



Sara Isabel Queirós Nóbrega

Klebsiella pneumoniae como um patógeno hospitalar: a sua importância com o aumento da resistência aos antibióticos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sara Isabel Queirós Nóbrega

Klebsiella pneumoniae como um patógeno hospitalar:
a sua importância com o aumento da resistência aos
antibióticos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
Orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A Tutora

(Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva)

A Aluna

(Sara Isabel Queirós Nóbrega)

Eu, Sara Isabel Queirós Nóbrega, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010144850, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão de outrem, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

(Sara Isabel Queirós Nóbrega)

Os meus sinceros agradecimentos,

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelas bases e conhecimentos científicos que me proporcionou.

À Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva, pela ajuda, disponibilidade e excelente orientação ao longo da elaboração da presente monografia.

Ao NEF/AAC que durante vários anos fez parte do meu percurso e que permite que hoje tenha uma maior noção daquilo que é o trabalho de equipa e a responsabilidade perante os colegas que esperam de nós o melhor trabalho. À direção NEF/AAC 2014/2015.

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra, pelos momentos inesquecíveis e amigos que levo para a vida. Só quem te vive é que sabe e eu sei.

Aos amigos da faculdade que muito me ajudaram e aturaram durante todo este percurso, vocês sabem que estão no meu coração.

Aos meus pais, irmão, família e amigas de infância pelo pilar que são na minha vida.

A Coimbra.

Índice

Lista de abreviaturas	2
Resumo/Abstract	3
1. Introdução	4
2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
3. Mecanismos de Resistência	8
3.1 Beta-Lactamases	11
3.1.1. Beta-Lactamases de Espectro Alargado (ESBLs)	12
3.1.2. Carbapenemases	13
4. Multirresistência	16
5. Tratamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistente	16
6. Prevenção e controlo de infeções por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
7. Conclusão	19
8. Referências Bibliográficas	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ECDC - European Centre of Disease Prevention and Control

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

LPS - Lipopolissacarídeo

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ARN - Ácido Ribonucleico

KPC - Carbapenemase produzida por *K.pneumoniae*

VIM - Verona Integron Metallo- β -lactamases

OXA-48 - Oxacilinas 48

IMP - Imipenemase metalo- β -lactamase

NDM - New Delhi metalo- β -lactamase

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA - Estados Unidos da América

KP-ESBL (+) - *K.pneumoniae* produtora de ESBLs

KP-ESBL (-) - *K.pneumoniae* não produtora de ESBLs

KP-KPC - *K.pneumoniae* produtora de KPC

RESUMO

A resistência aos antibióticos é cada vez mais um problema com que, diariamente, os clínicos de todo o mundo têm de lidar.

A emergir largamente nos últimos anos está *Klebsiella pneumoniae* que através de vários mecanismos de resistência é já considerada como uma das bactérias patogénicas de maior preocupação no que diz respeito à multirresistência aos antibióticos.

As beta-lactamases de largo espetro (ESBL) e as carbapenemases produzidas por *Klebsiella pneumoniae* (KPC) são os mecanismos de resistência mais utilizados por este bacilo e motivo de maior atenção pelos investigadores.

PALAVRAS-CHAVE: Mecanismos de resistência, *Klebsiella pneumoniae*, Beta-lactamases, ESBL, KPC, multirresistência

ABSTRACT

Antibiotic resistance is an arising problem that every day worldwide clinicians have to face in healthcare centers.

An emerging cause of multidrug-resistant infections is *Klebsiella pneumoniae* that through various mechanisms of resistance is already considered one of the most concerning pathogenic bacteria with regard to antibiotics multi-resistance.

The predominant mechanisms of resistance used by this bacillus are Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) and Carbapenemases produced by *Klebsiella pneumoniae* (KPC), causing greater attention to researchers.

KEYWORDS: Antibiotic resistance, *Klebsiella pneumoniae*, Beta-lactamases, ESBL, KPC, multiresistance

I. INTRODUÇÃO

O medicamento é cada vez mais um elemento fundamental da sociedade em que vivemos. Utilizado desde os tempos mais remotos, evoluiu de simples “mezinhas” para as atuais formulações complexas, mantendo sempre o mesmo propósito: permitir uma melhoria considerável da nossa qualidade de vida, o que o torna um dos grandes protagonistas pelo aumento da esperança média de vida da população, que em Portugal se situa hoje em cerca de 80 anos.¹

Como futuros farmacêuticos, promotores do benefício do medicamento, a nossa preocupação reside na sua qualidade, segurança e eficácia. Mas e quando estes deixam de ser eficazes? E quando o doente se desloca a uma unidade de saúde e corre o risco de contrair uma infeção que não possuía?

Os antibióticos são uma das classes farmacológicas mais importantes na terapêutica. Estes fármacos vieram revolucionar o tratamento das infeções bacterianas, reduzindo massivamente a mortalidade e a morbilidade destas doenças e permitindo tratamentos invasivos como cirurgias, transplantes, etc.

Contudo, nem sempre são utilizados da melhor forma, sendo mal prescritos, por exemplo para infeções virais para as quais não têm efeito, dosagens incorretas, posologias erradas, entre outras causas que ao longo dos anos se foram acumulando e que levaram à emergência de bactérias patogénicas resistentes a muitos antibióticos, sendo uma das grandes razões para a falha dos tratamentos. O aumento do uso incorreto destes medicamentos, como a automedicação ou a utilização na alimentação animal como profiláticos de infeções e promotores de crescimento, em que os animais podem ser reservatórios de genes de resistência, são também fatores que contribuem para o aumento da resistência aos antibióticos.

“A resistência aos antibióticos é uma séria ameaça para a saúde pública”, é assim que o European Center of Disease Prevention and Control (ECDC) descreve este problema. Cada vez mais na Europa, e em todo o mundo, há um aumento da percentagem de resistências reportadas a pelo menos um antibiótico, e a resistência a múltiplos fármacos é também uma preocupação comum.²

É da minha opinião que o farmacêutico, enquanto profissional de saúde especialista no medicamento, tem um dos papéis fulcrais na solução deste problema. Como iremos constatar ao longo da monografia, é necessário que todos os profissionais de saúde envolvidos no tratamento do doente se apercebam de que são um dos fatores principais

para a transmissão de bactérias, e consequentemente para aumento das resistências, quer desde a prescrição do médico até ao simples desinfetar de mãos de um enfermeiro ou auxiliar de saúde.

Da panóplia de bactérias existentes escolhi ***Klebsiella pneumoniae*** (*K. pneumoniae*), uma das bactérias patogénicas mais adquiridas pós-admissão no hospital em anos recentes, o que sugere uma transmissão nosocomial. A resistência aos antibióticos é um problema frequente com esta bactéria, sendo causa de muitos surtos hospitalares, uma vez que esta se propaga facilmente entre os doentes.³

As opções de tratamento para doentes infetados por *K. pneumoniae* estão hoje limitadas a poucos antibióticos, como os carbapenemos, uma vez que é frequente o isolamento de estirpes resistentes a várias classes de antibióticos. No entanto, também esta resistência, já conhecida pelos bacteriologistas, tem aumentado e está em vários países europeus, incluindo Portugal, como poderemos ver neste trabalho.^{2,4}

A bacteriologia é uma ciência em constante mudança, hoje sabemos que um dado adquirido agora pode não o ser no futuro, e *K.pneumoniae* é um grande exemplo deste facto.

Esta monografia tem como principal objetivo mostrar a importância de *Klebsiella pneumoniae* como um patógeno oportunista, atualmente em grande foco devido à emergência de estirpes multirresistentes, os mecanismos de resistência mais importantes, bem como algumas medidas preventivas e de controlo.

2. *Klebsiella pneumoniae*

Nomeada por Edwin Klebs, *Klebsiella spp.*, é uma espécie ubíqua na natureza, que pode ser encontrada quer no meio ambiente quer a colonizar as superfícies mucosas dos mamíferos, em locais como o trato gastrointestinal, olhos, trato respiratório e geniturinário, onde podem originar infeção.⁵

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é caracterizada por ser uma bactéria imóvel, ao contrário da maioria das enterobactérias que são móveis por flagelos peritricos, e também por possuir uma cápsula polissacarídica que facilmente é identificada ao formar colónias mucosas.⁶ É definida serologicamente pelo antigénio K (cápsula polissacarídea) e pelo antigénio O (lipopolissacarídeos) que funcionam como fatores de virulência.^{6,7}

Dentro do género *Klebsiella* existem quatro espécies com diferentes prevalências: *Klebsiella pneumoniae* (a mais comum); *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena* e *Raoultella planticola*.³

Klebsiella pneumoniae, a clinicamente mais importante, é a espécie que será abordada mais em pormenor neste trabalho. Este bacilo causa entre 75 a 86% das infeções por *Klebsiella spp.*, com considerável morbidade e mortalidade quando estão envolvidas estirpes multirresistentes.³ Esta bactéria é reportada como um dos patógenos Gram-negativos mais comuns em hospitais logo a seguir a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo causa de infeções nosocomiais (adquiridas 48 horas após internamento) no trato respiratório inferior, corrente sanguínea e trato urinário, provocando doenças como a pneumonia, sépsis, infeções cirúrgicas e urinárias.^{8,9} É considerada a segunda bactéria a seguir à *Escherichia coli* na causa de sépsis e infeções urinárias.^{6,8}

Nos animais é também motivo de preocupação, uma vez que quando infetados provoca mastites que levam à perda de leite e à morte do gado.³

Os principais fatores de risco para a aquisição desta bactéria são:^{7,10}

- Utilização prévia de antibióticos (3 meses antes da hospitalização);
- Hospitalização prévia e tempos de internamento longos;
- Elevado uso de antibióticos (pressão seletiva);
- Ventilação mecânica, cateterização arterial e venosa e outros procedimentos invasivos;
- Diabetes *mellitus*;
- Sistema imune comprometido;
- Baixo peso em prematuros.

Os alvos mais comuns são normalmente recém-nascidos de risco, crianças, imunodeficientes ou imunocomprometidos, onde devido à sua eficiente colonização juntamente com a grande resistência aos antibióticos, tem conseguido persistir e disseminar-se rapidamente.^{6,11}

As fontes ambientais onde se encontra maioritariamente este bacilo incluem: aparelhos de monitorização de pressão sanguínea, de diálise, ventiladores, solução de dextrose, desinfetantes de mãos. No entanto, a fonte de transmissão mais comum são as mãos.⁶ Segundo um estudo realizado em 2013, as infeções por *K.pneumoniae* são superiores em hospitais de internamentos mais longos do que nas unidades de cuidados intensivos de curta estadia.^{8,12}

É considerada uma grande ameaça em casos de infeções invasivas, tendo aumentado nos últimos anos o problema da escolha de antibióticos para o seu combate. O elevado risco de transmissão e propagação das resistências ainda aumentam mais esta ameaça.

FATORES DE VIRULÊNCIA

Klebsiella pneumoniae possui vários fatores de virulência, nomeadamente:

- A cápsula, elemento muito importante para a patogenicidade da bactéria, uma vez que é a primeira a interagir com os anticorpos ou recetores celulares da célula hospedeira, consegue proteger o organismo das moléculas bactericidas do soro pela camuflagem dos antígenos. Por intermédio de mutações ou aquisição de plasmídeos, devido a pressão do ambiente hospedeiro, *Klebsiella pneumoniae* vai evoluindo as características da superfície capsular, mimetizando as células humanas impedindo a resposta imune da célula hospedeira;⁵

- O lipopolissacarídeo (LPS) ou antígeno O, constituído por 3 domínios, sendo um o Lípido A, hidrofóbico, que além de ligar o LPS à membrana externa é também uma endotoxina que após lise celular é libertada e consegue estimular o sistema imunitário, um oligossacárido e por fim o antígeno O. Este último, dependendo da sua constituição pode ou não ser reconhecido pelos fatores bactericidas do soro;⁵

- As suas fímbrias adesivas que aumentam a ligação da bactéria ao epitélio através da capacidade de aglutinar eritrócitos e da ligação sensível à manose facilitando a invasão do hospedeiro. Estes fatores adesivos estão muito associados à formação de biofilmes;^{5,7}

- Os sideróforos, compostos que capturam o ferro, são produzidos e secretados pela bactéria para removerem o ferro das proteínas do hospedeiro que se ligam a ele (hemoglobina, mioglobina, transferrina). Este é um importante fator de virulência uma vez que o ferro é um importante cofator no metabolismo bacteriano;^{5,7}

- A enzima urease permite o seu crescimento no trato urinário, pois hidrolisa a ureia a amônia e carbamato, o que aumenta o pH da urina e exacerba a infecção;⁵

A formação de biofilmes, facilitada pela cápsula através de ligações eletrostáticas, de Van der Waals e ligações específicas ligando-recetor, é considerada a maior causa para a falha dos dispositivos médicos implantados, pois permitem uma sobrevivência longa das bactérias e uma menor suscetibilidade aos antibióticos.^{5,13}

3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Os microrganismos podem desenvolver resistência logo após a introdução do antibiótico na terapêutica. Os mecanismos de resistência mais importantes são:

➤ Alteração do local de ação

Neste mecanismo, o antibiótico deixa de conseguir ligar-se corretamente ao alvo devido à perda de afinidade com o local de ligação. A alteração do alvo do fármaco pode advir de diversas alternativas, uma alteração da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de ADN (ácido desoxirribonucleico).^{14,15}

A alteração da estrutura do peptidoglicano consiste na inibição das enzimas que participam na construção do mesmo. Por exemplo, a presença de uma mutação nos domínios de ligação das proteínas que se ligam às penicilinas, resulta na diminuição da afinidade para os antibióticos beta-lactâmicos.^{14,15}

A interferência na síntese proteica é um processo que influencia os antibióticos que interferem nesta via como os aminoglicosídeos, tetraciclina e macrólidos, assim como a rifampicina, que interfere com a transcrição, na ARN polimerase (ácido ribonucleico polimerase). A resistência a estes antibióticos é conseguida com a alteração do respetivo alvo.^{14,15}

Por último, a interferência na síntese de ADN afeta antibióticos como as fluoroquinolonas (interagem com a ADN girase e enzimas topoisomerase IV), uma vez que mutações nestas enzimas impedem a ligação do antibiótico.^{14,15}

➤ Redução da concentração intracelular de antibiótico

▪ Redução da permeabilidade da membrana externa

A permeabilidade reduzida da membrana externa resulta numa captação reduzida de antibiótico para o interior da bactéria.^{14,15}

As bactérias Gram-negativas, como *K.pneumoniae*, possuem uma membrana externa, constituída por fosfolípidos e lípido A do lipopolissacarídeo, que diminui a penetração dos fármacos hidrofílicos, sendo o transporte alcançado por proteínas que formam poros na membrana externa, as porinas (hidrofílicas).^{14,15}

Exemplos como os beta-lactâmicos, o cloranfenicol e fluoroquinolonas entram nas Gram-negativas via estas proteínas. Assim sendo, alterações quer em número, alteração da conformação ou seletividade das porinas vão alterar a difusão destes antibióticos.^{14,15}

Em *K.pneumoniae* a ausência OmpK35, OmpK36 e OmpK37 tem ligação direta com a resistência aos antibióticos, nomeadamente aos carbapenemos.¹⁶

- Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas membranares que exportam os antibióticos para fora da célula e mantêm as suas concentrações intracelulares em níveis reduzidos limitando a sua ação. Este mecanismo de resistência afeta todas as classes de antibióticos, especialmente aqueles cujo mecanismo de ação é intracelular como é o caso dos macrólidos, das fluoroquinolonas e tetraciclina.^{14,15}

Como as bombas de efluxo possuem a capacidade de expelir um largo espectro de diferentes antibióticos, este mecanismo contribui bastante para a multirresistência bacteriana.^{14,15}

- **Inativação ou modificação enzimática do fármaco**

Este último mecanismo inclui a produção de enzimas que degradam ou modificam o próprio fármaco através de processos bioquímicos como a hidrólise, a transferência de um grupo ou mecanismos *redox*. As enzimas são geralmente excretadas pela bactéria inativando os antibióticos antes de estes atingirem o alvo dentro da bactéria.¹⁴

Relativamente ao processo de hidrólise um exemplo bem conhecido são as beta-lactamases (beta-lactamases de largo espectro, carbapenemases, etc.) que quebram o anel beta-lactâmico das penicilinas e cefalosporinas.¹⁴

A inativação do antibiótico pela transferência de grupo é associada ao grupo de enzimas transferases, que inativam aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrólidos ou a rifampicina por substituição química (grupos adenil, fosforil, acetil) alterando a ligação do fármaco ao alvo.¹⁴

No que diz respeito à inativação do antibiótico por processo *redox*, a oxidação ou redução são pouco associadas a bactérias patogénicas.¹⁴

Uma espécie bacteriana pode possuir mais que um tipo de mecanismo de resistência. A prevalência de um dado mecanismo vai sempre depender da natureza do antibiótico, do alvo, da própria estirpe e se a resistência é mediada por mutações cromossômicas ou um plasmídeo resistente.¹⁴

A resistência bacteriana pode ser natural sendo intrínseca do organismo e específica para determinados antibióticos, por exemplo pela ausência de local de ação, de transporte ou impermeabilidade celular, ocorrendo sem uma exposição prévia ao antibiótico. Por outro lado, pode ser adquirida, através de alterações genéticas quer pela ocorrência natural de mutações espontâneas durante o crescimento quer pela transferência horizontal de genes dos organismos resistentes para os sensíveis, associados a estruturas de ADN móveis como os plasmídeos, transposões e integrões.^{15,17}

As mutações, erros na síntese de ADN durante a replicação e falhas nos sistemas de reparação de ADN, podem ocorrer espontaneamente ou serem induzidas. As primeiras ocorrem em ambientes naturais e têm uma baixa prevalência, enquanto as induzidas devem-se à ação de radiação (ultravioleta, ionizante), espécies reativas de oxigénio (ROS), hidroxilamina ou agentes alquilantes. Se o erro for benéfico para a bactéria tenderá a preconizar na espécie.¹³

Os plasmídeos, elementos genéticos móveis não essenciais para a bactéria, são o grande motor da resistência que favorecem a disseminação de genes resistentes. Normalmente codificam enzimas que inativam os antibióticos ou reduzem a permeabilidade das células. Quando a resistência evolui, os genes de resistência conseguem disseminar-se entre as bactérias através dos mecanismos de transformação, transdução e conjugação (este último mediado por plasmídeos conjugativos).¹⁸

Na transformação, processo espontâneo na natureza, a bactéria adquire moléculas de ADN ou partes dela que estão dispersas no meio (por exemplo de bactérias mortas) e incorpora-as à cromatina. Na transdução, são bacteriófagos (vírus) que transferem de uma bactéria para a outra as moléculas de ADN bacteriano juntamente com o seu.^{6,13,18}

Se a bactéria sobreviver à infeção viral, passa a incluir genes de outra bactéria no seu genoma. Na conjugação, também conhecida como o “sexo bacteriano”, as bactérias transferem os genes através da formação de *pili* entre elas.^{6,13,18}

A pressão seletiva dos antibióticos elimina as bactérias patogénicas suscetíveis e induz a resistência de bactérias remanescentes que acabam por se multiplicar, deixando o antibiótico de ser eficaz para uma infeção futura.

Dentro dos mecanismos de resistência que mais têm emergido recentemente, encontra-se a produção de beta-lactamases, com especial relevância em *K. pneumoniae*.

3.1 Beta-lactamases

Os antibióticos beta-lactâmicos, que inibem a síntese de peptidoglicano nas bactérias, sempre foram os antibióticos de eleição para as infeções por *Klebsiella pneumoniae*, um vez que este bacilo Gram-negativo produz frequentemente enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, esterases de macrólidos, e apresenta sistemas de efluxo que tornam outras classes pouco efetivas no seu tratamento. Contudo, com o tempo esta situação veio a sofrer mudanças devido à emergência das várias classes de beta-lactamases.³

Estas enzimas, que podem ser codificadas por genes localizados no cromossoma ou em plasmídeos, têm como mecanismo a hidrólise da ligação amida dos fármacos beta-lactâmicos e são o mecanismo primário de resistência utilizado pela *K.pneumoniae*.

A classificação molecular, a classificação de Amber, divide as beta-lactamases em quatro grandes classes baseando-se na sequência de aminoácidos das proteínas: a classe A que corresponde às penicilinas, a C às cefalosporinas e a D às oxacilinas, são beta-lactamases com serina no local ativo e a classe B, as metalo-beta-lactamases, que possuem o zinco.^{19,20}

Outra classificação, a classificação Bush-Jacob-Medeiros, foi elaborada de acordo com o perfil hidrolítico e inibidor das enzimas onde os grupos de enzimas são nomeados consoante a classe de beta-lactâmicos em que mais actuam. Na Tabela I, estão descritos os grupos funcionais clinicamente mais importantes compilados com a classificação molecular.²¹

Tabela I: Grupos maioritários de beta-lactamases em bactérias Gram-negativas que conferem resistência ao beta-lactâmicos e respetiva classificação.²¹

GRUPO FUNCIONAL	CLASSE MOLECULAR	NOME COMUM	RESISTÊNCIA CONFERIDA
I	C	Cefalosporinas	Penicilinas, Cefalosporinas
2b	A	Penicilinas	Penicilinas, Cefalosporinas de 1ª geração
2be	A	ESBL	Penicilinas, Cefalosporinas, monobactâmicos
2df	D	Carbapenemases	Carbapenemos e outros beta-lactâmicos
2f	A	Carbapenemases	Todos os beta-lactâmicos
3	B	Metalo-beta-lactamases	Todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos

Atualmente, entre as beta-lactamases, o grupo mais preocupante para os clínicos são as beta-lactamases de largo espectro (ESBL), que pertencem à classe A de Ambler, e as carbapenemases que incluem enzimas das classes A, B e classe D.^{3,19,20}

3.1.1 Beta-lactamases de largo espectro (ESBLs)

Algum tempo após a descoberta da primeira beta-lactamase codificada por um cromossoma (em 1940), surgiram os primeiros plasmídeos que codificavam uma beta-lactamase, a Temoneira beta-lactamase (TEM-1), em *Escherichia coli*. Simultaneamente, uma variante sulfidril da TEM-1, a SHV- I, apareceu em *K. pneumoniae* e em *E.coli*. Estas duas enzimas existiam em elevada prevalência nas *Enterobacteriaceae* antes da introdução de oximino-cefalosporinas, que mostraram ter grande estabilidade contra as beta-lactamases TEM-1 e SHV-I, e passaram a ser intensamente usadas para o tratamento de infecções hospitalares severas.²¹

Contudo, a resistência a este antibiótico rapidamente emergiu, sendo descrita uma nova beta-lactamase com a capacidade de hidrolisar antibióticos beta-lactâmicos de largo espectro, que foi designada de SHV-2. Devido à sua atividade hidrolítica característica, foram nomeadas de beta-lactamases de largo espectro (ESBL).²¹

Hoje em dia, as SHV e TEM foram amplamente substituídas pela beta-lactamase do tipo CTX-M, da família das ESBL, que possuem grande atividade contra as cefalosporinas de largo espectro, tornando-se predominantes em muitos locais de saúde.^{3,22}

O grupo das enzimas TEM e SHV são eficazmente inibidas por inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico, tazobactam ou sulfabactam, uma propriedade que é um teste fenotípico importante para identificar as ESBLs na bactéria. As CTX-M têm a característica que são mais eficazmente inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico.^{5,7}

As ESBL são enzimas que hidrolisam as cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a geração, conferindo também resistência às aminopenicilinas e aztreonam. Os carbapenemos como o meropenem e imipenem, ou cefamicinas como a cefoxitina continuam a ser antibióticos para os quais as bactérias com ESBL são susceptíveis.^{7,23}

A sua distribuição geográfica é total, existindo em todas as regiões do mundo e predominantemente nas enterobactérias.⁷ Na Europa, em 2012, as percentagens de

K.pneumoniae resistentes a cefalosporinas de 3ª geração variavam desde 1,7% (Finlândia) para 74.8% (Bulgária) sendo a média europeia de 25.6%.²

Portugal encontrava-se entre os 25 e 50%, tendo-se mantido nestes valores durante o ano de 2013 como se pode constatar pela Figura I. Dependendo do país a percentagem destas bactérias com ESBL variou dos 62% a 100%.²

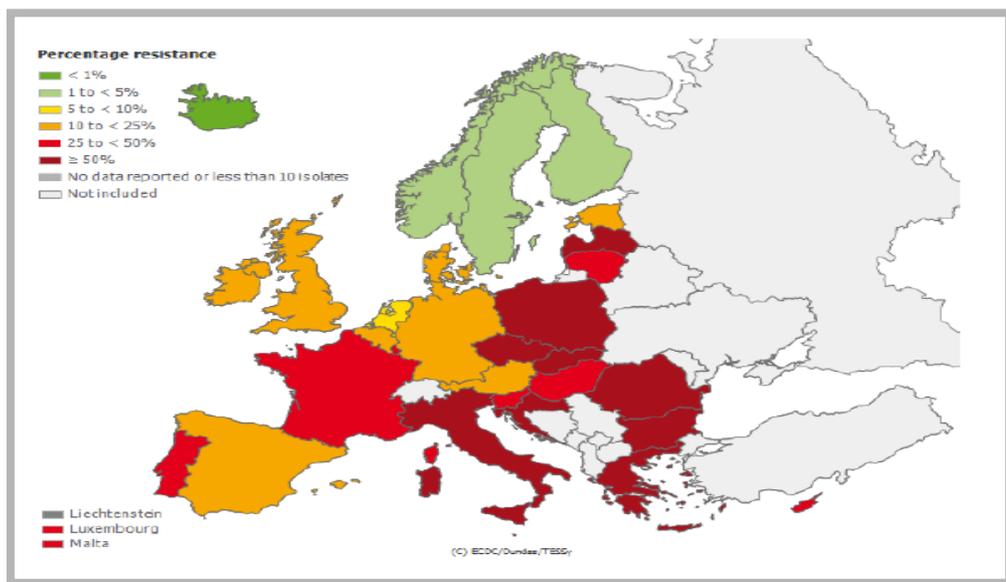


Figura I: Proporção de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a cefalosporinas 3ª geração, em 2013. (adaptado do relatório anual do ECDC, *Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections*, 2014).

3.1.2 Carbapenemases

Os carbapenemos são beta-lactâmicos de largo espectro que se utilizam por norma em último recurso no tratamento de infeções originadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes. O facto de serem antibióticos estáveis na resposta a ESBLs e beta-lactamases AmpC bem como o aumento da incidência de resistências a outros grupos de antibióticos dentro das *Enterobacteriaceae*, por exemplo às fluoroquinolonas, levou a que na prática clínica o seu uso tenha aumentando, levando mais tarde ao surgimento da resistência.^{24,25}

Em 2013, a resistência a este antibiótico estava no top três das ameaças de resistências mais emergentes, estando cada vez mais a emergir dentro das enterobactérias.^{8,24,26}

No ano anterior, 2012, a percentagem de resistência aos carbapenemos variava de 0% em países com a Finlândia, Suécia e Noruega, para 60,5% na Grécia, o país com maior prevalência na Europa.² Em Portugal, as percentagens eram inferiores a 1% tendo aumentado em 2013 para 1,8% como se pode constatar pelos dados recolhidos pelo ECDC, apresentados na Tabela II.^{2,26}

Tabela II: Suscetibilidade de isolados de *K.pneumoniae* a Carbapenemos em Portugal, de 2010 a 2013.²

Pais	Ano	Antibiótico	S	I	R	Total N	%S	%I	%R
Portugal	2010	Carbapenemos	436	1	6	443	98.4%	0.2%	1.4%
Portugal	2011	Carbapenemos	577	1	2	580	99.5%	0.2%	0.3%
Portugal	2012	Carbapenemos	743	1	5	749	99.2%	0.1%	0.7%
Portugal	2013	Carbapenemos	882	6	16	904	97.6%	0.7%	1.8%

A resistência aos carbapenemos é mediada maioritariamente por dois mecanismos, nomeadamente: a produção de uma beta-lactamase (cefalosporinase ou ESBL) combinada com um decréscimo na permeabilidade devido a perda ou alteração de porinas ou a produção de uma carbapenemase.^{27,28}

As carbapenemases representam a família mais versátil das beta-lactamases com atividade hidrolítica para quase todos os beta-lactâmicos, incluindo os carbapenemos, e estão associadas com outras resistências de outras classes como os aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e o clotrimoxazol.^{26,27}

As enzimas do grupo das carbapenemases podem ser de dois tipos, dependendo do mecanismo hidrolítico que possuem no local ativo:

- Serina-carbapenemases, KPC (carbapenemase produzida por *K.pneumoniae*) e OXA-48 (oxacilinas 48), que pertencem à classe A e D do sistema de Ambler, respetivamente, têm a capacidade de hidrolisar os carbapenemos e são parcialmente inibidas por ácido clavulânico.^{25,27}

-Metallo-beta-lactamases, VIM (Verona Integron Metallo- β -lactamases), IMP (Imipenemase Metallo- β -lactamase) e NDM (New Delhi Metallo- β -lactamase) que pertencem à classe B do sistema Ambler, uma vez que possuem pelo menos um átomo de zinco no local ativo. As metallo-beta-lactamases conseguem hidrolisar todos os beta-lactâmicos exceto os monobactâmicos (por ex.: o aztreonam) e são inibidas não por ácido

clavulânico mas por EDTA. Predominantemente as carbapenemases pertencem às beta-lactamases de classe A e B.^{25,26,27,28}

Estas enzimas são codificadas por genes cromossomais ou adquiridas via os plasmídeos e têm sido reportadas na grande parte das *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.^{26,28}

Este trabalho irá focar-se especificamente na enzima KPC, a enzima mais frequente do grupo que nos últimos anos tem emergido.

Em 1996, a primeira KPC foi isolada de uma estirpe de *K.pneumoniae* na Carolina do Norte, nos EUA, e em 2005 foi detetado o primeiro caso de KPC na Europa, em França. Hoje as enzimas KPC estão espalhadas pelo mundo sendo até consideradas endémicas em Israel, da Grécia, Itália e USA. Treze variantes da enzima foram já identificadas contudo as mais comuns são as KPC-2 e KPC-3.^{4,20,24,28}

A KPC está associada a vários surtos e a altas taxas de mortalidade (podem atingir os 50%) em infeções invasivas, uma vez que estirpes que a produzem são geralmente pouco suscetíveis a vários antibióticos.^{28,29}

Estas enzimas são codificadas pelo gene *bla_{KPC}*, que possui um grande potencial de disseminação geográfico e entre diferentes espécies, e é facilmente explicado pela sua localização num transposição do tipo *Tn3*, o *Tn4401*, em plasmídeos de conjugação sendo transmitidos horizontalmente. Geralmente plasmídeos com o gene *bla_{KPC}*, estão associados com determinantes de resistência a outros antibióticos, como os genes que codificam *QnrA* e/ou *QnrB* que elevam a concentração inibitória máxima das fluoroquinolonas e o *rmtB*, que metila o ARN ribossomal, alvo dos aminoglicosídeos. Consequentemente, muitas infeções por Gram-negativos vêm o seu tratamento limitado ou mesmo inexistente.^{21,24,28}

Em Portugal, existem apenas casos esporádicos de KPC e ainda pouco se sabe em relação à epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases.⁴

Num estudo português realizado entre 2006 e 2013, onde participaram 13 hospitais portugueses, foi avaliada a suscetibilidade das bactérias a determinados antibióticos. De 2105 *Enterobacteriaceae*, 165 mostraram uma suscetibilidade reduzida aos carbapenemos (ertapenem), dos quais 26 eram *K.pneumoniae* produtoras de carbapenemases, nomeadamente, KPC, VIM e NMD.⁴

4. MULTIRRESISTÊNCIA

A multirresistência aos antibióticos na Europa tem sido um acontecimento comum nos últimos anos. Em 2013, a percentagem de *K.pneumoniae* que era multirresistente na Europa, considerando a resistência combinada de cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, ultrapassou os 10% em mais de metade dos países que foram analisados.² Países como Itália, Croácia e República Checa, e outros que se pode ver na Figura III, reportaram multirresistências superiores a 25% e inferiores a 50%. As maiores percentagens verificaram-se na Grécia, Polónia e Eslováquia. Portugal reportou valores inferiores a 25%, no entanto superiores a 10%.²

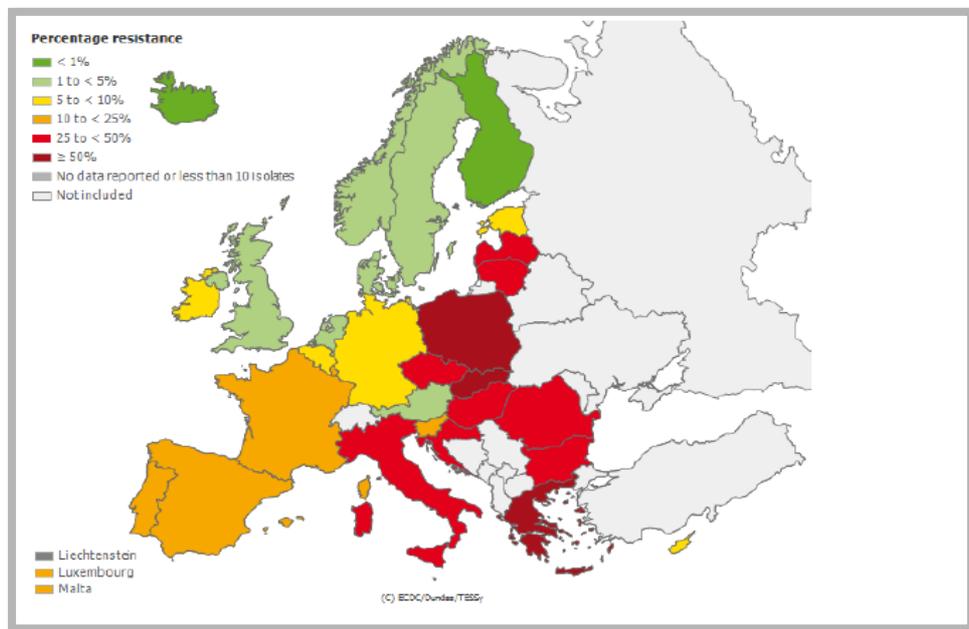


Figura III: Multirresistência reportada em *K.pneumoniae* no ano de 2013. Resistência combinada de cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. (adaptado do relatório anual do ECDC, *Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections*, 2014).

5. Tratamento de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente

O número limitado de opções disponíveis para o tratamento de *K.pneumoniae* multirresistente representa cada vez mais um grande desafio para os clínicos.

Os antibióticos que *in vitro* demonstraram ser ativos contra *K.pneumoniae* produtora de carbapenemases, nomeadamente a KPC são a tigeciclina, gentamicina, fosfomicina, colistina (polimixina E) e polimixina B.²⁸

A tigeciclina é uma gliciliciclina que é frequentemente usada em bactérias produtoras de KPC e bactérias gram-negativas multirresistentes. Contudo não é recomendado no tratamento de infecções sanguíneas e urinárias pois apresenta nestes locais baixas concentrações. Relativamente aos aminoglicosídeos, a resistência a estes tem aumentado, porém quando é detetada alguma suscetibilidade é uma opção terapêutica importante no tratamento de bactérias produtoras de KPC.^{20,29}

As polimixinas são uma classe de antibióticos polipéptidos cíclicos e a polimixina B e E (colistina) são as utilizadas atualmente. A colistina altera a permeabilidade da membrana bacteriana, levando à perda de conteúdo celular e por fim à morte da bactéria. O uso destes antibióticos não era frequente devido à associada nefrotoxicidade e neurotoxicidade, no entanto, muitas vezes são os únicos com atividade contra as bactérias produtoras de KPC pois atingem níveis no soro adequados para tratar infecções sanguíneas.^{20,29} Normalmente, este antibiótico é usado em combinação com outros antibióticos, uma vez que em monoterapia pode ocorrer o crescimento da bactéria novamente.²⁹

Outros antibióticos antigos como a fosfomicina ou a nitrofurantoína têm sido discutidos para o tratamento de infecções urinárias.²⁴

Uma experiência realizada na Grécia entre 2009 e 2010, em 205 doentes com infeção sanguínea por *K.pneumoniae*, verificou-se que um tratamento ótimo em *K.pneumoniae* resistentes a carbapenemos envolvia uma terapêutica combinada de carbapenemos (imipenem, meropenem, ou doripenem), juntamente com tigeciclina e um aminoglicosídeo ou colistina.³⁰

A monoterapia está associada com o aumento de resistências emergentes e com falhas no tratamento, sendo a suscetibilidade da bactéria aos antibióticos superior quando é usada a terapia combinada. O uso das doses máximas aprovadas deve ser tido sempre em conta em infeções severas quando MIC (concentração inibitória mínima) de beta-lactâmicos estão próximos do limite de suscetibilidade.²¹

Num estudo retrospectivo de 2013, realizado em Varsóvia, foram analisadas amostras recolhidas de um tubo endotraqueal, lavagem broncoalveolar, expetoração e fluido pleural, sendo que a expetoração é considerada a menos confiável pela provável contaminação com os microrganismos existentes na cavidade oral ou garganta. Dos 1171 doentes avaliados 19.6% das bactérias detetadas correspondia a *K.pneumoniae*. Os isolados foram testados para identificar mecanismos de resistência a antibióticos e no caso da *K.pneumoniae* foram detetadas ESBLs e KPC. Neste estudo foi também avaliada a suscetibilidade de *K.pneumoniae* produtoras de ESBLs (KP-ESBL(+)) e não produtoras (KP-ESBL(-)) e *K.pneumoniae*

produtoras de KPC (KP-KPC) a determinados antibióticos, onde se constatou que para o tratamento de infeções de KP-ESBL(+) e KP-ESBL(-), estas mostraram ser altamente resistentes a cefalosporinas e quinolonas e suscetíveis apenas para a colistina e carbapenemos (Tabela III). No entanto, as KP-ESBL(-) são também muito sensíveis aos restantes antibióticos.³¹

Para o tratamento de KP-KPC, a terapêutica mais eficaz foi a gentamicina, colistina e tigeciclina, onde demonstraram 100% de suscetibilidade, sendo resistentes para todos os restantes. Verificou-se que a bactéria gram-negativa era 100% sensível à colistina, independentemente da beta-lactamase produzida.³¹

Tabela III: Suscetibilidade de *K.pneumoniae* produtora de ESBL e não produtora ESBL e *K.pneumoniae* produtora de KPC a determinados antibióticos.³¹

Antibiótico	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL-		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL+		<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	
	Suscetibilidade	Resistência	Suscetibilidade	Resistência	Suscetibilidade	Resistência
Ceftazidima	98.4	1.6	0.0	100	0.0	100
Cefotaxima	100	0.0	0.0	100	0.0	100
Imipenem	100	0.0	98.0	2.0	0.0	100
Meropenem	100	0.0	98.0	2.0	0.0	100
SXT	97.6	2.4	25.7	74.3	0.0	100
Piperacilina/ Tazobactam	91.3	8.7	4.0	96.0	0.0	100
Ciprofloxacina	92.9	7.1	0.0	100	0.0	100
Gentamicina	97.6	2.4	21.8	78.2	100	0.0
Colistina	100	0.0	100	0.0	100	0.0
Tigeciclina	94.4	5.6	66.3	33.7	100	0.0

A multirresistência torna-se assim um grande desafio para os clínicos uma vez que nem sempre é identificada pelos métodos de identificação de rotina, o que implica que não é dado o tratamento efetivo resultando em elevadas taxas de falhas de tratamento.²⁴

6. Prevenção e Controlo de Infeções por *Klebsiella pneumoniae*

Algumas estratégias para prevenir a disseminação da *K.pneumoniae* multirresistente passam pela construção de espaços ou enfermarias de isolamento, vigilância mais apertada

destes casos, a limpeza intensiva do ambiente, a contínua educação dos profissionais de saúde envolvidos relativamente aos fatores de risco e medidas que podem tomar para evitar a disseminação e novas políticas na escolha/restricção de antibióticos.²³ Foi estudado que o aumento da resistência a determinados antibióticos está diretamente relacionado com o aumento do consumo desses mesmos antibióticos.³²

As condições de higiene são cruciais para combater a propagação da bactéria, dado que doentes assintomáticos colonizados com *K.pneumoniae* podem servir de reservatório para a bactéria com subsequente transmissão para outros doentes através das mãos dos profissionais de saúde, assim como itens ou unhas artificiais usadas por eles.⁷ *K.pneumoniae* pode ser resistente à cloro-hexidina (utilizado como desinfetante), o que leva a uma vantagem competitiva desta bactéria.³

É extremamente vital uma deteção laboratorial precoce da bactéria e a realização do seu antibiograma, bem como determinar o seu mecanismo de resistência. Os isolados podem aparentar fenotipicamente serem suscetíveis aos carbapenemos atrasando a terapêutica adequada e as medidas de controlo de infeção levando à transmissão dentro das instituições.

7. Conclusão

Actualmente, *Klebsiella pneumoniae* multirresistente é considerada um dos patógenos nosocomiais de maior preocupação para clínicos e investigadores. A resistência deste bacilo Gram-negativo é extremamente disseminável, uma vez que por plasmídeos conjugativos facilmente se propaga entre a espécie ou mesmo entre espécies diferentes.

Como vimos neste trabalho, na Europa, países como Grécia, Polónia e Eslováquia já possuem um percentagem de resistência superior a 50 e em Portugal a situação tende a piorar, sendo já superior a 10 por cento. Actualmente, muitas infeções causadas por este patógeno vêm o seu tratamento limitado ou mesmo inexistente.

Importa assim referir que as unidades de saúde devem atuar rapidamente para evitar o aumento deste valor, desde o cuidado redobrado na prescrição, à preparação de locais próprios para o isolamento dos doentes infetados e consciencialização de todos os profissionais de saúde para os procedimentos de desinfeção. Estes devem ser implementados não apenas como uma necessidade de higienização mas como uma medida preventiva importante, dado que a falha na desinfeção destes profissionais é um dos principais fatores para a disseminação desta estirpe multirresistente.

8. Referências Bibliográficas

1. **Tábua da mortalidade para Portugal 2011-2013**, Instituto Nacional de Estatística [Acedido a 6 de agosto de 2015]. Disponível na Internet em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=211349189&DESTAQUESmodo=2
2. **Annual epidemiological report 2014-Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections**, European Centre for Disease Prevention and Control, 2015 [Acedido a 1 de agosto de 2015]. Disponível na Internet em: http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1292
3. BROBERG, C., PALACIOS, M., MILLER, L.V. – ***Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter**. FI000Prime Reports (2014) 6-64.
4. MANAGEIRO, V., FERREIRA, E., ALMEIDA, J., BARBOSA, S., SIMÕES, C., BONOMO, A.R., CANIÇA, M. – **Predominance of KPC-3 in a survey for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal**. Antimicrobials Agents and Chemotherapy (2015) 50-65.
5. WU, M., LI, X. – ***Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa***. In: Tang, Y., SUSSMAN, M., LIU, D., POXTON, I., SCHWARTZMAN, J. Molecular Medical Microbiology, North Dakota: Academic Press, 2015, ISBN: 978-0-12-397169-2. p. 1547-1564.
6. FISHER, G.R. – ***Klebsiella***. In: CHERRY, J. DEMMLER-HARRISON, J.G., KAPLAN, L.S., STEINBACH, J.W., HOTEZ, P. Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases, Saunders, 2013, ISBN: 978-1-4557-1177-2. p. 1465-1469.
7. GUPTA, A., AMPOFO, K., RUBENSTEIN, D., SAIMAN, L. – **Extended spectrum β -lactamase-producing *K.pneumoniae* infections: a review of the literature**. Journal of Perinatology. 23, (2003) 439-443.
8. VUOTTO, C., LONGO, F., BALICE, P.M., DONELLI, G., VARALDO, E.P. – **Antibiotic resistance related to biofilm formation in *K.pneumoniae***, Pathogens. 3. (2014) 743-758.
9. ORSI, G.B., SCORZOLINI, L., FRANCHI, C., MONDILLO, V., ROSA, G., VENDITTI, M. – **Hospital-acquired infection surveillance in a neurosurgical intensive care unit**. Journal of Hospital Infection. 64, (2006) 23-29.

10. PODSCHUN, R., ULLMANN, U. – ***Klebsiella spp.* As Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods and Pathogenicity Factors**, Clinical Microbiology Reviews, 11, 4 (1998) 589-603.

11. CARPENTIER, M., APPERE, V., SALIOU, P., TINTENIAC, A., FLOCH, H., LE GALL, F., COSSE, M., EL BOUYOUSFI, M., BARON, J., JOURDAIN, S., LEJEUNE, B., NANCY, B., PRAT, G., TANDE, D., VIRMAUX, M., WARGNIER, J., GARLANTÉZEC, R. – **Outbreak of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit (Brest)**, Médecine et maladies infectieuses, 42, (2012) 501-509.

12. LIN, M.Y., LYLES-BANKS, R.D., LOLANS, K., HINES, D.W., SPEAR, J.B., PETRAK, R., TRICK, W.E., WEINSTEIN, R.A., HAYDEN, M.K. – **The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae**, Clinical Infectious Diseases, 57, (2013) 1246-1252.

13. MURRAY, P., ROSENTHAL, K., PFALLER, A.M. – **Microbiologia Médica**, 6ª Ed, São Paulo: Elsevier Editora, 2010, ISBN:978-85-352-7106-5.

14. SCHMIEDER, R., EDWARDS, R. – **Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches**, Future Microbiology, 7, (2012) 73-89.

15. DUARTE, A. – **Agentes antibacterianos: mecanismos de ação e de resistência**. In: BARROSO, H., SILVESTRE, A., TAVEIRA, N. – **Microbiologia Médica**, Lisboa: Lidel, 19, 2014, ISBN: 978-989-752-057-0. p. 221-227.

16. TSAI, Y., FUNG, C., LIN, J., CHEN, J., CHANG, F., CHEN, T., SIU, L.K. – ***Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins Ompk35 and Ompk36 Play Roles in Both Antimicrobial Resistance and Virulence**, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, 4, (2011) 1485-1493.

17. MARTINEZ, J., FAJARDO, A., GARMENDIA, L., HERNANDEZ, A., LINARES, J., SOLANA, L., SANCHEZ, M. – **A global view of antibiotic resistance**, Federation of European Microbiological Societies, (2009) 44-65.

18. DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. – **Antibiotic resistance Mechanisms in Bactéria: Biochemical and Genetic Aspects**, Food Technology and Biotechnology (2008) 11-21.

19. PEREZ, F., ENDIMIANI, A., HUJER, K., BONOMO, R. – **The continuing challenge of ESBLs**, Current Opinion in Pharmacology, (2007) 559-569.

20. HIRSCH, B. E., TAM, H.V. – **Detection and Treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: an emerging cause of multidrug-resistant infection**, Journal of Antimicrobials Chemotherapy, (2010) 1119-1125.
21. BUSH, K. – **Bench- to-bedside review: the role of β -lactamases in antibiotic resistance gram-negative infections**, Critical Care (2010)14:224.
22. TURNER, J.P. – **Extended-spectrum β -lactamases**, Clinical Infectious Diseases, (2005) 273-275.
23. SAIDEL-ODES, L., BORER, A. – **Limiting and controlling of carbapenem-resistance *Klebsiella pneumoniae***, Infection and Drug Resistance, (2013) 9-14.
24. ARNOLD, R., THOM, A.K., SHARMA, S., PHILLIPS, M., JOHNSON, K., MORGAN, J.D. – **Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria**, South Medical Journal (2011) 40-45.
25. QUEENAN, M.A., BUSH, K. – **Carbapenemases: the versatile β -lactamases**, Clinical Microbiology Reviews, 20., 3, (2007) 440-458.
26. CANTÓN, R., AKÓVA, M., CARMELI, Y., GISKE, G.C., GLUPCZYNSK, Y., GNIADKOWSK, M., LIVERMORE, M.D., MIRIAGOU, V., NAAS, T. ROSSOLINI, SEIFERT,H., WOODFORD, N., NORDMANN, P. – **Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe**, Clinical Microbiology and Infection, (2012) 413-431.
27. DJAHMI, N., DUNYACH-RENNY, C., PANTEL, A., DEKHIL, M., SOTTO, A., LAVIGNE, J. – **Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries**, BioMed Research International, (2014) 1-11.
28. ROBILOTTI, E., DERESINSKI, S. – **Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae***, F1000 Prime Reports, (2014) 6:80.
29. LEE, C.G., BURGESS, S. D.–**Treatment of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports**, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, (2012) 11:32.
30. DAIKOS, G.L., TSAOUSI, S., TZOUVELEKIS, L.S., ANYFANTIS, I., PSICHOGIOU, M., ARGYROPOULOU, A., STEFANOU, I., SYPSA, V., MIRIAGOU, V., NEPKA, M., GEORGIADOU, S., MARKOGIANNAKIS, A., GOUKOS, D., SKOUTELIS, A. – ***Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Lowering Mortality by antibiotic combination Schemes and the role of Carbapenems**, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58, (2011) 2322-8.

31. GUZEK, A., RYBICKI, Z., KORZENIEWSKI, K., MACKIEWICZ, K., SAKS, E., CHCIAŁOWSKI, A., AND ZWOLINSKA, E. – Etiological Factors Causing lower Respiratory Tract Infections Isolated from Hospitalized Patients, Biology-Neuroscience and Respiration, (2015) 37-44.

32. JOSEPH M.N., BHANUPRIYA, B., SHEWADE, G.D., HARISH, N.B. – Relationship between Antimicrobial consumption and the incidence of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates, Journal of Clinic and Diagnostic Research, 9., 2, (2015) 8-12.