

MODELO EXPERIMENTAL DE TRATAMENTO DE SEPSE POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORA DE BETALACTAMASE DE AMPLO ESPECTRO

Experimental model for treatment of extended spectrum betalactamase producing-Klebsiella pneumoniae

Paula Virginia Michelson **TOLEDO**^{1,2,6}, Felipe Francisco **TUON**^{1,3,6}, Larissa **BAIL**⁴, Francine **MANENTE**⁴, Polliane **ARRUDA**¹, Ayrton Alves **ARANHA-JUNIOR**^{1,5}

Trabalho realizado no ¹Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR; ²Departamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR; ³Departamento de Saúde Comunitária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; ⁴Departamento de Farmácia e Bioquímica, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa; ⁵Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba; ⁶Programa de Pós-graduação em Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

DESCRIPTORIOS - *Klebsiella pneumoniae*. Sepsis. Modelos animais.

Correspondência:

Paula Toledo
Email: paulavmtoledo@yahoo.com.br

Fonte de financiamento: A pesquisadora Paula Virginia Michelson Toledo recebeu bolsa de doutorado pela CAPES.
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 30/01/2014

Aceito para publicação: 13/05/2014

HEADINGS - *Klebsiella pneumoniae*. Sepsis. Models, animal.

RESUMO – Racional: Modelos animais são importantes para avaliar a eficácia de antimicrobianos e a validação do sítio de infecção e a carga bacteriana. **Objetivo:** Definir a concentração do inóculo bacteriano, a dose e o tempo de administração de antimicrobianos a fim de validar um modelo experimental para o tratamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de amplo espectro em sepsis letal. **Método:** Inóculos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido de $1,5 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) a $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram administrados via injeção peritoneal em ratos Wistar adultos. Sobrevida e dados microbiológicos de hemoculturas e culturas quantitativas de fluido peritoneal foram avaliados inicialmente em animais não tratados. Animais inoculados com $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram tratados dose única de meropenem (30mg/kg) e animais inoculados com $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram tratados imediatamente com meropenem (50 mg/kg) por 24 horas e os desfechos foram avaliados após 24 horas da inoculação. **Resultados:** Soluções com $1,5 \times 10^9$ e $6,0 \times 10^9$ UFC/ml não foram letais. Inóculos de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml e de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram letais em 80% e 100% dos animais respectivamente. Sepsis letal ($1,0 \times 10^{10}$ CFU/mL) com tratamento imediato e por 24 horas apresentou 40% de mortalidade, comparada com 80% nos controles ($p=0.033$). Culturas quantitativas de fluido peritoneal apresentaram $\leq 10^4$ UFC/ml enquanto que controles sem tratamento apresentaram $> 10^5$ UFC/ml ($p=0.001$). **Conclusão:** Modelo experimental com inóculo de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml submetido ao tratamento imediato e por 24 horas foi capaz de avaliar resposta microbiológica e de sobrevida podendo ser modelo de embasamento e de controle para tratamento de sepsis letal por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

ABSTRACT - Background: Animal models are useful to evaluate the efficacy of antimicrobials in experimental sepsis. **Aim:** To elucidate the steps of producing an experimental model for the treatment of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* sepsis. **Methods:** Several ESBL inoculums ranging from 1.5×10^9 colony-forming units per milliliter (CFU/mL) to 2.0×10^{10} CFU/mL were administered by peritoneal injection in adult Wistar rats. Outcomes and microbiological data of quantitative peritoneal and blood cultures were observed in untreated animals. Animals which received 2.0×10^{10} CFU/mL inoculums were treated with single meropenem dose (30mg/kg) after one hour and those which received 1.0×10^{10} CFU/mL inoculums were treated immediately with three doses of meropenem 50 mg/kg. Outcomes were observed for 24 hours after inoculation. **Results:** Solutions with 1.5×10^9 and 6.0×10^9 CFU/mL were not lethal within 24 hours. Inoculums of 1.0×10^{10} CFU/mL were lethal in 80% and solutions with 2.0×10^{10} CFU/mL were lethal in 100% of animals. ESBL lethal sepsis (1.0×10^{10} CFU/mL) was treated immediately with 50 mg/kg of meropenem every eight hours for 24 hours and presented 40% mortality compared with 80% mortality of the control group ($p=0.033$). Quantitative cultures of peritoneal fluid presented 10^4 CFU/mL or less for treated animals compared to more than 10^5 for untreated animals ($p=0.001$). **Conclusion:** Inoculums of 1.0×10^{10} CFU/mL achieved the best results to study a model of lethal sepsis and this model of treatment of carbapenem-susceptible *Enterobacteriaceae* can serve as control to further evaluation of treatment of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* models.

INTRODUÇÃO

A incidência de enterobactérias produtoras de carbapenemases aumentou consideravelmente em nosso meio e o tratamento ideal para estes microrganismos não está estabelecido. Alguns estudos retrospectivos sugerem que a associação de antimicrobianos pode ser benéfica^{10,11,12}. A resposta de diferentes antibióticos no tratamento de microrganismos específicos pode ser avaliada através de mortalidade global, tempo de sobrevida e taxa de cura microbiológica. Tais desfechos podem sofrer influência de outros fatores clínicos e desta forma, modelos experimentais são úteis na avaliação da combinação de antimicrobianos para o tratamento de enterobactérias produtoras de carbapenemases até que ensaios clínicos avaliem esta hipótese. Um modelo experimental de tratamento de enterobactérias produtora de betalactamase de espectro estendido (ESBL), sensível a carbapenêmicos seria útil para controlar modelos de tratamento de enterobactérias produtoras de carbapenemases.

Modelos animais de tratamento de enterobactérias em peritonite, pneumonia e de infecção de partes moles após imunossupressão foram revisados e nenhum foi encontrado definindo o inóculo bacteriano e o tempo de terapia para ESBL. Modelos de peritonite em ratos utilizaram inóculos de 10^5 a 10^{10} unidades formadoras de

colônias por mililitro (UFC/ml) de *E. coli*. Sepse letal para ratos foi estudada com inóculo de 10^9 a 10^{10} UFC/ml^{2, 3, 5} e não letal com inóculos de 10^5 a 10^8 UFC/ml^{1,13}. Os modelos que estudaram *Klebsiella pneumoniae* foram de peritonite em camundongos neutropênicos (3×10^5 UFC/ml)⁴, infecção de partes moles em ratos neutropênicos (10^6 / 10^8 UFC/ml)^{6,8} e modelos de pneumonia em ratos (10^6 / 10^{10} UFC/ml)⁷. Inóculos de 10^{10} UFC/ml de *Enterobacter* spp também foram avaliados em modelos de pneumonia em ratos⁹.

É necessária a padronização de concentrações de inóculo de *Klebsiella pneumoniae* a fim de determinar um modelo de sepsse letal capaz de ser reprodutível e válido para avaliar a eficácia da terapia antimicrobiana na redução da mortalidade e no tempo de sobrevivência de animais tratados com terapia padrão. O número de doses de antimicrobiano e o tempo de tratamento também devem ser padronizados. Uma vez validado, o modelo poderia servir de controle para o tratamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

Desta forma, o presente estudo visa validar um modelo experimental de sepsse letal e tratável de peritonite por *K. pneumoniae* ESBL em ratos não neutropênicos, através da definição da concentração ideal de inóculo, bem como da posologia a ser empregada de meropenem.

MÉTODO

Animais

O experimento foi realizado com ratos Wistar adultos (20–24 semanas) de ambos os sexos com peso médio de 200–340 g. Foram mantidos sob temperatura (22–24° C) e umidade adequadas, em ciclo dia-noite artificial, recebendo dieta-padrão e água ad libitum. A comissão de ética para o uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa aprovou o estudo. Foram incluídos 50 animais nas diferentes fases deste experimento.

Cepas bacterianas, produção do inóculo e indução da sepsse

Uma cepa-padrão de *K. pneumoniae* ESBL (ATCC 700603) foi inoculada em meio Mueller-Hinton e incubada a 37° C por 24 horas. As colônias foram diluídas e homogeneizadas em solução salina isotônica estéril para formar inóculos.

As soluções eram centrifugadas a 2500 rotações por minuto por cinco minutos e as concentrações eram aferidas. Inicialmente, utilizou-se densímetro (Densimat Biomerieux®) capaz de medir densidades de 0,5 a 7,5 McFarland para aferir a concentração do inóculo. Concentrações de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml eram obtidas em 5 McFarland. A fim de obter medidas mais acuradas de inóculos, utilizou-se espectrofotômetro (Lambda 25 UV/Vis Spectrophotometer Perkin Elmer®) com densidade óptica de 625 nm. Inóculos com $1,5 \times 10^{10}$ e $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml correspondiam às soluções de cloreto de bário e ácido sulfúrico de 50 (5% de H_2SO_4 e 5% de $BaCl_2$) e 67 (3,3% de H_2SO_4 e 6,7% de $BaCl_2$) McFarland e as absorvâncias destas soluções eram de 2.343 e 2.764 respectivamente. De acordo com a lei de Beer-Lambert, absorvâncias acima de 0.890 não são acuradas para medir contagem de microorganismos; assim, após diluição de 1:20, os inóculos de $1,5 \times 10^{10}$ e $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml apresentaram absorvâncias de 0.543 e 0.633. Os de $6,0 \times 10^9$ UFC/ml e $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram obtidos diluindo 0,4 ml e 0.6 ml da solução de $1,5 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Todos os inóculos produzidos para injeção intraperitoneal eram semeados em Mueller-Hinton e incubados por oito horas para confirmar contagem de colônias antes da indução da sepsse.

Sepsse foi induzida através de injeção intraperitoneal dos inóculos descritos com agulha de 26 gauge no quadrante inferior direito do abdome. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas.

A letalidade do inóculo foi definida através da observação após injeção de solução com $1,5 \times 10^9$ UFC/ml em

seis animais, $6,0 \times 10^9$ UFC/ml em outros seis, $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml em dez animais e $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml em outros dez.

Terapia antimicrobiana

Dois grupos com sepsse letal por *K. pneumoniae* ESBL foram tratados com meropenem (Astra-Zeneca®). Doze ratos receberam inóculos de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml, sendo seis tratados com dose única de meropenem 30 mg/kg administrada uma hora após a indução da sepsse. Vinte animais receberam inóculos de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml e 10 foram imediatamente tratados com 50 mg/kg de meropenem a cada oito horas por 24 horas (três doses). Os animais foram distribuídos homogeneamente em termos de peso e sexo entre os grupos controle e de tratamento.

Avaliação do desfecho

A resposta ao inóculo e ao tratamento foram avaliados através da taxa de letalidade, tempo de sobrevivência, positividade de hemoculturas e de culturas quantitativas de líquido peritoneal. Os animais que não apresentaram sepsse letal após 24 h, sofreram eutanásia com doses letais de xilazina e quetamina.

Hemoculturas (0,5–1 ml) foram coletadas através de punção intracardiaca após o óbito e incubadas em meio "brain heart infusion". O líquido peritoneal foi obtido após laparotomia e injeção de 5 ml de solução salina isotônica, homogeneização e aspiração. Um microlitro deste aspirado foi semeado em agar McConkey para culturas quantitativas. Além disso, culturas quantitativas foram realizadas após diluição de 1:100 do aspirado e semeadura de 1µL em agar McConkey.

Análise estatística

Variáveis contínuas foram descritas como média e desvio-padrão e frequências como porcentagens. Variáveis categóricas foram comparadas através do teste de Mann-Whitney. Teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a sobrevivência dos grupos sem tratamento. Foi utilizado o nível de significância de 0,05. Os dados foram computados em Excel (Microsoft, New York, USA) e a análise estatística foi realizada usando o programa SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, USA). Gráficos e análise estatística pelo teste de Mann-Whitney foram realizados pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, USA).

RESULTADOS

Soluções de *K. pneumoniae* ESBL com concentrações de $1,5 \times 10^9$ a $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram avaliadas em termos de promoção de letalidade em ratos Wistar adultos e observou-se que inóculos com $1,5 \times 10^9$ UFC/ml e $6,0 \times 10^9$ UFC/ml não eram letais em seis (100%) e quatro (80%) dos animais respectivamente submetidos à estas concentrações de microorganismos. Inóculos de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram letais em oito (80%) dos animais. Soluções de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram letais em 10 (100%) ratos (Figura 1).

Seis dos 12 que receberam inóculos de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml foram tratados com dose única de 30 mg/kg após uma hora da indução da sepsse e a mortalidade foi de 83,3% (cinco de seis ratos) no grupo que recebeu tratamento e de 100% no controle sem tratamento. No grupo de 20 animais inoculados com $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml, 10 foram tratados imediatamente com 50 mg/kg de meropenem a cada oito horas por 24 horas e observou-se que quatro (40%) dos tratados e oito (80%) dos controles evoluíram para óbito ($p=0.042$, Figura 2).

Culturas quantitativas de fluido peritoneal realizadas no grupo de ratos inoculados com $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml apresentaram 10^4 UFC/ml ou menos para nos animais tratados e acima de 10^5 UFC/ml nos controles ($p=0.001$). Enquanto que no grupo de ratos inoculados com $2,0 \times 10^{10}$ UFC/ml, as culturas quantitativas de fluido peritoneal apresentavam contagens de colônias acima de 10^5 UFC/ml independente do tratamento (Figura 3).

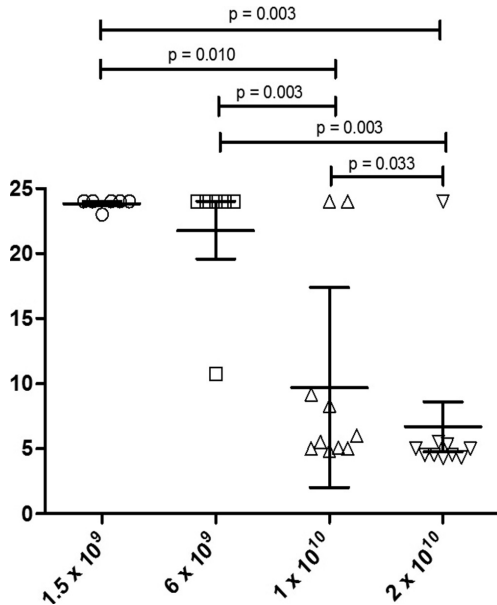


FIGURA 1 – tempo de sobrevivência, em horas, dos animais não tratados de acordo com a concentração do inóculo administrado (UFC/ml).

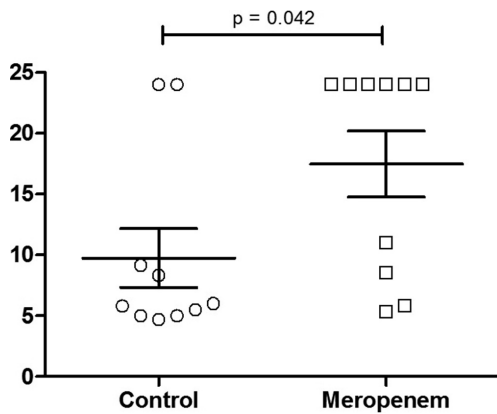


FIGURA 2 – Tempo de sobrevivência (horas) após a injeção de solução de 1.0x10¹⁰UFC/ml em animais sem tratamento (controles) e nos tratados imediatamente com 50mg/kg de meropenem.

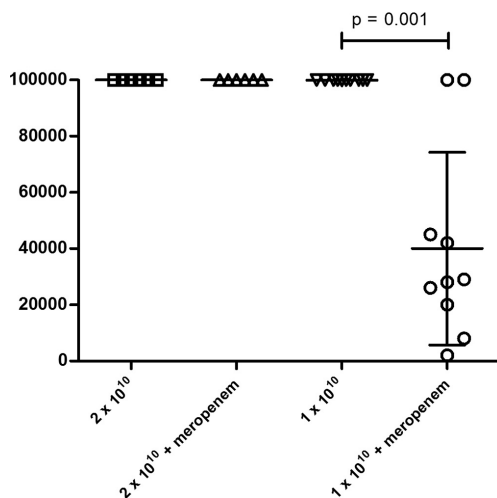


FIGURA 3 – Culturas quantitativas de fluido peritoneal em UFC/ml nos animais não tratados e tratados que receberam respectivamente soluções com 2,0x10¹⁰UFC/ml e tratamento com 30mg/kg de meropenem em dose única e soluções de 1,0x10¹⁰UFC/ml e tratamento com 50mg/kg de meropenem em 3 doses.

Estudos prévios descreveram modelos experimentais de inóculos para sepse peritoneal de enterobactérias não *K.pneumoniae*^{2,5,13}. Modelos de infecção de partes moles em ratos neutropênicos foram realizados com inóculos pouco concentrados para avaliar dados microbiológicos e não a mortalidade relacionada ao tratamento antimicrobiano⁸. Este estudo descreve a padronização para atingir um modelo de sepse letal por *K. pneumoniae* ESBL, passível de tratamento para avaliar a resposta ao antimicrobianos em ratos imunocompetentes.

Inóculos com concentrações de 10⁸ e 10⁹ UFC/ml promovem sepse não letal em ratos imunocompetentes. Sepse induzida por soluções nestas concentrações, pode ser útil para estratificar dose de antimicrobianos e comparar a eficácia antimicrobiana através de resultados microbiológicos, mas não permite avaliar o desfecho em termos de sobrevivência. Inóculos concentrados excessivamente promovem sepse letal, porém não permitem avaliar diferenças de mortalidade e de culturas quantitativas entre animais tratados e controles. No presente estudo, observou-se que a concentração de 2,0x10¹⁰UFC/ml nos inóculos foi excessiva em termos de observar diferenças de sobrevivência e culturas quantitativas.

Inóculos de 1.0x10¹⁰ UFC/ml, aferidos acuradamente por espectrofotometria produziram sepse letal passível de ser tratada imediatamente após a indução da sepse, com antibioticoterapia por 24 horas. Tal modelo permitiu comparar sobrevivência e dados microbiológicos de animais tratados e controles. Indaga-se se a administração imediata de antimicrobianos poderia reduzir a carga bacteriana do inóculo; porém, observou-se a positividade de culturas apesar desta técnica e além disso, a mesma baseou-se em outros modelos prévios^{2,5}.

Este estudo valida um modelo experimental de sepse induzindo peritonite letal entre seis e 24 horas. O modelo possibilita a avaliação da eficácia antimicrobiana através de hemoculturas, culturas quantitativas e sobrevivência dos animais.

CONCLUSÃO

O modelo experimental com inóculo de 1,0x10¹⁰UFC/ml submetido ao tratamento imediato e por 24 horas foi capaz de avaliar resposta microbiológica e de sobrevivência podendo ser modelo de embasamento e de controle para tratamento de sepse letal por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às técnicas Maria da Luz Pereira e Marilene Terezinha Barbosa e ao professor Daniel Fernandes do biotério da UEPG. Agradecem também aos professores Carmen Sanches Ito e Carlos Alberto Lima Utrabo, do Departamento de Medicina da UEPG respectivamente pelo auxílio com os cálculos nas diluições e padronização das culturas quantitativas e pela disponibilização do laboratório de técnica operatória para a execução do modelo experimental. Finalmente agradecem a bioquímica Lavinia Arend do Laboratório Central do Estado do Paraná pelo auxílio com a cepa padrão de ATCC e pelas opiniões na validação do inóculo.

REFERÊNCIAS

1. Bosscha K, Nieuwenhuijs VB, Gooszen AW, van Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verweij WR, Akkermans L M. A standardised and reproducible model of intraabdominal infection and abscess formation in rats. *Eur J Surg* 2000; 166: 963-967.
2. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Mocchegiani F, Fineo A, Orlando F, Del Prete MS, Rocchi M, Saba V, Scalise G. Single-dose intraperitoneal magainins improve survival in a gram-negative-pathogen septic shock rat model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 101-104.
3. Davis SD. Activity of gentamicin, tobramycin, polymyxin B, and colistimethate in mouse protection tests with *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8: 50-53.
4. Endimiani A, Hujer KM, Hujer AM, Pulse ME, Weiss WJ, Bonomo RA. Evaluation of ceftazidime and NXL104 in two murine models of infection due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 82-85.
5. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Paggi AM, Orlando F, Kamysz W, Kasprzykowski F, Mackiewicz Z, Scalise G, Saba V. Therapeutic efficacy of intraperitoneal polymyxin B and polymyxin-like peptides alone or combined with levofloxacin in rat models of septic shock. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 193-196.
6. Housman ST, Keel RA, Crandon JL, Williams G, Nicolau DP. Efficacy of human simulated exposures of ceftaroline against phenotypically diverse *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2576-2580.
7. Kesteman AS, Ferran AA, Perrin-Guyomard A, Laurentie M, Sanders P, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4740-4748.
8. Maglio D, Banevicius MA, Sutherland C, Babalola C, Nightingale CH, Nicolau DP. Pharmacodynamic profile of ertapenem against *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a murine thigh model. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 276-280.
9. Mimoz O, Leotard S, Jacolot A, Padoin C, Louchahi K, Petitjean O, Nordmann P. Efficacies of imipenem, meropenem, cefepime, and ceftazidime in rats with experimental pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase-producing strain of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 885-890.
10. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Doi Y. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2108-2113.
11. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 943-950.
12. Tuon FF1, Rocha JL, Toledo P, Arend LN, Dias CH, Leite TM, Penteado-Filho SR, Pilonetto M, Zavascki AP. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Braz J Infect Dis* 2012; 16: 416-419.
13. Wandall DA, Arpi M, Wandall JH. A rat model of non-lethal bacterial infection. *APMIS* 1997; 105: 187-191.