



Bir Üniversite Hastanesinde 2014-2018 Yılları Arasında Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Citrobacter* Suşlarının Antibiyotik Direncinin Değerlendirilmesi

Mustafa Kerem Çalgın 
Yeliz Çetinkol 

Evaluation of Antibiotic Resistance of Citrobacter Strains Isolated from Various Clinical Samples in a University Hospital Between 2014-2018

Öz

İnsan gastrointestinal sistemini kolonize edebilen *Citrobacter* suşları, aynı zamanda riskli popülasyonlarda ciddi enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Klinik örneklerde tespit edildiklerinde duyarlılıklarının belirlenmesi, doğru tedavinin uygulanarak direnç gelişiminin önlenmesi için gereklidir. Bu çalışmada Mart 2014 ile Haziran 2018 tarihleri arasında Ordu Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarına poliklinik ve servislerden gönderilen çeşitli klinik örneklerden elde edilmiş olan *Citrobacter* izolatlarının antibiyogram sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

İncelenen 116 *Citrobacter* suşunun 67'si *Citrobacter freundii*, 33'ü *Citrobacter koseri* ve 16'sı diğer *Citrobacter* türleri olarak tanımlanmıştır (yedi *Citrobacter youngae*, altı *Citrobacter braakii*, iki *Citrobacter amalonaticus*, bir *Citrobacter farmeri*).

Bu suşlar en fazla idrar örneklerinden izole edilmiş olup antimikrobiyal direnç oranları sırasıyla aşağıdaki şekilde saptanmıştır: amikasin % 3, gentamisin % 7, meropenem % 10, trimetoprim/sülfametoksazol % 13, imipenem % 14, siprofloksasin % 15, piperasilin/tazobaktam % 17, sefepim % 20 ve seftazidim % 28 olarak saptanmıştır.

Citrobacter suşları ülkemizde hala birçok antibiyotiğe duyarlı olarak tespit edilmektedir. Çalışmamızda amikasin ve gentamisin *Citrobacter* enfeksiyonları için iyi bir tedavi alternatifi olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: antibiyotik direnci, *Citrobacter*

ABSTRACT

Citrobacter strains are capable of colonizing in the human gastrointestinal tract, and can also cause severe infections in populations with risk factors. When detected in clinical specimens, the identification of the sensitivity is necessary to prevent the development of resistance by the initiation of adequate treatment. This study aimed to evaluate the antibiogram results of *Citrobacter* isolates that were obtained from various clinical samples that were collected from outpatient clinics and services and examined in the microbiology laboratory of Ordu University Training and Research Hospital between March 2014 and June 2018.

A total of 116 *Citrobacter* strains were examined, 67 were identified as *Citrobacter freundii*, 33 were *Citrobacter koseri*, and 16 were identified as other *Citrobacter* species (seven *Citrobacter youngae*, six *Citrobacter braakii*, two *Citrobacter amalonaticus*, one *Citrobacter farmeri*). The strains were mostly isolated from urine samples, and their antimicrobial resistance rates were as follows, respectively: amikacin 3 %, gentamicin 7 %, meropenem 10 %, trimethoprim/sulphamethoxazole 13 %, imipenem 14 %, ciprofloxacin 15 %, piperacillin/tazobactam 17 %, cefepime 20 %, and ceftazidime 28 %. *Citrobacter* strains are still susceptible to various antibiotics in our country. It has been concluded that amikacin and gentamicin are good treatment alternatives for *Citrobacter* infections.

Keywords: antibiotic resistance, *Citrobacter*

Alındığı tarih: 12.05.2019

Kabul tarihi: 01.08.2019

Yayın tarihi: 30.08.2019

Mustafa Kerem Çalgın
Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Ordu - Türkiye
✉ mkcalgin@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4236-6177

Y. Çetinkol 0000-0003-4940-4498
Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Ordu - Türkiye

GİRİŞ

Citrobacter cinsi bakteriler *Enterobacteriaceae* ailesinde ve oksidaz negatif, tek karbon kaynağı olarak sitrati kullanan, fakültatif anaerop, hareketli, Gram negatif basillerdir. Çevrede, suda, toprakta, yiyeceklerde ve zaman zaman hayvan ve insanların gastrointestinal sistemlerinde bulunabilirler⁽¹³⁾. İnsan gastrointestinal sistemini kolonize eden *Citrobacter* suşlarının düşük virülansa sahip olduğu düşünülmese rağmen, bu bakteriler idrar yolları, solunum sistemi, karın içi, yara, kemik, kan dolaşımı ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonların etkeni olarak tespit edilmektedirler^(4,11-13). Bununla birlikte, bu bakteriler hastane ortamında direnç kazanıp çok ilaca dirençli (MDR) hale gelerek çeşitli hastane enfeksiyonlarının kaynağı olabilme potansiyeli de taşımaktadır⁽¹⁴⁾.

Antibiyotik direnci, kliniklerde aşırı antibiyotik kullanımına bağlı olarak bakteriler arasında hızla artmakta ve bu durum hastane atık suları gibi ortamlarda direnç genlerinin yayılmasına neden olmaktadır⁽⁹⁾. Son yıllarda yapılan çalışmalar seçici ortamlar olarak hastane atık sularının rolünü göstermiş ve buradan doğal ortamlara dirençli bakterilerin yayılabileceği görülmüştür^(9,10). İnsan gastrointestinal sistemini kolonize eden *Citrobacter* suşları, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* cinsi bakteriler ile birlikte atık sulardan izole edilebildikleri için bu bakterilerin klinik örneklerde tespit edildiklerinde duyarlılıklarının belirlenmesi önemlidir⁽⁹⁾. İleride oluşabilecek nozokomiyal enfeksiyonlar ve direnç gelişimi böylelikle önlenebilecektir. Bunun yanında antimikrobiyal tedavide kültür sonuçları dikkate alınmalı ve kültür sonuçları gelene kadar ampirik antibiyotik tedavisine karar verilirken bölgesel direnç fenotipleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Literatürde *Citrobacter*'lerin duyarlılıklarının belirlendiği çalışmalar az sayıdadır. Bu çalışmada, Ordu Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Citrobacter* izolatlarının, tür düzeyinde tayini ve çeşitli antimikrobiyal maddelere olan direnç durumlarının saptanması ile bu verilere katkı sağlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mart 2014 ile Haziran 2018 tarihleri arası süreçte Ordu Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na poliklinik ve servislerden gönderilen çeşitli klinik örneklerden elde edilmiş olan *Citrobacter* izolatlarının antibiyogram sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Hastalardan uygun şartlarda alınan örnekler, % 5 koyun kanlı agar (Salubris, İstanbul, Türkiye) ve "eosin methylene blue" (EMB) (Salubris, İstanbul, Türkiye) agar besiyerlerinin yüzeyine steril özeler kullanılarak inoküle edilmiştir. Besiyeri plakları 37°C'lik inkübatörde 18-24 saat aerop ortamda inkübe edilmiş ve üremesi olan kültürler incelemeye alınmıştır. Hastaların aynı tür örneklerindeki tekrarlayan üremelerden ilki çalışmaya alınmıştır. Elde edilen izolatların tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılık testleri VITEK 2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemi ile çalışılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Ocak 2017 tarihine kadar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) daha sonrasında ise The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, gentamisin, amikasin, siprofloksasin, imipenem, meropenem ve trimetoprim sülfametoksazole (SXT) direnç oranları analiz edilmiştir. Artmış dozda duyarlı, "intermediate" tespit edilen suşlar dirençli olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda 116 *Citrobacter* suşu incelenmiştir. Bu suşların 67'si *Citrobacter freundii*, 33'ü *Citrobacter koseri* ve 16'sı diğer *Citrobacter* türleri olarak tanımlanmıştır (yedi *Citrobacter youngae*, altı *Citrobacter braakii*, iki *Citrobacter amalonaticus*, bir *Citrobacter farmeri*).

C.frendii, *C.koseri* ve diğer *Citrobacter* türleri en sık idrar örneklerinden izole edilmiş olup suşların klinik örneklerde göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

C.frendii, *C.koseri* ve diğer *Citrobacter* türleri

Tablo 1. *Citrobacter* suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı (n).

Örnek tipi	C.freundii	C.koseri	Diğer <i>Citrobacter</i> türleri
İdrar	56	29	13
Yara	8	1	2
Kan	1	2	-
Balgam	1	1	-
ETA	1	-	1
Toplam	67	33	16

ETA: Endotrakeal aspirat

Tablo 2. *Citrobacter* suşlarının kliniklere göre dağılımı (n).

Klinikler	C.freundii	C.koseri	Diğer <i>Citrobacter</i> türleri
Poliklinikler	54	30	11
Palyatif bakım servisi	3	2	2
Yoğun bakım ünitesi	4	-	1
Süt çocuğu servisi	2	-	2
İç hastalıkları servisi	1	1	-
Beyin cerrahi servisi	1	-	-
Nöroloji servisi	1	-	-
Plastik cerrahi servisi	1	-	-
Toplam	67	33	16

Tablo 3. *Citrobacter* türlerinin antimikrobiyal direnç oranları [dirençli sayı/test edilen sayı (%)].

Antibiyotik	C.freundii	C.koseri	Diğer <i>Citrobacter</i> türleri	TOPLAM
Piperasilin/Tazobaktam	15/58 (26)	1/30 (3)	1/13 (8)	17/101 (17)
Seftazidim	23/67 (34)	6/33 (18)	4/16 (25)	33/116 (28)
Sefepim	7/38 (18)	4/18 (22)	3/14 (21)	14/70 (20)
Gentamisin	8/67 (12)	-/33 (0)	-/16 (0)	8/116 (7)
Amikasin	3/59 (5)	-/31 (0)	-/15 (0)	3/105 (3)
Siprofloksasin	14/67 (21)	3/33 (9)	1/16 (6)	18/116 (15)
İmipenem	12/55 (22)	1/32 (3)	1/13 (8)	14/100 (14)
Meropenem	7/59 (12)	2/31 (7)	2/15 (13)	11/105 (10)
SXT	15/67 (22)	-/32 (0)	-/16 (0)	15/115 (13)

SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol

en sık poliklinik hastalarından izole edilmiş olup suşların kliniklere göre dağılımı Tablo 2’de verilmiştir.

İzole edilen suşların antimikrobiyal direnç oranları Tablo 3’te verilmiştir.

TARTIŞMA

Yurtdışında yapılan çalışmaların birinde Maraki ve ark.⁽⁸⁾ 2017 yılında Yunanistan’da izole ettikleri 385 *Citrobacter* suşunun % 45’inin *C.freundii* ve % 43’ünün *C.koseri* olduğunu saptamışlar ve bu suşların en fazla idrar (% 44) ve yara (% 27) örneklerinden izole edildiğini bildirmişlerdir. *Citrobacter* saptanan örneklerin 114’ünü poliklinik, 271’ini servis hastalarından elde etmişler ve suşların en fazla kolistin ve fosfomisine duyarlı olduklarını (% 99.2) ve bunları karbapenemler (% 99), aminoglikozidler (% 96-98), tigesiklin (% 96), sefepim (% 95), siprofloksasin (% 94), tetrasiklin (% 93), SXT (% 91), kloramfenikol (% 88), piperasilin/tazobaktam (% 87) ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin (% 86) izlediğini

belirtmişlerdir⁽⁸⁾. Diğer bir çalışmada ise Samonis ve ark.⁽¹³⁾ 2009 yılında Yunanistan’da elde edilen 78 *Citrobacter* suşundan en fazla oranda *C.freundii* (% 72) izole etmişler ve bunu *C.koseri* (% 23) ve *C.braakii*’nin (% 4) takip ettiğini saptamışlardır. Bu suşların en fazla idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan (% 52) izole edildiğini ve *Citrobacter*’lere karşı kolistin (% 100), fosfomisin (% 100), imipenem (% 97), gentamisin (% 90), nitrofurantoin (% 90), siprofloksasin (% 81) ve sefepimin (% 74) en etkili antimikrobiyaller olduklarını tespit etmişlerdir⁽¹³⁾. Mohanty ve ark.⁽¹¹⁾ 2007 yılında Hindistan’da yaptıkları çalışmalarında 205 suşun % 90’ını *C.koseri* ve % 10’unu *C.freundii* olarak tanımlayıp hastaların % 96’sının nozokomiyal enfeksiyonu olduğunu bildirmişlerdir. Sıklık sırasına göre bu suşlar idrar (% 46), solunum yolu örnekleri (% 16), kan (% 15), yara (% 12) ve steril vücut sıvılarından (% 9) elde edilmiş olup ilaç direncinin *C.freundii*’ye kıyasla *C.koseri*’de daha fazla gözlemlendiği tespit edilmiştir⁽¹¹⁾.

Citrobacter türleri ülkemizde yayınlanan

makalelerde genellikle enterik bakteriler içerisinde az sayıda yer almaktadır. Yalnızca bu türleri içeren çalışmalar sınırlı sayıda olduğundan antibiyogram verileri de oldukça sınırlıdır. Yurtiçinde bu konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalara bakıldığında Atmaca ve ark.⁽³⁾ 2017 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptıkları çalışmalarında izole ettikleri 72 *Citrobacter* suşundan 37'sini *C.freundii*, 35'ini diğer *Citrobacter* türleri olarak tanımlamışlar ve bu suşları sırasıyla en fazla idrar yolu, yara ve kan örneklerinden izole edildiğini bildirmişlerdir. *Citrobacter* suşlarını en fazla polikliniklerden izole etmişler ve *Citrobacter*'lere karşı en etkili antibiyotiklerin aminoglikozid ve karbapenem grubu antibiyotikler olduğunu belirlemişlerdir⁽³⁾. Kurtoğlu ve ark.⁽⁷⁾ 2011 yılında Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yaptıkları çalışmalarında toplam 52 *Citrobacter* suşunun % 46'sını *C.freundii*, % 21'ini *C.youngae* ve % 15'ini *C.koseri* olarak tespit etmişler ve bu suşların sırasıyla en fazla idrar, cerrahi yara ve balgam örneklerinden izole edildiğini bildirmişlerdir. *Citrobacter* saptanan örneklerin % 29'unu erişkin yoğun bakım, % 21'ini pediatri, % 11'ini genel cerrahi, % 10'unu yenidoğan yoğun bakım, % 10'unu plastik cerrahi, % 7'sini üroloji, % 6'sını yanık ünitesi ve % 6'sını nefroloji servisinde yatan hastalardan izole etmişler ve *Citrobacter*'lerin en duyarlı oldukları antimikrobiyal ajanların sırasıyla amikasin (% 100), meropenem (% 100), imipenem (% 96) ve piperasilin/tazobaktam (% 96) olduğunu saptamışlardır⁽⁷⁾. Gülhan ve ark.⁽⁵⁾ 2007 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptıkları çalışmalarında 73 *Citrobacter* suşundan 53'ünü *C.freundii*, dokuzunu *C.braakii*, sekizini *C.youngae*, üçünü *C.koseri* olarak tanımlamışlar ve bu suşların en fazla idrar ve ikinci sıklıkla yara materyallerinden izole edildiğini bildirmişlerdir. Örneklerin yarıya yakınının polikliniklerden gönderildiğini ve nefroloji kliniğinin en çok materyal gönderen klinik olduğunu tespit ederek *Citrobacter*'lere karşı en etkili antibiyotikleri meropenem ve amikasin, levofloksasin, siprofloksasin ve gentamisin olarak saptamışlardır⁽⁵⁾. Aral ve ark.⁽²⁾ 2011 yılında Kahramanmaraş'ta idrar örneklerinden izole ettikleri 624 enterik bakteri içinde dört suşun *C.freundii*

olduğunu ve bu suşların tümünün poliklinik hastalarından elde edildiğini bildirmişler ve en duyarlı antibiyotiklerin meropenem, ertapenem, amikasin ve SXT olduğunu saptamışlardır. Güneş ve ark.⁽⁶⁾ 2013 yılında Tekirdağ'da gerçekleştirdikleri çalışmalarında çocuk yaş grubu idrar kültürlerinde üretilen 127 enterik bakteri içinde yedi adet *Citrobacter* spp. bulunduğunu ve bu suşların imipenem ve amikasine en fazla duyarlı oldukları bildirilmiştir.

Yapılmış olan çalışmalarda^(2,3,5,6,7,8,13) ve bizim çalışmamızda da *Citrobacter* türlerinden en fazla *C.freundii* izole edilmesine rağmen Hindistan'da yapılan çalışmada⁽¹¹⁾ *C.koseri* ilk sırayı almıştır. Bu da *Citrobacter* türlerinin dağılımlarında coğrafi olarak farklılık olabileceğini göstermektedir. *Citrobacter* suşları çoğunlukla idrar ve solunum sistemi enfeksiyonlarından izole edilmektedir⁽¹⁾. Yapılan çalışmalarda^(2,3,5-8,11,13) *Citrobacter* suşları en fazla idrar örneklerinden tespit edilmiştir. Bu bakterilerin neden olduğu üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi önemlidir çünkü mortalitesi yüksek bir klinik tablo olan sepsise neden olabilmektedir. Bizim çalışmamızda da *Citrobacter* türleri en fazla idrar örneklerinden izole edilmiştir. Yurtdışında *Citrobacter* enfeksiyonları daha çok nozokomiyal kökenli olmalarına rağmen, ülkemizde genellikle poliklinik hasta örneklerinden izole edilmektedir^(2,3,5-8,11,13). Bizim çalışmamızda da *Citrobacter* türleri ülkemizdeki verilere uygun olarak en fazla polikliniklerde görülmüş olup kliniklerden çok az sayıda *Citrobacter* izole edilmiştir. *Citrobacter* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılıklarına bakıldığında, çalışmamızda incelenen 10 antibiyotikten en etkili olanların sırası ile amikasin, gentamisin, meropenem, SXT ve imipenem olduğu saptanmıştır. Bu bulgular en etkili antibiyotiklerin aminoglikozid ve karbapenem grubu ilaçlar olarak saptandığı ülkemizde yapılmış olan diğer çalışmalar ile paraleldir^(2,3,5-7).

Citrobacter türleri hastane enfeksiyonları yönünden potansiyel olarak riskli mikroorganizmalardır. Bu izolatların direnç fenotiplerinin düzenli olarak takip edilmesi gerekmektedir. Hizmet veren personelin eğitilmesi, kullanılacak antibiyotiklerin seçimine ve dozlarına dikkat edilmesi ve enfeksiyon kontrolünün kurallara uygun olarak yapılması

gerekmektedir. Bunun yanında direnç gelişimi her hastanede değişebileceğinden her merkezin kendi direnç fenotipini belirlemesi, etkili ve uygun tedavinin uygulanabilmesi açısından yol gösterici olacaktır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

KAYNAKLAR

1. Akalın H. Enterobacter ve diğer Gram negatif enterikler, "Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds.) İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 2.baskı" kitabında s.1583-84, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul (2002).
2. Aral M, Kireççi E, Doğan ŞS. İdrar örneklerinden izole edilen gram negatif bakteriler ve antibiyotiklere direnç oranlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2011;41(4):139-42. <https://doi.org/0.5222/TMCD.2011.139>
3. Atmaca S, Özekinci T, Yakut S, Akpolat N, Gül K. 2015-2017 yılları arasında izole edilen *Citrobacter* suşlarında antibiyotik direnci. ANKEM Derg. 2017; 31(3):79-84. <https://doi.org/10.5222/ankem.2017.079>
4. Doran TI. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: review. Clin Infect Dis. 1999;28(2):384-94. <https://doi.org/10.1086/515106>
5. Gülhan B, Özekinci T, Meşe S, Atmaca S. 2004-2006 yılları arasında izole edilen *Citrobacter* suşlarında antibiyotik direnci. ANKEM Derg. 2007;21(2):91-4.
6. Güneş H, Donma MM, Nalbantoğlu B, Aydın M, Kaya AD, Topçu B. Namık Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran çocuklarda idrar örneklerinden izole edilen etkenler ve antibiyotik direnç durumları. Cumhuriyet Tıp Derg. 2013;35(1):1-8. <https://doi.org/10.7197/1305-0028.1662>
7. Kurtoglu MG, Opus A, Ozdemir M, Baysal B. Isolation of *Citrobacters* in various infections and their antimicrobial sensitivity rates. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2011;17(Suppl A):99-104.
8. Maraki S, Vardakas KZ, Mavromanolaki VE, et al. In vitro susceptibility and resistance phenotypes in contemporary *Citrobacter* isolates in a University Hospital in Crete, Greece. Infect Dis. 2017;49(7): 532-9. <https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1297896>
9. Matyar F. Identification and determination of antibiotic multiresistance of gram-negative bacteria isolated from hospital sewage. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. 2016;4(10):845-9. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i10.845-849.759>
10. Moges F, Endris M, Belyhun Y, Worku W. Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. BMC Res Notes. 2014;7:215. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-215>
11. Mohanty S, Singhal R, Sood S, Dhawan B, Kapil A, Das BK. *Citrobacter* infections in a tertiary care hospital in Northern India. J Infect. 2007;54(1):58-64. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.015>
12. Pepperell C, Kus JV, Gardam MA, Humar A, Burrows LL. Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(11):3555-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3555-3560.2002>
13. Samonis G, Karageorgopoulos DE, Kofteridis DP. *Citrobacter* infections in a general hospital: characteristics and outcomes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(1):61-8. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0598-z>
14. Santos C, Ramalheira E, Da Silva G, Mendo S. Genetically unrelated multidrug- and carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* detected in outpatients admitted to a Portuguese hospital. J Glob Antimicrob Resist. 2017;8(1):18-22. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.09.010>