

CAT

Critically Appraised Topic

Hypervirulente *Klebsiella pneumoniae*

Auteur: Alexander Ockerman

Supervisor: Dr. Michaël Boudewijns

Datum: 27/05/2025

Waarom deze CAT?

In 2024 waarschuwden zowel de World Health Organization (WHO) als de European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) voor een wereldwijde toename van infecties met carbapenem-resistente hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* (CR-hvKp). Om de opmars van deze levensbedreigende infecties tegen te gaan roepen ze enerzijds op tot klinische awareness, anderzijds vragen ze om de laboratoriumcapaciteit om deze kiemen te detecteren te verhogen (1,2).

Deze “**call to action**” was de aanleiding voor deze CAT. We wilden een methode evalueren voor het detecteren van hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) in de klinische routine en op deze manier de epidemiologie van hypervirulente *Klebsiella pneumoniae*, al dan niet carbapenem resistent, in AZ Groeninge Kortrijk in kaart te brengen. Hiervoor werd de LAMP-gebaseerde eazyplex[®] hvKp assay (Amplex Diagnostics) geëvalueerd.

Vragen

1. Wat is hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* en hoe kan je deze detecteren?
2. Is het klinisch relevant om hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* te detecteren?
3. Komen infecties met hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* reeds voor in ons patiëntenpopulatie?

Vraag 1. Wat is hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* en hoe kan je deze detecteren?

Klinisch beeld en definitie van een hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* infectie

K. pneumoniae is een belangrijk bacteriële pathogeen die na *E. coli* een van de meeste geïdentificeerde gram-negatieve bacteriën is in klinische laboratoria. Het is een gram-negatieve bacil behorend tot de Enterobacterales. In de literatuur wordt gesproken van twee pathotypes, namelijk classical *K. pneumoniae* (cKp) en hypervirulente *K. pneumoniae* (hvKp) (tabel 1).

Het klinisch beeld van cKp infectie is welbekend: het is meestal een opportunistische pathogeen die voorkomt in ziekenhuis setting bij de oudere patiënt met comorbiditeiten of met doorbraak van fysiologische barrières (bv. endotracheale tube, intravasculaire catheters, chirurgische wonde). Deze kiemen zijn berucht voor het gemakkelijk opnemen van resistentiegenen waardoor ESBL- (bv. CTX-M, SHV en TEM) en CPE- (bv. OXA-48, NDM) productie vaak voorkomt (3,4).

De eerste infecties met hvKp werden beschreven in de jaren 80 en 90 in Zuid-Oost Azië (5,6). Dit klinisch beeld is veel minder gekend bij klinici. Een belangrijk kenmerk is dat hvKp ook jonge gezonde patiënten kan infecteren zonder comorbiditeiten. Vaak zijn er meerdere strooihaarden door metastasering doorheen het lichaam, wat zeer ongewoon is voor leden van de Enterobacterales. Het meest kenmerkende klinische syndroom dat aanleiding gaf tot zijn herkenning in de jaren 80 is het cryptogene pyogene leverabces (5). Dit leverabces door hvKp is bijna altijd mono-microbiëel in tegenstelling tot cKp leverabces wat vaak poly-microbiëel is (7). Ook komt het hvKp leverabces voor zonder geassocieerde biliaire of leverpathologie. HvKp kan echter bijna overal in het lichaam infectie veroorzaken.

Nog een opvallende klinische manifestatie die uniek voorkomt bij hvKp is endoftalmitis. Dit is een verwoestende complicatie die kan optreden bij hvKp infectie door secundaire strooiing naar het oog. Ongeveer 5% van patiënten met hvKp bacteriëmie ontwikkelt endoftalmitis (8). Typisch treedt er een pijnlijke zwelling en roodheid van het oog op met een plots visusdaling. Bilaterale aantasting komt voor in tot 25% van de gevallen. Deze visusdaling kan zo acuut verlopen dat er in sommige patiënten irreversibele blindheid is voordat een systemische focus gevonden is. Anderzijds kan deze complicatie tot 30 dagen na initiële hvKp infectie optreden (9). Zelfs met snelle intraveneuze en intravitreale antibioticatherapie is de klinische respons slecht. De meeste patiënten ondervinden een gedaalde visus en tot bijna de helft van de gevallen is er een enucleatie van het aangedane oog nodig (10).

Respiratoire hvKp infectie presenteert zich naast de lobaire pneumonie vaker als empyeem of longabces met septische pulmonaire embolen (11). Recent zijn ook

ventilator associated pneumonia (VAP) beschreven (12).

Meningitis door hvKp komt voor in patiënten met een intacte bloed-hersen barrière, zonder neurochirurgie of cerebraal trauma, wat zeer ongewoon is voor een gram negatieve kiem. Het kan zowel een primaire als secundaire focus zijn. Concomitante multiële hersenabcessen en ventriculitis kunnen voorkomen (13).

Verder zijn tromboflebitis, musculoskeletale, huid en weke delen en urogenitale infecties beschreven met hvKp (14,15).

Parameter	Finding for pathotype	
	hvKp	cKp
Location for the development of infection	More commonly the community ^b	More commonly a health care setting
Host	All ages; often otherwise healthy	Older, with some form of compromise
Ethnic background	Often Asian, Pacific Islander, Hispanic	No ethnic predilection
Hepatic abscess	Usually occurs in the absence of biliary disease	Usually occurs in the presence of biliary disease
Number of sites of infection	Often multiple	Usually single
Unusual infectious syndromes for <i>K. pneumoniae</i>	Endophthalmitis, meningitis, ^c brain abscess, necrotizing fasciitis, splenic abscess, epidural abscess	None
Copathogens at the site of infection	Rare, usually monomicrobial	Not uncommon, especially with abdominal, soft tissue, or urinary catheter infection

Tabel 1: algemene verschillen klinische manifestaties hvKp en cKp die kunnen helpen in het herkennen van infecties met hvKp (16).



Figuur 1: leverabces (rode pijl) met secundair abces in de milt (zwarte pijl)(16)



Figuur 2: endoftalmitis (16)

Er is geen consensus over de definitie van hvKp gezien de complexiteit van de betrokken virulentie mechanismen en de gedeeltelijke overlap met cKp. De diagnose wordt gesteld op basis van een suggestief klinisch beeld (zoals hierboven beschreven), fenotypische kenmerken, de aanwezigheid van bepaalde virulentiegenen of een combinatie hiervan (17). De verhoogde virulentie ten op zichte van cKp is het belangrijkste kenmerk maar valt moeilijk te definiëren.

Fenotypische kenmerken van hvKp

Hypermucoviscositeit door overexpressie van kapsel polysachariden het belangrijkste virulentiemechanisme van hvKp. Het hypermucoïd kapsel zorgt voor bescherming tegen fagocytose en bactericide stoffen in de gastheer.

Bijna alle hvKp vertonen een hypermucoïd fenotype op bloed of MacConkey agar. Deze eigenschap kan getest worden door het uitvoeren van een string test. Hierbij wordt een verse kolonie voorzichtig aangetikt met een entlus en omhooggetrokken. Als de slijmerige draad tussen kolonie en entlus >5mm meet is de stringtest positief (figuur 3) (18). Vroeger dacht men dat dit hypermucoïd fenotype gelijkgesteld kon worden aan hvKp maar intussen zijn er ook hvKp stammen beschreven die niet hypermucoïd zijn en zelfs sommige cKp kunnen deze eigenschap ook bezitten (17,19).

Deze overproductie van capsulaire polysachariden in hvKp wordt gemedieerd door mucoid phenotype regulator A en/of A2 (rmpA/A2) en welke bovendien losstaat van het kapseltype. MagA (mucoviscosity associated gene A) speelt ook een rol in de synthese van extracellulaire polysachariden. Er is een sterke associatie tussen hvKp met het K1 kapseltype en aanwezigheid van magA.



Figuur 3: voorbeeld van positieve string test (slijmdraad >5mm bij licht aantikken kolonie)

De meest voorkomende kapseltype zijn K1, gevolgd door K2, die samen 70% van de hvKp kapseltypes vormen. Verder zijn beschreven K5, K20, K54 en K57. Deze kapseltypes zijn echter niet specifiek voor hvKp en kunnen ook bij cKp voorkomen (20). Door horizontale overdracht van virulentiegenen op plasmides binnen *K. pneumoniae* wordt verwacht het aantal kapseltypes bij hvKp zal blijven groeien.

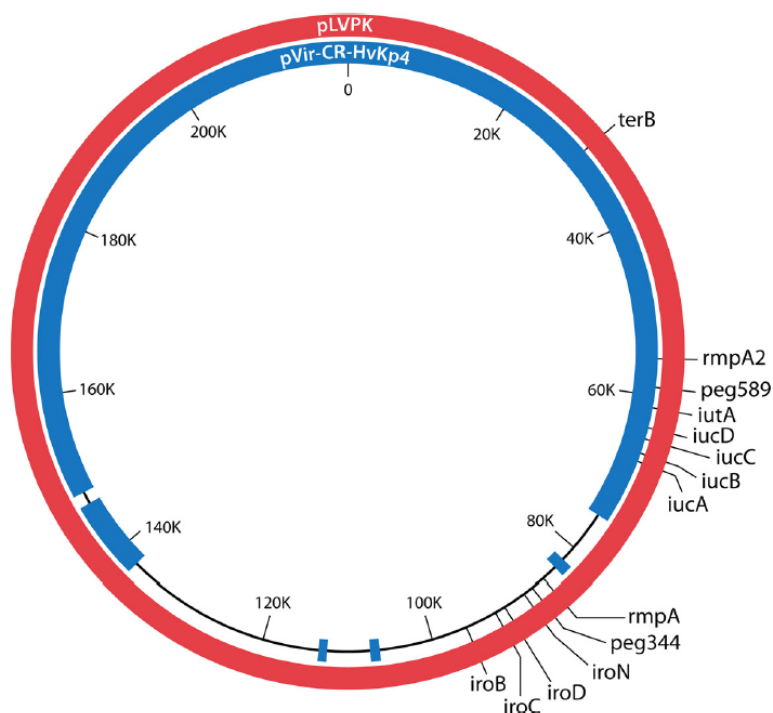
De meeste K1 serotypes behoren tot multilocus sequense type 23 (ST23). Het K2 kapseltype wordt gevonden in verschillende ST's.

Hiernaast zijn er in hvKp ook genen aanwezig die coderen voor sideroforen. Deze zorgen voor een sterk verhoogde siderofoorproductie in vergelijking met cKp. Hier worden iuc (aerobactin), iro (salmochellin) en ybt (yersiniabactin) het meest beschreven. De hierdoor sterk verhoogde ijzer-uptake geven hvKp een groei en overlevingsvoordeel in de gastheer.

Virulentiegenen van hvKp

Recente genomische epidemiologische studies beschrijven de aanwezigheid van een virulentieplasmides pLVPK (figuur 4) en het zeer gelijkaardige pK2044 die veel hvKp stammen gemeen hebben (21). Op deze plasmides liggen de gen loci *iro* (salmochelin

synthese), *iuc* (aerobactin synthese), *rmpA* en *rmpA2* (regulator of mucoïd phenotype) en *peg-344* (een metabole transporter), welke samen zeer sterk suggestief zijn voor een hvKp stam (17,22). Er zijn nog andere virulentieplasmides beschreven die niet altijd alle genloci bevatten zoals pVir-CR-hvKP4 en ook kleinere integrative conjugative elements (ICE) met mucoid phenotype regulator en siderofoor-genen komen voor (12). Integratie van de virulentiegenen in het chromosoom werd ook beschreven.



Figuur 4: schematische voorstelling van virulentieplasmide pLVPK en pVir-CR-hvKp4 met gen loci iro, iuc, rmpA/rmpA2, peg-44, geassocieerd met hvKp (16)

Mucoid phenotype regulator A en/of A2 (*rmpA/A2*) medieert de overproductie van capsulaire polysachariden in hvKp en zorgt voor het hypermucoïde fenotype van hvKp.

Aerobactin en salmochelin zijn de belangrijkste siderofooren van hvKp en worden gecodeerd door respectievelijk *iuc* en *iro*. Ze zorgen voor een verhoogde ijzer-uptake vanuit de gastheer en geven hvKp een groei en overlevingsvoordeel (figuur 5). In cKp wordt de incidentie van deze siderofooren op 2-6% geschat maar in hvKp op meer dan 90%. Genoom analyse toonde aan dat de *iuc* en *iro* loci in bijna alle hvKp aanwezig zijn (23).

Hiernaast wordt yersiniabactin (*ybt*) ook nog frequent beschreven als siderofoor maar

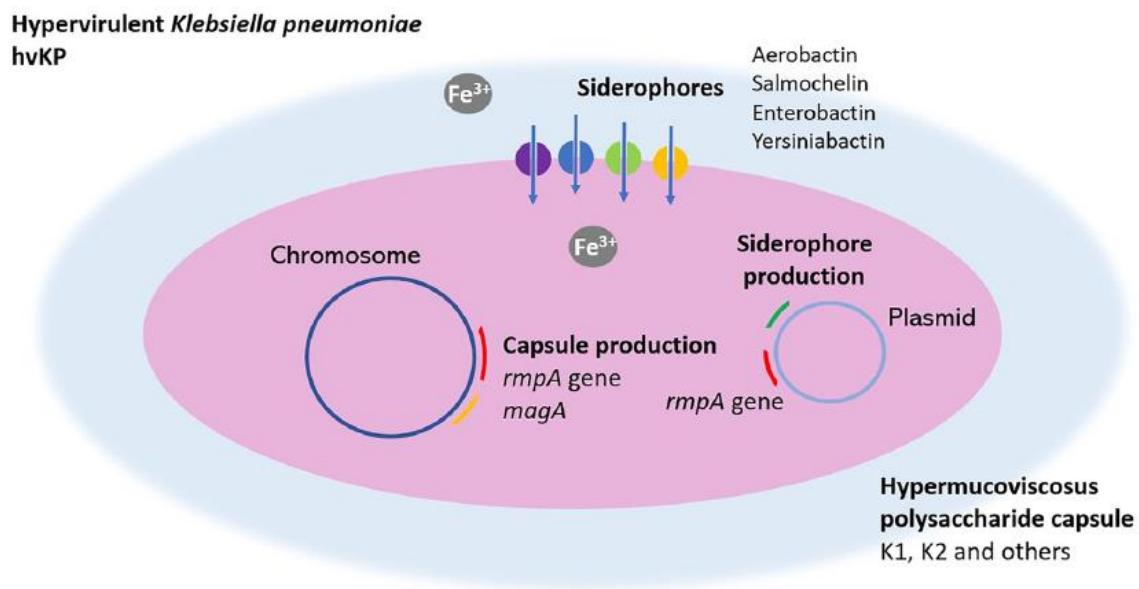
deze maakt geen deel uit van het typische virulentieplasmide en komt ook frequent voor in cKp (24).

Het gen *clb* dat codeert voor colibactine, een genotoxine dat tot DNA dubbelstrengbreuken leidt, maakt ook geen deel uit van de klassiek beschreven hvKp virulentieplasmides maar is vaak chromosomaal aanwezig in hvKp (25).

Peg-344, een bacteriële membraantransportereiwit, helpt de overleving van hvKp in ascitesvocht. Peg-344 wordt in bijna 100% van de hvKp stammen gedetecteerd (26).

MagA (mucoviscosity associated gene A) is een K1 serotype allel van het *wzy* gen dat zich op het bacteriële chromosoom bevindt in plaats van op een virulentie plasmide. Het is een cruciale virulentiefactor die een rol speelt in de synthese van extracellulaire polysachariden en biofilm formatie. Er is een sterke associatie tussen hvKp met het K1 kapseltype en de aanwezigheid van *magA* (27).

hvKp kunnen behoren tot verschillende sequence types (ST). Een grote cluster die vaak geassocieerd wordt met hvKp is ST23. Deze is sterk geassocieerd met expressie van het K1 kapseltype. De meest voorkomende sequence types zijn ST23, ST25, ST65, ST86 en ST375.



Figuur 5: schematische voorstelling virulentiefactoren in hvKp (28)

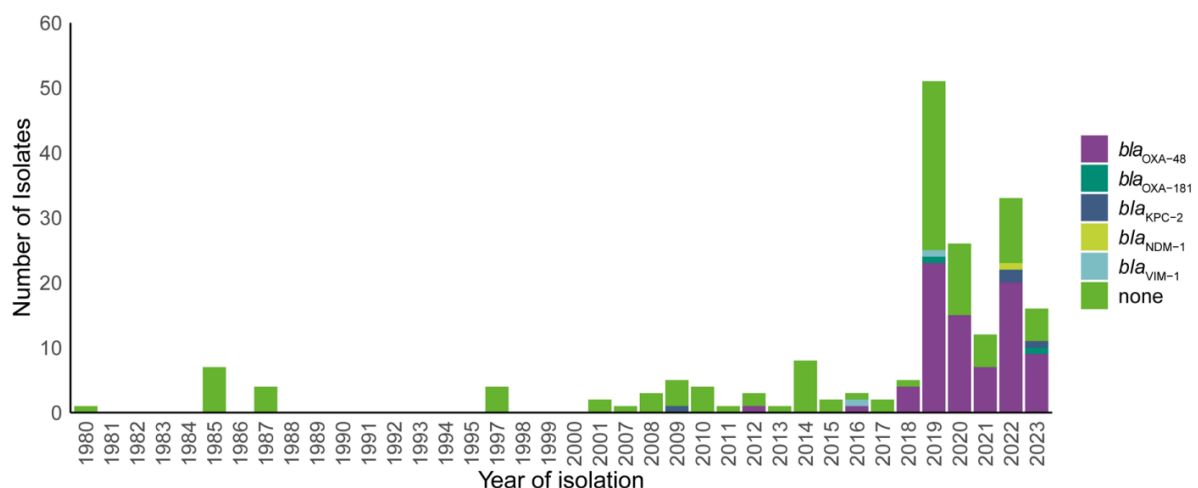
Epidemiologie

Klassiek werd hvKp vooral in Zuid-Oost Azië gevonden en buiten Azië enkel in clusters bij patiënten met een reisgeschiedenis naar Azië of Aziatische etniciteit (6). De recente toename van infecties met deze kiem wereldwijd is een reden tot grote bezorgdheid. Vooral de toegenomen detectie van Sequence Type (ST) 23 die vaak carbapenem-resistentie genen draagt (CR-hvKp) is zeer zorgwekkend (1,2). Deze convergentie van hypervirulentie met antimicrobiële resistentie vormt een aanzienlijke bedreiging voor de volksgezondheid gezien de hoge mortaliteit van deze infecties mede door de beperkte therapeutische opties (29,30).

Er is ook een toename van nosocomiale hvKp infecties bij comorbiede patiënten in het ziekenhuis, wat detectie door het klassieke klinische beeld van een community-acquired infectie bij de jonge gezonde patiënt bemoeilijkt.

De WHO waarschuwt dat hvKp zeer waarschijnlijk sterk ondergedetecteerd is gezien er geen globaal surveillance netwerk bestaat en de diagnosemogelijkheden in de meeste laboratoria beperkt zijn.

De geschatte prevalentie van hvKp binnen *K. pneumoniae* bacteriëmie isolaten werd op 8.2% geschat in Canada en 6.3% in de USA (31,32).



Figuur 6: hvKp ST23 K1 isolaten per jaar ingestuurd naar ECDC (ECDC 2024)

Sinds het vorige ECDC rapport in 2021 is het aantal Europese landen waar hvKp ST23 stammen gedetecteerd zijn toegenomen van 4 naar 10 met ook een sterke toename van het aantal ingestuurde stammen voor analyse per land van 12 naar 143.

Carbapenemase-genen worden frequent gedetecteerd in deze stammen (figuur 6). De stammen worden op vrijwillige basis ingestuurd naar ECDC ter analyse, wat maakt dat dit zeker geen volledig representatief epidemiologisch beeld is. Waarschijnlijk is er een sterke bias voor de detectie van CR-hvKp ten opzichte van hvKp aangezien het detecteren van carbapenemase-resistentie vaak een trigger is voor verdere diagnostiek naar hvKp.

Een recente studie van het Belgisch NRC voor hvKp beschreef 22 ingestuurde hvKp stammen in België tussen 2014 en 2020, waarvan 31% K1 (allen behorend tot ST23) en 64% K2 (behorend tot 7 verschillende ST's) stammen waren (33). Opvallend is dat de meeste van de patiënten geen buitenlandse reisgeschiedenis hadden of van Aziatische etniciteit waren. Dit in tegenstelling tot een cohortstudie in de Verenigde staten waar 50% van de patiënten met hvKp infectie van Aziatische etniciteit waren (34). Ook werden er comorbiditeiten vastgesteld bij de meerderheid van de patiënten (gemiddelde leeftijd 61 jaar). In geen van de stammen werden carbapenemase-resistentie-genen gedetecteerd.

Zeer waarschijnlijk is deze studie ook niet volledig representatief voor de Belgische epidemiologie aangezien stammen op vrijwillige basis werden opgestuurd naar het NRC en de beperkte klinische awareness en diagnosemodaliteiten voor hvKp.

Microbiologische detectiemethoden

Zoals reeds eerder vermeld is er heden geen consensus over de definitie van hvKp. Naast het typische klinische beeld en virulente karakter van de infecties, zijn er nog enkele andere methodes beschreven die kunnen helpen bij het vermoeden van hvKp. Er is echter geen gouden standaard diagnostische test.

String test

Het kapsel speelt een belangrijke rol in de verhoogde virulentie van hvKp. De transcriptiefactoren rpmA/rpmA2 regelen de expressie van het kapsel en het hypermucoïd fenotype. De meeste hvKp zijn dus zeer mucoïd en deze eigenschap kan gemakkelijk getest worden door het licht aantikken van een verse kolonie met een entlus. Als het mucus kapsel aan de entlus blijft hangen met een lengte van >5 mm wordt deze test als positief beschouwd. Vroeger werd dit hypermucoïd fenotype als voldoende beschouwd om te spreken van hvKp. Echter toonden verdere studies aan dat niet alle hvKp hypermucoïd zijn en dat het hypermucoïd fenotype ook in cKp stammen teruggevonden werd (17).

De test is makkelijk en snel in gebruik en kan zo wel een eerste aanwijzing zijn voor het vermoeden van hvKp.

Telluriet resistentie test

In het virulentieplasmide van hvKp bevindt zich een telluriet resistentie gen. *K. pneumoniae* zou kunnen gekweekt worden op selectieve media met telluriet. Als er zwarte kolonies groeien zijn deze verdacht voor hvKp. Telluriet resistentie genen zijn echter niet volledig specifiek voor hvKp (35). Deze test zou eventueel kunnen gebruikt worden in combinatie met de string test.

Siderofoor productie

Ijzer ionen zijn onontbeerlijk voor bacteriële groei. Bacteriële sideroforen hebben een hogere affiniteit voor ijzer ionen dan menselijke sideroforen. Hierdoor kunnen ze vrije ionen uit de menselijke gastheer opnemen. De hoeveelheid sideroforen in hvKp is 6-10x hoger dan in cKp. Stammen die meer dan 30µg/L sideroforen bevatten zijn suggestief voor hvKp. Hoewel deze test een goede sensitiviteit en specificiteit heeft is de praktische toepassing ervan niet echt haalbaar in een routine labo gezien het meten van sideroforen arbeidsintensief is (17).

Maldi TOF

Er is een methode beschreven om met MALDI-TOF MS , hvKp te detecteren op basis van zijn specifieke massa spectrum. Deze is echter nog niet bruikbaar in de klinische routine en nog gelimiteerd tot kapseltype K1 hvKp (36) .

Moleculaire testen

Zoals eerder reeds beschreven is het door middel van moleculaire technieken (qPCR/WGS/LAMP) detecteren van hvKp-virulentiegenen de meest accurate laboratoriumtechniek voor het aantonen van hvKp. De virulentiegenen van hvKp worden gezien als moleculaire biomarkers specifiek voor hvKp.

Kleborate score

Dit is een software tool die het genoom van *K. pneumoniae* kan screenen naar onder andere virulentie genen en een virulentiescore kan toekennen van 0- 5 (https://usegalaxy.eu/?tool_id=kleborate). Er moet dus wel eerst een moleculaire test gebeuren waarna de data kan ingeladen worden in de software. De score kan ook manueel berekend worden. De score wordt berekend als volgt:

- 0 = negative for all of yersiniabactin (ybt), colibactin (clb), aerobactin (iuc)
- 1 = yersiniabactin only
- 2 = yersiniabactin and colibactin (or colibactin only)
- 3 = aerobactin (without yersiniabactin or colibactin)
- 4 = aerobactin with yersiniabactin (without colibactin)
- 5 = yersiniabactin, colibactin and aerobactin

HvKp isolaten zijn sterk geassocieerd met Kleborate virulentiescores van 4 of 5 (24). Er zijn echter ook hvKp beschreven met lagere Kleborate scores.

Bemerk wel dat noch het salmochelin (iro) of rmpA/A2 gen in deze virulentiescore worden opgenomen, wat toch 2 belangrijke virulentiegenen zijn in hvKp. Echter komen deze meestal samen voor met aerobactin (iuc) op een virulentieplasmide.

Het gen *clb* dat codeert voor colibactine, een genotoxine dat tot DNA dubbelstrengbreuken leidt, is niet aanwezig op de klassiek beschreven hvKp virulentieplasmides maar is vaak chromosomaal aanwezig in hvKp (25).

Vraag 2. Is het klinisch relevant om hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* te detecteren?

Klinische implicaties

Gezien de tendens van hvKp infecties om strooihaarden te vormen op secundaire anatomische sites, lijkt het opportuun om te weten of het om een hvKp infectie gaat. Men zou dan laagdrempelig door bijkomende beeldvorming (CT/MRI) op zoek kunnen gaan naar deze foci, welke mogelijks nood hebben aan drainage voor een betere source control (37). Het op deze manier opsporen van meningitis, hersenabcessen, leverabcessen, prostatitis of endoftalmitis is belangrijk aangezien deze vaak een specifieke keuze voor antimicrobiëel product (anatomische-site specifieke penetratie) of specifieke behandelingsduur met zich meebrengen (5). Zeker alertheid voor endoftalmitis is belangrijk gezien de desastreuze gevolgen op de visus en de specifieke oftalmologische behandeling zoals vitrectomie en intravitreale antibioticatoediening (38). Anekdotische data suggereren dat hvKp infecties vaker recidiveren, mogelijks zou een langere behandelingsduur noodzakelijk kunnen zijn dan de standaard 1-2w bij een bacteriëmie (indien secundaire metastatische foci afwezig zijn) (39). In de literatuur is er voorlopig geen meerwaarde beschreven voor het systematisch afnemen van opvolghemoculturen.

Impact op infectiepreventie maatregelen

Er is weinig data om de zin van verhoogde infectiepreventie maatregelen (naast de standaard voorzorgsmaatregelen) op te baseren. Er is nog weinig gekend over de reservoirs en verspreidingsmechanismen van hvKp, maar een belangrijk reservoir voor humane infectie lijkt de eigen darmflora te zijn (40).

Als we kijken naar cKp, is er wel data die toont dat ESBL+ cKp zich sneller verspreidt op ICU (Intensive Care Unit) dan ESBL+ *E. coli* (41). Het nosocomiale verspreidingspotentieel lijkt dus zorgwekkend als we dit extrapoleren naar hvKp.

Het is intussen duidelijk dat hvKp niet langer enkel een community-acquired (CA) infectie is, maar ook tot nosocomiale infecties leidt (1,2). In 2018 werd in China een CR-hvKp outbreak met ventilator-associated pneumonia (VAP) beschreven op ICU die fataal was voor alle 5 geïnfecteerde patiënten (42).

Momenteel is het echter nog onduidelijk of verhoogde infectiepreventie maatregelen nut hebben voor non-CR-hvKp. Gezien de potentiële ernst van deze infecties vallen contact-isolatie maatregelen op een ICU bijvoorbeeld wel te overwegen. Een verhoogde

awareness en surveillance van hvKp-infecties zal hopelijk tot meer bruikbare data leiden.

In het geval van CR-hvKp zijn verhoogde infectiepreventie maatregelen reeds van toepassing gezien deze dezelfde zijn voor niet hypervirulente carbapenemase-producerende stammen (1,2). De bijkomende detectie van het hypervirulente karakter van de stam zal dus geen bijkomende impact hebben op de maatregelen hebben, gezien carbapenemase-productie gemakkelijk kan worden opgespoord in de meeste microbiologische laboratoria door middel van het antibiogram en het breed beschikbaar zijn van snelle bevestigingsmethodes .

Vraag 3. Komen infecties met hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* reeds voor in onze patiëntenpopulatie?

Gezien moleculaire detectie van virulentiegenen de meest betrouwbare methode lijkt te zijn voor het opsporen van hvKp, werd gekozen voor de LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)-gebaseerde eazyplex[®] hvKp assay (Amplex Diagnostics). De assay heeft het voordeel snel en gebruiksvriendelijk te zijn: er kan rechtstreeks van bacteriële kolonies gewerkt worden en men krijgt een resultaat binnen de 30 minuten, wat dus een 'diagnose' kan betekenen de dag na het afnemen van een klinisch staal. Dit maakt de assay bruikbaar in kader van de verschillende klinische aanpak van hvKp of eventuele in te stellen infectiepreventie maatregelen.

Methode

De eazyplex[®] hvKp assay (Amplex Diagnostics) is een ready-to-use teststrip met gelyofiliseerde mastermixes met primers voor *K. pneumoniae*, iucC, iroC, ybt, clb, rmpA, rmpA2 en een inhibitiecontrole. De kit werd gebruikt in combinatie met het Genie II LAMP-toestel (Amplex Diagnostics).

Een klein deeltje van een kolonie *K. pneumoniae* wordt aangetikt met een entnaald en gesuspendeerd in 500µL RALF-buffer (meegeleverd met kit). Deze suspensie wordt 5 minuten geïncubeerd op 99 graden voor lysis van de bacteriële celwand. Vervolgens wordt 25µL van gelyseerde suspensie gepipetteerd in elke well van de teststrip. Na oplossen van de reagentia en het verwijderen van eventuele luchtbelletjes door zacht te tikken wordt de teststrip in het Genie II toestel geplaatst. De LAMP-reactie zelf loopt 20 minuten op 65°C. Het detectieprincipe is gebaseerd op het meten van real-time fluorescentie van een intercalerende dye die vrijkomt bij amplificatie. De resultaten worden automatisch berekend door de software. Enkel het aan of afwezig zijn van een gen wordt aangetoond. De amplificatiecurves worden live op het scherm getoond en worden opgeslagen in de software.

Een totaal van 24 *K. pneumoniae* isolaten verzameld uit de klinische routine tussen november 2024 tot maart 2025 werden getest met de eazyplex[®] hvKp assay. Isolaten

geïsoleerd uit steriele sites, respiratoire mono-microbiële, carbapemase-producerende of string test positieve isolaten kwamen in aanmerking. De stammen werden ingevroren met cryobank parels en bewaard op -80°C tot moment van analyse. Voor het invriezen werd ook telkens een string test uitgevoerd zoals reeds eerder beschreven in de tekst. De uiteindelijke geteste collectie betrof isolaten geïsoleerd uit volgende anatomische sites: 14 hemoculturen (58%), 7 respiratoire stalen (29%; BAL, sinus of bronchusaspiraats), 1 abdominaal staal (4%; galvocht), 1 huidweefsel (4%) en 1 urinair staal (4%).

Resultaten en discussie

4 van de 24 geteste isolaten (17%) testten positief op alle virulentiegenen in de assay (zie tabel bijlage)). Dit suggereert een volledig intact hvKp virulentieplasmide. Deze 4 isolaten waren tevens string test positief. We definiëren deze isolaten dan ook als hvKp in onze epidemiologische studie. De 4 isolaten zijn geïsoleerd uit 3 unieke patiënten: 2 van de isolaten zijn afkomstig van eenzelfde patiënt, beide geïsoleerd uit hemoculturen met 1 maand tussen. Hoewel een prevalentie van 17% hvKp isolaten over 5 maanden veel lijkt moet men rekening houden met de studieopzet: maar een klein deel van alle *K. pneumoniae* isolaten over deze periode konden getest worden wegens het beperkte aantal demo-kits beschikbaar. Er werd rekening gehouden met het klinisch beeld beschreven in de literatuur om de pre-kans van detectie te verhogen. Het betrof grotendeels isolaten uit hemoculturen, waar een hogere prevalentie kan verwacht worden voor hvKp gezien zijn virulentiemechanismen. Ter vergelijking, er werden in diezelfde periode ongeveer 300 *K. pneumoniae* isolaten in de klinische routine geïsoleerd (waarvan 75% urinair).

7 van de 24 geteste isolaten waren string test positief (29%), waaronder de 4 hvKp-isolaten. Dit bevestigt inderdaad de sterke correlatie van het hypermucoïd fenotype met hvKp. We zien echter ook dat 3 van de string test positieve isolaten geen hvKp virulentiegenen bezitten, wat dus de literatuur bevestigt dat een positieve string test op zich onvoldoende specifiek is voor hvKp. String test negatieve isolaten die toch de hvKp virulentiegenen bezaten hebben we niet gedetecteerd in onze studie.

Opvallend werd ook in de helft van de cKp isolaten het ybt-virulentiegen (coderend voor yersiniabactin) gedetecteerd (50%, 10/20). Deze bevinding is ook beschreven in de literatuur (24).

De gevonden hvKp isolaten werden opgestuurd naar het Nationaal Referentiecentrum (NRC, CHU UCL Namur Mont-Godinne) voor bevestiging van de gedetecteerde virulentiegenen en het bepalen van ST en kapseltype.

De 4 gevonden hvKp isolaten werden geïsoleerd bij 3 unieke patiënten.

Casus 1 (isolaat 1 en 2, hemoculturen) betreft een 78-jarige man afkomstig uit West-

Vlaanderen met diabetes mellitus type 2 en chronische hepatitis C. Er werden doorheen onze studie 2 onafhankelijke isolaten van deze patiënt geïncubeerd, telkens geïsoleerd uit de hemoculturen met ongeveer 1 maand tussen. Dit werd pas achteraf duidelijk bij het analyseren van de isolaten. Hij werd opgenomen op geriatrie met een CA K. *pneumoniae* bacteriëmie zonder duidelijke focus, vermoedelijk respiratoir en werd 10 dagen behandeld met amoxicilline-clavulaanzuur. Een maand later wordt de man terug opgenomen met een K. *pneumoniae* bacteriëmie zonder duidelijke focus. Een CT-abdomen toont letsels verdacht voor leverabcessen en er wordt behandeld met amoxicilline-clavulaanzuur gedurende 6 weken met heden gunstige outcome. Er was geen opname op intensieve zorgen nodig. Beide isolaten bezaten hetzelfde wildtype resistentiepatroon en virulentiegenen, wat dus sterk doet vermoeden dat het effectief om dezelfde stam gaat. Dit klinisch beeld komt overeen met het beschreven beeld in de literatuur van hvKp met secundaire strooihaarden.

Casus 2 (isolaat 3, respiratoir BAL) betreft een 47-jarige man afkomstig uit West-Vlaanderen zonder relevante voorgeschiedenis die werd opgenomen op intensieve zorgen na een polytrauma. Hij ontwikkelde recidiverende respiratoire infecties (VAP) waaronder met bacteriëmie, die behandeld werden met onder andere piperacilline-tazobactam, amoxicilline-clavulaanzuur en levofloxacin met gunstige outcome. Initieel was er wel reeds K. *pneumoniae* aanwezig in het eerste respiratoire surveillance staal, wat dus kolonisatie met hvKp bij deze patiënt doet vermoeden als bron van infectie. Er was een wildtype resistentiepatroon.

Casus 3 (isolaat 4, hemocultuur) betreft een 80-jarige man afkomstig uit West-Vlaanderen met diabetes mellitus type 2 die werd opgenomen omwille van pyelonefritis met bacteriëmie op intensieve zorgen. Hij werd behandeld met onder andere temocilline en ceftriaxone gedurende 3 weken met gunstige outcome.

Alle 4 gedetecteerde hvKp isolaten bezaten een wildtype resistentiepatroon. Er lijkt dus gelukkig heden nog geen sprake te zijn van circulerende CR-hvKp in onze bestudeerde patiëntenpopulatie. Er werd 1 OXA-48 K. *pneumoniae* isolaat uit een huid en weke delen infectie getest welke geen hvKp virulentiegenen bezat.

Conclusie

Naar aanleiding van een recente “**call to action**” van de WHO en ECDC om de surveillancemiddelen naar carbapenem-resistente hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* (CR-hvKp) op te schalen werd in ons centrum de LAMP-gebaseerde eazyplex® hvKp assay (Amplex Diagnostics) geëvalueerd. Deze moleculaire assay kan hypervirulente *Klebsiella pneumoniae*-(hvKp) geassocieerde virulentie-genen (rmpA/A2, iucC, iroC, ybt, clb) detecteren.

Er werden 24 K. *pneumoniae* isolaten, verzameld tussen december 2024 en maart 2025

getest: 4/24 isolaten (27%) testten positief voor alle resistentiegenen en waren allen string test positief. Zij werden als hvKp beschouwd. Alle hvKp isolaten bezaten een wildtype resistentiepatroon, er werden geen CR-hvKp stammen gedetecteerd. Er circuleren dus reeds hvKp stammen in de patiëntenpopulatie van een regionaal Belgisch ziekenhuis.

Het beschikbaar zijn van een snelle methode in het microbiologisch laboratorium voor het detecteren van hvKp kan belangrijk zijn voor een aangepast klinisch beleid in deze ernstige infecties en kan mogelijks leiden tot verhoogde infectiepreventie maatregelen. De eazyplex[®] hvKp assay kan hiervoor gemakkelijk geïmplementeerd worden in de routine microbiologische diagnostiek.

We willen oproepen tot een verhoogde waakzaamheid om bij een suggestief klinisch beeld, positieve string test en/of carbapenem-resistente stammen laagdrempelig op te sturen naar het NRC voor het verbeteren van de surveillance en zo de verdere verspreiding van deze potentiële levensbedreigende (CR)-hvKp infecties tegen te gaan.

Acties:

- Laagdrempelig klinisch verdachte/string test positieve/carbapenem-resistente *K. pneumoniae* isolaten doorsturen naar NRC
- Bij verdachte kliniek/string test positieve/carbapenem-resistente *K. pneumoniae* isolaten sneller diagnostiek naar strooihaarden voorstellen
- In de toekomst eventueel toch moleculaire assay voor snelle detectie hvKp in routine brengen

Bijlage

Isolate	Age	Gender	Underlying Conditions	Anatomical Site	Primary Focus	Bacteremia	Metastasis	ICU	Treatment	Outcome	Resistance	String Test	mpA	mpA2	iucC aerobactin	iroC salmocheilin	ybt yersiniabactin	clb collibactin
1	78	m	DM, chron hepC	Bloed	Pneumonie	+	-	-	AMC	gunstig	wt	+	+	+	+	+	+	+
2	78	m	DM, chron hepC	Bloed	Leverabces	+	+	-	TZP, AMC	gunstig	wt	+	+	+	+	+	+	+
3	47	m	/	Respiratoir	Pneumonie	+	-	+	AMC, TZP, FQ	gunstig	wt	+	+	-	+	+	+	+
4	80	m	DM	Bloed	Pylonefritis	+	-	+	C3G, TEM	gunstig	wt	+	+	+	+	+	+	+

Tabel: klinische kenmerken van de 4 geïsoleerde hypervirulente *Klebsiella pneumoniae* isolaten.

DM: Diabetes Mellitus; AMC: amoxicilline-clavulaanzuur; ICU: intensive care unit admission; TZP: piperacilline-tazobactam; FQ: fluoroquinolone; C3G: 3^e generatie cefalosporine; TEM: temocilline; wt: wildtype

Referenties

1. Antimicrobial Resistance, Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - Global situation [Internet]. [cited 2025 May 10]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON527>
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries, first update. 2024;(February).
3. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2025 May 10];48(1):1–12. Available from: <https://dx.doi.org/10.1086/595011>
4. Ecdc. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) EU targets on antimicrobial resistance •. [cited 2025 May 11]; Available from: <https://atlas.ecdc.europa.eu/>
5. Liu YC, Cheng DL, Lin CL. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess Associated With Septic Endophthalmitis. *Arch Intern Med* [Internet]. 1986 Oct 1 [cited 2025 May 11];146(10):1913–6. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/607365>
6. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence* [Internet]. 2013 Feb 15 [cited 2025 May 11];4(2):107–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23302790/>
7. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu YC, Wang RS. Septic Metastatic Lesions of Pyogenic Liver Abscess: Their Association With *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia in Diabetic Patients. *Arch Intern Med* [Internet]. 1991 Aug 1 [cited 2025 May 11];151(8):1557–9. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/615380>
8. Lee HC, Chuang YC, Yu WL, Lee NY, Chang CM, Ko NY, et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. *J Intern Med* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2025 May 11];259(6):606–14. Available from: [/doi/pdf/10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x](https://doi/pdf/10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x)
9. Margo CE, Mames RN, Guy JR. Endogenous *Klebsiella* Endophthalmitis: Report of Two Cases and Review of the Literature. *Ophthalmology* [Internet]. 1994 Jul 1 [cited 2025 May 11];101(7):1298–301. Available from: <https://www.aaojournal.org/action/showFullText?pii=S0161642094311766>

10. Yang CS, Tsai HY, Sung CS, Lin KH, Lee FL, Hsu WM. Endogenous *Klebsiella* Endophthalmitis Associated with Pyogenic Liver Abscess. *Ophthalmology* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2025 May 11];114(5):876-880.e2. Available from: <https://www.aaojournal.org/action/showFullText?pii=S0161642007001157>
11. Lin YT, Chen TL, Siu LK, Hsu SF, Fung CP. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired thoracic empyema or complicated parapneumonic effusion caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [Internet]. 2010 Aug 27 [cited 2025 May 11];29(8):1003–10. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-010-0961-8>
12. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2025 May 11];18(1):37–46. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S1473309917304899>
13. Lin YT, Liu CJ, Chen TJ, Fung CP. Long-Term Mortality of Patients with Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess: A Population-Based Study. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 27 [cited 2025 May 11];7(3):e33978. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033978>
14. Cheng NC, Yu YC, Tai HC, Hsueh PR, Chang SC, Lai SY, et al. Recent Trend of Necrotizing Fasciitis in Taiwan: Focus on Monomicrobial *Klebsiella pneumoniae* Necrotizing Fasciitis. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2025 May 11];55(7):930–9. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/cis565>
15. Lee HC, Chuang YC, Yu WL, Lee NY, Chang CM, Ko NY, et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. *J Intern Med* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2025 May 11];259(6):606–14. Available from: [/doi/pdf/10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x](https://doi/pdf/10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x)
16. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(3):1–42.
17. Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2025 May 11];56(9):776–94. Available from: [/doi/pdf/10.1128/jcm.00776-18?download=true](https://doi/pdf/10.1128/jcm.00776-18?download=true)

18. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2025 May 11];199(5):697–705. Available from: <https://dx.doi.org/10.1084/jem.20030857>
19. Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence* [Internet]. 2017 Oct 3 [cited 2025 May 11];8(7):1111–23. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/21505594.2017.1317412>
20. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2025 May 11];62(1):1–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889308002265?via%3Dihub>
21. Lam MMC, Wyres KL, Duchêne S, Wick RR, Judd LM, Gan YH, et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nature Communications* 2018 9:1 [Internet]. 2018 Jul 13 [cited 2025 May 11];9(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05114-7>
22. Lam MMC, Wyres KL, Duchêne S, Wick RR, Judd LM, Gan YH, et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nature Communications* 2018 9:1 [Internet]. 2018 Jul 13 [cited 2025 May 11];9(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05114-7>
23. Ye M, Tu J, Jiang J, Bi Y, You W, Zhang Y, et al. Clinical and genomic analysis of liver abscess-causing *Klebsiella pneumoniae* identifies new liver abscess-associated virulence genes. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2016 Nov 29 [cited 2025 May 11];6(NOV):234735. Available from: www.frontiersin.org
24. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature Communications* 2021 12:1 [Internet]. 2021 Jul 7 [cited 2025 May 19];12(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24448-3>
25. Zhao L, Xia X, Yuan T, Zhu J, Shen Z, Li M. Molecular Epidemiology of Antimicrobial Resistance, Virulence and Capsular Serotypes of Carbapenemase-Carrying

- Klebsiella pneumoniae* in China. *Antibiotics* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2025 May 21];11(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36009969/>
26. Kamau E, Ranson EL, Tsan AT, Bergmann-Leitner ES, Garner OB, Yang S. Clinical and genomic characterization of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) infections via passive surveillance in Southern California, 2020–2022. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 Oct 14 [cited 2025 May 23];13:1001169. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>
 27. Guo Y, Wang S, Zhan L, Jin Y, Duan J, Hao Z, et al. Microbiological and clinical characteristics of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with invasive infections in China. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2025 May 11];7(FEB):230924. Available from: www.frontiersin.org
 28. Kocsis B. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: An update on epidemiology, detection and antibiotic resistance. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2023;70(4):278–87.
 29. Jiang J, Wang L, Hu Y, Chen X, Li P, Zhang J, et al. Global emergence of Carbapenem-resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* driven by an IncFIK34 KPC-2 plasmid. *EBioMedicine* [Internet]. 2025 Mar 1 [cited 2025 May 14];113. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S2352396425000714>
 30. Tang Y, Du P, Du C, Yang P, Shen N, Russo TA, et al. Genomically defined hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* contributed to early-onset increased mortality. *Nature Communications* 2025 16:1 [Internet]. 2025 Mar 1 [cited 2025 May 14];16(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-025-57379-4>
 31. Peirano G, Pitout JDD, Laupland KB, Meatherall B, Gregson DB. Population-Based Surveillance for Hypermucoviscosity *Klebsiella pneumoniae* Causing Community-Acquired Bacteremia in Calgary, Alberta. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2025 May 14];24(3):e61–4. Available from: [/doi/pdf/10.1155/2013/828741](https://doi.org/10.1155/2013/828741)
 32. Chou A, Nuila RE, Franco LM, Stager CE, Atmar RL, Zechiedrich L. Prevalence of hypervirulent *klebsiella pneumoniae*-associated genes *rmpA* and *magA* in two tertiary hospitals in Houston, TX, USA. *J Med Microbiol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2025 May 14];65(9):1047–8. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000309>
 33. Anantharajah A, Deltombe M, de Barsey M, Evrard S, Denis O, Bogaerts P, et al. Characterization of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates in Belgium.

- European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 May 14];41(5):859–65. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-022-04438-z>
34. Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY. Klebsiella pneumoniae liver abscess: A new invasive syndrome. Lancet Infect Dis [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2025 May 14];12(11):881–7. Available from: <https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S1473309912702050>
 35. Wu X, Zhan F, Zhang J, Chen S, Yang B. Identification of hypervirulent Klebsiella pneumoniae carrying terW gene by MacConkey-potassium tellurite medium in the general population. Front Public Health. 2022 Aug 24;10:946370.
 36. Huang Y, Li J, Gu D, Fang Y, Chan EW, Chen S, et al. Rapid detection of K1 hypervirulent Klebsiella pneumoniae by MALDI-TOF MS. Front Microbiol [Internet]. 2015 Dec 21 [cited 2025 May 21];6(DEC):166495. Available from: www.frontiersin.org
 37. Patel PK, Russo TA, Karchmer AW. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae. Open Forum Infect Dis [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2025 May 20];1(1). Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/ofid/ofu028>
 38. Ang M, Jap A, Chee SP. Prognostic factors and outcomes in endogenous Klebsiella pneumoniae endophthalmitis. Am J Ophthalmol [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2025 May 20];151(2):338–344.e2. Available from: <https://www.ajo.com/action/showFullText?pii=S0002939410006707>
 39. Fierer J, Walls L, Chu P. Recurring Klebsiella pneumoniae pyogenic liver abscesses in a resident of San Diego, California, due to a K1 strain carrying the virulence plasmid. J Clin Microbiol [Internet]. 2011 Dec [cited 2025 May 20];49(12):4371–3. Available from: [/doi/pdf/10.1128/jcm.05658-11?download=true](https://doi/pdf/10.1128/jcm.05658-11?download=true)
 40. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae – clinical and molecular perspectives. J Intern Med [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2025 May 20];287(3):283–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31677303/>
 41. Gurieva T, Dautzenberg MJD, Gniadkowski M, Derde LPG, Bonten MJM, Bootsma MCJ. The Transmissibility of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Intensive Care Units. Clinical Infectious Diseases [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2025 May 20];66(4):489–93. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/cix825>
 42. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2018 Jan 1 [cited

2025 May 20];18(1):37–46. Available from:
<https://www.thelancet.com/action/showFullText?pii=S1473309917304899>