

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



***Klebsiella pneumoniae* e a ameaça da  
resistência aos antibióticos**

**Joana Margarida Costa Ferreira**

Monografia Professora Doutora Madalena Maria Vilela Pimentel,  
Categoria Professora Associada com Agregação

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2022**



**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



***Klebsiella pneumoniae* e a ameaça da  
resistência aos antibióticos**

**Joana Margarida Costa Ferreira**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia Professora Doutora Madalena Maria Vilela Pimentel,  
Categoria Professora Associada com Agregação

**2022**

## Resumo

A *Klebsiella pneumoniae*, descrita pela primeira vez em 1882, por Carl Friedlander é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que se encontra facilmente dispersa pelo meio ambiente. Esta é uma bactéria oportunista, capaz de causar infecções no Homem ao nível do trato respiratório, trato urinário e também infecções primárias da corrente sanguínea, podendo provocar meningite e pneumonia. Para a sua patogenicidade contribuem cinco fatores de virulência com mecanismos conhecidos, a cápsula, o lipolissacarídeo, as *fimbriaes* do tipo 1 e 3, os sideróforos e a capacidade de produzir biofilme, que permitem a entrada e fixação no organismo.

Uma estirpe mais virulenta, designada por essa razão de *Klebsiella pneumoniae* Hipervirulenta (hvKp) surgiu na década de 1980 como um agente patogénico global capaz de causar infecções adquiridas na comunidade, nomeadamente abscessos hepáticos, muitas vezes em indivíduos saudáveis. A sua hipervirulência está associada aos sistemas de aquisição de ferro, aumento da produção de cápsulas, tipos de cápsulas K1 e K2, e à produção da toxina *colibactin*.

A *Klebsiella pneumoniae* tem-se revelado uma ameaça global para a saúde pública, devido a um aumento de isolados multiresistentes aos antibióticos, destacando-se a resistência aos Beta Lactâmicos e o aparecimento de resistência à Colistina, colocando em causa a utilização da última linha de terapêutica contra a bactéria. Por estas razões tem sido considerada, pela Organização Mundial de Saúde, um problema prioritário.

A descoberta de novas alternativas terapêuticas é urgente sendo o novo foco de investigação a atividade contra a virulência. A União Europeia e o Espaço Económico Europeu têm como uma das prioridades a monitorização e controlo da resistência para que se consiga travar o aumento da mesma.

**Palavras Chaves:** *Klebsiella pneumoniae*; Resistência Antimicrobiana; Antibióticos; Virulência.

# Abstract

*Klebsiella pneumoniae* is a gram-negative bacterium belonging to the family Enterobacteriaceae, first described by Carl Friedlander in 1882, which is easily dispersed in the environment. It is an opportunistic bacterium, capable of invading the human body and causing infection in the respiratory tract, urinary tract, and primary bloodstream infections, and can ultimately cause meningitis and pneumonia. This bacterium has thus become a global threat to public health. It currently has five virulence factors with known mechanisms, the Capsule, Lipopolysaccharide, Type 1 and 3 *Fimbriae*, Siderophores and Biofilm, which allow entry and fixation in the organism.

Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, emerged as a global pathogen in the 1980s as a more virulent strain of *Klebsiella pneumoniae* capable of causing community-acquired infections, including liver abscesses, often in healthy individuals. Causes of its virulence are iron acquisition systems, increased capsule production, K1 and K2 capsule types, and the toxin colibactin.

The emergence of Antimicrobial Resistance is a normal evolutionary process that occurs by selective pressure exerted by widespread use and misuse of antimicrobials. *Klebsiella pneumoniae* acquires resistance to multiple antibacterial drugs and has been considered a priority problem by the World Health Organization. In recent years, there has been a growing increase in isolates resistant to Beta Lactams, and the emergence of resistance to colistin has called into question the use of the last line of therapy against the bacterium.

The discovery of new therapeutic alternatives is urgent and the new focus of research is the activity against virulence. The European Union and the European Economic Area have as one of their priorities the monitoring and control of resistance in order to stop its increase.

**Key Words:** *Klebsiella pneumoniae*; Antimicrobial Resistance; Antibiotics; Virulence.

# Abreviaturas

CPS - Polissacarídeos capsulares

ECDC - European Center for Disease Prevention and Control

EFSA - European Food Safety Authority

ERIC-PCR - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction

ESBL- Beta-lactamases de Espectro Alargado

hvKp - *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

IL - Interleucina

MAR - Multiple Antibiotic Resistance Index

MDD - Método de Difusão em Disco

KPC - Carbapenemase produzida por *Klebsiella pneumoniae*

PMNs - Polimorfonucleares

LPS - Lipolissacarídeo

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

OMPs - Proteínas da Membrana Externa

OMS - Organização Mundial de Saúde

PMNs - Leucócitos Polimorfonucleares

RAM - Resistência antimicrobiana

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

TSI - Tríplice Açúcar Ferro

UE/EEE - União Europeia/Espaço Económico Europeu

WHO – *World Health Organization*

## Índice

<b>1. Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>2. Métodos</b>	<b>11</b>
<b>3. <i>Klebsiella</i> spp.</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Transmissão de <i>Klebsiella</i> spp. em humanos</b>	<b>14</b>
<b>4. <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>15</b>
<b>4.1 Espécie</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Características bioquímicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>16</b>
<b>4.3 Serótipos</b>	<b>17</b>
<b>4.4 Patogenicidade de <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>17</b>
<b>4.4.1 Cápsula</b>	<b>19</b>
<b>4.4.2 Lipopolissacarídeo</b>	<b>21</b>
<b>4.4.3 <i>Fimbriae</i> do Tipo 1 e 3</b>	<b>22</b>
<b>4.4.4 Sideróforos</b>	<b>24</b>
<b>4.4.5 Biofilmes</b>	<b>25</b>
<b>5. <i>Klebsiella</i> Hipervirulenta</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Epidemiologia</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Apresentação clínica e fatores de risco</b>	<b>30</b>
<b>6. Resistência Antimicrobiana</b>	<b>32</b>
<b>6.1 Beta-lactâmicos</b>	<b>34</b>
<b>6.1.1 Beta-Lactamases</b>	<b>37</b>
<b>6.1.1.1 <math>\beta</math>-lactamases de espectro alargado (ESBL)</b>	<b>38</b>
<b>6.1.1.2 Cefalosporinase</b>	<b>39</b>
<b>6.1.1.3 Carbapenamases</b>	<b>39</b>
<b>6.2 Colistina</b>	<b>40</b>
<b>7. Opções Terapêuticas Atuais Contra a Multirresistência</b>	<b>41</b>
<b>8. Perspetivas Futuras</b>	<b>43</b>
<b>8.1 Novos Fármacos</b>	<b>43</b>
<b>8.2 Estratégias da OMS e UE/EEE</b>	<b>44</b>
<b>Conclusão</b>	<b>46</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>47</b>

## Índice de Figuras

Figura 1- Cultura de <i>K. pneumoniae</i> ao microscópio ótico (20).....	16
Figura 2 Cultura de <i>K. pneumoniae</i> em Macconkey Agar (21). .....	17
Figura 3 - Representação esquemática dos fatores de virulência de <i>K. pneumoniae</i> (6).....	18
Figura 4 - Papel da cápsula na virulência de <i>K. pneumoniae</i> (28). .....	21
Figura 5 - Papel do LPS na virulência de <i>K. pneumoniae</i> (28).....	22
Figura 6 - Funções das Fímbrias do Tipo 1 durante a infecção por <i>K. pneumoniae</i> e formação de biofilme (28).....	23
Figura 7 - Funções das Fímbrias do Tipo 3 durante a infecção por <i>K. pneumoniae</i> e formação de biofilme (28).....	24
Figura 8 - Imagem representativa do biofilme de <i>K. pneumoniae</i> em microscopia eletrónica de varrimento (36).....	26
Figura 9 -Representação esquemática dos fatores associados à hipervirulência de hvKp (41). .....	29
Figura 10 - Características epidemiológicas de hvKP. A disseminação endémica de hvKP significa que vários surtos de hvKP foram relatados numa região indicada. A disseminação esporádica de hvKP significa que apenas estudos de caso (sem surto) foram relatados em uma região indicada (40).....	30
Figura 11 - Percentagem média ponderada pela população de isolados resistentes entre os isolados invasivos bacterianos, em 29 países da UE/EEE, entre 2014 e 2020. (64).....	33
Figura 12 - Percentagem de isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes às cefalosporinas de 3º geração na Europa em 2020 (66).....	35
Figura 13 - Percentagem de isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes às cefalosporinas de 3º geração na Europa (2005-2020) (66).....	35
Figura 14 - Percentagem de isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes às cefalosporinas de 3º geração por faixa etária em Portugal (2020) (66).....	35
Figura 15 - Evolução anual, de 2005 a 2020, de isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes aos carbapenemos em Portugal (66).....	36
Figura 16 - Percentagem de isolados de <i>K.pneumoniae</i> resistentes a Carbapenemos na Europa (66). .....	36
Figura 17 - Percentagem de isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes aos carbapenemos por faixa etária em Portugal (2020) (66). .....	37

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resumo dos fatores de virulência envolvidos na patogenicidade da <i>K. pneumoniae</i> (27).....	18
Tabela 2 - Características demográficas e clínicas que ajudam a diferenciar a infecção devido a estirpes hipervirulentas e clássicas de <i>K. pneumoniae</i> (59). .....	31
Tabela 3 - Principais grupos de $\beta$ -lactamases em bactérias Gram-negativas que ameaçam o papel dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos (67).....	38

<b>Tabela 4 - Suscetibilidade e resistência de <i>K. pneumoniae</i> ESBL negativa (-), <i>K. pneumoniae</i> ESBL positiva (+) e <i>K. pneumoniae</i> KPC a antibióticos (74). .....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 5 - Classificação prioritária para a descoberta de novos antibióticos segundo a ECDC, PHAC e WHO (63).....</b>	<b>43</b>

# 1. Objetivos

Esta monografia tem como objetivo geral avaliar o ponto de situação da resistência da *Klebsiella pneumoniae* aos antibióticos disponíveis para o tratamento da sua infeção no organismo do ser humano.

Os objetivos específicos são os seguintes:

- Caracterizar a bactéria e identificar quais os mecanismos de virulência;
- Identificar os antibióticos aos quais a bactéria é resistente e descrever os mecanismos de resistência.

## 2. Métodos

Na redação da presente monografia, foram usados vários motores de busca para a pesquisa bibliográfica, entre os quais, o PubMed e o Google Acadêmico. As palavras chaves utilizadas para que a pesquisa de artigos científicos fosse facilitada foram as seguintes: *Klebsiella pneumoniae*, resistência antimicrobiana,  $\beta$ -lactâmicos, antibióticos, cefalosporinas, carbapenemos e colistina.

Para além dos motores de busca acima mencionados, também se retirou informação de alguns websites de entidades como: *Future Medicine*, *World Health Organization* e *European Centre for Disease Prevention and Control*.



### 3. *Klebsiella* spp.

A *Klebsiella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae* (1). Esta família é constituída por 53 géneros e cerca de 170 espécies. As enterobactérias estão associadas a uma vasta gama de síndromes clínicas, intoxicações alimentares e infeções zoonóticas, que incluem surtos esporádicos a pandemias (1,2). Alguns géneros e espécies como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*) e *Enterobacter* spp. são reconhecidas como importantes agentes etiológicos de infeções hospitalares, responsáveis por cerca de 70% das infeções do trato urinário e 50% dos casos de septicémia . Um estudo realizado em hospitais americanos no período de 2009 a 2010 pela *National Healthcare Safety Network* (NHSN), do *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) mostrou que cinco géneros de *Enterobacteriaceae* estavam entre os 10 microrganismos mais frequentemente isolados em infeções hospitalares. A *Escherichia coli* foi o terceiro mais isolado (11,5%), *Klebsiella* spp. foi o sexto (8%), *Enterobacter* spp. encontrava-se em oitavo lugar (4,7%), seguido de *Proteus* spp. (2,5%) (3). As *Enterobacteriaceae*, apresentam as seguintes características fisiológicas e bioquímicas: são bacilos de Gram negativo, aeróbios-anaeróbicos facultativos, crescem em meios de cultura simples, fermentam a glucose, são oxidase negativas e reduzem os nitratos a nitritos (4).

A classificação das espécies de *Klebsiella* spp. é seguida, na maioria dos países europeus e americanos, pela classificação de Ørskov que identifica 5 espécies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica*. As espécies de *Klebsiella* spp., caracterizadas por serem não móveis, capazes de produzir cápsula, são encontradas de forma ubíqua na natureza, inclusivé em plantas, animais e humanos. Elas são causadoras de vários tipos de infeções em humanos, incluindo infeções do trato respiratório, infeções do trato urinário e infeções primárias da corrente sanguínea (1,4,5,6,7).

A grande maioria das infeções por *Klebsiella* spp. estão associadas à hospitalização. Como agentes patogénicos oportunistas, as *Klebsiella* spp. atacam principalmente indivíduos imunocomprometidos que estão hospitalizados e sofrem de doenças graves subjacentes, tais como diabetes mellitus ou obstrução pulmonar crónica, pacientes cujos cuidados requerem dispositivos como ventiladores ou cateteres intravenosos e pacientes que tomam antibióticos em regimes de tempo alargado. Pessoas

saudáveis geralmente não contraem infecções por *Klebsiella*. As infecções por *Klebsiella spp.* nosocomial, infecções que pode ocorrer aquando o doente é internado no hospital, são causadas principalmente por *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*), a espécie medicamente mais importante do género, sendo responsável por 8% de todas as infecções bacterianas nosocomiais na Europa e Estados Unidos. Em menor grau, a *K. oxytoca* tem sido detetada em isolados clínicos humanos (9).

### **3.1 Transmissão de *Klebsiella spp.* em humanos**

Para desenvolver uma infecção por *Klebsiella spp.*, uma pessoa tem de ser exposta à bactéria. Por exemplo, *Klebsiella spp.* deve entrar no trato respiratório para causar pneumonia, ou no sangue para causar uma septicémia (3).

Em meio hospitalar, a bactéria *Klebsiella spp.* pode ser transmitida através do contato de pessoa para pessoa, por exemplo, de paciente para paciente através das mãos contaminadas de profissionais de saúde ou outras pessoas, ou, menos comumente, por contaminação do meio ambiental, não se propagando pelo ar (3).

Uma das vias de introdução da bactéria no organismo acontece em pacientes em estabelecimentos de saúde, quando necessitam de ventiladores, cateteres intravenosos ou contêm feridas, uma vez que estas bactérias podem acumular-se nas tubagens destes equipamentos médicos (3).

## 4. *Klebsiella pneumoniae*

### 4.1 Espécie

A *K. pneumoniae* é uma bactéria comensal, que se encontra amplamente distribuída no meio ambiente e na microbiota normal do trato intestinal de humanos e animais (1,2). Esta quando cultivada em meios de cultura sólidos, apresenta colônias mucosas características, devido à produção de uma cápsula polisacarídica que tem função de proteger a bactéria contra a fagocitose e bactericidas (1,4).

É um patógeno oportunista capaz de causar uma vasta gama de infecções adquiridas na comunidade (11,12), tais como infecções respiratórias, como a pneumonia, infecções do trato urinário e septicemia, tendo sido descrita pela primeira vez por *Carl Friedlander* em 1882, onde foi isolada dos pulmões de pacientes que morreram de pneumonia (5,11).

A *K. pneumoniae* tornou-se uma das principais causas mundiais de infecções nosocomiais, nomeadamente infecções respiratórias, com uma taxa de mortalidade crescente, particularmente em indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos. Esta está cada vez mais implicada em infecções comunitárias severas tais como pneumonia e meningite (7). *K. pneumoniae* é um organismo identificado como uma ameaça urgente à saúde humana pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) e o *Public Health England* (PHE), devido ao seu fácil contágio entre seres humanos, à sua virulência, aumento da resistência aos antibióticos e à sua ampla distribuição geográfica (7,13). Esta também faz parte do acrónimo ESKAPE que compreende os nomes científicos de seis patógenos bacterianos altamente virulentos e resistentes a antibióticos, incluindo: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp* (14).

Dentro de uma espécie bacteriana, existe um conjunto de genes que é conservado entre todos os membros. Este conjunto de genes é considerado o genoma central. Em *K. pneumoniae* o genoma central, definido como presente em mais de 95% dos isolados, estima-se atualmente ser composto por aproximadamente 2.000 genes (5, 15).

Genes que variam entre os isolados são referidos como o genoma acessório, este inclui ilhas de patogenicidade, plasmídeos e bacteriófagos. Uma vez que os genes de *K.*

*pneumoniae* são tipicamente entre 5.000 e 6.000, isso significa que a maior parte do genoma é composto por genes acessórios. Os genes que constituem o genoma acessório podem codificar para proteínas que participam em processos específicos, como por exemplo a fixação de nitrogênio ou codificar fatores de virulência específicos. O genoma acessório também contém genes que codificam várias enzimas que participam nos mecanismos de resistência a antibióticos (5,16). Os genes acessórios podem ser adquiridos por transferência horizontal de genes entre espécies bacterianas, como evidenciado pela presença de ilhas de patogenicidade e plasmídeos, em muitos isolados. Os genes codificados em ilhas de patogenicidade podem ajudar os isolados a adaptarem-se a locais específicos de infecção ou colonização (3,17).

#### **4.2 Características bioquímicas de *Klebsiella pneumoniae***

A *K. pneumoniae* é facilmente isolada das superfícies de mucosas humanas, mãos contaminadas com fezes, água contaminada e superfícies hospitalares (Fig.1) (18,19).

As provas bioquímicas que permitem a sua identificação são as seguintes: lisina positiva, citrato e indol negativos, tríplex açúcar ferro (TSI) positivo com produção de gás, ornitina descarboxilase negativa, metabolização da lactose, hidrólise da ureia e utilização do citrato como fonte de carbono (4).

Na cultura de ágar *MacConkey* as colônias de *K. pneumoniae*, crescem bem, apresentando-se em grande número e com de cor rósea brilhante, devido a ser lactase positiva (Fig.2) (4).



**Figura 1-** Cultura de *K. pneumoniae* ao microscópio óptico (20).



**Figura 2** Cultura de *K. pneumoniae* em Macconkey Agar (21).

### 4.3 Serótipos

Os isolados de *K. pneumoniae* apresentam uma grande variedade antigénica, sendo classificados em serótipos. A serotipagem, é baseada no reconhecimento de variações distintas dos seus polissacarídeos existentes à superfície da bactéria, nomeadamente antigénios-O e antigénios-K, por anticorpos específicos. Em *K. pneumonniae*, existe uma grande variedade de antigénios O e K, devido à grande variação na constituição do lipopolissacarídeo (LPS), os antigénios-O são a parte mais externa do LPS, enquanto que os antigénios-K são o polissacarídeo da cápsula bacteriana (CPS). O número de serótipos em *K.pneumoniae* tem sido estimado em oito para os antigénios-O, O1, O2, O3, O4, O5, O12, OL101 e OL104, e setenta e oito para os antigénios-k. Os serótipos O1, O2 e O3 são os mais predominantes, representando aproximadamente 80% de todas as infeções, enquanto que os serótipos K mais comuns são K1, K2, K5, K16, K23, K27, K28, K54, K62 e K64 (22).

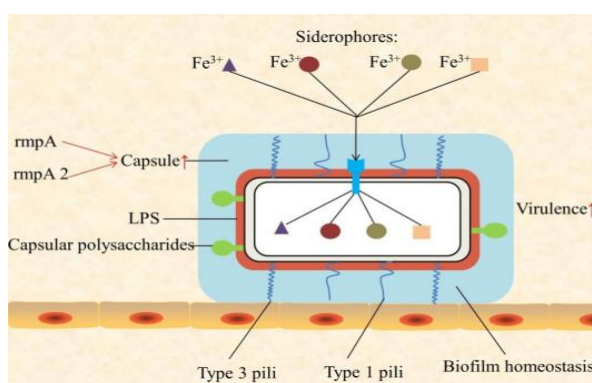
Alguns serótipos, os K1 e K2, apresentam um fenótipo hiper mucoviscoso, em placas de agar, devido ao aumento da produção de polissacarídeo capsular (CPS), que é reconhecido como um dos fatores de virulência mais importantes de *K. pneumoniae* (23, 24, 25).

### 4.4 Patogenicidade de *K. pneumoniae*

Para causar infeção no Homem, a *K. pneumoniae* tem que, em primeiro lugar, ultrapassar as barreiras mecânicas e químicas do hospedeiro, e escapar ao reconhecimento pela imunidade humoral e imunidade celular (10,26). A capacidade de causar graves infeções está associada à sua capacidade de mutação, aquisição de plasmídeos e

transposões, que transportam genes de virulência e de resistência aos antibióticos. A combinação de vários genes que codificam para fatores de virulência conduziu ao aparecimento de estirpes de *K. pneumoniae* hipervirulentas (10).

Os fatores de virulência mais relevantes, associados à patogênese de *K. pneumoniae* incluem a cápsula, o LPS, as *fimbriaes* de tipo 1 e 3, os sideróforos e a capacidade de formar biofilme (figura 3). Vários outros fatores foram recentemente identificados desempenhando papéis na virulência, no entanto, não estão ainda caracterizados. São exemplos: proteínas da membrana externa como as porinas, bombas de efluxo, sistemas de transporte de ferro e produtos de genes envolvidos no metabolismo da alantoína (11,6).



**Figura 3 - Representação esquemática dos fatores de virulência de *K. pneumoniae* (6).**

**Tabela 1 - Resumo dos fatores de virulência envolvidos na patogênese da *K. pneumoniae* (27).**

<u>Fator de Virulência</u>	<u>Papel na patogênese</u>
Cápsula	Inibir e evitar a fagocitose pelas células hospedeiras; induzir a maturação das células dendríticas
LPS	Antigênio-O fornecer resistência sérica
Sideróforo	Capturar o ferro essencial para a sobrevivência, os fenótipos hiper mucoviscosos têm sido ligados ao aumento da atividade de ligação ao ferro
Fímbria do tipo 1	Envolvida na formação de biofilmes

Fímbria do tipo 3	Importante para a formação de biofilme sobre superfícies bióticas e abióticas
Biofilme	A formação promove a resistência ao sistema imunitário do hospedeiro e aos antimicrobianos

#### 4.4.1 Cápsula

A cápsula da *K. pneumoniae* é constituída por uma matriz de polissacarídeos, que ancora na superfície da célula (Fig.4). É um dos fatores de virulência mais relevantes, sendo também o mais estudado. As estirpes desta bactéria produzem cápsula, a qual é constituída por antígenos K, que são codificados por genes localizados num operão genómico (6).

Foram identificadas várias causas de virulência associada à cápsula de *K. pneumoniae*. A cápsula mascara a superfície celular bacteriana, evitando assim a fagocitose e a opsonofagocitose pelas células imunitárias. A presença desta estrutura permite evitar a ativação fulminante da resposta imunitária, mediada pela diminuição das espécies reativas de oxigénio (ROS), IL-8, IL-6, E TNF- $\alpha$ , protegendo o LPS do reconhecimento por recetores celulares (28). Da mesma forma dificulta a ação bactericida dos agentes antimicrobianos. Por outro lado, evita que os componentes complementares, como o C3, interajam com a membrana externa, impedindo assim a lise completa e a opsonização (6,28).

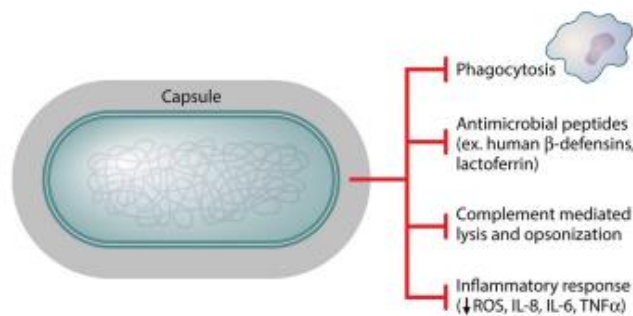
A capacidade das cápsulas específicas de *K. pneumoniae* para inibir ou dificultar a fagocitose por células hospedeiras foi relatada há mais de 20 anos. A produção de cápsulas em *K. pneumoniae* é dependente da via do Grupo I ou Wzx/Wzy. A produção é iniciada por uma glicosiltransferase (GT), que liga a primeira porção de glicose (WcaJ) ou galactose (WbaP) a um transportador lipídico, undecaprenil fosfato (Und-P). Outros oligossacarídeos, como fucose e ácido urónico, são adicionados na extremidade não redutora do glicosil-Und-P. Esses resíduos ligados a lipídios são lançados por Wzx através da membrana interna, do citoplasma para o espaço periplasmático e polimerizados em virtude da polimerase Wzy. Após a regulação do comprimento da cadeia oligossacarídica por Wzc, a cápsula é transferida para o exterior da célula por Wza, um exportador de membrana externa. Finalmente, a cápsula é ancorada à superfície da célula,

provavelmente por Wzi. A diversidade de GT, que varia entre as estirpes, resulta em diferentes combinações de oligossacarídeos e modificações de resíduos. Essas diferentes combinações de resíduos resultam na classificação das cápsulas em diferentes serótipos. Pelo menos 77 serótipos de cápsula são definidos sorologicamente, e mais de 130 são identificados por comparação de genomas de *K. pneumoniae*. Posteriormente, foi demonstrado que as cápsulas possuidoras do dissacarídeo *Man- $\alpha$ -2-Man* exibiam uma maior ligação e suscetibilidade às células fagocitárias, um fenômeno denominado lectinofagocitose. O serótipo K2 não possui o *Man- $\alpha$ -2-Man* e está mais frequentemente associado a infecções humanas, indicando que, em parte, a resistência à fagocitose por alguns serótipos pode ser uma função de ligação diminuída a estas células hospedeiras (29,30).

Não só a cápsula pode influenciar a suscetibilidade à fagocitose por ligação direta a estas células, mas também foi demonstrado que a composição da cápsula influencia a opsonofagocitose. Serótipos ou estirpes geneticamente modificadas que produzem cápsulas que possuem o *Man- $\alpha$ -2-Man* exibiram uma capacidade reduzida de estimular os leucócitos polimorfonucleares (PMNs). Este dissacarídeo não é reconhecido por muitos componentes do sistema imunitário inato, tais como as proteínas do surfactante pulmonar, a ativação de complementos alternativos constituintes, para além do recetor manose e de células fagocitárias (30,31). Isto levou à sugestão de que serótipos virulentos como o K1 produzem uma cápsula de superfície composta por glicopítopos não reconhecidos por estes fatores. Em geral, as estirpes mais virulentas de *K. pneumoniae* produzem uma cápsula composta de sacarídeos que não facilitam a ligação às células fagocitárias e, portanto, são mais resistentes à fagocitose. Além disso, estas cápsulas também se apresentam como opsoninas pobres e evitam a fagocitose por ativação complementar (28, 30). Portanto, mecanismos pelo qual a cápsula pode inibir eficazmente a interação das bactérias com estas células irão facilitar a sobrevivência (30).

Para além do papel das cápsulas na interação entre *K. pneumoniae* e macrófagos ou PMNs, provas recentes indicam que as cápsulas afetam a interação com células dendríticas (30,32). Os resultados de estudos indicam que o material capsular *K. pneumoniae* induz uma resposta imunológica defeituosa (30).

Utilizando estudos de infecção competitiva e variantes não capsuladas para além das estirpes parentais, foi possível demonstrar que as estirpes capsuladas superam as variantes *in vivo* (30).



**Figura 4 - Papel da cápsula na virulência de *K. pneumoniae* (28).**

#### 4.4.2 Lipopolissacarídeo

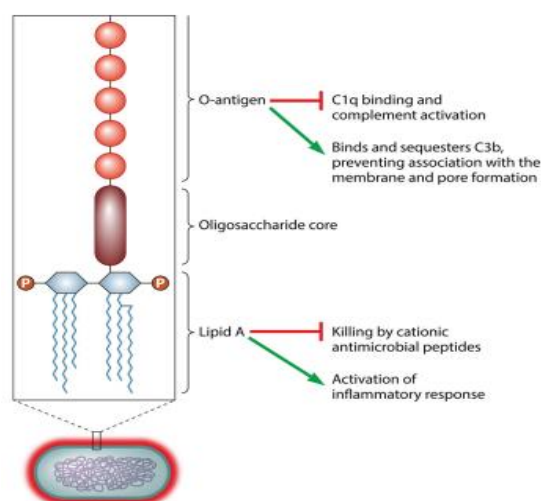
LPS, também conhecido como endotoxina, é um componente importante e necessário do folheto externo da membrana externa de todas as bactérias Gram-negativas (Fig. 5). Embora exista uma variação considerável nas estruturas do LPS entre as espécies bacterianas, é tipicamente composto por um antígeno-O, um oligossacarídeo *core* e um lípido A (23). O LPS é o principal meio de proteção contra o sistema complemento (6,30).

O lípido A insere-se na membrana bacteriana e é um ativador potente da inflamação. A porção lipídica da bactéria, lípido A, é bem conhecida por ser um potente ligante de TLR. A estimulação do TLR4 leva à produção de citocinas e quimiocinas que ajudam a recrutar e ativar respostas celulares, incluindo neutrófilos e macrófagos, que eliminam as *K. pneumoniae* e controlam a sua propagação a outros tecidos (30). Isto foi demonstrado em modelos de rato de infecção bacteriana por *K. pneumoniae*, onde ratos sem TLR4 ou MyD88, uma proteína sinalizadora, são mais suscetíveis à pneumonia e propagação sistêmica de *K. pneumoniae* (30,33,34). Nestes ratos mais suscetíveis, a produção de citocinas e quimiocinas e o recrutamento de neutrófilos estão diminuídos. Certas estirpes de *K. pneumoniae* podem usar a cápsula para proteger parcialmente o LPS da detecção por TLR. Um fenómeno semelhante ocorre nas estirpes hipervirulentas de *K. pneumoniae*, onde a cápsula amortece a sinalização TLR4 (27,34).

O antígeno O é a subunidade mais exterior do LPS. Desempenha um papel importante na proteção contra o complemento, incluindo a prevenção da ligação C1q às bactérias, que inibe a ativação subsequente da via do complemento, bem como a ligação de C3b e, portanto, inibe a lise bacteriana (27). A sua ausência torna a bactéria mais suscetível à ligação de C1q à superfície celular, resultando na ativação da via clássica

(27). As estirpes que contêm um LPS de comprimento total (constituído por antígeno-O, oligossacarídeo do *core* e o lipídio A), ou "LPS suave", são resistentes ao ataque do complemento, enquanto que as estirpes com cadeias O truncadas ou ausentes (constituído por lipídio A e oligossacarídeos do *core* progressivamente mais curtos), ou "LPS rugoso", são suscetíveis ao ataque mediado pelo complemento, mesmo na presença de cápsula (26,35).

Resumindo, o LPS em *K. pneumoniae* pode ser modificado em parte, e isto leva a que *K. pneumoniae* não seja reconhecido pela célula hospedeira, enquanto outras estirpes podem usar a cápsula para camuflar o LPS para evitar a detecção do TLR4 (7,28). A resposta inflamatória é inibida, e a eliminação de bactérias é reduzida por estas modificações (26,35).



**Figura 5 - Papel do LPS na virulência de *K. pneumoniae* (28).**

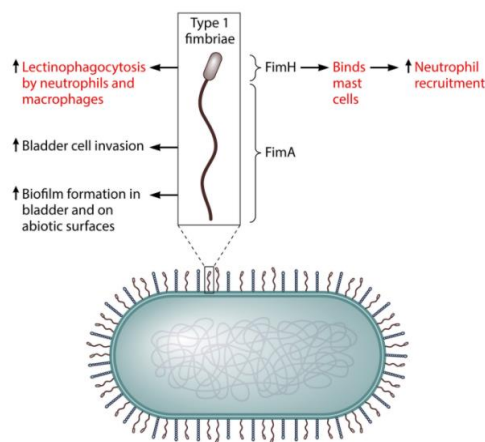
#### 4.4.3 *Fimbriae* do Tipo 1 e 3

As *Fimbriae* representam outra classe de fatores de virulência de *K. pneumoniae* que se encontram ancoradas na membrana externa sendo mediadores importantes da adesão da bactéria às células do hospedeiro. As *Fimbriae* tipos 1 e 3 são as principais estruturas adesivas que têm sido caracterizadas como fatores de patogenicidade. As *Fimbriae* do tipo 1 (Fig.6) apresentam-se em forma de apêndices finos e as do tipo 3 apresentam-se em forma de dupla hélice (Fig.7). Estas estruturas conferem ligação de *K. pneumoniae* ao carcinoma humano e às linhas de células intestinais, sugerindo um

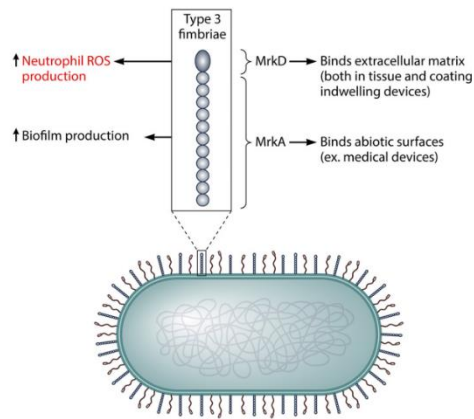
envolvimento destes genes na colonização do trato gastrointestinal, tornando o indivíduo ainda mais debilitado (27).

As *Fimbriae* do tipo 1 são expressas em 90% dos isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae*, assim como quase todos os membros das Enterobacteriaceae (27,36). Estas são estruturas compostas principalmente por subunidades FimA, com a subunidade FimH na ponta. Estas têm um papel na invasão das células da bexiga, bem como na formação de biofilme na bexiga e em superfícies abióticas (27).

As *Fimbriae* tipo 3 são compostas principalmente por subunidades MrkA, com a subunidade MrkD na ponta. Estas são necessárias para a produção do biofilme e ligação a dispositivos médicos. Verificou-se que o MrkD liga-se especificamente à matriz extracelular, como a que fica exposta em tecidos danificados e a que reveste dispositivos internos, enquanto o MrkA liga-se a superfícies abióticas, como dispositivos médicos, antes da inserção em pacientes e após a inserção (27).



**Figura 6 - Funções das Fímbricas do Tipo 1 durante a infecção por *K. pneumoniae* e formação de biofilme (28).**



**Figura 7 - Funções das Fímbrias do Tipo 3 durante a infecção por *K. pneumoniae* e formação de biofilme (28).**

#### 4.4.4 Sideróforos

O ferro metálico é um elemento crítico necessário para processos metabólicos essenciais a bactérias e aos seres humanos, e a disponibilidade limitada de ferro no fluido extracelular dificulta a aquisição de ferro bacteriano, tornando-o uma forma de defesa imunológica não específica. Se as bactérias pretendem sobreviver e crescer, elas precisam empregar táticas para superar essa dificuldade de aquisição de ferro. Em hospedeiros humanos, a ingestão de ferro geralmente necessita de um sistema de aquisição de ferro dependente de sideróforo como resultado da insolubilidade do ferro livre  $Fe^{3+}$  durante condições fisiológicas. Da mesma forma, a maioria das bactérias, incluindo *K. pneumoniae*, possuem esse sistema com maior afinidade pelo ferro do que o hospedeiro, que serve como estratégia predominante de aquisição de ferro para sobreviver à competição com os hospedeiros (37).

Os sideróforos são pequenas moléculas de ligação de ferro que são sintetizadas dentro das bactérias e secretadas fora das células, estes ligam-se ao ferro ambiental e transportam-no de volta para as células. Subsequentemente, os complexos ferro sideróforo são reconhecidos pelos receptores específicos da membrana externa que transportam o material correspondente para o periplasma, onde os sideróforos combinam-se com as proteínas do periplasma para transportá-los para a membrana interna. Por fim, o ferro passa pela passagem mediada por um transportador ABC para o citoplasma bacteriano, onde o ferro férrico é reduzido em ferro ferroso acessível às bactérias (38).

O sideróforo primário expresso por *K. pneumoniae* é o *enterobactin*, que é expresso na maioria das estirpes patogênicas, sendo produzido por mais de 90% dos isolados enterobacterianos. É de salientar que outros sideróforos como *salmoachelin*, *yersiniabactin*, *colibactin* e *aerobactin* também podem ser expressos em *K. pneumoniae* (27).

Os genes que codificam *aerobactin* e *salmoachelin* estão localizados num grande plasmídeo de virulência, pLVPK, que não está presente na maioria das estirpes de *K. pneumoniae*. O locus *yersiniabactin*, localizado dentro da ilha de patogenicidade das espécies de *Yersinia*, foi adquirido por via transferência horizontal de genes (31).

#### **4.4.5 Biofilmes**

Os biofilmes são comunidades biológicas com um elevado grau de organização, onde as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais (Fig.8). Estas comunidades biológicas encontram-se em matrizes poliméricas produzidas por elas próprias. Os biofilmes podem desenvolver-se em qualquer superfície húmida, seja ela biótica ou abiótica. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (39).

A *K. pneumoniae* pode formar biofilmes, acumulando-se nas células da matriz de substâncias extracelulares poliméricas. Substâncias extracelulares poliméricas são estruturas complexas contendo polissacarídeos, proteínas e DNA. O biofilme de *K. pneumoniae* é formado, na sua maioria, no cateter e na superfície interna dos dispositivos médicos (7).

A formação de biofilmes desempenha um papel fundamental em muitas infeções bacterianas e contribui para a capacidade das bactérias superarem os mecanismos de defesa do hospedeiro. As infeções por *k. pneumoniae* são frequentemente associadas ao desenvolvimento de biofilmes e os fatores que contribuem para este processo podem desempenhar um papel importante na patogénese. O desenvolvimento de biofilmes de *K. pneumoniae* na superfície de objetos duros sofre a adesão de células, a formação de pequenas colónias, a maturação e a propagação como células de vida livre. As estruturas de superfície mais importantes de *K. pneumoniae* envolvidas no processo de formação são o pili tipo 3 e CPS (28).

O biofilme de *K. pneumoniae* pode levar à colonização nas vias respiratória, trato gastrointestinal e urinário, bem como ao desenvolvimento de infecções invasivas, especialmente em pacientes imunodeprimidos (6,28).



**Figura 8 - Imagem representativa do biofilme de *K. pneumoniae* em microscopia eletrônica de varrimento (36).**

## 5. *Klebsiella* Hipervirulenta

A *K. pneumoniae* Hipervirulenta (hvKp) é uma estirpe de *K. pneumoniae* mais virulenta que se disseminou globalmente, causando infecções adquiridas na comunidade, muitas vezes em indivíduos saudáveis, e contribuindo para o aumento das infecções adquiridas no hospital (18, 40).

O trato gastrointestinal é portador de hvKp, constituindo um importante reservatório da bactéria, o que contribui para a sua propagação na comunidade e nos locais de serviços de saúde. Reconhecida pela primeira vez na Ásia, surgiu como causa de abscessos hepáticos piogênicos. Nas décadas seguintes, hvKp propagou-se a nível mundial causando uma variedade de infecções. Para além dos abscessos hepáticos, a hvKp distingue-se de *K. pneumoniae* clássica, por ser invasiva, tendo capaz de se propagar para diferentes locais, incluindo o olho, pulmão e sistema nervoso central. hvKp tem também sido implicada em infecções extra-hepáticas primárias, incluindo bacteremia, pneumonia e infecções de tecidos moles (11, 41).

Os determinantes genéticos da hipervirulência são frequentemente encontrados em grandes plasmídeos de virulência, bem como em elementos genéticos móveis cromossômicos, os quais podem ser utilizados como biomarcadores para distinguir a hvKp dos isolados clínicos da *K. pneumoniae* clássica. Estes incluem genes biossintéticos do sideróforo *colibactin*, um gene que codifica para um transportador metabólico (PEG344) e reguladores que aumentam a produção de cápsulas (*rmp*) A e A2 (42).

O ferro é um metal essencial para o crescimento bacteriano e desempenha um papel crucial na progressão da infecção, incluindo a causada por hvKp. Em hvKP a atividade siderófora está aumentada 6 a 10 vezes em comparação com *K. pneumoniae* clássica devido ao aumento da produção do sideróforo *aerobactin* (Fig.9) (40, 42).

O PEG344 é um transportador metabólico, que embora não se sabendo exactamente qual o seu papel na virulência, o seu gene está presente no plasmídeo de virulência da estirpe hvKP1, sendo amplamente prevalente entre as estirpes de hvKP. Num estudo realizado por *Jeffrey Bulger*, a estirpe hipervirulenta hvKP1, quando cultivada em ascite humana, revelou um aumento da síntese de RNA. O impacto da virulência de hvKP1 foi testado in vitro por comparação com uma estirpe não produtora

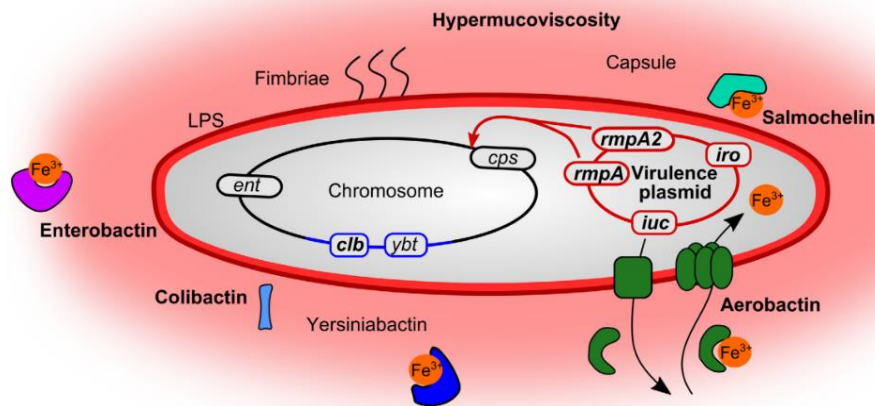
de PEG344, tendo-se reportado uma menor sobrevivência de animais infectados com hvKP1, por via pulmonar embora, não esteja claro se, isto é, devido ao aumento do crescimento ou sobrevivência dentro do compartimento pulmonar ou se o PEG344 aumenta a capacidade de se disseminar a partir deste local (43).

Os genes *rmpA* estão envolvidos na regulação do fenótipo mucóide, ativando a produção de cápsulas, resultando na hipermucosidade e aumento da virulência. Foram relatados três genes *rmpA* em estirpes hvKP: dois grandes genes *p-rmpA* e *p-rmpA2*, localizados num plasmídeo de virulência, pLVPK, e um gene cromossômico, *c-rmpA* (44, 45).

A cápsula é um importante fator de virulência, muitos relatórios têm demonstrado que os serótipos K1 e K2 estão fortemente associados a hvKP. Na China, entre os isolados clínicos de hvKp associados a vários tipos de infecções invasivas, incluindo abscesso hepático, 42,9% pertenciam ao serótipo K2 e 23,8% ao serótipo K1 (44, 46). Um estudo realizado na Coreia, que procurou estirpes de *K. pneumoniae* na urina de pacientes hospitalizados, mostrou que os serótipos capsulares K1 e K2 eram mais comuns em estirpes hvKp do que em estirpes hipermucoviscosa negativas (44, 47). Noutro estudo, a maioria das estirpes hipermucoviscosas isoladas de pacientes com bacteremia também pertenciam ao serótipo K1 ou K2, cerca de 78%. Muitos isolados hvKP notificados na Europa e América foram também classificados no serótipo K1 ou K2 (40,48). Tipicamente, as estirpes K1 e K2 são mais resistentes à fagocitose e à morte intracelular por macrófagos e neutrófilos do que estirpes de outros serótipos. Uma das explicações prende-se com o facto das estirpes K1 e K2 não possuírem as repetições específicas de resíduos de manose que são reconhecidas pelos fatores do hospedeiro, como o recetor de ligação de manose ao macrófago e a proteína surfactante secretada pelo pulmão. Por outro lado, as estirpes K1 e K2 apresentam um ácido siálico específico à superfície, que é conhecido por “imitar” as células hospedeiras, permitindo assim a invasão do hospedeiro. Acrescentar, as estirpes K1 e K2 podem induzir uma libertação de espécies reativas de oxigénio, permitindo uma maior sobrevivência em tecidos humanos (44,49).

A hvKP tem a capacidade de sintetizar uma genotoxina, a toxina *colibactina*. A *colibactina* é sintetizada como parte do metabolismo secundário por síntese não ribossomal de peptídeos e outras enzimas descritas pela primeira vez em *E. coli* (41,50,51). A *colibactina* danifica o DNA e perturba o ciclo celular do hospedeiro, mas os

mecanismos exatos através dos quais contribui para a patogênese de hvKp são em grande parte desconhecidos. Num estudo de inativação genética da síntese de *colibactin*, num serótipo K1, a capacidade, desta estirpe hvKP, de colonizar o intestino e se disseminar para outros órgãos diminui, assim como a indução da morte celular cerebral durante a meningite. Resumidamente, a colibactina contribui para a colonização e patogênese de hvKp (41,52).

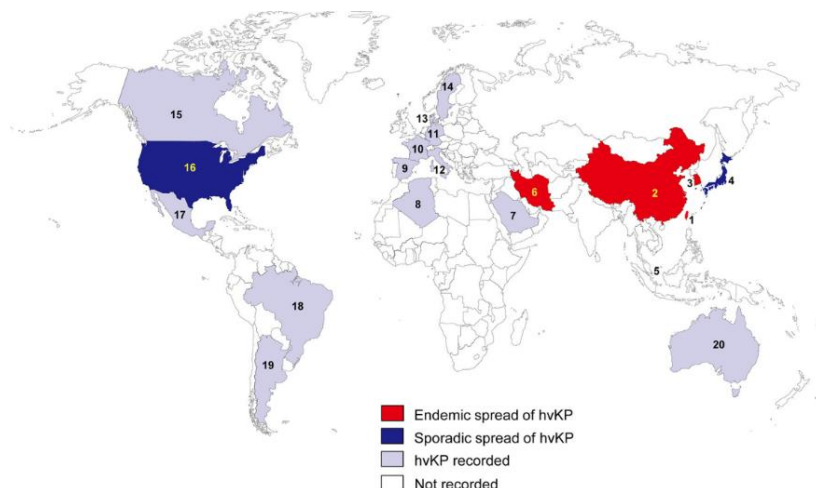


**Figura 9 -Representação esquemática dos fatores associados à hipervirulência de hvKp (41).**

## 5.1 Epidemiologia

O primeiro relatório em Taiwan sobre a disseminação esporádica de hvKP foi observada em muitos países asiáticos, europeus e países americanos (Fig. 10). Embora vários casos de hvKP tenham sido relatados na Europa e na América do Sul e Norte, a epidemia de hvKP ocorreu principalmente em países asiáticos, incluindo Taiwan, China, Coreia do Sul e Irão (40). Isto levou a que estas comunidades ficassem em estado de alerta pois para além da alargada disseminação, parte das recentes análises do *Human Microbiome Project* nos Estados Unidos, hvKP foi identificada em aproximadamente 4% das fezes e 10% das amostras de narinas de voluntários (41,32). Em pacientes hospitalizados, as taxas de colonização intestinal de hvKP são maiores e têm sido relatadas entre 19% e 38% (5,54, 55). A análise de 43 pacientes com hvKp, em Taiwan, encontrou uma forte associação entre a colonização gastrointestinal e o abscesso hepático, também identificou o transporte de isolados de hvKp em indivíduos saudáveis (54). Outros estudos identificaram hvKp em 5% dos adultos coreanos saudáveis e em 6% dos

quase mil adultos asiáticos pesquisados (49,56) . Essas altas taxas de identificação provavelmente contribuem para as infecções por hvKp na Ásia (41).



**Figura 10** - Características epidemiológicas de hvKP. A disseminação endêmica de hvKP significa que vários surtos de hvKP foram relatados numa região indicada. A disseminação esporádica de hvKP significa que apenas estudos de caso (sem surto) foram relatados em uma região indicada. Legenda Países: 1- Taiwan; 2- China; 3- Coreia do Sul; 4- Japão; 5- Singapura; 6- Irão; 7- Arábia Saudita; 8- Argélia; 9- Espanha; 10- França; 11- Alemanha; 12- Itália; 13- Dinamarca; 14- Suécia; 15- Canadá; 16- Estados Unidos; 17- México; 18- Brasil; 19- Argentina; 20- Austrália (40).

## 5.2 Apresentação clínica e fatores de risco

A hvKp pode causar infecções graves que são invulgares em *k.pneumoniae* , como endoftalmite, meningite, abscesso cerebral, fascite necrosante, abscesso esplênico, abscesso epidural, e risco de vida em indivíduos mais jovens e saudáveis (Tabela 2). Os sintomas da hvKp são inespecíficos e podem incluir febre, calafrios, dor abdominal, náuseas e vômitos, mas também podem ser causados pela localização da infecção metastática (41, 58,59).

Num estudo com mais de 800 pacientes com hvKP, em Taiwan, Coreia do Sul e Estados Unidos, 12% dos pacientes apresentaram evidência de doença metastática. Existem inúmeros relatos de pacientes com endoftalmite metastática ou uveíte,

colonização intestinal, infecções pulmonares incluindo doença intraparenquimatosa ou empiema e doença do Sistema Nervoso Central incluindo meningite, abscesso cerebral e abscesso epidural. Além disso, os pacientes podem apresentar abscesso hepático e infecções graves de pele, tecidos moles e ossos, incluindo fascíte necrosante, abscessos no pescoço e osteomielite (41, 57).

HvKp está associado à morbidade e mortalidade significativas. Pacientes com síndrome invasiva têm uma taxa de mortalidade que varia de 3 a 31% (41,49).

**Tabela 2 - Características demográficas e clínicas que ajudam a diferenciar a infecção devido a estirpes hipervirulentas e clássicas de *K. pneumoniae* (59).**

<u>Parâmetro</u>	<u>hvKp</u>	<u><i>K. pneumoniae</i></u>
Local para o desenvolvimento da infecção	Mais frequentemente na comunidade	Mais frequentemente num ambiente de cuidados de saúde
Hospedeiro	Todas as idades, frequentemente saudáveis	Idosos, com algumas morbidades
Contexto étnico	Ásia, ilhas do Pacífico, Península Ibérica	Sem Contexto
Abcesso hepático	Ocorre normalmente na ausência de doença biliar	Ocorre normalmente na presença de doença biliar
Número de locais de infecção	Frequentemente múltiplos	Normalmente único
Síndromes infecciosas invulgares para <i>K. pneumoniae</i>	Endoftalmite, meningite, abscesso cerebral, fascite necrosante, abscesso esplênico, abscesso epidural	Nenhum
Co-patógenos no local da infecção	Raro, geralmente mono microbiano	Não é raro, especialmente com infecção abdominal, de tecido mole ou de cateter urinário

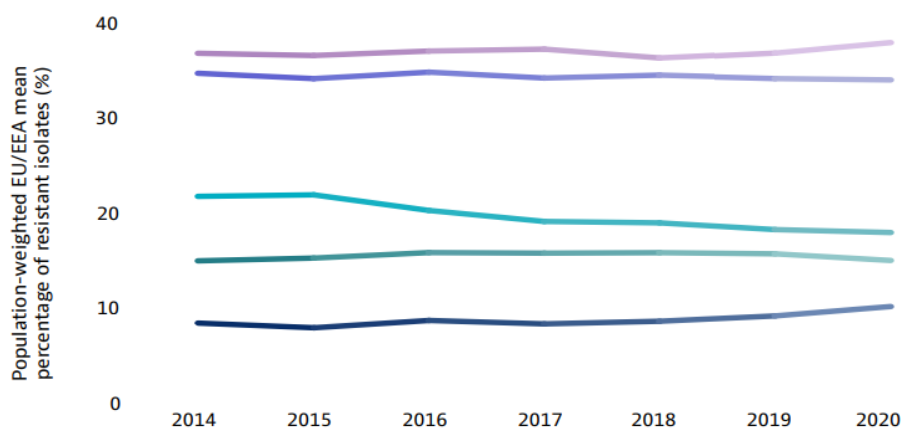
## 6. Resistência Antimicrobiana

A emergência da Resistência Antimicrobiana (RAM) é um processo evolutivo normal para microorganismos, bactérias, fungos, vírus e parasitas, que é acelerada pela pressão seletiva exercida pela utilização generalizada e uso indevido de antimicrobianos. A associação entre a utilização de antimicrobianos e resistência tem sido bem documentada nas instalações de cuidados de saúde, comunidades e países (55,60). Estão a surgir novos mecanismos com RAM e a sua propagação a nível mundial ameaça o tratamento de doenças infecciosas, resultando em doença prolongada, incapacidade e morte, aumentando assim o custo associado a cuidados de saúde (55,61). Além disso, porque as bactérias são encontradas no ser humano, ecossistemas animal e ambiental, alguns dos quais podem trocar genes que levam à RAM, é essencial compreender a dinâmica da RAM em diferentes setores, a fim de mitigar o seu impacto na saúde humana e para controlar rapidamente a sua propagação (61,62).

*K. pneumoniae* adquire resistência a múltiplos medicamentos antibacterianos principalmente através de transferências horizontais de elementos genéticos móveis, tais como *transposons* ou plasmídeos. Isto significa que existem poucas opções restantes de tratamento para infeções por *Klebsiella* em muitas partes do mundo (7). Os isolados possuem vários mecanismos para evitar a atividade  $\beta$ -lactâmica, como penicilinas, cefalosporinas e Carbapenemos. Estes incluem a produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), produção de AmpC  $\beta$ -lactamase, produção de metalo- $\beta$ -lactamase (MBL) e produção de Carbapenemase. Outros mecanismos de resistência incluem bombas de efluxo que aumentam a resistência ao cloranfenicol, macrolídeos, quinolonas, e  $\beta$ -lactâmicos (7,63)

A 3<sup>o</sup> geração cefalosporinas, que tem sido o padrão de tratamento intravenoso para infeções graves por *K. pneumoniae* nos hospitais, e carbapenems, são a última opção de tratamento de infeções graves quando as cefalosporinas já não são fiáveis devido a um elevado proporção de resistência mediada por ESBL (63).

RAM e estirpes virulentas são responsáveis por infecções graves e aumento da morbidade e mortalidade. Níveis elevados de RAM para várias combinações importantes entre antibiótico e bactérias, relatadas em 2020, mostram que a resistência continua a ser um grave desafio na União Europeia/Espaço Económico Europeu (UE/EEE) (Fig.12). O *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) estimou que, todos os anos, ocorrem mais de 670 000 infecções na UE/EEE devido a bactérias resistentes a antibióticos e que aproximadamente 33 000 pessoas morrem como consequência destas infecções. A nível global, estima-se que 1,27 milhões de mortes foram atribuíveis à RAM em 2016 (64).



**Figura 11 - Percentagem média ponderada pela população de isolados resistentes entre os isolados invasivos bacterianos (na sua maioria infecções da corrente sanguínea), em 29 países da UE/EEE, entre 2014 e 2020.** 1º linha - Espécies de *Acinetobacter*, resistentes ao carbapenemos; 2º linha- *Klebsiella pneumoniae*, resistente à cefalosporina de terceira geração; 3º linha- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente ao carbapenemos; 4º linha- *Escherichia coli*, resistente à cefalosporina de terceira geração; 5º linha- *Klebsiella pneumoniae*, resistente a carbapenemos (Nota: a legenda das linhas começa na 1º linha superior). A resistência antimicrobiana permanece alta e só mostra mudanças lentas ou permanece estável em bactérias comumente responsáveis por infecções associadas à saúde (64).

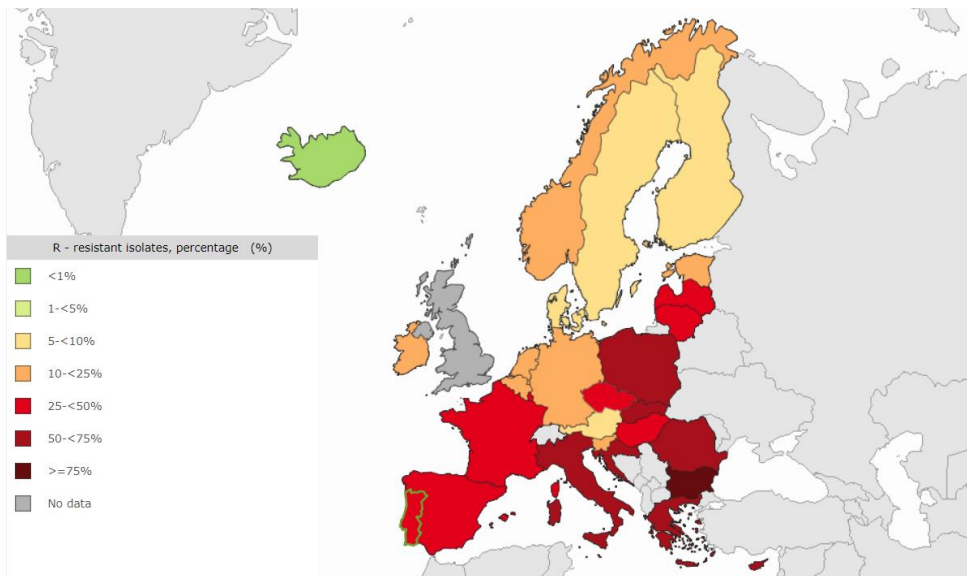
## 6.1 $\beta$ -lactâmicos

A resistência das bactérias aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos surgiu depois da penicilina ser amplamente utilizada para tratar infecções. *Alexander Fleming*, em 1929, foi o primeiro a notar que algumas bactérias, como a *K. pneumoniae*, não eram inibidas pela penicilina (5).

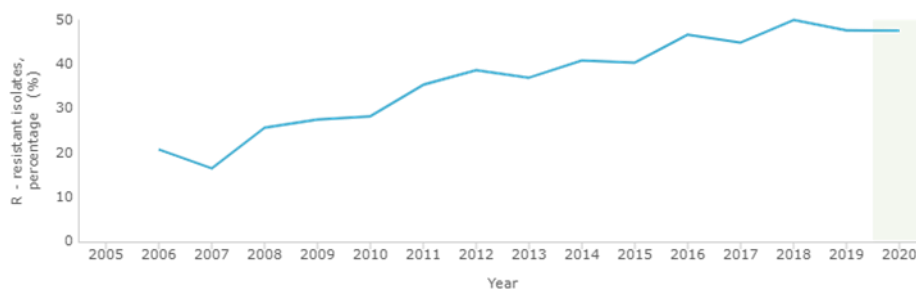
Os  $\beta$ -lactâmicos são uma grande classe de antibióticos que incluem as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams. Todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos possuem ação bactericida. Eles atuam por inibição da síntese da parede celular bacteriana, que é uma estrutura essencial da célula devido a manter a sua integridade, prevenindo-a da lise osmótica (65).

A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, em bactérias Gram-negativas, pode ocorrer por diferentes mecanismos, tais como a produção de  $\beta$ -lactamases, bombas de efluxo, e alteração das proteínas de ligação à penicilina (PBP=penicillin binding protein), sendo o primeiro o mais frequente (65).

Na Europa, segundo os dados do ECDC (66), a resistência de *k. pneumoniae* às cefalosporinas de 3<sup>o</sup> geração atingiu um estado crítico, assistindo-se a um aumento significativo desde 2007 (Fig.13) A maioria dos países encontra-se com taxas de isolados resistentes acima dos 25%, observando-se taxas de 50% a 75% em países como a Croácia, Eslováquia, Grécia, Itália, Polónia e Roménia. Numa situação mais preocupante encontra-se a Bulgária com uma taxa acima dos 75% (Fig.14). Em Portugal a taxa de resistência situa-se entre os 25% e os 50%, principalmente faixa etária dos 19 aos 64 anos (Fig.13 e 15).



**Figura 12 - Percentagem de isolados de *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de 3º geração na Europa em 2020 (66).**

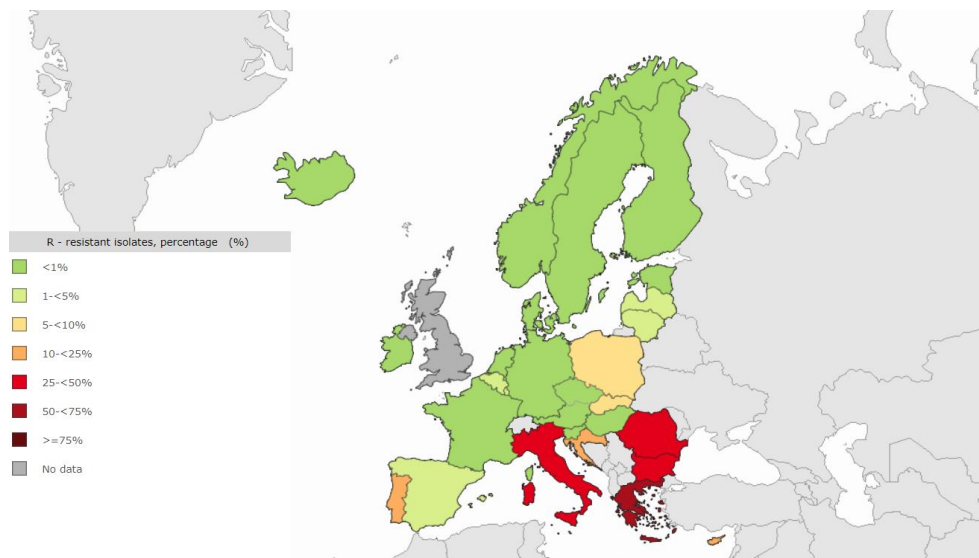


**Figura 13 - Percentagem de isolados de *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de 3º geração na Europa (2005-2020) (66).**

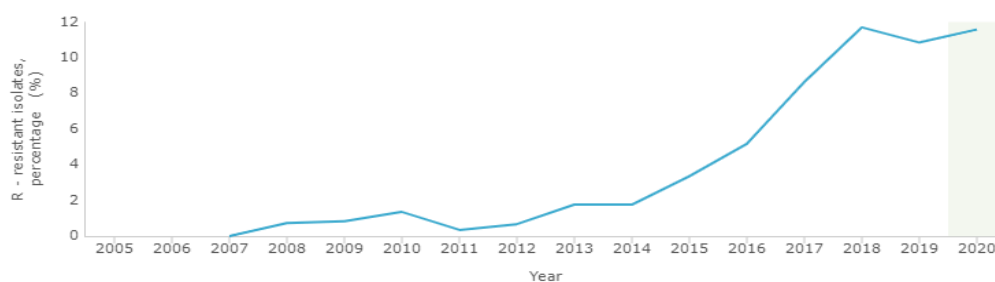


**Figura 14 - Percentagem de isolados de *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de 3º geração por faixa etária em Portugal (2020) (66).**

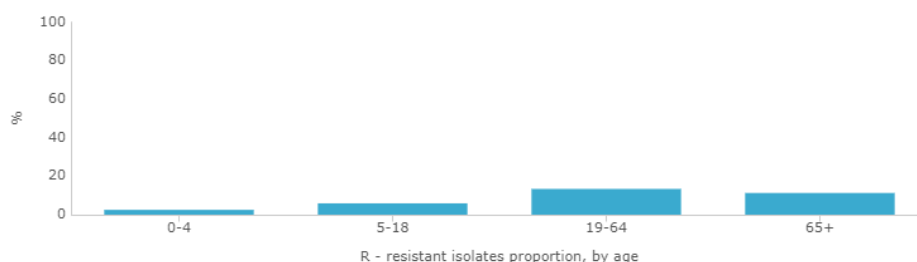
Para além da resistência às cefalosporinas, os dados do último relatório do ECDC revelam também uma taxa preocupante de resistência da *K.pneumoniae* aos carbapenemos, sendo esta a última linha de tratamento disponível capaz de combater a RAM. A resistência de *K.pneumoniae* aos carbapenemos na Europa, segundo os dados do ECDC, encontra-se num estado de alerta. Embora se observe na maioria dos países taxas de isolados resistentes abaixo dos 25%, países como a Bulgária, Itália e Roménia apresentam taxas preocupantes entre os 25% e os 50%. Numa taxa crítica, acima dos 50%, encontra-se a Grécia (Fig.16). Portugal tem taxas de isolados de *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos entre os 10% e os 25%, tendo havido um aumento significativo das taxas desde 2012 (Fig.17) sendo a faixa etária dos 19 aos 64 a mais afetada (Fig.18).



**Figura 15 - Evolução anual, de 2005 a 2020, de isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemos em Portugal (66).**



**Figura 16 - Percentagem de isolados de *K.pneumoniae* resistentes a Carbapenemos na Europa (66).**



**Figura 11 - Percentagem de isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemos por faixa etária em Portugal (2020) (66).**

### 6.1.1 Beta-Lactamases

Atualmente, mais de 890  $\beta$ -lactamases, frequentemente nomeadas como AmpC enzimas, têm sido identificadas em isolados bacterianos. Estas enzimas foram separadas em grupos, quer de acordo com as sequências de aminoácidos das enzimas ou de acordo com as suas propriedades inativadoras, para diferentes classes de  $\beta$ -lactâmicos. O esquema molecular de classificação divide  $\beta$ -lactamases em quatro classes baseadas nas sequências de aminoácidos de proteínas, enquanto que as numéricas são grupos funcionais que foram atribuídos com base na hidrólise e perfis de inibição das enzimas. Os principais grupos funcionais de importância clínica atual encontram-se na Tabela 3, onde os grupos enzimáticos são normalmente nomeados de acordo com a classe mais importante de  $\beta$ -lactâmicos que está inativada (67,68).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é obtida através da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico por  $\beta$ -lactamases. Em *K. pneumoniae*, a resistência a alguns  $\beta$ -lactâmicos é codificada no genoma central da espécie (67).

Outras  $\beta$ -lactamases fazem parte do genoma acessório. Este genoma também pode conter plasmídeos que codificam para enzimas AmpC que conferem resistência à maioria das penicilinas (5, 67).

**Tabela 3 - Principais grupos de  $\beta$ -lactamases em bactérias Gram-negativas que ameaçam o papel dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (67).**

<u>Grupo Funcional</u>	<u>Classe Molecular</u>	<u>Nome</u>	<u>Resistência a Antibióticos</u>
1	C	Cefalosporinase	Penincilinas, cefalosporinas
2b	A	Penincelinase	Penincilinas, cefalosporinas 1º geração
2be	A	$\beta$ -lactamases de espectro alargado	Penicilinas, Cefalosporinas, monobactâmicos
2d	D	Cloxacilinase	Penincilinas
2df	D	Carbapenamase	Carbapenens e outros beta-lactâmicos
2f	A	Carbapenamase	Todos os beta-lactâmicos
3	B	Metallo- $\beta$ -lactamase	Todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos

#### 6.1.1.1 $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL)

A *K. pneumoniae* produtora de ESBL foi identificada pela primeira vez na Europa em 1983 e nos Estados Unidos em 1989. Desde então, mais de 200 variantes de ESBL foram identificadas, algumas das quais se espalharam rapidamente a nível mundial. Além disso, muitas variantes da ESBL inicialmente identificadas em *K. pneumoniae* têm posteriormente sido transferidas para *E. coli*. *K. pneumoniae* produtora de ESBL é resistente a todos os medicamentos antibacterianos beta-lactâmicos de espectro alargado, tais como cefalosporinas e, para estas estirpes, os carbapenem são a principal opção de tratamento (5).

Em 2013, os Centros de Controlo e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC; GA, EUA) publicaram uma análise dos principais microrganismos resistentes a medicamentos considerados ameaças nos EUA, dividindo-os em ameaças urgentes, graves e preocupantes. Entre os patógenos citados, encontra-se *K. pneumoniae* produtora de ESBL (67).

### 6.1.1.2 Cefalosporinase

Cefalosporinas, que também podem ser designadas por  $\beta$ -lactamases AmpC, são enzimas clinicamente importantes porque podem estar associadas à resistência de uma ampla variedade de  $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenêmicos e cefepima, uma cefalosporina de 4º geração. As  $\beta$ -lactamases da classe AmpC hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas tais como cefoxitina ou cefotetan. Eles podem também hidrolisar cefalosporinas de 3º geração como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona e monobactamas como o aztreonam, mas as taxas de hidrólise para cefalosporinas de 4º geração como cefepima, ceftipiro e carbapenêmicos são muito baixas (65).

A diferença entre as  $\beta$ -lactamases AmpC e ESBL é a capacidade de hidrolisar cefamicinas e não serem afetados pelos inibidores de  $\beta$ -lactamase disponíveis (Manchanda e Singh, 2003). Plasmídeos com genes para  $\beta$ -lactamases AmpC muitas vezes contêm múltiplas resistências, incluindo genes para resistência a aminoglicosídeos, quinolonas, cloranfenicol, sulfonamida, tetraciclina e trimetoprima, bem como genes para outras  $\beta$ -lactamases (65).

O aumento da resistência à cefoxitina pode ser um indicador da atividade da AmpC, mas a resistência à cefoxitina também pode ser mediada através de alterações da permeabilidade da membrana externa (65).

### 6.1.1.3 Carbapenamases

*K. pneumoniae* é o produtor mais comum de carbapenamases (KPC), uma classe de enzimas bacterianas capazes de inativar os carbapenems. KPC é a carbapenamase de serina de classe A e é a carbapenamase mais frequente encontrada em *K. pneumoniae* (50,69).

O uso extensivo de carbapenem levou à seleção, evolução e disseminação generalizada de estirpes da família Enterobacteriaceae que albergam plasmídeos codificadores de carbapenem, entre os quais *Klebsiella* se tornou a principal espécie de Enterobacteriaceae resistente a carbapenems (69).

KPC é a principal causa de infecções por bactérias resistentes ao carbapenem em todo o mundo. Todos os genes importantes que podem conferir resistência ao carbapenem, via carbapenamases, estão presentes em *K. pneumoniae*. Para muitos

doentes infetados com estas bactérias não há tratamentos clinicamente eficazes (69). O último relatório de vigilância de resistência antimicrobiana da Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou que estirpes de *K. pneumoniae* resistente a carbapenem apareceram em todas as regiões da OMS, com algumas exibindo uma prevalência de 50% (46, 70). A percentagem de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenems continuou a aumentar lentamente de 8% em 2014 para 10% em 2020, enquanto que as percentagens de RAM diminuíram lentamente ou permaneceram geralmente estáveis para outras bactérias (13).

A resistência aos carbapenems é impulsionada principalmente pelo genoma acessório, por vezes em combinação com mutações no genoma central. A resistência a carbapenem em *K. pneumoniae* pode ser mediada em parte através de uma regulação mais rigorosa das bombas de efluxo e alteração dos poros exteriores da membrana no genoma central, e hiperprodução de Enzimas ESBL ou  $\beta$ -lactamases Ampc no genoma acessório (5,71). O mecanismo de resistência ao carbapenem é realizado através de carbapenemases mediadas por plasmídeos (5).

## **6.2 Colistina**

Colistina é um antibiótico da classe das polimixinas, utilizados para tratar infeções de bactérias Gram-negativas nas décadas de 1960 e 1970. A sua utilização foi interrompida devido à sua neurotoxicidade e nefrotoxicidade. No entanto, a RAM tornou necessário regressar à utilização de colistina como um antibiótico de último recurso (5).

A resistência à Colistina em *K. pneumoniae* é geralmente causada por mutações no genoma cromossómico, estes genes de resistência transmissíveis no genoma acessório são uma grande preocupação. Esta ocorre tipicamente através de mutações na regulação dos genes, tais como *mgrB*, que regulam a modificação dos lípidos bacterianos, o alvo dos antibióticos polimixínicos, diminuindo a capacidade de interação (5,72,73).

## 7. Opções Terapêuticas Atuais Contra a Multirresistência

As altas taxas de resistência à 3ª geração de cefalosporinas relatadas para *K. pneumoniae* significam que o tratamento de infecções suscetíveis de serem causadas por estas bactérias em muitos ambientes devem contar com os carbapenêmicos, o último recurso para tratar doenças graves adquiridas na comunidade e em infecções hospitalares. Estes antibacterianos são mais caros, podem não estar disponíveis em recursos limitados configurações, e também são suscetíveis de acelerar ainda mais o desenvolvimento de resistência. De grande preocupação é o facto de *K. pneumoniae* ser resistente também a carbapenêmicos pois foi identificada na maioria dos países que forneceu dados, com proporções de resistência até 54% (7).

Segundo um estudo realizado no Instituto de Medicina Militar, na Polónia, em 2016, as opções terapêuticas mais eficazes para o tratamento de *K. pneumoniae* KPC são a gentamicina, colistina, ou tigeciclina, enquanto infecções induzidas pela bactéria com ESBL demonstraram elevada suscetibilidade à maioria dos antibióticos, exceto colistina e carbapenens (74) (Tabela 4).

Adquirir dados precisos sobre a suscetibilidade a antibióticos e padrões de resistência permitem otimizar o tratamento hospitalar empírico de infecções enquanto se aguardam os resultados de testes microbiológicos (7,74).

**Tabela 4 - Suscetibilidade e resistência de *K. pneumoniae* ESBL negativa (-), *K. pneumoniae* ESBL positiva (+) e *K. pneumoniae* KPC a antibióticos (74).**

Antibiótico	<i>K.pneumoniae</i> ESBL-		<i>K.pneumoniae</i> ESBL+		<i>K.pneumoniae</i> KPC	
	Suscetibilidade (%)	Resistência (%)	Suscetibilidade (%)	Resistência (%)	Suscetibilidade (%)	Resistência (%)
Ceftazidima	98.4	1.6	0	100	0	100
Cefotaxima	100	0	0	100	0	100
Imipeneme	100	0	98	2	0	100
Meropeneme	100	0	98	2	0	100
Trimethoprim-sulfamethoxazole	97.6	3	25.7	74.3	0	100
Piperacilina/Tazobactam	91.3	11	4	96	0	100
Ciprofloxacina	92.9	9	0	100	0	100
Gentamicina	97.6	3	22	78.2	100	100
Colistina	100	0	101	0	100	100
Tigeciclina	94.4	7	66.3	33.7	100	100

## 8. Perspetivas Futuras

As estirpes resistentes a carbapenem e cefalosporinas de 3<sup>o</sup> geração são classificadas pela Lista de Patógenos Prioritários da OMS de bactérias resistentes a antibióticos como prioridades críticas para a investigação e desenvolvimento de novos e eficazes tratamentos, nomeadamente antibióticos (7,63) (Tabela 5).

**Tabela 5 - Classificação prioritária para a descoberta de novos antibióticos segundo a ECDC, PHAC e WHO (63).**

<u>Classificação de Prioridade</u>					
	Resistência	ECDC (2013)	PHAC (2015)	WHO (2017)	ECDC (2019)
<i>K.pneumoniae</i>	Carbapenemes	Urgente	Elevado	Crítico	Urgente
	3 <sup>o</sup> geração de cefalosporinas	Sério	Elevado	Crítico	Sério

A otimização do uso de antimicrobianos é uma das cinco estratégias-chave no *Global Action Plano on Antimicrobial Resistance*. Têm sido estimados que metade de todos os antimicrobianos utilizados nos cuidados de saúde humana nos países que fazem parte da ECDC podem ser considerados inadequados [64]. O consumo de antimicrobianos é um dos principais motores da RAM, tanto em humanos como em animais (7,63).

Estudos ecológicos demonstraram relações quase lineares entre o consumo de antibióticos e a prevalência da RAM. Mais recentemente, um relatório conjunto do ECDC, *European Food Safety Authority* (EFSA), e EMA encontrou provas de associações semelhantes entre o consumo de antimicrobianos e RAM em humanos e animais produtores de alimentos. Programas de gestão antibacteriana devem ser implementados, aumentando a especificidade do diagnóstico e limitação da duração de tratamentos (7, 63).

### 8.1 Novos Fármacos

A importância clínica mundial de *K.pneumoniae* e as taxas crescentes de RAM levam a que a busca por novas estratégias terapêuticas seja imperativa. Alternativas futuras para o tratamento de infeções causadas por este patógeno incluirá inevitavelmente compostos com atividade contra a virulência (5). Os biofilmes formados por *K.pneumoniae* são uma preocupação ainda maior, uma vez que existe atualmente um

número reduzido de antibióticos altamente eficazes no tratamento de bactérias Gram-negativas resistentes a carbapenem (63).

As alternativas antimicrobianas são cada vez mais limitadas, por isso têm sido estudadas novas estratégias, tais como a utilização de mecanismos contra a capacidade de virulência de *k. pneumoniae* que é considerada promissora por prever que exerça uma pressão seletiva muito mais baixa para o desenvolvimento da resistência do que os próprios antimicrobianos. Isto ocorre devido ao fato de que, ao contrário dos antibióticos, os compostos de antivirulência não afetam a sobrevivência bacteriana, mas sim a capacidade de causar danos ou doença. Segundo os estudos do artigo “*Global priority pathogens: virulence, antimicrobial resistance and prospective treatment options*”, para afetar a virulência de *K. pneumoniae*, os anticorpos monoclonais que visam o *fimbriae* tipo 3 são utilizados para inibir a formação de biofilme (63).

## **8.2 Estratégias da OMS e UE/EEE**

A RAM leva ao aumento dos custos com os cuidados de saúde, ao insucesso terapêutico e, por vezes, à morte. A sua frequência crescente representa um problema complexo resultante de múltiplos fatores, entre os quais se encontra o uso indiscriminado dos antibióticos. Trata-se de um problema grave, à escala mundial, que afeta tanto os países desenvolvidos como os em desenvolvimento. A progressão da RAM potência o aparecimento de infeções multirresistentes, de tratamento difícil e oneroso e, por ser irreversível, ou de reversão muito lenta, tornando-se particularmente preocupante (75).

A RAM foi considerada, pela OMS um problema prioritário, pelo que, desde 2001, instituíram medidas globais para o seu controlo, salientando-se a vigilância da resistência, a educação dos prescritores, dos profissionais de saúde e do grande público e a regulamentação da promoção de antibióticos pela indústria farmacêutica (75).

O consumo global de antibióticos em seres humanos na União UE/EEE diminuiu 23% entre 2011 e 2020, especialmente durante a pandemia da doença de Coronavírus 2019 (COVID-19), entre 2019 e 2020, o consumo médio total de antibióticos diminuiu quase 18%. No entanto, a utilização relativa de antibióticos de largo espectro aumentou e uma variabilidade significativa entre países sugere que ainda são possíveis reduções (13).

Os países da UE/EEE deram passos importantes nos últimos anos no desenvolvimento e implementação de planos de ação nacionais sobre a RMA, mas

continuam a existir lacunas. As análises da ECDC sugerem que as principais prioridades para a UE/EEE incluem:

- Avaliação e monitorização da implementação dos planos de ação nacionais;
- Vigilância integrada e alargada da RMA em bactérias provenientes de seres humanos, animais e do ambiente;
- Investimento em intervenções eficazes de redução de custos, tais como programas de gestão antimicrobiana e prevenção e controlo de infeções (13).

Os planos para uma nova iniciativa política da UE para impulsionar a implementação do Plano de Ação de Saúde Único da UE contra a RMA são uma oportunidade para o realizar:

- Continuar a incentivar a descoberta de vacinas, tratamentos, incluindo novos antibióticos, e testes, maximizando simultaneamente o acesso aos recursos existentes, tais como antibióticos com baixa disponibilidade;
- Controlar o consumo de antibióticos e a RAM nas instalações de cuidados a longo prazo;
- Estabelecer um sistema para partilhar e promover a implementação das melhores práticas para combater a RMA.
- Renovar o enfoque na cooperação internacional em matéria de vigilância e regulamentação (13).

## Conclusão

*K. pneumoniae* adquiriu resistência a múltiplos medicamentos antibacterianos principalmente através de transferências horizontais de elementos genéticos móveis. Esta possui  $\beta$ -lactamases que evoluíram para ESBL, cefalosporinases e KPCs que são capazes de inativar os b-lactâmicos, nomeadamente as cefalosporinas e carbapenems.

O aparecimento de isolados resistentes a cefalosporinas tem crescido a um ritmo acelerado, desde 2007 a 2020, sendo que a maioria dos países europeus encontra-se com taxas de isolados resistentes acima dos 25%. Por outro lado, o aparecimento de isolados resistentes a carbapenems tem aumentando de forma preocupante, pois estes antimicrobianos são atualmente utilizados como a última linha de tratamento na maior parte dos hospitais europeus, sendo que a maioria dos países encontra-se com taxas de isolados resistentes abaixo dos 25%. Estes dados demonstram que a situação é bastante preocupante e que seria importante haver dados precisos sobre os perfis de suscetibilidade a antibióticos e padrões de resistência, permitindo, assim, otimizar o tratamento hospitalar empírico de infeções enquanto se aguardam os resultados de testes microbiológicos.

Alternativas futuras para o tratamento de infeções causadas por este patógeno incluem compostos com atividade contra a virulência, nomeadamente contra o biofilme. A UE/EEE irá desenvolver e implementar planos de ação nacionais sobre a RMA mais fortes, de forma a evitar as lacunas existentes.

O papel do farmacêutico tanto a nível hospitalar como a nível comunitário é fulcral para o controlo e monitorização da dispensa e uso dos antibióticos. Enquanto não chegam à população novos fármacos ou uma vacina contra *K. pneumoniae* a prevenção e o controlo são a chave para que os valores de isolados resistentes não tenham tendência crescente ao longo dos anos.

## Referências Bibliográficas

1. Herridge, W. P., Shibu, P., O'Shea, J., Brook, T. C., & Hoyles, L. (2020). Bacteriophages of *Klebsiella spp.*, their diversity and potential therapeutic uses. *Journal of medical microbiology*, 69(2), 176–194. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001141>
2. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2021). The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), e00174-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>
3. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>
4. Verdi, C. M., Eloise, C., Zimmermann, P., Nascimento, E., Andrade, C., Ledur, P. C., & Gurgel Velasquez, P. (2016). Detecção Laboratorial dos Mecanismos de Resistência da *Klebsiella Pneumoniae*: Uma Revisão. (Vol. 17, Issue 9). <http://local.cneccsan.edu.br/revista/index.php/saude/index>
5. Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
6. Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of environmental research and public health*, 17(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
7. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report Early implementation. (2016-2017).
8. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>
9. Enterobacteriaceae e os sistemas de água hospitalares. (2021, November 16). *Microambiental*. <https://microambiental.com.br/agua-segura-para->

hospitais/conheca-a-familia-enterobacteriaceae-e-os-riscos-para-os-sistemas-de-agua-hospitalares/

10. Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of environmental research and public health*, 17(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
11. Shon, A. S., Bajwa, R. P., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 4(2), 107–118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>
12. Check out the Morphology and Culture Characteristics Of *Klebsiella pneumoniae* (K. pneumoniae). (2019, January). Laboratory Hub.
13. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA A One Health Response. (2022).
14. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
15. Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Nguyen, K. V., Nguyen, T. V., Dao, T. T., Mensink, M., ... Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), E3574–E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
16. Bi, D., Jiang, X., Sheng, Z. K., Ngmenterebo, D., Tai, C., Wang, M., Deng, Z., Rajakumar, K., & Ou, H. Y. (2015). Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a 'resistance-disarmed' model organism. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 70(10), 2770–2774. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv204>
17. Zhang, J., van Aartsen, J. J., Jiang, X., Shao, Y., Tai, C., He, X., Tan, Z., Deng, Z., Jia, S., Rajakumar, K., & Ou, H. Y. (2011). Expansion of the known *Klebsiella pneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands

- integrated into tmRNA gene sites. *Journal of microbiological methods*, 84(2), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12.016>
18. Choby, J. E., Howard-Anderson, J., & Weiss, D. S. (2020). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. *Journal of internal medicine*, 287(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>
  19. Rock, C., Thom, K. A., Masnick, M., Johnson, J. K., Harris, A. D., & Morgan, D. J. (2014). Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. *Infection control and hospital epidemiology*, 35(4), 426–429. <https://doi.org/10.1086/675598>
  20. Kulkarni, M. B., & Awandkar, S. (2019). Antibiogram of Pathogens from Nasal Affections in Equine. <https://www.researchgate.net/publication/>
  21. Check out the Morphology and Culture Characteristics Of *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). (2019, January). Laboratory Hub. <https://laboratoryhub.com/morphology-culture-characteristics-of-klebsiella-pneumoniae/>
  22. Follador, R., Heinz, E., Wyres, K. L., Ellington, M. J., Kowarik, M., Holt, K. E., & Thomson, N. R. (2016). The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microbial genomics*, 2(8), e000073. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073>
  23. Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*, 9(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>
  24. Shon, A. S., & Russo, T. A. (2012). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: the next superbug. *Future microbiology*, 7(6), 669–671. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.43>
  25. Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00001-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19>
  26. Hua, K. F., Yang, F. L., Chiu, H. W., Chou, J. C., Dong, W. C., Lin, C. N., Lin, C. Y., Wang, J. T., Li, L. H., Chiu, H. W., Chiu, Y. C., & Wu, S. H. (2015). Capsular Polysaccharide Is Involved in NLRP3 Inflammasome Activation by

- Klebsiella pneumoniae* Serotype K1. *Infection and immunity*, 83(9), 3396–3409. <https://doi.org/10.1128/IAI.00125-15>
27. Clegg, S., & Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *MicrobiologySpectrum*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0005-2012>
  28. Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
  29. Rendueles O. (2020). Deciphering the role of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* during pathogenesis: A cautionary tale. *Molecular microbiology*, 113(5), 883–888. <https://doi.org/10.1111/mmi.14474>
  30. Clegg, S., & Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *MicrobiologySpectrum*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0005-2012>
  31. Sahly, H., Keisari, Y., & Ofek, I. (2009). Manno(rhamno)biose-containing capsular polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* enhance opsono-stimulation of human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of innate immunity*, 1(2), 136–144. <https://doi.org/10.1159/000154812>
  32. Evrard, B., Balestrino, D., Dosgilbert, A., Bouya-Gachancard, J. L., Charbonnel, N., Forestier, C., & Tridon, A. (2010). Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, 78(1), 210–219. <https://doi.org/10.1128/IAI.00864-09>
  33. Branger, J., Knapp, S., Weijer, S., Leemans, J. C., Pater, J. M., Speelman, P., Florquin, S., & van der Poll, T. (2004). Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative *pneumoniae* in mice. *Infection and immunity*, 72(2), 788–794. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.788-794.2004>
  34. Cai, S., Batra, S., Shen, L., Wakamatsu, N., & Jeyaseelan, S. (2009). Both TRIF- and MyD88-dependent signaling contribute to host defense against pulmonary *Klebsiella* infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 183(10), 6629–6638. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901033>
  35. Rodrigues, C., Passet, V., Rakotondrasoa, A., & Brisse, S. (2018). Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and

- Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Frontiers in microbiology*, 9, 3000. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03000>
36. Stahlhut, S. G., Tchesnokova, V., Struve, C., Weissman, S. J., Chattopadhyay, S., Yakovenko, O., Aprikian, P., Sokurenko, E. V., & Krogfelt, K. A. (2009). Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 191(21), 6592–6601. <https://doi.org/10.1128/JB.00786-09>
  37. Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
  38. Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 12, 642484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642484>
  39. Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
  40. Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Nov 21;7:483. doi: 10.3389/fcimb.2017.00483. PMID: 29209595; PMCID: PMC5702448.
  41. Choby, J. E., Howard-Anderson, J., & Weiss, D. S. (2020). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. *Journal of internal medicine*, 287(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>
  42. Russo, T. A., Olson, R., Macdonald, U., Metzger, D., Maltese, L. M., Drake, E. J., & Gulick, A. M. (2014). Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, 82(6), 2356–2367. <https://doi.org/10.1128/IAI.01667-13>
  43. Bulger, J., MacDonald, U., Olson, R., Beanan, J., & Russo, T. A. (2017). Metabolite Transporter PEG344 Is Required for Full Virulence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain hvKP1 after Pulmonary but Not Subcutaneous

- Challenge. *Infection and immunity*, 85(10), e00093-17.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00093-17>
44. Habib, M., Porter, B. D., & Satzke, C. (2014). Capsular serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using the Quellung reaction. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (84), e51208. <https://doi.org/10.3791/51208>
45. Hsu, C. R., Lin, T. L., Chen, Y. C., Chou, H. C., & Wang, J. T. (2011). The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 12), 3446–3457. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050336-0>
46. Yang, X., Dong, N., Chan, E. W., Zhang, R., & Chen, S. (2021). Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in microbiology*, 29(1), 65–83. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.012>
47. Patel, P. K., Russo, T. A., & Karchmer, A. W. (2014). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Open forum infectious diseases*, 1(1), ofu028. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu028>
48. Jung, S. W., Chae, H. J., Park, Y. J., Yu, J. K., Kim, S. Y., Lee, H. K., Lee, J. H., Kahng, J. M., Lee, S. O., Lee, M. K., Lim, J. H., Lee, C. H., Chang, S. J., Ahn, J. Y., Lee, J. W., & Park, Y. G. (2013). Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Epidemiology and infection*, 141(2), 334–340. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000933>
49. Lin, Y. T., Siu, L. K., Lin, J. C., Chen, T. L., Tseng, C. P., Yeh, K. M., Chang, F. Y., & Fung, C. P. (2012). Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries. *BMC microbiology*, 12, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-13>
50. Chen, Y. T., Lai, Y. C., Tan, M. C., Hsieh, L. Y., Wang, J. T., Shiau, Y. R., Wang, H. Y., Lin, A. C., Lai, J. F., Huang, I. W., & Lauderdale, T. L. (2017). Prevalence and characteristics of pks genotoxin gene cluster-positive clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan. *Scientific reports*, 7, 43120. <https://doi.org/10.1038/srep43120>
51. Murakami, E., Shionoya, T., Komenoi, S., Suzuki, Y., & Sakane, F. (2016). Cloning and Characterization of Novel Testis-Specific Diacylglycerol Kinase  $\eta$

- Splice Variants 3 and 4. PloS one, 11(9), e0162997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162997>
52. Lu, M. C., Chen, Y. T., Chiang, M. K., Wang, Y. C., Hsiao, P. Y., Huang, Y. J., Lin, C. T., Cheng, C. C., Liang, C. L., & Lai, Y. C. (2017). Colibactin Contributes to the Hypervirulence of pks+ K1 CC23 *Klebsiella pneumoniae* in Mouse Meningitis Infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 103. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00103>
53. Gorrie, C. L., Mirceta, M., Wick, R. R., Edwards, D. J., Thomson, N. R., Strugnell, R. A., Pratt, N. F., Garlick, J. S., Watson, K. M., Pilcher, D. V., McGloughlin, S. A., Spelman, D. W., Jenney, A., & Holt, K. E. (2017). Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 65(2), 208–215. <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>
54. Fung, C. P., Lin, Y. T., Lin, J. C., Chen, T. L., Yeh, K. M., Chang, F. Y., Chuang, H. C., Wu, H. S., Tseng, C. P., & Siu, L. K. (2012). *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess. *Emerging infectious diseases*, 18(8), 1322–1325. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111053>
55. Ikeda, M., Mizoguchi, M., Oshida, Y., Tatsuno, K., Saito, R., Okazaki, M., Okugawa, S., & Moriya, K. (2018). Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *klebsiella pneumoniae* infection in Japan. *International Journal of General Medicine*, 11, 293–299. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S166940>
56. Chung, D. R., Lee, H., Park, M. H., Jung, S. I., Chang, H. H., Kim, Y. S., Son, J. S., Moon, C., Kwon, K. T., Ryu, S. Y., Shin, S. Y., Ko, K. S., Kang, C. I., Peck, K. R., & Song, J. H. (2012). Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(4), 481–486. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1334-7>
57. Siu, L. K., Yeh, K. M., Lin, J. C., Fung, C. P., & Chang, F. Y. (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *The Lancet. Infectious diseases*, 12(11), 881–887. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70205-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70205-0)

58. Patel, P. K., Russo, T. A., & Karchmer, A. W. (2014). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Open forum infectious diseases*, 1(1), ofu028. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu028>
- Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19>
59. Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00001-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19>
60. Catalán-Nájera, J. C., Garza-Ramos, U., & Barrios-Camacho, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes. *Virulence*, 8(7), 1111–1123. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>
61. World Health Organization. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/>
62. World Health Organization. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation [Internet]. 2018. Available from: <https://www.who.int/>
63. M Campos, J. C., Antunes, L. C., & Ferreira, R. B. (2020). Global priority pathogens: virulence, antimicrobial resistance and prospective treatment options. *Future microbiology*, 15, 649–677. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0333>
64. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA A One Health Response. (2022).
65. Abdel-Rhman S. H. (2020). Characterization of  $\beta$ -lactam resistance in *K. pneumoniae* associated with ready-to-eat processed meat in Egypt. *PloS one*, 15(9), e0238747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238747>
66. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2022) Surveillance Atlas of Infectin Diseases. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>
67. Bush K. (2010). Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical care (London, England)*, 14(3), 224. <https://doi.org/10.1186/cc8892>
68. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>

69. De Rosa, F. G., Corcione, S., Cavallo, R., Di Perri, G., & Bassetti, M. (2015). Critical issues for *Klebsiella pneumoniae* KPC-carbapenemase producing *K. pneumoniae* infections: a critical agenda. *Future microbiology*, 10(2), 283–294. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.121>
70. World Health Organization (2014) Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance, WHO.
71. Filgona, J., Banerjee, T., & Anupurba, S. (2015). Role of efflux pumps inhibitor in decreasing antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in North India. *Journal of infection in developing countries*, 9(8), 815–820. <https://doi.org/10.3855/jidc.6216>
72. Wright, M. S., Suzuki, Y., Jones, M. B., Marshall, S. H., Rudin, S. D., van Duin, D., Kaye, K., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., & Adams, M. D. (2015). Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(1), 536–543. <https://doi.org/10.1128/AAC.04037-14>
73. Jayol, A., Poirel, L., Brink, A., Villegas, M. V., Yilmaz, M., & Nordmann, P. (2014). Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(8), 4762–4766. <https://doi.org/10.1128/AAC.00084-14>
74. Guzek, A., Rybicki, Z., Korzeniewski, K., Mackiewicz, K., Saks, E., Chciałowski, A., & Zwolińska, E. (2015). Etiological factors causing lower respiratory tract infections isolated from hospitalized patients. *Advances in experimental medicine and biology*, 835, 37–44. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2014\\_23](https://doi.org/10.1007/5584_2014_23)
75. Passadouro, R., Fonseca, R., Figueiredo, F., Lopes, A., & Fernandes, C. (2014). Avaliação do Perfil de Sensibilidade aos Antibióticos na Infecção Urinária da Comunidade [Evaluation of the antimicrobial susceptibility of community-acquired urinary tract infection]. *Ata medica portuguesa*, 27(6), 737–742.