

2.12.99 - Microbiologia

## ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO PULMONAR CAUSADA POR *Klebsiella pneumoniae*, EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Weverson Alves dos Reis<sup>1\*</sup>, Fernando Ricardo Sousa Carvalho<sup>1</sup>, Octávio Luiz Franco<sup>2</sup>,  
Jamila Reis de Oliveira<sup>3</sup>

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

### Resumo

A alta prevalência e incidência de pneumonia por *Klebsiella pneumoniae* em ambiente hospitalar, com alta taxa de morbimortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos e neonatos, levanta a necessidade de estudos *in vivo*, com vistas à observação da patogênese da infecção, bem como do comportamento desse bacilo gram-negativo, que tem um elevado potencial de multirresistência, como as conhecidas cepas produtoras de carbapenemases (KPC).

Além de observar o curso clínico da infecção é importante também evidenciar a importância da atuação do sistema imune na patogênese da infecção através do bloqueio do TNF- $\alpha$  que é uma importante citocina do sistema leucocitário.

O objetivo desse trabalho foi estudar a histopatologia da infecção pulmonar causada por *Klebsiella pneumoniae*, em modelo murino por instalação de um inóculo bacteriano proveniente de isolado clínico.

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

**Palavras – chave:** *Klebsiella pneumoniae*; pneumonia; histopatologia.

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

### Introdução

A pneumonia tem sido evidenciada como a maior causa de mortalidade dentre as doenças respiratórias e ocupa o 4º lugar de mortalidade geral no Brasil, excluindo-se as causas externas. Estima-se a incidência mundial em 12 casos por 1000 habitantes/ano (SCHWARTZMANN et al., 2010).

Embora uma variedade de antibióticos esteja disponível no mercado, o tratamento dessas infecções tem se tornado limitado, devido ao surgimento de populações de bactérias resistentes. Esse quadro se agrava mais ainda com a notável capacidade de algumas espécies de bactérias resistirem a múltiplos antibióticos ou a todos (THEURETZBACHER E TONEY, 2006).

A *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo gram-negativo, membro da família das enterobactérias, encontrado em locais como água, solo, plantas e esgoto (BRISSE et al., 2009). Pode ser encontrado colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis. Entretanto, no organismo de indivíduos imunocomprometidos, encontra um ambiente propício para seu crescimento, levando aos quadros de infecção (MARCH et al., 2013; SHON et al., 2013).

As razões pelas quais este microrganismo pode ser tão patogênico estão intimamente ligadas aos aspectos morfológicos e moleculares da bactéria, como por exemplo os

fatores de virulência capsulares e lipopolissacarídeos. A bactéria KPC apresenta sua membrana constituída pelo lipopolissacarídeo que, devido à variação na sua estrutura, confere uma grande diversidade sorológica de antígenos O (LAVIGNE et al., 2013). Já a cápsula apresenta componentes de constituição polissacarídica capaz de proteger a *K. pneumoniae* da fagocitose, além de prevenir a morte dessa bactéria por componentes antimicrobianos presentes no soro. (GIAMARELLOU et al., 2013; MOSCA et al., 2013).

Sabe-se que as citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , exibem um papel fundamental no curso de doenças infecciosas, isso porque exercem funções de defesa como por exemplo a ativação de células leucocitárias. O TNF- $\alpha$  é um potente ativador de polimorfonucleares e macrófagos, levando ao aumento da liberação de proteases, e indução de leucócitos e expressão de moléculas de adesão, que são essenciais para transmigração destas células para os locais de infecção (LAICHALK L.L et al., 1996).

O objetivo desse trabalho foi estudar a histopatologia da infecção pulmonar causada por *Klebsiella pneumoniae*, em modelo murino por instalação intraqueal de um inóculo bacteriano proveniente de isolado clínico.

## **Metodologia**

### Animais

Foram utilizados 30 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com idade entre 6-8 semanas, obtidos do Biotério Central da Universidade Católica de Brasília (UCB), mantidos sob temperatura ambiente, em um ciclo claro escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum* até o momento da indução de pneumonia pela cepa 1410503 de KPC proveniente de isolado clínico. A eutanásia ocorreu após sedação, por exsanguinação.

### Modelo de infecção

Após definida a concentração do inóculo, em experimento piloto prévio, utilizou-se 30 animais, subdivididos em 3 grupos com 10 animais cada, sendo estes: Grupo de controle negativo (Grupo 1); Grupo de infecção pulmonar (Grupo 2) e Grupo de bloqueio de TNF- $\alpha$  seguido de infecção (Grupo 3). As eutanásias dos camundongos obedeceram aos tempos de 24 h e 72 h após inoculação de 50 $\mu$ L com 10<sup>8</sup> UFC/mL.

### Técnica de Inoculação

Para a inoculação, 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. 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. No Grupo 1 administrou-se 50 $\mu$ L de solução salina. No Grupo 3 foi realizado o bloqueio do receptor de TNF- $\alpha$  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.

### Coleta e tratamento das amostras

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 (técnica de exsanguinação); Lavado bronco-alveolar (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 de sangue foram divididas: 100  $\mu$ L para análises bacteriológicas e o restante foi centrifugado, para que o soro fosse separado e armazenado à -80°C para

futuras análises moleculares. A avaliação bacteriológica foi realizada pela técnica da diluição seriada e plaqueamento em meio AMH, armazenadas em temperatura ambiente durante 24 h, contando-se então as CFUs. Amostras de LBA igualmente a anterior, foram diluídas e plaqueadas em meio AMH. Os pulmões foram removidos assepticamente e realizou-se uma secção do lobo inferior direito para análise histopatológica (formol 10%). O restante foi acondicionado em 1ml de solução salina para homogeneização e posterior aliquotagem. Parte (100 µl) foi plaqueada e meio AMH, e armazenada em temperatura ambiente, para avaliação bacteriológica (contagem de UFCs) e o restante armazenado a -80°C para posteriores análises moleculares.

### Resultados e Discussão

A infecção pulmonar foi produzida nos grupos estudados, exceto no grupo controle. Pôde-se recuperar bactérias nas amostras de pulmão e LBA dos grupos casos, mas não foram observados quadros de bacteremia em ambos os grupos, indicando que o método de inoculação produziu uma infecção primária local.

Foram observadas diferenças estatisticamente significante entre as quantidades de UFCs, nas amostras de pulmão e do LBA, entre os grupos, tanto no tempo de 24 h, quanto de 72 h. Com teste de Tukey observou-se diferença entre os grupos: controle x infecção, controle e bloqueio e infecção e bloqueio.

Os cortes histopatológicos dos pulmões dos grupos inoculados mostraram presença de infiltrado neutrofílico em alveolos pulmonares, mas com maior intensidade inflamatória (congestão perivascular, bronquiolite, hemorragia) no grupo infectado sem bloqueio de TNF- $\alpha$ . Os cortes com 72h seguiram o padrão inflamatório entre os grupos, no entanto com um maior número de macrófagos.

Yadav et al, em um estudo publicado em 2003 conseguiram induzir pneumonia por via intranasal, inoculando-se  $10^4$  UFC/mL da cepa B5055, encontrando uma maior carga bacteriana com 72 horas de infecção. Tal estudo contrapõe os resultados aqui obtidos, pois a partir da cepa KP 1410503, proveniente de isolado clínico, utilizou-se uma concentração de  $10^8$  UCF/mL, isso se deve por diferenças no perfil de crescimento de cada cepa. Salienta-se a coerência com o estudo de Yadav et al, onde nos grupos com tempo de infecção de 72 horas eram maiores as cargas bacterianas.

O bloqueio de TNF-a resultou em diminuição do influxo de neutrófilos e numa menor extensão inflamatória pulmonar, sobretudo na fase mais aguda. Como o TNF não é uma citocina quimiotática direta para polimorfonucleares, tal redução deve ser devido a uma subregulação na expressão de moléculas de adesão. Adicionalmente, não percebeu-se um número reduzido de bactérias no pulmão e no LBA no grupo com TNF-a bloqueado, logo o controle da infecção deve ter ocorrido por meio da imunidade inata.

Machado et al (2004) descreveram sobre a importância do TNF-a na defesa contra bactérias. Sendo essa uma citocina pró-inflamatória, é produzida na fase aguda da infecção e promove, por meio da ação no hipotálamo, inibição do crescimento bacteriano através da febre. É também responsável pela expressão de moléculas de adesão (seletina P e ICAM) auxiliando a passagem de células do vaso para o tecido e também para produção de NO (óxido nítrico) para destruição das bactérias. Sendo isso evidenciado pelo grupo de infecção sem bloqueio de TNF-a, onde o infiltrado leucocitário foi maior.

## Conclusão

Nesse trabalho foi possível induzir pneumonia por *Klebsiella pneumoniae* em modelo murino. A histologia dos diferentes grupos foi capaz de retratar o curso clínico distinto para cada situação, seja de infecção, controle ou bloqueio de TNF- $\alpha$ .

Houve diferença no mecanismo da infecção não somente entre os grupos citados, mas também entre os tempos de infecção em cada grupo. A ausência do TNF- $\alpha$  foi importante numa redução do processo inflamatório inicial, mas houve uma equiparação entre os grupos infectados com e sem bloqueio de TNF- $\alpha$ , no tempo de 72h, nas características do infiltrado crônico observado, indicando o papel da imunidade inata na condução do processo.

## Referências bibliográficas

- SCHWARTZMANN PV, VOLPE GJ, et al; Pneumonia comunitária e pneumonia hospitalar em adultos, Medicina (Ribeirão Preto) 2010;433: 238-48
- LAICHALK LL, KUNKEL SL, et al; Tumor Necrosis Factor Mediates Lung Antibacterial Host Defense in Murine *Klebsiella* Pneumonia. Infection and Immunity. Vol 64. No 12. p. 5211-5218. 1996.
- MUNDER A, KRUSCH S, et al; Pulmonary microbial infection in mice: Comparison of different application methods and correlation of bacterial numbers and histopathology. Exp Toxic Pathol. Vol 54. p. 127-133. 2002.
- MEHRAD B & STANDIFORD TJ; Use of Animal Models in the Study of Inflammatory Mediators of Pneumonia. WAR Journal. Vol 40. No 40. p. 167-174. 1999.
- THEURETZBACHER, U. e TONEY, J. H. 2006. Nature's clarion call of antibacterial resistance: Are we listening? Current Opinion in Investigational Drugs, 7, n.2, p.158 – 166.
- BRISSE, S., FEVRE, C., PASSET, V., ISSENHUTH-JEANJEAN, S., TOURNEBIZE, R., DIANCOURT, L., AND GRIMONT, P. 2009. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. PloS one
- MARCH, C., CANO, V., MORANTA, D., LLOBET, E., PEREZ-GUTIERREZ, C., TOMAS, J.M., SUAREZ, T., GARMENDIA, J., AND BENGOCHEA, J.A. 2013. Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. PloS one 8, 765-786.
- LAVIGNE, J.P., CUZON, G., COMBESCURE, C., BOURG, G., SOTTO, A., AND NORDMANN, P. 2013. Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla KPC-2 carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. PloS one 8, e67847.
- GIAMARELLOU, H., GALANI, L., BAZIAKA, F., AND KARAIKOS, I. 2013. Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy 57, 2388-2390.
- YADAV V, SHARMA S, et al; Induction & resolution of lobar pneumonia following intranasal instillation with *Klebsiella pneumoniae* in mice. Indian J Med Res. 2003, 118, 47-52.
- MACHADO, P.R.L., et al,. Mecanismos de resposta