

2.12.99 - Microbiologia

PADRONIZAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE INFECÇÃO PULMONAR, VIA INTUBAÇÃO TRAQUEAL, POR *Klebsiella pneumoniae* KPC

Fernando Ricardo Sousa Carvalho ^{1*}, Weverson Alves dos Reis ¹, Octávio Luiz Franco ²; Jamila Reis de Oliveira ³

1. Estudantes de IC da Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília;
2. Pesquisador da Universidade Católica de Brasília,
3. Orientadora, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Resumo

A alta prevalência e incidência de pneumonia por *Klebsiella pneumoniae* em ambiente hospitalar, com elevada morbimortalidade levanta a necessidade de estudos *in vivo* que possibilitem melhor entendimento da patogênese e comportamento dessa bactéria gram-negativa com elevado potencial de multirresistência, tais como cepas produtoras de carbapenemases (KPC). Modelos animais têm sido úteis no estudo de vias envolvendo a patogênese e novas ideias para tratamento. O objetivo desse trabalho foi padronizar um modelo experimental murino de infecção pulmonar por KPC, proveniente de isolado clínico, através da via inoculação por intubação traqueal.

Autorização legal: Os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo CEUA da UCB.

Palavras-chave : *Klebsiella pneumoniae*, infecção pulmonar, modelo murino.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Faculdade de Ceilândia – FCE/UnB.

Introdução

A resistência bacteriana é um grande problema em ambiente nosocomial, que está diretamente associada ao tempo de hospitalização e custos para os serviços de saúde, tornando-se assim um assunto

mundialmente preocupante (Sifuentes - Osornio, 2000). As bactérias em ambientes hospitalares podem adquirir habilidades de resistências a mecanismos enzimáticos, e dentre as enterobactérias, tem-se a produção de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) que possui mecanismo emergente, o que justifica sua constante vigilância (Bierg et al 2014).

As KPCs são produzidas pelas enterobactérias ou enterobacteriáceas, que são uma família de bacilos Gram-negativos e aeróbicas facultativas. A detecção em isolados clínicos confere resistência aos antibióticos carbapenêmicos e inativam penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Nicoletti et al., 2012).

Os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos envolvem a redução da afinidade pelos alvos da droga (Penicillin Biding Proteins - PBP), a alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana e a inativação ou destruição da droga pela hidrólise do anel β -lactâmico (Shlaes et al, 1997; Rice, 2001; Sousa Jr et al, 2004).

Sabe-se que hoje estudos, usando modelos animais, tem obtido êxito no que diz respeito a novas ideias de tratamento de patogenicidades causadas por *K. pneumoniae carbapenemase* (Irma A.J.M ,2003; Vanashree Yadav, 2002). Esse presente estudo propõe a padronização

da técnica utilizada no modelo experimental murino de infecção pulmonar por KPC, através da intubação traqueal.

Metodologia

A infecção pulmonar foi induzida por *Klebsiella pneumoniae* KPC proveniente de isolado clínico. Foram realizadas curvas de crescimento bacteriano, tréplica, para determinar a relação entre a quantidade de Unidade Formadora de Colônias (UFC) e a leitura de densidade óptica (OD), na fase log de crescimento. A concentração bacteriana a ser inoculada foi determinada após testar concentrações: 10^4 , 10^6 e 10^8 ufc/mL-1 em 18 animais, subdivididos em três grupos com 6 animais cada. Em cada grupo foram analisadas as UFCs nos tempos 24 e 72h pós eutanásia por exsanguinação, em amostras de sangue, pulmão e lavado broncoalveolar (LBA), para a determinação da concentração a ser usada no experimento. A concentração de 10^8 ufc/mL-1 foi elegida para o experimento de infecção.

Trinta camundongos C57BL/6, fêmeas, com oito semanas foram divididos em três grupos: indução de infecção pulmonar; controle negativo (solução salina) e bloqueio de TNF- α mais infecção. As eutanásias obedeceram aos tempos 24h e 72h após inoculação de 50 μ L com 10^8 ufc/mL-1. Foram coletadas amostras de sangue, LBA e pulmão para determinação da quantidade de UFCs.

Em ambas as etapas os animais foram postos, um a um, em uma placa metálica com inclinação de 70°, onde eram fixados com o auxílio de liga plástica à plataforma, assim facilitando o acesso a traqueia (Fig 1.A).

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente (ketamina 75 mg/kg e xilazina 7,5 mg/kg) e colocados individualmente em uma placa metálica com inclinação de 70°. Para a instilação endotraqueal, da solução salina, bem como do inóculo

bacteriano, utilizou-se cateter venoso 22G (Fig 1.B). Após acesso oral à traqueia, procedia-se um teste de movimentação de gota de soro fisiológico, em uma seringa sem o êmbolo, a fim de certificar-se que o cateter estava realmente na traqueia (Fig 1.C). No Grupo 1 administrou-se 50 μ l de solução salina. No Grupo 3 foi realizado o bloqueio do receptor de TNF- α através da administração intraperitoneal do anticorpo numa concentração visando neutralização máxima de TNF (segundo recomendação do fabricante PetroTech[®]) com 15 min de antecedência à inoculação bacteriana.

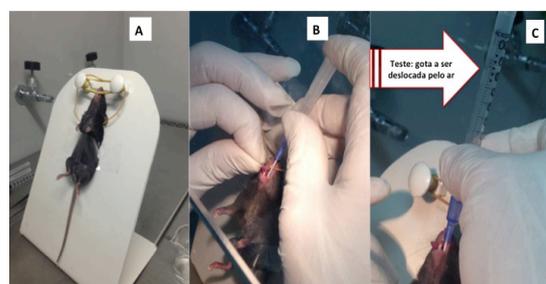


Fig 1. A) Placa metálica com inclinação de 70°. B) Cateter venoso dando acesso a traqueia, C) Teste do deslocamento de ar – certificação de posicionamento traqueal do cateter.

Seguindo aos tempos de 24 h e 72 h após instilação, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Coletou-se amostras de sangue total, por punção cardíaca; LBA, através de cateter venoso 22G, contendo 1 ml de solução salina, o qual era instilado nos pulmões e depois recuperado por aspiração; e pulmões após assepsia e laparotomia. As amostras foram divididas para análises bacteriológicas e futuras análises moleculares. A avaliação bacteriológica foi realizada nas amostras de sangue, LBA e pulmão, pela técnica da diluição seriada e plaqueamento em meio AMH, armazenadas em temperatura ambiente durante 24 h, contando-se então as UFCs.

Resultados e Discussão

O modelo de infecção por intubação traqueal foi escolhido visando uma via mais direta e efetiva de inoculação, sem interferência cirúrgica, como na via de exposição traqueal.

Após realização de réplicas de curva de crescimento, foi determinado a OD de 0,350, equivalendo a concentração de 10^8 ufc/mL-1, foi escolhida após teste piloto, com a qual bactérias puderam ser recuperadas no LBA e pulmão de todas as amostras, sem gerar óbito em nenhum animal. Não foram encontradas bactérias nas amostras de sangue, indicando que o modelo funciona bem como indutor de infecção local e não sistêmica.

No modelo experimental testado a infecção pulmonar foi produzida nos grupos estudados, exceto no controle. Os pulmões coletados revelaram uma diferença nos grupos infectados, apresentando uma coloração mais avermelhada (hiperemiada) e com aspecto granular. A avaliação bacteriológica mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as quantidades de UFCs, nas amostras de pulmão e do LBA, entre os grupos, tanto no tempo de 24h, quanto de 72h.

Estudos realizados com modelo animal experimental, mostraram que a indução de infecção pulmonar por intubação traqueal, é uma das técnicas mais efetivas a fim de assegurar uma infecção primária representativa para uma pesquisa, dentre as possíveis vias de inoculação existentes, sendo essas vias: traqueostomia, aplicação intranasal, via aerossol e intubação traqueal (A.Munder et al 2002; Irma A.J.M,2003; Martin & Matute-Bello, 2011).

O modelo testado de intubação traqueal mostrou-se adequado na obtenção de infecção pulmonar aguda primária, utilizando-se uma concentração de 10^8 ufc/mL-1. A padronização dessa via, utilizando uma plataforma metálica com inclinação de 70° para inoculação, revelou-se satisfatória tendo em vista as técnicas

intranasal, de difícil instilação nas pequenas narinas e a de exposição traqueal, eliminando um ato cirúrgico, bem como garantiu a certeza de concentração e quantidade de inóculo a ser instalado em comparação com a via aerossol e via intranasal respectivamente.

Conclusão

O uso de bactérias provenientes de isolado clínico gerou a necessidade de uma avaliação do seu comportamento biológico, para obtenção de um inóculo mais efetivo na produção da infecção desejada.

O modelo experimental de infecção pulmonar via intubação traqueal mostrou-se adequado para esse tipo de estudo, visto que minimiza efeitos inflamatórios de danos cirúrgicos, como no modelo de traqueostomia, bem como promove uma inoculação pulmonar adequada da carga bacteriana pretendida, para o experimento, em detrimento da dificuldade técnica de inoculação intranasal.

Referências bibliográficas

Martin. T.R; Bello.G.M; Experimental Models and Emerging Hypotheses for Acute Lung Injury; Crit Care Clin 27 (2011) 735–752.

Irma. A.J.M; Bakker Woudenberg; Experimental Models of pulmonary infection; Journal of Microbiological Methods 54 (2003) 295–313.

Yadav. V; Sharma. S et al; Induction & resolution of lobar pneumonia following intranasal instillation with *Klebsiella pneumoniae* in mice; Indian J Med Res 118, July 2003, pp 47-52.

A. Munder , S;Krusch, et al; Pulmonary microbial infection in mice: Comparison of different application methods and correlation of bacterial numbers and histopathology; Exp Toxic Pathol 2002; 54: 127–133.

Borna Mehrad and Theodore J. Standiford; Use of Animal Models in the Study of Inflammatory Mediators of Pneumonia; WAR Journal Volume 40, Number 4, 1999.

Mark A. Miller; et al; Visualization of Murine Intranasal Dosing Efficiency Using Luminescent *Francisella tularensis*: Effect of Instillation Volume and Form of Anesthesia; PLoS ONE 7(2): e31359. doi:10.1371/journal.pone.0031359, 2012.

Sifuentes-Osornio J. Extended-spectrum betalactamases (ESBL) na América Latina: seu impacto clínico. In: 1º Simpósio ESBL: Incidência, importância e soluções. Argentina; 2000.

Nicoletti AG, Fehlberg LCC, Picão RC American J Infect Control (2012) Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 56:4563-4564.

Camila Arguelo Biberg, et al; KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil; Brazilian Journal of Microbiology 46, 2, 501-504 (2015).

Santos, Daniella Fabíola dos; Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial; Dissertação (mestrado); Universidade Católica de Goiás, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, 2006.