

Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Hastanemizde Yayılımı: Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişkinin Araştırılması[§]

Spread of Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Our Hospital: Investigation of Molecular Typing and Clonal Relationship

Reyhan Yiş*[®], Ebru Demiray Gürbüz**[®], Ayşe Nur Sarı**[®], Zeynep Gülay**[®]

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir, Türkiye

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Yaş R, Demiray Gürbüz E, Sarı AN, Gülay Z. Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının hastanemizde yayılımı: Moleküler tiplendirme ve klonal ilişkinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):33-41.

Öz

Amaç: Özellikle son 10 yılda Enterobacterales üyeleri arasında karbapenem direnci artan sıklıkta rapor edilmeye başlanmıştır. Karbapenemaz üreten izolatların taranması ve saptanması, hem tedavinin doğru yönlendirilebilmesi hem de yayılımın önüne geçilebilmesi açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda hastanemiz Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden ardışık olarak soyutlanan karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının karbapenemaz tipleri ve moleküler epidemiyolojik ilişkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Temmuz-Eylül 2014 tarihleri arasında Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden soyutlanan toplam 32 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya alındı. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması klasik yöntemlere ek olarak BD Phoenix ID/AST otomatize sistemi ile yapıldı. İzolatların karbapenemaz tipleri (*bla*OXA-48, *bla*NDM, *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*VIM ve *bla*GES) PCR ile araştırıldı. İzolatlar arasındaki klonal ilişki PFGE ile değerlendirildi.

Bulgular: Onsekiz izolatın yoğun bakım ünitelerinden, dokuz izolatın servislerden ve beş izolatın polikliniklerden gönderilen örneklerden izole edildikleri görülmüştür. İzolatların tümünde *bla*OXA48 geni pozitif olarak saptanmış, diğer karbapenemaz genleri bulunmamıştır. Hastanemizde 32 farklı hastadan üretilen izolatların A-L olarak adlandırılan 12 farklı PFGE pulsotipine sahip olduğu belirlendi. Bunlar arasında en fazla görülenler B (n=18) ve bununla yakın ilişkili B1 paterni (n=2) idi. Geriye kalan izolatlar, birbirinden farklı olan 11 tipte temsil edildi. Salgından sorumlu B pulsotipine sahip ilk izolatın Genel Yoğun Bakım ünitesinden kaynaklanarak yayılım göstermiş olduğu görüldü.

Sonuç: Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının hastanede yayılımının gastrointestinal kolonizasyonu olan hastalardan, hastane personelleri aracılığıyla diğer hastalara izolatların transferi yoluyla gerçekleşmiş olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle aktif surveillance programları ile kolonizasyonu saptanarak temas izolasyonu ve etkin enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması yoluyla hastanelerde izolatların yayılımı sınırlandırılabilir.

Anahtar kelimeler: Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, moleküler tiplendirme, Klonal ilişki

ABSTRACT

Objective: Carbapenem resistance has been reported with increasing frequency among members of Enterobacterales, especially in the last 10 years. Screening and detection of carbapenemase-producing isolates is important in terms of both directing the treatment and preventing its spread. In our study, it was aimed to determine the carbapenemase types and molecular epidemiological relationships of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates, which were isolated sequentially from the samples sent to microbiology laboratory of our hospital.

Method: A total of 32 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates of the samples sent to microbiology laboratory between July and September 2014, were included in the study. In addition to classical methods, identification of isolates at species level was made with BD Phoenix ID/AST automated system. Carbapenemase types (*bla*OXA-48, *bla*NDM, *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*VIM and *bla*GES) of the isolates were investigated by PCR. The clonal relationship between the isolates was assessed with PFGE.

Results: It was noted that 18 isolates were obtained from intensive care units, 9 from inpatient and 5 from outpatient departments. The *bla*OXA48 gene was found in all isolates while the other carbapenemase genes were not found. It was determined that strains were isolated from 32 patients in our hospital had 12 different PFGE pulsotypes, named as A-L. Among these, the most common ones were B (n=18) and closely related B1 pattern (n=2). The remaining isolates were represented by 11 different types. It was observed that the first isolate with B pulsotype was responsible for the spread of the outbreak from General Intensive Care Unit.

Conclusion: It has been thought that the spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates in the hospital was probably occurred through the transfer of isolates from patients with gastrointestinal colonization to other patients through hospital staff. Therefore, the spread of the isolates in hospitals can be limited by detecting colonization with active surveillance programs and by applying contact isolation and effective infection control measures.

Keywords: Carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, molecular typing, clonal relationship

Alındığı tarih / Received:
28.07.2020 / 28.July.2020

Kabul tarihi / Accepted:
22.10.2020 / 22.October.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

R. Yiş 0000-0001-5774-0315
E. Demiray Gürbüz 0000-0003-2849-9029
A. N. Sarı 0000-0002-3927-9921
Z. Gülay 0000-0002-4135-9154

✉ reyhanys@yahoo.com

[§]Bu çalışma, 33. Ankem Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Antibiyotik direncinin giderek artıyor olması, ancak buna karşın yeni antibiyotiklerin geliştirilmiyor olması dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavi seçeneklerini azaltmaktadır. 1980'li yılların başlarında Geniş spektrumlu sefalosporinlerin keşfinden çok kısa süre sonra Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae*'lar ortaya çıkmış, bu izolatlar karşı karbapenem grubu antibiyotiklerin yoğun kullanımı da karbapenem direnci ile sonuçlanmıştır⁽¹⁻⁴⁾. CDC tarafından 2013 yılında karbapenem dirençli *Enterobacterales*'in (KDE) halk sağlığı açısından acil tehdit oluşturan üç mikroorganizmadan biri olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾. Özellikle son 10 yılda *Enterobacterales* üyeleri arasında karbapenem direnci artan sıklıkta rapor edilmeye başlanmıştır⁽⁶⁾. Karbapenem direnci ile ilişkili en sık görülen mekkanizma, karbapenemaz olarak da bilinen enzimlerdir. Özellikle *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenemler dahil olmak üzere tüm β -laktamları inaktive edebilen karbapenemazlar sıklıkla tespit edilmektedir⁽⁷⁾.

Karbapenemazlar; enzim aktivasyonu için divalan katyonlara bağımlı olup olmamalarına göre: metallo karbapenemazlar (çinko bağımlı, sınıf B) ve non-metallo karbapenemazlar (çinko bağımsız, sınıf A, C ve D) olarak ayrılmıştır⁽⁷⁾. *K. pneumoniae* karbapenemazı (KPC) gibi sınıf A karbapenemazlar dünya çapında *K. pneumoniae*'da tanımlanmıştır⁽⁸⁾. Hastaneden kazanılmış çoklu dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında Sınıf B ve D karbapenemazlar tespit edilmiş ancak Sınıf C karbapenemazlar nadiren saptanmıştır⁽⁶⁾. Oksasilinazlar (OXA) olarak adlandırılan 400'den fazla Sınıf D β -laktamazın sadece bazı varyantları karbapenemaz aktivitesine sahiptir. Bunlar arasında da sadece birkaç alt grup *K. pneumoniae*'da (OXA-23, OXA-48, OXA-51, OXA-58) bildirilmiştir. OXA-48 en yaygın Sınıf D karbapenemazdır⁽⁷⁾. OXA-48 ilk olarak 2001 yılında Türkiye'de tanımlanmış olup, OXA-48 üreten *K. pneumoniae*'nın ana rezervuarlarından birinin Türkiye olduğu düşünülmektedir⁽⁹⁾. Yayılmının ilk aşamasında ülkemizdeki OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatından elde edilen *pOXA48a* adlı plazmidin, tüm

ülkeye ve Akdeniz ülkelerine OXA48'i yaymış olması, global bir yayılımın başlangıç noktasını oluşturmuştur.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* (KDKP)'nın neden olduğu Kan dolaşımı enfeksiyonlarında mortalitenin yüksek seyretmesinin yanında karbapenemaz genlerinin çoğunlukla hastane ortamından kazanılarak mobil genetik elemanlar ve plazmidler aracılığıyla, hastadan hastaya ve diğer bakterilere de aktarılabilmesi sorunun boyutunu daha da arttırmaktadır⁽¹⁰⁾. Karbapenemaz aktivitesi gösteren bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda izolatların saptanması tedavinin doğru yönlendirilmesi ve yayılımın önüne geçilmesi açısından önem taşımaktadır. Olası salgın durumlarında mikrobiyal klonal ilişkinin saptanması enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkinliğinin izlemine de izin verir. Bunun yanında bu veriler epidemiyolojik olarak da oldukça değerlidir. Çalışmamızda hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden ardışık olarak izole ettiğimiz karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının karbapenemaz enzim tiplerinin ve moleküler epidemiyolojik ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar: Temmuz- Eylül 2014 tarihleri arasında farklı hastalardan Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden üretilmiş olan toplam 32 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edildi. Her hastanın tek izolatu çalışmaya alındı. **İzolatların identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri:** Örnekler, %5 Koyun Kanlı (Salubris, Türkiye) ve "eosin methylene blue" (EMB) (Salubris, Türkiye) agara ekimleri yapılarak 18-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İzolatların identifikasyon ve antibiyotik duyarlılıkları testleri klasik yöntemlere ek olarak BD Phoenix ID/AST (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD) otomatize sistemi ile çalışılarak "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre değerlendirildi⁽¹¹⁾.

Gradyent test çalışması: BD Phoenix ID/ AST otomati-

ze sistemiyle karbapeneme azalmış duyarlı (I) veya dirençli (R) olarak saptanan suşlarda karbapenem direncinin doğrulanması CLSI önerileri doğrultusunda gradient test stripleri (Ertapenem, Meropenem Etest®, bioMérieux, Fransa) [İmipenem MIC Test Strip (MTS-Liofilchem®)] kullanılarak yapıldı⁽¹²⁾.

Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması: İzolatların karbapenemaz tipleri (bla_{OXA-48} , bla_{NDM} , bla_{IMP} , bla_{KPC} , bla_{VIM} ve bla_{GES}) PCR ile araştırıldı⁽¹²⁻¹⁷⁾. DNA eldesi için 24 saatlik koloniler deiyonize suda süspansiyon edildi ve 10 dk. 100°C'de kaynatıldı. Beş dk. 10.000 devirde santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, kalıp DNA olarak kullanıldı. PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla %2'lik agaroz jel kullanıldı. Jel 1X TBE tamponu (Tris-Borik asit-EDTA, pH=8) içinde 45 dakika yürütüldü ve beklenen bant büyüklüğündeki bantlar değerlendirildi. PCR çalışmasında araştırılan her bir gen bölgesi için pozitif olduğu sekans ile doğrulanmış izolatlar pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol için saf su kullanıldı.

Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri, beklenen bant büyüklükleri

ve PCR reaksiyon şartları Tablo 1'de yer almaktadır.

PFGE: Klonal ilişkiyi incelemek amacıyla izolatların makrorestriksiyon analizi, "Pulse Net *Escherichia coli* PFGE Protokolü" ne göre *Xba* I restriksiyon enzimi kullanılarak yapıldı⁽¹⁸⁾. Restriksiyonu yapılan izolatlar CHEF-DR® III (Bio-Rad) cihazında belirtilen koşullarda yürütülerek ayrımlandı; Isı=14°C, yürütme zamanı=19 saat, ilk sinyal (Initial switch time)=5 sn, son sinyal (Final switch time)=20 sn. ve voltaj=6.0 Volt/cm ya da 200 V. Her izolata ait PFGE profili birbirleri ile karşılaştırılarak, Tenover kriterlerine göre yorumlandı ve harf olarak paternler atandı⁽¹⁹⁾.

Çalışma, İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.09.2018, Oturum No: 2019/03, Karar No: 04)

BULGULAR

Otuz iki izolatın, 18'inin yoğun bakım ünitelerinden, dokuz izolatın servislerden ve beş izolatın polikliniklerden gönderilen örneklerden izole edildikleri görülmüştür.

Tablo 1. Karbapenemaz direnç genlerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri, beklenen bant büyüklükleri ve PCR reaksiyon şartları.

Primer	Ürün Büyüklüğü	Kaynak	Reaksiyon Şartları
OXA-48A:5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG 3' OXA-48B:5'-GAGCACTTCTTTGTGATGGC 3'	743 bp	14	Ön denatürasyon: 94°C 5 dk Denatürasyon: 94°C 1 dk Birleşme: 54°C 1 dk Uzama: 72°C 1,5 dk Son uzatma: 72°C 10 dk } 30 döngü
VIM-A:5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' VIM-B:5'- TCG GTC GAA TGC GCA GCA CC-3'	388 bp	15	
IMP-F: 5'- GTTTATGTTACATCGTT-3' IMP-R: 5'- CCAAACCACTACGTTATCT-3'	396 bp	13	
KPCF: 5'-GTATCGCCGCTAGTTCTGC-3' KPCR: 5'-GGTCGTGTTCCCTTTAGCC-3'	493 bp	16	
NDM-1-F:5'- CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG-3' NDM-1-R:5'- ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA-3'	726 bp	17	Ön denatürasyon: 94°C 5 dk Denatürasyon: 94°C 1 dk Birleşme: 54°C 1 dk Uzama: 72°C 1,5 dk Son uzatma: 72°C 10 dk } 30 döngü
GES-1A 5'-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3' GES-1B 5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3'	864 bp	18	Ön denatürasyon: 94°C 5 dk Denatürasyon: 94°C 1 dk Birleşme: 55°C 1 dk Uzama: 72°C 1,5 dk Son uzatma: 72°C 10 dk } 30 döngü

Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması: 18 izolatın yoğun bakım ünitelerinden, dokuz izolatın servislerden ve beş izolatın polikliniklerden olduğu belirlenen çalışma izolatlarının tümünde 743 bp büyüklüğündeki *bla*OXA48 gen bölgesi pozitif olarak saptanmıştır. Çalışılan diğer karbapenemazlara ait gen bölgeleri (*bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{GES}) tüm izolatlar için negatiftir. Yapılan tüm PCR çalışmalarında pozitif kontrol izolatlarında istenen bant büyüklüğünde bantlar görülmüş olup, negatif kontrollerde bant görülmemiştir.

PFGE: Tek hasta tek izolat olacak şekilde çalışmaya dahil edilen 32 izolatın PFGE analizi sonucunda A-L olarak adlandırılan 12 farklı patern belirlendi. Patern sıralaması en başta izole edilen izolattan, en son tarihte izole edilen izolata göre yapıldı. En sık görülen patern B paterni olup (n=18), bu patern ile ilişkili olduğu belirlenen B1 paterni de iki izolatta görüldü. D paterni de iki izolatta tespit edildi. Geri kalan paternlerin her biri birbirinden farklı olup, birer izolatta görüldü (Tablo 2). PFGE analizi bulguları sonucunda çalışma izolatlarının %62.5'inin B ve ilişkili paterni ile temsil edilirken; %6.3'ünün D paterni ile temsil edildiğini ve geri kalanının her birinin farklı bir paternde olduğu belirlendi. İzolatlara ait 12 farklı paternin ve B ile yakın ilişkili paternin gösterildiği jel görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Hastanelerde; geniş spektrumlu antimikrobiyal ilaçların, invazif prosedürler ve cihazların sık kullanımı, yüksek komorbidite sıklığı olan hastalar ve uzun süreli hastanede kalış süreleri gibi faktörler nedeniyle yoğun bakım üniteleri (YBÜ) antibiyotiklere dirençli bakteri enfeksiyonlarının daha sık görüldüğü bölümlerdir⁽²⁰⁾. *Klebsiella pneumoniae*, özellikle YBÜ'nde sepsis, üriner sistem enfeksiyonu, Kateter ilişkili enfeksiyonlar, pnömoni ve cerrahi alan enfeksiyonları gibi komplike ve tedavisi zor enfeksiyonlardan sorumlu olup, hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık nedenidir⁽²¹⁾. Son yıllarda, *K. pneumoniae*'nin yarattığı tehdit, karbapenem dirençli suşların ortaya

çıkması ve dünya çapında yayılması ile belirgin bir şekilde artmıştır⁽²²⁻²⁴⁾. KDKP'nin neden olduğu enfeksiyonlar, az sayıda tedavi seçeneğine sahip olup, karbapenem duyarlı izolatların etken olduğu enfeksiyonlara göre oldukça yüksek mortalite oranları ile ilişkilidir^(3,25-27). *K. pneumoniae*'nin sağlık kurumlarında salgınlara neden olma eğilimleri, çoklu dirençli izolatların oluşturduğu mevcut problemleri daha da şiddetlendirmektedir⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Çoğu nozokomiyal patojende olduğu gibi, çoklu ilaç direnci hem hastanede yatan hastalarda, hem de hastane ortamında antibiyotik kullanımının yaygın olduğu yerlerde bu organizmalara doğal selektif avantaj sağlamaktadır⁽²⁸⁾. Özellikle *K. pneumoniae*'da hastalar ve hastane personelinde, nazofarinks ve gastrointestinal sistem başta olmak üzere mukozal yüzeylerde sessiz kolonize olma, yeteneği vardır. Özellikle gastrointestinal kolonizasyon oranları toplumdaki bireylere göre hastane ortamındaki bireylerde oldukça yüksektir⁽³¹⁾. Hastanede oldukça yoğun antibiyotik kullanımının olması da kolonizasyon oranlarını arttırmakta, sessiz kolonize bireyler, yayılımı kolaylaştırarak, kontrolü zor olan salgınlara rezervuar rolü oynamaktadırlar⁽³¹⁾. Bunun yanında, *K. pneumoniae*'nin hastane personelinin ellerinde birkaç saat boyunca canlı kalabiliyor olması dahastane kaynaklı yayılımı kolaylaştıran bir diğer faktördür⁽³²⁾.

Salgınlara etkin kontrolünde, transmisyonun nasıl gerçekleştiğinin ayrıntılı olarak araştırılması, kaynağın saptanması büyük önem taşımaktadır. Enfeksiyonların veya salgınlara araştırılmasında kümeleri ve salgınlara tanımlamak, kaynağı izlemek ve yayılma zincirini belirlemek ve popülasyon yapısını ve patojen evrimini incelemek için çok sayıda alt tipleme tekniği kullanılmıştır. Son yıllarda *K. pneumoniae* izolatları ile lokal ve global yayılımının anlaşılması amacıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda yöntem olarak plazmid analizi, ribotiplendirme, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı tiplendirme yöntemleri ve PFGE kullanılmaktadır^(33,34). Bu teknikler arasında, "Multilocus Sequence Typing" (MLST) ve

PFGE, *K. pneumoniae* salgınlarını araştırmak için en sık kullanılan iki yöntemdir. PFGE, moleküler epidemiyolojik yöntemler içinde, ilk olarak tanımlandığı 1983 yılından sonra standart bir yöntem haline gelmiştir. Kromozomal DNA polimorfizmine dayalı, tüm genomu hedef alan genotiplendirme yöntemi olup, bant paternlerinin benzerlik yüzdesi veya bant sayısı ve büyüklüğündeki farklılıklara göre izolatlar arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde kullanılır. PFGE ile megabaz büyüklüğündeki kromozom DNA'sı, restriksiyon enzimleriyle kesilmekte, farklı yönlerden elektrik akımı uygulama özelliğindeki elektroforez cihazı ile jel üzerinde yürütüldükten sonra kesilmiş olan DNA parçaları görüntülenebilmektedir⁽¹⁹⁾. PFGE, salgın ve salgın olmayan izolatları belirleme ve ayırt etme yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, PFGE'nin çalışması zahmetlidir ve bu yöntemin sonuçlanması birkaç gün sürer. MLST, yedi gen lokusunun seKanslanmasına dayalı güçlü bir yöntemdir ve büyük bir MLST veritabanı mevcuttur. Bununla birlikte, MLST'nin ayrımcı gücü, salgın ve salgın olmayan izolatları ayırt etme gücü düşük olup, zaman alıcı ve emek yoğun bir süreçtir. PFGE birçok mikroorganizma için halen 'altın standart' genotiplendirme yöntemi olup, MLST yapılamadığı durumlarda veya daha kolay bir yöntem ihtiyacı duyulduğunda, salgın ve salgın olmayan izolatların karakterizasyonu için etkili ve uygun yöntem olarak kabul edilmektedir⁽³⁵⁾. Tüm dünyadan ve ülkemizden, KDKP ile ortaya çıkan pek çok salgın durumu bildirilmiştir. Oteo ve ark.⁽³⁶⁾ 2011 Ocak-2012 Mayıs tarihleri arasında, İspanya'da altı farklı bölgedeki 10 hastanede, *bla*_{OXA-48} üreten *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan, PFGE ile iki tanesi ana klon olmak üzere altı farklı klon saptanmış geniş bir salgın bildirmişlerdir. Almanya'da bir hastanede 2010 Haziran-2012 Temmuz tarihleri arasında Ducombe ve ark.⁽³⁷⁾ tarafından *bla*_{KPC-2} üreten *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan bir hastane salgını bildirilmiştir. Yunanistan'da Voulgari ve ark.⁽³⁸⁾ 2011 Aralık-2012 Mart tarihleri arasında *bla*_{OXA-48} geni taşıyan 13 KDKP izolatını incelemişler ve izolatların tamamının tek bir PFGE klonuna ait olduklarını saptamışlardır. Ülkemizde 2008 yılında bildirilmiş olan, *bla*_{OXA-48} üreten *K. pneumoniae* izolatlarının etken

olduğu ilk salgında 39 izolatın iki klona ait olduğu saptanmıştır⁽³⁹⁾. Çetinkol ve ark.⁽⁴⁰⁾, bir üniversite hastanesi yoğun bakımından izole ettikleri 20 adet OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* izolatı arasındaki klonal ilişkiyi inceledikleri çalışmada, PFGE ile özellikle salgın izolatı olarak değerlendirdikleri, bir klonda yoğunlaşan üç farklı pulsotip saptamışlardır.

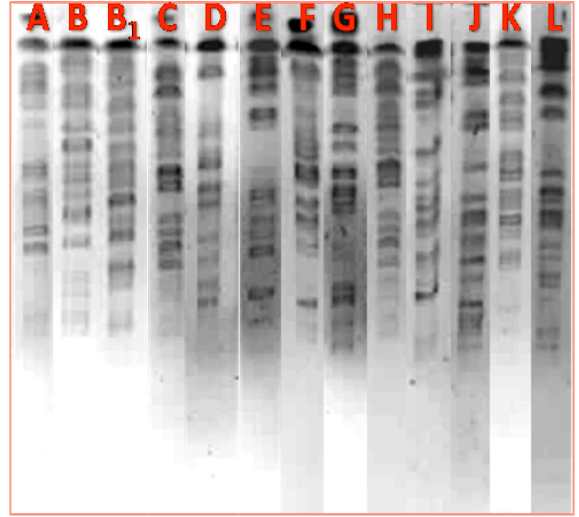
Çalışmamızda bir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde ardışık olarak izole edilen *bla*_{OXA-48} üreten, KDKP'nın hastane kaynaklı ilk salgını ve OXA-48 pozitif klonların hastane içi yayılımı dokümanite edilmiştir. *K. pneumoniae*'nin yüksek aktarılabileme eğilimi ve *bla*_{OXA-48} taşıyan plasmidin horizontal gen transfer kabiliyeti salgın oluşumuna yakınlık yaratan faktörlerdir⁽⁴¹⁾. Çalışmada izolatların daha çok kolonize oldukları YBÜ'lerinden gönderilen örneklerden üretilmiş olduğu (n=18) dikkat çekmektedir. En çok izolasyon, hastanemiz genel YBÜ'nden gönderilmiş olan örneklerde olmuştur (n=9). KDKP izole edilmiş en sık klinik örnek olan İdrar (n=17), yapısı gereği hasta personelinin elleri yoluyla kolaylıkla etkenin yayılımını sağlayabilecek bir örnektir. Bunun yanında kolonizasyonun en sık tespit edildiği rektal bölgeye yakınlık ve İdrar sondası için sürekli manipülasyon, izolasyon sıklığını açıklayabilir.

Çalışmamızda PFGE analiz sonuçlarına göre 32 farklı hastadan üretilen *K. pneumoniae* izolatlarının 12 pulsotip altında (A-L) kümelendiği saptanmıştır. Yirmi izolat bir küme oluşturmuş [Pulsotip B (n=18) ve bununla yakın ilişkili B1 paterni (n=2)] diğer 12 izolat herhangi bir kümeye dahil edilmemiştir. İzolatların kümelenme oranı %62.5 (32 izolattan 12'si) olarak bulunmuştur. B+B1 pulsotipine sahip 20 izolatın 13 tanesi yoğun bakım hastalarından izole edilmiş olup, bu durum KDKP'nın YBÜ'lerindeki yüksek aktarılabileme eğiliminin göstergesi olarak kabul edilebilir. YBÜ kaynaklı izolatlar dışında B pulsotipine sahip izolatların dört tanesi genel cerrahi servisten, bir tanesi nöroloji servisten, iki tanesi de poliklinikten izole edilmiştir. Salgından sorumlu B pulsotipine sahip ilk izolatın genel yoğun bakım ünitesinden kaynaklanarak yayılım göstermiş olduğu görülmüştür. Genel

Tablo 2. Klinik örnekler ve servislere göre PFGE paternlerinin dağılımı.

İzolasyon No	Örnek tipi	Servis	PFGE paterni
1	İdrar	Üroloji Böbrek taşı plk	A
4	Trakeal Aspirat	Genel YB	B
5	Kateter	Genel YB	B
6	İdrar	Beyin Cerrahi YB	B
8	İdrar	Nöroloji YB	B
9	Trakeal Aspirat	Genel YB	B
10	Kan	Genel YB	B
11	Kateter	Genel Cerrahi Servisi	B
12	İdrar	Nöroloji YB	B
13	İdrar	Genel Cerrahi Servisi	B
14	Yara	Genel Cerrahi Servisi	B
17	Trakeal Aspirat	Genel YB	B
22	İdrar	Genel YB	B
25	İdrar	Dahiliye Plk	B
26	İdrar	Nöroloji Servisi	B
28	İdrar	Genel Cerrahi Servisi	B
29	İdrar	Nöroloji YB	B
30	İdrar	Enfeksiyon Hastalıkları Plk	B
32	Trakeal Aspirat	Reanimasyon	B
3	Yara	Genel YB	B1
7	Trakeal Aspirat	Reanimasyon	B1
2	İdrar	Nöroloji Servisi	C
19	Kan	Dahiliye YB	D
20	Kan	Dahiliye YB	D
24	Yara	Genel YB	E
15	Kan	Reanimasyon	F
23	İdrar	Lokal Üroloji plk	G
16	İdrar	Nöroloji Servisi	H
27	Yara	Genel YB	I
32	Yara	Genel Cerrahi 2. kısım	J
21	İdrar	Beyin Cerrahi Servisi	K
31	İdrar	Organ Nakli Plk	L

yoğun bakımdan kaynaklı dokuz izolattan yedisinde, nöroloji yoğun bakım kaynaklı üç izolatta ve genel cerrahi servisi kaynaklı dört izolattın tamamında B pulsotipi saptanmıştır (Tablo 2). Çalışmamızda yer alan izolatlardan saptandıkları klinik örnek tipleri incelendiğinde; B+ B1 pulsotipindeki izolatlardan 10 tanesinin İdrar, beş tanesinin Trakeal Aspirat, iki tanesinin Kateter, iki tanesinin yara ve bir tanesinin Kan kültür örneklerinden izole edilmiş olduğu görülmüştür. Çalışmada yer alan 17 İdrar kültürü örneğinin 10'unda aynı pulsotipin saptanması, İdrarın etkeni aktarabilme ve yayabilme potansiyelinin yüksek olduğunu düşündürmektedir. Örnek tipine göre değerlendirildiğinde tüm Trakeal Aspirat ve Kateter örneklerinde B pulsotipi gösterilmiştir (Tablo 2). B pulsotipi pozitif KDKP hastaların verileri incelendiğinde servisler arası hasta transferinin gerçekleşmemiş olduğu, aynı pulsotipin servisler arası yayılımının ortak personel kullanımı yoluyla aktarım şeklinde ortaya çıkmış olabile-



Şekil 1. İzolatlara ait PFGE paternlerinin gösterildiği jel görüntüsü.

ceği düşünülmüştür.

KDKP ile kolonizasyon veya enfeksiyon için risk faktörleri, antibiyotik tedavisine maruz kalma, uzamış hastaneye yatış, YB'ünde yatış, immünsüpresyon ve organ transplantasyonu gibi sağlık hizmetleriyle ilişkili olsa da nadiren daha önce herhangi bir sağlık hizmeti teması olmaksızın, endemik olmayan bölgelerde toplum-kökenli enfeksiyonlar olarak ortaya çıkabilir. Bunun yanında KDKP, sadece immünsüpresif veya kritik hastalığı olanları değil, aynı zamanda daha önce sağlıklı olan ve kötü enfeksiyon kontrolü uygulanan sağlık ortamlarında bulunmuş hastaları da kolonize ya da enfekte edebilmektedir⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾.

Çalışma sonuçlarına göre dikkat çeken bir nokta, beş izolattın polikliniklerden gönderilen İdrar kültürü örneklerinden izole edilmiş olmasıdır. Karbapenemaz üreten izolatlar genellikle hastane kökenli olsa da, nadiren toplum kökenli izolatlar da saptanmaktadır⁽⁴⁵⁾. Özellikle *bla*_{NDM} ve *bla*_{OXA-48} üreten izolatlar nozokomial ve toplum kökenli olabilmektedir⁽⁴⁶⁾. Çalışmaya alınan izolatlardan izole edildiği hastaların geriye dönük kayıtları incelendiğinde, polikliniklerden örnekleri gönderilmiş olan beş hastadan üçünün daha önce çeşitli servislere yatışları olduğu (1. hasta: üç defa üroloji servisi yatış; 2. hasta: üç defa genel cerrahi organ nakli servisi yatış ve bir defa lokal cerrahi ame-

liyathanesi yatış; 3. hasta: bir defa lokal cerrahi ameliyathanesi yatış ve bir defa üroloji servisi yatış), iki hasta için ise herhangi bir hastaneye yatış veya başvuru öyküsünün bulunmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu özellikle OXA-48 pozitif *K. pneumoniae*'nin endemik olarak saptandığı ülkemizde, KDKP izolatlarının etken olduğu hastane kökenli enfeksiyonların yanı sıra toplum kökenli enfeksiyonların da karşımıza çıkabileceğini düşündürmektedir.

Nozokomiyal salgınların ortaya çıkması durumunda moleküler epidemiyolojik izlem, etken izolatların yayılımını önleyerek, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması konusunda yardımcı olabilir. KDKP izolatlarının hastanede yayılımının muhtemelen gastrointestinal kolonizasyonu olan hastalardan, hastane personelleri aracılığıyla diğer hastalara izolatların transferi yoluyla gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle aktif sürveyans programları ile kolonizasyonun saptanarak temas izolasyonu ve etkin enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması yoluyla hastanelerde KDKP izolatlarının yayılımı sınırlandırılabilir. Ayrıca hastanede akılcı antibiyotik kullanımı, invaziv araçların kısıtlı kullanımı ve el hijyeni gibi standart önlemlere de hizmet içi eğitimler yoluyla dikkat çekilmiştir. Bunun yanında uzun süreli kullanıma rağmen tedaviye yanıt vermeyen toplum kökenli enfeksiyonlarda da, karbapenem direnci akıldta tutulmalıdır.

Çalışmamızda yer alan izolat sayısının az olması, salgın sürecinde hasta izolatları dışında çevresel ve hastane personellerinin sürveyans örneklerinin çalışılmamış olması çalışmamızın kısıtlılığı olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, hastanemizde ilk defa karşılaşmış olduğumuz karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatları ile çalıştığımız için verilerimiz hastanemiz için epidemiyolojik olarak önem taşımaktadır. Bunun yanında çalışma 2014 yılındaki durumu göstermekte olup, aradan geçen uzun sürede hastanemizde KDKP izolatları ciddi oranda artmış ve farklı karbapenemaz tipleri saptanmaya başlanmıştır. Ancak hastanemiz adına sadece sporadik olarak KDKP izole ediliyor iken, yaşadığımız ilk salgın olması nedeniyle çıkardığımız çok sayıda ders olması açısından

dan çok büyük önem taşımaktadır. Salgın ve sonrasında öğrendiklerimiz, daha sonraki yıllarda benzer tablolara karşı vermiş olduğumuz refleks ve tepkileri belirlemiş olması açısından oldukça değerlidir.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.09.2018, Oturum No: 2019/03, Karar No: 04).

Çıkar Çatışması: Belirtilmemiştir.

Finansal Destek: Belirtilmemiştir.

Ethics Committee Approval: The study was carried out with the approval of the İzmir Bozyaka Training and Research Hospital Clinical Research Ethics Committee (Date: 05.09.2018, Session No: 2019/03, Decision No: 04).

Conflict of Interest: Not declared.

Funding: Not declared.

KAYNAKLAR

1. Reyes J, Aguilar AC, Caicedo A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: microbiology key points for clinical practice. *Int J Gen Med*. 2019;12:37-446. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S214305>
2. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl 1):S28-36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>
3. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1):18. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0191-3>
4. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay A, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48 positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2950-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.01672-07>
5. Zowawi HM, Sartor AL, Balkhy HH, et al. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the countries of the Gulf cooperation council: Dominance of OXA-48 and NDM producers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3085-90. <https://doi.org/10.1128/AAC.02050-13>

6. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1791-8.
<https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
7. Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(6):609-16.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000608>
8. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015;277(5):501-12.
<https://doi.org/10.1111/joim.12342>
9. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
<https://doi.org/10.1128/aac.48.1.15-22.2004>
10. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. CLSI Document M100-S21, 2013. CLSI, Wayne, PA.
12. Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, et al. Identification of *bla*(IMP-22) in *Pseudomonas spp.* in urban waste water and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(5):901-8.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkp061>
13. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
14. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3129-35.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005>
15. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1660-4.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01172-08>
16. Samuelsen Ø, Thielsen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümmel A, Sundsfjord A. Identification of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Norway. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):670-2.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkq483>
17. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):622-32.
<https://doi.org/10.1128/aac.44.3.622-632.2000>
18. <https://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
19. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.
<https://doi.org/10.1128/JCM.33.9.2233-2239.1995>
20. Tran GM, Ho-Le TP, Ha DT, et al. Patterns of antimicrobial resistance in intensive care unit patients: A study in Vietnam. *BMC Infect Dis.* 2017;17:429.
<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2529-z>
21. Büyüktuna SA, Hasbek M, Çelik C, ve ark. Yoğun bakım ünitesinde gelişen *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonları: karbapenem direnci ve hasta mortalitesi ile ilgili risk faktörleri. *Mikrobiyol Bul.* 2020;54(3):378-91.
<https://doi.org/10.5578/mb.69679>
22. Zhang Y, Wang Q, Yin Y, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(2):e01882-17.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01882-17>
23. Aires-de-Sousa M, Ortiz de la Rosa JM, Gonçalves ML, Pereira AL, Nordmann P, Poirel L. Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(9):1632-8.
<https://doi.org/10.3201/eid2509.190656>
24. Kohler PP, Volling C, Green K, Uleryk EM, Shah PS, McGeer A. Carbapenem resistance, initial antibiotic therapy, and mortality in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: A systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2017;38(11):1319-28.
<https://doi.org/10.1017/ice.2017.197>
25. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1119-25.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkq108>
26. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob. Agents.* 2011;37(5):415-9.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012>
27. Ben-David D, Kordevani R, Keller N, et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* blood stream infections. Clin Microbiol Infect. 2012;18(1):54-60.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03478.x>
 28. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: A systematic review. Am J Infect Control. 2016;44(11):1374-80.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.022>
 29. Guducuoglu H, Gursoy NC, Yakupogullari Y, et al. Hospital outbreak of a colistin-resistant, NDM-1- and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*: High mortality from pandrug resistance. Microb Drug Resist. 2018;24(7):966-72.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0173>
 30. Protonotariou E, Poulou A, Politi L, et al. Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. Int J Antimicrob Agents. 2018;52(3):331-7.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.004>
 31. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
 32. Casewell M, Phillips I. Hands as route of transmission for *Klebsiella* species. Br Med J. 1977;2(6098):1315-7.
<https://doi.org/10.1136/bmj.2.6098.1315>
 33. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(8):3365-70.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00126-09>
 34. Ece G, Tunc E, Otlu B, Aslan D, Ece C. Detection of *bla*OXA-48 and clonal relationship in carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates at a tertiary care center in Western Turkey. J Infect Public Health. 2018;11(5):640-2.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.003>
 35. Zhou H, Liu W, Qin T, Liu C, Ren H. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole genome sequence-based typing of *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2017;8:371.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00371>
 36. Oteo J, Hernández JM, Espasa M, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. J Antimicrob Chemother. 2013;68(2):317-21.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks383>
 37. Ducombe T, Fauchoux S, Helgig U, et al. Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. J Hosp Infect. 2015;89(3):179-85.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.012>
 38. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. J Antimicrob Chemother. 2013;68(1):84-8.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks356>
 39. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(8): 2950-4.
 40. Cetinkol Y, Yildirim AA, Telli M, Calgin MK. The investigation of oxacillinase/metallo-beta-lactamase genes and clonal analysis in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Infez Med. 2016;24(1):48-53.
 41. Haverkate MR, Dautzenberg MJ, Ossewaarde TJ, et al. Within-host and population transmission of *bla*OXA-48 in *K. pneumoniae* and *E. coli*. PLoS ONE. 2015;10(10):e0140960.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140960>
 42. ECDC. Risk assessment on the spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between health care facilities, with special emphasis on cross border transfer. European Centre for Disease Prevention and Control. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/110913_Risk_assessment_resistant_CPE.pdf [Erişim tarihi: Kasım 2012]
 43. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. Infect Drug Resist. 2012;5:133-41.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S26613>
 44. Chia JH, Su LH, Lee MH, et al. Development of high-level carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* among patients with prolonged hospitalization and carbapenem exposure. Microb Drug Resist. 2010;16(4):317-25.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0048>
 45. Cantón R, Akova M, Carmeli Y, et al. Rapid evaluation and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):413-31.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>
 46. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae world wide. Clin Microbiol Infect. 2014;20(9):821-30.
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>