Strong adjuvant action of *Klebsiella* O3 lipopolysaccharide and its inhibition of systemic anaphylaxis. FEMS Immun Med Microbiol, 10: 181-4.

Yokochi T, Nakashima I, Kato N. 1977; Effect of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* on the differentiation and functional capacity of macrophages cultured in vitro, Microbiol Immun, 21: 601-10.

Yokochi T, Nakashima I, Kato N. 1979; Further studies on generation of macrophages in in vitro cultures of mouse spleen cells and its inhibition by the capsular polysaccharide of *Klebsiella* pneumoniae.Microbiol Immun, 23: 487-99.

Yüce A. Nozokomiyal pnömonide sağaltım. Klimik Derg.. 2000; 13 (Özel Sayı): 7 – 11.

8 ÖZGEÇMİŞ

18.03.1982 Mersin'de doğdu. 2002 yılında Sakarya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulunu bitirdi. 2004 yılında Sağlık Bakanlığı'na ataması yapıldı. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.