Cristiane Luchesi de Mello Moraes

**Estudo comparativo da administração intravenosa e por
nebulização de vancomicina em pulmão saudável de
suínos sob ventilação mecânica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Anestesiologia

Orientadora: Dra. Denise Aya Otsuki

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Morais, Cristiane Luchesi de Mello

Estudo comparativo da administração intravenosa e
por nebulização de vancomicina em pulmão saudável de
suínos sob ventilação mecânica / Cristiane Luchesi de
Mello Moraes. -- São Paulo, 2018.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Anestesiologia.

Orientadora: Denise Aya Otsuki.

Descritores: 1.Aerossóis 2.Nebulizadores
3.Inalação 4.Vancomicina 5.Pneumonia
6.Staphylococcus aureus resistente à meticilina
7.Respiração artificial 8.Terapia

USP/FM/DBD-323/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
meu marido
e meus filhos,
aos quais quero estar
unida por toda a eternidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Pai nos céus, que mostrou seu auxílio incomparável em todas as etapas, a quem devo todas as coisas.

À minha orientadora Denise Aya Otsuki pela oportunidade de fazer o doutorado, por toda a dedicação para que este projeto pudesse ser realizado, pelo exemplo de conhecimento, habilidades e maturidade científica.

Ao meu pai João, sem o qual teria sido impossível realizar este estudo, cuidando sempre dos meus filhos, me apoiando incondicionalmente em uma quantidade indescritível de momentos, e à minha mãe Marcia por ser uma avó carinhosa, entretendo as crianças nas incontáveis vezes que precisei.

Ao meu marido Fernando, pelas infinitas conversas, conselhos, considerações, meu grande amigo e confidente de qualquer hora, por ser um grande exemplo de amor às pessoas.

À minha sogra Osmarina e meu sogro Antônio que durante o experimentos noturnos acolheram nossa família, oferecendo seu tempo e nutrindo as crianças com jantinhas de temperos inigualáveis.

À ABL Brasil que foi muito gentil ao doar os antibióticos para o estudo durante estes anos.

À Maquet por ter possibilitado este estudo ao fazer a valiosa doação dos filtros Servo Duo Guard.

Ao Professor Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento e Aline Corrêa Ribeiro pelo trabalho no processamento de amostras, por estarem sempre prontos a tirar

dúvidas e pelo espírito colaborativo, sem os quais teria sido impossível obter os resultados deste estudo.

Ao Professor Dr. Matheus Vane por toda benevolência e inestimável auxílio durante a pesquisa.

À Professora Dra. Denise Tabacchi Fantoni por ter me orientado a buscar o doutorado nesta faculdade, tendo-se aberto uma porta sem precedentes em minha vida.

Ao Professor Dr. José Otavio Costa Auler Junior e à Solange pelo apoio para que a pesquisa pudesse ter suporte financeiro para sua realização.

À Claudia, Sandra e Cleyton por todo apoio que encontrei neles durante estes anos de tantas necessidades e por serem prestativos em tudo.

À Dra. Débora, Gilberto e Letícia pelo prazer de trabalhar com eles, pela orientação e pela ajuda imprescindível em toda a prática do experimento.

À professora Silvia Regina Cavani Jorge Santos, que trouxe alegria em meu aprendizado nas matérias cursadas na Faculdade de Farmácia, pelo carinho e incentivo.

Aos meus amigos, que sempre torceram por mim.

Aos meus queridos filhos, Beatriz (9), Arthur (7) e Luísa (3), que são meus tesouros; crianças admiráveis, inteligentes, cheias de beleza e graça, que me tornam uma pessoa melhor a cada dia.

*Lembraí-vos da fé, da virtude, do conhecimento,
da temperança, da paciência, da bondade fraternal,
da piedade, da caridade, da humildade, da diligência.*

Pedi e recebereis; batei e ser-vos-á aberto.

Livro Doutrina e Convênios 4:6-7

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas e Abreviaturas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Patogênese, Terapia e Prevenção da Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV)	4
2.2	Patógeno Multirresistente: <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina	5
2.3	Terapia Antimicrobiana Inalatória	8
2.3.1	Breve histórico	8
2.3.2	Vantagens e efeitos adversos da terapia inalatória: estudos experimentais e clínicos	9
2.3.3	Métodos de otimização e instrumentação da terapia inalatória	13
2.3.4	Características de um antibiótico ideal para nebulização	16
2.3.5	Terapia inalatória: diretrizes, prática e desenvolvimento atuais	17
2.4	Penetração de Antibióticos no Tecido Pulmonar	19
2.5	Vancomicina	20
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Principal	23
3.2	Objetivo Secundário	23
4	MÉTODOS	24
4.1	Local de Realização e Comissão de Ética	24
4.2	Preparo Animal	24
4.3	Geração do Aerossol e Acesso à Deposição Extrapulmonar	27
4.4	Avaliações Hemodinâmicas, Hemogasométricas e Respiratórias	29
4.5	Condições Cromatográficas Para Detecção e Quantificação da Vancomicina por Cromatografia Líquida	30
4.5.1	Padronização das condições cromatográficas	30
4.6	Preparo das Amostras	32
4.7	Correção da Contaminação Sanguínea no Tecido Pulmonar	35
4.8	Cálculo Amostral e Análise Estatística	36
5	RESULTADOS	38
5.1	Deposição Extrapulmonar de Vancomicina	38
5.2	Deposição Pulmonar de Vancomicina	40
5.3	Dosagem Sérica de Vancomicina e Parâmetros Farmacocinéticos	43
5.4	Avaliação hemodinâmica, ventilatória e hemogasométrica	45
6	DISCUSSÃO	52
6.1	Deposição extrapulmonar de vancomicina	52
6.2	Deposição pulmonar de vancomicina após aerossolização	53
6.3	Deposição pulmonar de vancomicina após administração intravenosa	57
6.4	Farmacocinética plasmática	58
6.5	Alterações hemodinâmicas, ventilatórias e hemogasométricas	59

6.6 Limitações.....	60
7 CONCLUSÃO	62
8 ANEXOS E APÊNDICES	63
8.1 Anexo A- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	63
8.2 Apêndice A – Somatória da quantidade de vancomicina das partes do circuito representando a retenção total do fármaco no circuito ventilatório de cada animal dos grupos NEB 1h e NEB 12h. As concentrações foram obtidas a partir dos dados das áreas de vancomicina dos cromatogramas	64
8.3 Apêndice B- Comparação dos resultados dos lavados das partes do circuito respiratório dos grupos NEB 1h e NEB 12h.....	66
8.4 Apêndice C – Dosagem de vancomicina pulmonar por cromatografia líquida de alta eficiência (dados da área de vancomicina no cromatograma, área do padrão interno, razão das áreas de vancomicina, PI: padrão interno) e concentração pulmonar de vancomicina corrigida quanto à contaminação sanguínea ($\mu\text{g/g}$) por meio das concentrações séricas obtidas de vancomicina no momento da eutanásia.....	67
8.5 Apêndice D- Concentrações séricas de vancomicina obtidas nos animais dos grupos intravenoso e nebulizado, eutanasiados 1 hora ou 12 horas após receberem uma dose deste fármaco.(área vancomicina, área padrão interno obtidos a partir de cromatogramas da técnica de dosagem por cromatografia líquida de alta eficiência). (PI: padrão interno)	70
9 REFERÊNCIAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Nebulizador Aeroneb Pro Nebulizer. O nebulizador consiste no módulo controle e da câmara de nebulização na parte superior acoplado à peça T. 15
- Figura 2.** Desenho experimental para nebulização da vancomicina com nebulizador de placa vibratória. 15
- Figura 3.** Diagrama do delineamento experimental e coletas de sangue para dosagem sérica de vancomicina. 26
- Figura 4** Pulmão suíno com representação das regiões coletadas (lado esquerdo, posição prona). A. Lobo apical B. Lobo médio C. Lobo diafragmático apical D. Lobo diafragmático anterior E. Lobo diafragmático posterocaudal 27
- Figura 5.** Condições cromatográficas utilizadas na detecção de vancomicina nas matrizes lavado, soro e tecido pulmonar em aparelho de cromatografia líquida 31
- Figura 6.** Curvas de calibração para as amostras de lavado, soro e tecido pulmonar.....32
- Figura 7.** Cromatograma referente à solução aquosa de vancomicina 100µg/mL e amostra de lavado da câmara de nebulização. Condições: Tempo de retenção da vancomicina= 4,3 min. Eluição isocrática. FM: solução de fosfato de sódio dibásico e de potássio monobásico 5 33
- Figura 8.** Cromatograma referente às amostras de soros dos animais analisados. Vancomicina acrescentada ao soro branco; Padrão interno: cafeína.....34
- Figura 9.** Cromatograma referente à amostra de tecido pulmonar. A: Amostra de pulmão branco adicionado com solução de vancomicina 10 mg.mL⁻¹. B. Amostra de pulmão Branco. C. Padrão interno cafeína 100 µg.mL⁻¹. 35
- Figura 10.** Porcentagem de vancomicina retida por parte do circuito respiratório após nebulização de uma dose de 37,5 mg.Kg⁻¹ em doze suínos anestesiados submetidos à ventilação mecânica Estatística: dados expressos através de mediana e interquartis (IQ₂₅₋₇₅)..... 38
- Figura 11.** Vancomicina tecidual pulmonar após administração intravascular (15 mg.kg⁻¹) vs. nebulização 23 (21-26mg.kg⁻¹) dos animais dos grupos que receberam uma dose do fármaco e foram eutanasiados 1 ou 12 horas após a administração. • valores outliers..... 40

Figura 12. Concentração de vancomicina tecidual após administração intravascular (n=6) vs. nebulização (n=6) por região pulmonar dos animais que receberam uma dose de vancomicina e foram eutanasiados 1 hora após o término administração.

..... 42

Figura 13. Concentração de vancomicina tecidual após administração intravascular (n=6) vs. nebulização (n=6) por região pulmonar dos animais que receberam uma dose de vancomicina e foram eutanasiados 12 horas após o término da administração. • valores outliers. 42

Figura 14. Concentração sérica de vancomicina dos suínos do grupo IV 12h após administração de uma dose de vancomicina (15 mg.Kg^{-1}) e do grupo NEB 12 horas após administração de uma dose mediana (IQ_{25-75}) de 23 (21-26) mg.Kg^{-1} . * $p < 0,05$ 43

..... 43

Figura 15. Pressão arterial média e frequência cardíaca dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de vancomicina por intravenosa (IV 12h) em azul ou por nebulização (NEB 12h) em laranja.....45

Figura 16 Variáveis hemodinâmicas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h).....47

Figura 17. Pressão de pico das vias aéreas dos animais durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). * $p < 0,05$ vs Basal. 48

Figura 18. Complacência pulmonar dinâmica dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). * $p < 0,05$ vs Basal. 48

Figura 19. Pressão de plateau das vias aéreas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). * $p < 0,05$ vs Basal. 48

Figura 20. Variáveis hemogasométricas dos animais avaliados 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h).....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cálculos relacionados ao resultado da deposição extrapulmonar de Vancomicina (n=12 animais) apresentando a dose final entregue ao tecido pulmonar.....	39
Tabela 2 - Concentração de vancomicina ($\mu\text{g.g}^{-1}$) obtida por região pulmonar nos grupos em suínos após administração de uma dose. Mediana (interquartis IQ_{25-75})	41
Tabela 3 - Mediana e intervalo interquartil das concentrações séricas de vancomicina nos grupos IV 12h e NEB 12h dos animais eutanasiados 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina.....	44
Tabela 4. Comparação entre o grupo IV 12h e NEB 12 h dos parâmetros farmacocinéticos obtidos por observação dos dados da concentração sérica de vancomicina. Mediana (Interquartis IQ_{25-75}).....	44
Tabela 5. Variáveis hemodinâmicas dos animais avaliados dos grupos IV 12h ou NEB 12h. Mediana (IQ_{25-75})	46
Tabela 6. Variáveis ventilatórias das vias aéreas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). Mediana (IQ_{25-75})	49
Tabela 7. Variáveis hemogasométricas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). Mediana (IQ_{25-75}). IQ: interquartil	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABL	Antibióticos do Brasil
ASC/CIM	Área sob a curva/ concentração inibitória mínima
BE	Excesso de base (Do inglês: “Base excess”)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl ⁻	Íon cloreto
DC	Débito cardíaco
FC	Frequência cardíaca
FDA	Food and Drug Administration
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FR	Frequência respiratória
h-VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina com resistência heterogênea
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
IC	Índice cardíaco
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IRPV	Índice de resistência vascular pulmonar
IRVS	Índice de resistência vascular sistêmica
K ⁺	Íon potássio
LIM	Laboratório de Investigação Médica
Na ⁺	Íon Sódio
<i>p</i>	Probabilidade estatística
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PAPM	Pressão média da artéria pulmonar
PAS	Pressão arterial sistólica

PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
PEEP	Pressão positiva expiratória final
POAP	Pressão de oclusão da artéria pulmonar
PVC	Pressão venosa central
PvCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue venoso misto
PvO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue venoso misto
RL	Ringer lactato
SaO ₂	Saturação de hemoglobina no sangue arterial
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
SvO ₂	Saturação de oxigênio no sangue venoso misto
TAV	Traqueobronquite associada à ventilação mecânica
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária a vancomicina (Do inglês: Vancomycin intermediate-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina (Do inglês: Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)

RESUMO

Morais CLM. *Estudo comparativo da administração intravenosa e por nebulização de vancomicina em pulmão saudável de suínos sob ventilação mecânica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) causada por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) é uma infecção nosocomial frequente em pacientes críticos. A vancomicina é o tratamento de escolha, porém tem apresentado altas taxas de falha terapêutica, sendo uma das possíveis causas a baixa penetração no tecido pulmonar após administração intravenosa. Diversos estudos experimentais têm demonstrado que a administração de antibióticos por nebulização possibilita a obtenção de altas concentrações no tecido pulmonar e maior efeito bactericida que a obtida por infusão intravenosa. Entretanto, até o momento, a literatura carece de estudos comparando a utilização de vancomicina por via intravenosa com a via inalatória. **Objetivo:** O objetivo principal deste estudo foi comparar a concentração de vancomicina atingida no tecido pulmonar saudável após a administração de dose única via intravenosa ou por nebulização, em suínos anestesiados e submetidos à ventilação mecânica. **Métodos:** Vinte e quatro suínos foram submetidos à anestesia intravenosa, intubação e ventilação mecânica e aleatoriamente distribuídos: Doze animais receberam uma dose única de vancomicina por infusão intravenosa (15 mg.Kg^{-1}), dos quais seis animais foram eutanasiados uma hora após término da administração e seis animais foram eutanasiados após 12 horas e doze animais receberam uma dose única de vancomicina por nebulização com nebulizador de placa vibratória ($37,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$), dos quais seis animais foram eutanasiados uma hora após término da administração e seis animais foram eutanasiados após 12 horas. Foram coletadas amostras de sangue para dosagem sérica de vancomicina antes da administração em 30', 1, 2, 4, 6, 8 e 12h após o término da administração. Após a eutanásia, foram coletadas amostras de tecido pulmonar de regiões dependentes e não dependentes para dosagem tecidual de vancomicina. Nos animais que receberam a vancomicina por nebulização, a deposição extrapulmonar deste antibiótico foi

calculada após da lavagem das partes do circuito ventilatório e da câmara de nebulização. A dosagem de vancomicina foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). **Resultados:** A concentração de vancomicina no tecido pulmonar obtida no grupo nebulizado de uma hora foi aproximadamente treze vezes maior que a concentração pulmonar obtida no grupo intravenoso de uma hora; (mediana e intervalo interquartilico) 161 (71-301) vs. 12 (4-42) $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($p<0,05$), respectivamente. A concentração pulmonar de vancomicina no grupo nebulizado de 12 horas foi 63 (23-119) $\mu\text{g.g}^{-1}$ e níveis indetectáveis de vancomicina foram obtidos no grupo intravenoso de 12 horas; 0 (0-19) $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($p<0,05$). Houve ausência de um pico sérico de vancomicina após o término da administração por nebulização no grupo de doze horas comparado ao grupo intravenoso. **Conclusão:** A administração de vancomicina por nebulização apresentou maiores concentrações pulmonares do que pela via intravenosa. Os resultados sugerem uma passagem lentificada da vancomicina pela barreira alvéolo-capilar após nebulização.

Palavras-chave: aerossóis; nebulizadores; inalação; vancomicina; pneumonia; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; respiração artificial; terapia.

ABSTRACT

Morais CLM. *Intravenous versus nebulized vancomycin in ventilated piglets with healthy lungs* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction: Ventilator-associated pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* methicillin resistant is a frequent nosocomial infection in critically ill patients. Vancomycin is the treatment of choice, but it has presented high rates of therapeutic failure, possibly due to its low penetration in lung tissue following intravenous administration. Many studies have shown that lung tissue deposition and antibacterial efficiency of nebulized antibiotics were greater than by intravenous administration. However, to date, the literature lacks studies comparing the use of vancomycin intravenously with the inhalation route

Objective: The aim of this study was to compare vancomycin concentration in healthy lungs after a single dose nebulized or intravenously administered in anesthetized and ventilated piglets.

Methods: Twenty four piglets were anesthetized, intubated and submitted to mechanical ventilation. Twelve animals received a single dose of vancomycin by intravenous infusion (15 mg.kg^{-1}), of which six animals were euthanized one hour after the end of administration and six animals were euthanized after 12 hours and twelve animals received a single dose of vancomycin using a vibrating plate nebulizer ($37,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), of which six animals were euthanized one hour after the end of administration and six animals were euthanized after 12 hours. Blood samples were collected for serum vancomycin dosage before and at 30', 1, 2, 4, 6, 8 and 12 hours after the end of administration. After euthanasia, tissue samples from dependent and non-dependent lung tissue were collected for tissue dosage of vancomycin. In animals receiving vancomycin by nebulization, the extrapulmonary deposition of this antibiotic was calculated after washing the parts of the ventilator circuit and the nebulization chamber. The dosage of vancomycin was performed using high performance liquid chromatography (HPLC-UV). **Results:** Vancomycin lung tissue concentrations in one-hour aerosol group were thirteen times greater than pulmonary concentration in one-hour intravenous group (median and

interquartile range): 161 (71-301) $\mu\text{g.g}^{-1}$ vs. 12 (4-42) $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($p < 0.05$). Vancomycin lung tissue concentration in twelve-hour aerosol group was 63 (23-119) $\mu\text{g.g}^{-1}$ and it was undetectable in twelve-hour intravenous group; 0 (0-19) $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($p < 0.05$). There was no vancomycin serum peak following the end of administration by nebulization in the 12-hour group compared to intravenous administration. **Conclusion:** Administration of vancomycin by nebulization showed higher lung tissue concentrations than intravenous route. The results suggest a slower passage of vancomycin through alveolar capillary barrier after nebulization.

Key words: aerosols; nebulizers; inhalation; vancomycin; pneumonia; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; artificial respiration; theraph

1 INTRODUÇÃO

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é definida por ter seu início 48 a 72 horas após a intubação orotraqueal (1) e é uma complicação hospitalar frequente em pacientes críticos. (2, 3). A PAV é responsável por aproximadamente metade de todos os casos de pneumonia hospitalar, com ocorrência aproximada de 9 a 27% dos pacientes submetidos à ventilação mecânica por mais de 48 horas (4, 5) (2, 4, 6-9). A PAV apresenta mortalidade atribuível em torno de 13%, sendo que o tratamento desta enfermidade representa mais de 50% de todo o consumo de antibióticos em pacientes da unidade de terapia intensiva (10). (2, 11).

A ocorrência de PAV pode levar a um aumento do tempo de ventilação mecânica de 7 a 11 dias (12) e do tempo de internação hospitalar de 11,5 a 13,1 dias (13, 14). Este aumento da permanência de internação gera um custo adicional hospitalar estimado em de US 40.000 dólares por episódio em pacientes adultos (2, 11). Em um estudo de 2008 no Canadá, estimou-se que um aumento de 4,3 dias na UTI atribuível à PAV leva a um custo nacional anual estimado em 43 milhões de dólares por ano (15). Devido aos custos envolvidos com o tratamento da PAV, o tratamento precoce e efetivo desta afecção é uma questão relevante (16).

O tratamento atual de antibioticoterapia para a PAV é principalmente realizado por via intravenosa e se torna especialmente complicado quando esta afecção é causada por bactérias multirresistentes, os quais são dominantes nas unidades de terapia intensiva. O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) é um patógeno multirresistente, sendo um agente etiológico causador da PAV em 12 a 15 % dos casos, e este número sobe para 30% dos casos em pacientes que estão sob ventilação mecânica por período prolongado ou que foram submetidos a antibioticoterapia prévia (17). Entre as limitadas opções de tratamento, a vancomicina tem sido o antibiótico de escolha em infecções por SARM (12, 18), mas têm apresentado altas taxas de falha terapêutica (17, 19). As

principais causas para este insucesso inclui a baixa penetração da vancomicina no tecido pulmonar após administração intravenosa (20, 21), a demora no início do tratamento, a ocorrência de subdoses e consequente seleção de patógenos resistentes.

Estudos mostram que a concentração pulmonar de vancomicina varia entre 5 e 50% da concentração sérica (20, 22-25). Fatores como a menor ligação com proteínas plasmáticas e maior penetração no tecido pulmonar em pacientes com PAV poderiam alterar esse perfil de penetração. As doses de vancomicina padrão a cada 12 horas frequentemente falham em alcançar o alvo de uma relação estabelecida, a (ASC_{0-24h}/CIM), que é a divisão da área sob a curva de um gráfico da concentração sérica em 24 horas pela concentração inibitória mínima da bactéria. Este valor deve resultar em valores acima de 400 para uma eficiente eliminação bacteriana (22). O aumento da dose ou frequência de administração poderiam melhorar a penetração da vancomicina no tecido pulmonar resultando em uma maior concentração tecidual, porém levariam ao aumento de risco de efeitos adversos como nefrotoxicidade ou ototoxicidade (26). Nas recentes diretrizes de tratamento de infecções por SARM, há a recomendação da utilização de doses maiores de $25-30mg.kg^{-1}$ de vancomicina em casos de infecção grave (18).

O sucesso terapêutico é especificamente difícil de ser obtido se a cepa SARM infectante apresentar uma $CIM > 1 \mu g.mL^{-1}$. Um estudo demonstrou que cerca de metade dos isolados de cepas SARM apresentam níveis da $CIM > 1,5 \mu g.mL^{-1}$, sendo que a mortalidade da PAV por SARM aumenta em função da CIM de vancomicina (19). De forma geral, a literatura tem demonstrado uma resposta clínica baixa de 35 a 57% ao tratamento com vancomicina de pacientes acometidos de pneumonia nosocomial por este patógeno (17, 19, 27-30).

A terapia antimicrobiana respiratória por nebulização tem como objetivo levar o fármaco diretamente ao local da infecção em concentrações elevadas nas vias aéreas distais, ou seja, aos alvéolos pulmonares, com esperado mínimo efeito tóxico sistêmico. Estudos têm demonstrado a eficácia da antibioticoterapia

por aerossolização em erradicar organismos multirresistentes, com reduzida pressão de nova de seleção de resistência respiratória (31-34).

Inicialmente, a administração de antibióticos por nebulização foi padronizada em pacientes com fibrose cística e vem sendo empregada com bons resultados nesta enfermidade (35). Estudos experimentais e clínicos com nebulização de antibióticos como colistina, amicacina e ceftazidima para o tratamento da PAV têm sido impulsionados pela limitada disponibilidade de novos antibióticos e pelo desenvolvimento de novas tecnologias de nebulização (33, 36-42).

Este estudo tem como objetivo avaliar a nebulização de vancomicina em animais não infectados submetidos à ventilação mecânica, comparando a concentração tecidual pulmonar obtida após sua administração por nebulização e por via intravenosa. Justifica-se a realização deste estudo devido a carência na literatura de estudos da nebulização de vancomicina com nebulizador de placa vibratória neste tipo de modelo experimental. Os dados experimentais obtidos poderão auxiliar no uso clínico da vancomicina por via inalatória no tratamento da PAV causada por SARM nos pacientes críticos por meio da quantificação da deposição pulmonar após nebulização da vancomicina pulmonar e da avaliação da toxicidade por meio dos dados farmacocinéticos

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Patogênese, Terapia e Prevenção da Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV)

A PAV é definida como um infiltrado pulmonar novo ou progressivo, sinais sistêmicos de infecção (febre, aumento de células leucocitárias), alterações no escarro e detecção do agente etiológico (1).

Os pacientes internados submetidos à ventilação mecânica são um grupo de risco aumentado para pneumonia, sendo que a determinação do desenvolvimento da PAV é um resultado da complexa interação entre a presença do tubo endotraqueal no paciente, virulência da bactéria invasora e a imunidade do hospedeiro (1). Dentre estas condições, a presença do tubo endotraqueal é o fator mais importante, resultando na violação dos mecanismos naturais de defesa como o reflexo de tosse da glote e da laringe (1).

O acesso de bactérias infecciosas às vias aéreas inferiores se dá por: a) microaspiração, que pode ocorrer no próprio momento da intubação; b) desenvolvimento de biofilme carregado de patógenos (dentre eles bactérias Gram negativas e fungos) dentro do tubo endotraqueal; c) acúmulo e escorrimento de secreções ao redor do balonete do tubo endotraqueal (1, 43-45) d) prejuízo do clearance mucociliar nas vias aéreas; e) possibilidade de inoculação de material contaminado na traqueia por meio de nebulizações realizadas com materiais contaminados (43). Estruturas anatômicas próximas (seios nasais, nasofaringe, orofaringe, estômago), com substituição da flora normal por linhagens mais virulentas, também podem ser fontes de patógenos (44). Em pacientes graves, com estado imunológico debilitado, a infecção se desenvolve começando como uma bronquiolite, progredindo para broncopneumonia lobar e possivelmente para pneumonia confluenta (46).

Quanto ao aspecto fisiopatológico, a pneumonia por *S. aureus* inicia-se com bronquite aguda e bronquiolite, sendo que o epitélio extensivamente destruído e as

paredes subjacentes apresentam um importante infiltrado com leucócitos polimórficos. As lesões ulceradas podem ser cobertas com uma membrana fibrinopurulenta contendo microrganismos. Há um rápido desenvolvimento de necrose tecidual podendo levar à trombose dos ramos lobulares adjacentes da artéria pulmonar e presença de êmbolo séptico. Nos alvéolos, há edema e preenchimento destes por fluido proteináceo (47).

Para o diagnóstico do agente causal da PAV, é recomendado que sejam obtidas amostras do trato respiratório inferior para cultura e análise microbiológica. Estas podem ser coletadas por aspirado endotraqueal, lavado broncoalveolar ou amostras coletadas por escova protegida por cateter plástico, sendo que o isolamento do agente etiológico serve como guia para o tratamento da PAV (1, 4).

Em caso de terapia empírica inicial, a duração da ventilação mecânica é um guia na seleção do antibiótico apropriado para o tratamento da PAV. Quadros de PAV com duração de até 4 dias exigem antibióticos de largo espectro, enquanto quadros com duração de mais de 4 dias são frequentemente causados por patógenos multirresistentes e devem ser tratados com antibióticos de espectro limitado (1, 4).

Existem várias medidas recomendadas para a prevenção de PAV, ainda que sejam também questionadas quanto à sua eficiência. Algumas delas são a elevação da cama, higiene bucal com clorexidine, profilaxia de úlcera de estresse, profilaxia de trombose venosa e avaliação diária da sedação (1).

2.2 Patógeno Multirresistente: *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

Dentre os principais agentes causadores de PAV, o mnemônico “ESKAPE” resume os seis agentes etiológicos multirresistentes mais citados na literatura, sendo o *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp* (3). Entre as bactérias multirresistentes, o SARM é o maior responsável por infecções hospitalares na Europa e nos Estados Unidos,

sendo causador desde infecções cutâneas até quadros de endocardite, incluindo também osteomielites, pneumonias, infecções de corrente sanguínea, dentre outras (4, 48). Nos hospitais do Brasil, os índices de cepas SARM variam de 40% a 80% (49) e as afecções causadas por este patógeno são responsáveis por aumentar os custos da saúde e a morbimortalidade de pacientes (50). Estima-se que nos hospitais dos Estados Unidos haja 200.000 infecções por ano por este agente com um custo de aproximadamente US\$ 3,3 bilhões de dólares (51). Além disto, o risco de morte em afecções por SARM é 20 vezes superior do que em afecções por *S. aureus* sensível à meticilina (52, 53).

Esta espécie bacteriana tem adquirido resistência a diferentes classes de antibióticos. Em 1941, a penicilina foi utilizada para tratar infecções estafilocócicas, porém já em 1942 houve relato de cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina em pacientes hospitalizados devido a produção de penicilinasas. A propagação rápida da resistência à penicilina foi interrompida após a introdução da meticilina semissintética de segunda geração na década de 1960. A meticilina é uma penicilina estável às penicilinasas. No entanto, as cepas resistentes à meticilina logo surgiram. Em aproximadamente 20 anos, a resistência à meticilina tornou-se endêmica nos Estados Unidos, chegando a 29% dos pacientes hospitalizados infectados com *S. aureus* [26, 27]. O mecanismo de resistência envolve uma alteração na proteína de ligação à penicilina (PBP) nas cepas SARM, designada PBP-2a, conferindo afinidade reduzida para penicilina e também a outras cefalosporinas e carbapenêmicos (54). Na década de 80, devido à resistência às penicilinas semissintéticas, o tratamento com vancomicina voltou a ser utilizado para esta espécie bacteriana. Atualmente, como alternativas ao tratamento com vancomicina há apenas dois novos antibióticos, a ceftobiprole, uma nova cefalosporina, e a razupenem, um novo carbapenêmico (55).

A atuação fisiológica da PBP2a no metabolismo bacteriano é enzimática, catalisando a formação da camada de peptidoglicano no processo de síntese da parede celular, sendo uma transpeptidase (56). O PBP-2a é codificada pelo *mecA*, um gene localizado no cromossomo do *S. aureus* [24], que reside dentro da ilha genômica móvel, o SCCmec (cromossomo mecânico de fita estafilocócica) (57).

Uma cepa de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina se torna resistente após adquirir uma ilha genômica SCCmec (58).

Há vários tipos de SCCmec e os tipos I, II e III estão associados às infecções adquiridas em hospitais e podem conter genes que codificam resistência a outros antibióticos. O SCCmec tipo IV tem sido encontrado principalmente em cepas SARM adquiridas na comunidade que tendem a ser menos resistentes, porém produzindo toxinas potentes, com presença de fatores de virulência, sendo também mais transmissível, tendo causado surtos epidêmicos na última década nos Estados Unidos e em países da Europa (59, 60). Cepas SARM que causam infecções hospitalares muitas vezes são resistentes a outros agentes antimicrobianos comumente usados, incluindo eritromicina, clindamicina, fluoroquinolonas e tetraciclina, enquanto cepas causadoras de infecções associadas à comunidade são frequentemente resistentes apenas a agentes betalactâmicos e eritromicina, podendo ser resistentes à fluoroquinolonas.

Em 1996, foram isoladas no Japão, pela primeira vez, uma cepa SARM apresentando também susceptibilidade reduzida à vancomicina, sendo descritas como *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária de vancomicina/VISA CIM= 4-8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (61), observando que uma cepa sensível à vancomicina apresenta uma CIM $\leq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (62). O primeiro VISA foi isolado de uma criança em tratamento de uma infecção cirúrgica. A susceptibilidade reduzida desta cepa foi atribuída à ocorrência de uma parede celular mais espessa que continha peptídeos que se ligavam à vancomicina impedindo sua ação. Posteriormente em 2002, nos Estados Unidos, foram isolados *Staphylococcus aureus* com resistência total à vancomicina (CIM $\geq 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo denominados *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA). A resistência da VRSA é conferida pelo gene VanA, que está presente em um plasmídeo.

O número total de infecções VRSA humanas nos Estados Unidos foi de somente 14 casos. Porém, já foi relatado também a ocorrência desta cepa na França, Coreia, África do Sul e Brasil, demonstrando ser esta uma questão global (63). A prevalência do VISA é relativamente mais elevada, variando de 3 a 7% das cepas SARM pesquisadas na Europa, Ásia e Estados Unidos, porém com

maior incidência na Ásia do que nos outros continentes (64). Os VISA estão associados a infecções persistentes, falha no tratamento da vancomicina e resultados clínicos ruins (65).

Na literatura ainda se descreve a cepa h-VRSA, ou heterogenous-VRSA, que apresenta uma CIM de cepas suscetíveis, mas ao ser exposta ao tratamento com vancomicina gera uma cepa VRSA. A presença de h-VRSA pode ser um fator importante indicativo de um possível declínio hospitalar na resposta ao tratamento com a vancomicina para estas cepas (63).

2.3 Terapia Antimicrobiana Inalatória

2.3.1 Breve histórico

O conceito terapêutico de conferir diferentes compostos diretamente ao trato respiratório tem estado presente há centenas de anos. Porém, foi a partir do século XX que se verificou maiores avanços e conhecimento a respeito da terapia inalatória. Em 1932, Whitlaw e Patterson iniciaram o uso do termo aerossol, significando ar e solução associados (31). Tentativas de tratamento com aerossóis foram feitas para doenças como a tuberculose, ainda antes do advento dos antibióticos. Em 1947, Tiffeneau e Brun reportaram a necessidade de haver um diâmetro ideal das gotículas para que se evitasse seu impacto na região da faringe (66). Mesmo com a falta de dispositivos médicos seguros entre 1940 e 1975 foram feitas tentativas de aerosolizar antibióticos como neomicina, polimixina e penicilina G para tratar pacientes críticos com pneumonia (67-71).

Estudos clínicos conduzidos na década de 1970 pela administração nebulizada de polimixina B ou gentamicina registraram que sua utilização prevenia a ocorrência de PAV. No entanto, quando esta via era utilizada preventivamente para infecção pulmonar por mais de uma semana, a incidência de PAV por patógenos resistentes à polimixina B aumentou levando a um abandono temporário deste método de tratamento (67).

Já na década de 90 houve maior entendimento a respeito das condições

necessárias para que o antibiótico nebulizado pudesse alcançar as regiões pulmonares mais distais, havendo o desenvolvimento de novos tipos de nebulizadores (72). Entre 1990 e 2000 ocorreram avanços tecnológicos levando a introdução de tobramicina especificamente formulada para o tratamento de pacientes com fibrose cística e colonização crônica por *Pseudomonas aeruginosa* (35). Também em 1998, um estudo em pacientes traqueostomizados sugeriu que a nebulização de aminoglicosídeos com nebulizador a jato produziu partículas com diâmetro adequado tratando adequadamente traqueobronquite associada à ventilação mecânica (73).

Entre 2000 e 2010, estudos experimentais avaliando farmacocinética e farmacodinâmica de antibióticos com o uso de nebulizadores ultrassônicos e nebulizadores de placa vibratória trouxeram maior conhecimento e interesse na utilização desta via de administração por este método de tratamento. Atualmente outras questões importantes quanto à terapia inalatória são a formulação apropriada do fármaco a ser nebulizado e a eficácia clínica da via inalatória para tratamento de pacientes não acometidos de fibrose cística (31).

2.3.2 Vantagens e efeitos adversos da terapia inalatória: estudos experimentais e clínicos

A nebulização de antibióticos pode ser uma técnica vantajosa por levar antibióticos diretamente à árvore traqueobrônquica, em contraste ao revés da baixa penetração pulmonar dos antibióticos administrados por via intravenosa. Antibióticos aerossolizados podem atingir concentrações pulmonares tão elevadas quanto vinte e cinco vezes a concentração inibitória mínima de um patógeno (34, 74).

A razão da escolha desta via de administração é evitar a barreira alvéolo-capilar, a qual os antibióticos intravenosos precisam atravessar para atingir o sítio pulmonar. A barreira alvéolo-capilar consiste em duas membranas (parede capilar e alveolar), separadas pelo espaço intersticial com fluidos. O capilar pulmonar é fenestrado e pode-se esperar uma difusão passiva de antibióticos com peso

molecular de até 1000g.mol^{-1} , porém se espera que as células epiteliais alveolares não permitam difusão passiva de antibióticos, porque estão ligadas por “tight junctions” (72).

Em um estudo em animais saudáveis, a administração de amicacina por nebulização, quando comparada à administração intravenosa, resultou em uma concentração pulmonar de amicacina superior em 10 vezes (40). Já em um modelo de pneumonia por *Escherichia coli*, o resultado obtido foi uma concentração pulmonar de amicacina 3 a 30 vezes superior no grupo nebulizado, com ausência de crescimento bacteriano após o tratamento por nebulização (75).

Lu e col. realizaram um estudo experimental semelhante com a colistina em um modelo de pneumonia por *Pseudomonas aeruginosa* (41). Com a nebulização da colistina, obteve-se uma concentração pulmonar de mediana $2,8\text{ }\mu\text{g/g}$ ($1,8\text{--}13,7\text{ }\mu\text{g/g}$) contrastando com a ausência de deposição pulmonar detectável após administração intravenosa. Após 24 horas de tratamento, 67% dos segmentos pulmonares avaliados apresentaram contagem bacteriana menor que 10^2 UFC/grama de tecido após nebulização enquanto somente 28% dos segmentos pulmonares apresentaram esta baixa quantidade após infusão intravenosa de colistina.

Estudos experimentais com a nebulização da ceftazidima, um antibiótico tempo dependente, também apresentaram alta concentração pulmonar em animais saudáveis e com broncopneumonia, também apresentando melhor taxa de eliminação microbiológica quando comparado à administração intravenosa (39, 76). Efeitos adversos da nebulização foram descritos como a ocorrência de obstrução do filtro expiratório com aumento repentino da pressão de pico inspiratória e hipotensão arterial grave, recomendando-se a troca do filtro expiratório a cada nebulização (39).

Nos modelos experimentais com pneumonia, a distribuição do antibiótico nebulizado se mostrou pior nos segmentos pulmonares com quadros mais graves de broncopneumonia, porém mesmo nessas regiões as concentrações teciduais do antibiótico administrado por nebulização foram significativamente maiores que as obtidas pela via intravenosa (38, 40).

Ainda que a PAV seja caracterizada pela presença de múltiplos plugues purulentos que obstruem os bronquíolos distais, é provável que os ajustes ventilatórios que levam ao recrutamento de áreas não aeradas, como a utilização de pressão positiva expiratória final ou manobras de recrutamento, possam auxiliar no aumento da deposição pulmonar de antibióticos nebulizados (72). Um estudo sugere que as próprias lesões de hiperdistensão resultantes da ventilação mecânica representam uma das maneiras pela qual o antibiótico é depositado no parênquima pulmonar infectado (75). Devido à diferença na deposição do antibiótico nebulizado de acordo com a gravidade da infecção, os dados experimentais indicam a importância de se administrar antibióticos por nebulização nos estágios iniciais da PAV (72).

Os estudos experimentais permitiram avaliar a permeabilidade da barreira alvéolo-capilar aos diferentes antibióticos nebulizados e também a toxicidade sistêmica. Inicialmente acreditava-se, por analogia ao que ocorre na administração intravenosa no quadro de pneumonia aguda, que a difusão sistêmica dos antibióticos aerossolizados presentes no espaço alveolar seria reduzida, limitando a toxicidade. Isso é parcialmente explicado porque na pneumonia aguda experimental ocorre vasoconstrição e trombose regional, o que reduz a perfusão de antibióticos presentes na circulação pulmonar, limitando a penetração pulmonar. No entanto, para antibióticos nebulizados como os aminoglicosídeos e as cefalosporinas, os dados experimentais não confirmaram menor toxicidade. A barreira alvéolo capilar e o epitélio bronquiolar íntegros são fatores limitantes para a difusão sistêmica do fármaco nebulizado, porém a infecção aumenta grandemente sua permeabilidade (72).

A amicacina nebulizada em animais com pneumonia teve maior eliminação urinária que em animais saudáveis; ($74 \pm 12\%$) vs. ($58 \pm 18\%$), respectivamente (40, 75). No entanto, a colistina nebulizada em animais com pneumonia demonstrou menor toxicidade, devido a colistina não atravessar facilmente a barreira alvéolo-capilar (41, 72). O colistimetato no pH fisiológico do corpo apresenta-se com carga negativa, confrontando-se com a membrana basal alveolar, a qual também é formada por cargas negativas. Com isso a passagem

da colistina para a circulação sanguínea é lentificada, resultando no prolongamento da meia vida de eliminação, o que justifica sua maior concentração pulmonar.

Moléculas de baixa penetração na barreira alvéolo-capilar são mais adequadas para nebulização, como a colistina, o aztreonam e a tobramicina (77-79). A tobramicina inalada já é aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para pacientes com fibrose cística, mas a utilização clínica da tobramicina para o tratamento da PAV está ainda sob investigação. Hallal e col. (80) em um estudo piloto de coorte com aerossolização da tobramicina em cinco pacientes teve resultados positivos para o tratamento de PAV por *Acinetobacter spp* e *P. aeruginosa* com menor incidência de efeitos deletérios sistêmicos em comparação à administração intravenosa.

Na prática clínica, a aerossolização de antibióticos é ainda não padronizada, havendo variações no manejo da PAV. Duas estratégias de tratamento por nebulização foram identificadas em uma metanálise quanto ao tratamento de infecções respiratórias nosocomiais em adultos sob ventilação mecânica: a adjuntiva e a substitutiva (81). Na estratégia adjuntiva, descreve-se o uso da colistina ou aminoglicosídeos nebulizados em pacientes que já recebiam colistina ou aminoglicosídeo por via intravenosa, além de outro antibiótico intravenoso padrão adicional como parte do protocolo. Na estratégia substitutiva, a colistina ou aminoglicosídeo foram administrados a pacientes que não recebiam estes mesmos antibióticos por via intravenosa. Nesta estratégia também foi utilizado outro antibiótico padrão intravenoso. A estratégia adjuntiva para o tratamento da PAV causada por bactérias resistentes foi a que apresentou desfecho mais representativo em relação à nebulização de antibióticos. Na estratégia de administração substitutiva não foi encontrada diferença em termos de cura clínica ou duração da ventilação mecânica. Porém, não foi registrada emergência de bactérias resistentes no grupo nebulizado, enquanto que 50% das cepas de infecções persistentes se tornaram resistentes no grupo de tratamento intravenoso (81).

No tocante à segurança do tratamento por nebulização, a avaliação final da metanálise demonstrou menor ocorrência de nefrotoxicidade nos pacientes nebulizados e um aumento de 9% na incidência de complicações respiratórias (81). No estudo de Lu e col. registrou-se maior número de complicações cardiorrespiratórias, porém sem evidência da ocorrência de broncoespasmos. As complicações descritas foram piora da hipoxemia após nebulização em pacientes já gravemente hipoxêmicos, complicações relativas à obstrução do filtro expiratório e um caso de parada cardíaca secundária (33).

2.3.3 Métodos de otimização e instrumentação da terapia inalatória

Desde a década de 1990, esforços vem sendo realizados a fim de otimizar a entrega do fármaco nebulizado para as vias aéreas, numa época em que menos de 5% da dose depositada no nebulizador era depositada nos pulmões. Entendimento de condições técnicas e inovações tecnológicas aumentaram a entrega para 30 a 60% da dose inicial (41, 72, 76, 82). Sete fatores são críticos para a deposição pulmonar de antibióticos nebulizados; o tamanho da partícula, o tipo de nebulizador durante a ventilação mecânica, as características físicas do gás carreador, os ajustes ventilatórios, a posição do nebulizador no circuito respiratório, a gravidade da broncopneumonia e aeração pulmonar (72).

As partículas que conseguem chegar aos bronquíolos e alvéolos têm tamanho de 1 a 5 μm , e a maioria dos nebulizadores comerciais gera este tamanho de partícula, dentre eles o inalador de pó seco, inalador dosimetrado, inaladores a jato, ultrassônico e de placa vibratória (72). Quanto ao gás carreador, durante a nebulização não deve haver umidificação ou aquecimento. A umidificação aumenta o tamanho da partícula de aerossol. A própria nebulização gera uma forma de umidificação, e deve haver um cuidado para que a nebulização não seja realizada em um período maior que uma hora, a fim de evitar dano ao epitélio ciliado e oclusão do tubo endotraqueal. Um filtro expiratório deve ser utilizado quando realizada a nebulização de antibióticos para proteção da entrada de partículas no ventilador mecânico, e estudos experimentais indicam a importância deste

acessório ser trocado a cada nebulização a fim de evitar a saturação do circuito e efeitos deletérios ao paciente (77, 81, 83). Em relação ao gás utilizado, a substituição do gás nitrogênio/oxigênio por hélio/oxigênio pode aumentar a entrega das partículas aerossolizadas para o sistema respiratório (72).

Entre os tipos disponíveis, os nebulizadores a jato geram fluxo inspiratório turbulento que resulta em deposição pulmonar baixa, menor que 15%, além de haver a ocorrência de um grande volume residual de antibiótico na câmara de nebulização, o que pode influenciar na eficácia do tratamento (83). Os nebulizadores ultrassônicos por outro lado, podem chegar a uma eficiência de deposição do antibiótico entre 30-40% (72). Entretanto, durante a formação das partículas por vibração de quartzo, geram calor, podendo alterar a estrutura química do antibiótico. Outro tipo disponível é o nebulizador por placa vibratória, que, além de não apresentar aumento de temperatura, pode chegar a uma eficiência de deposição do antibiótico entre 40-60% (72). O nebulizador de placa vibratória que contém múltiplos orifícios que produzem as partículas aerossolizadas com o movimento de uma placa interna. Existem opções de nebulizador de placa vibratória com diferentes modos de ação (sincronizados ou não com a respiração), necessidade ou não de retirada da umidificação do sistema respiratório e mesmo diferenças na eficiência da entrega do fármaco nebulizado. O Aeroneb Pro Nebulizer (Aerogen) (Figura 1), utilizado neste experimento, caracteriza-se por nebulização contínua e necessita de retirada da umidificação dos gases inalatórios, o que não é o ideal para pacientes de UTI (16).

O cálculo da dose de um antibiótico a ser administrado por nebulização requer a determinação da quantidade de deposição extrapulmonar. A deposição extrapulmonar do antibiótico aerossolizado é definida como a somatória da retenção na câmara de nebulização e deposição no circuito respiratório (parte inspiratória, peça y, tubo endotraqueal, parte expiratória, filtro expiratório e câmara de nebulização, conforme representado na figura 2) e deve ser mensurada após a nebulização do antibiótico com subsequente lavagem de cada parte do circuito com volume conhecido de água destilada. Posteriormente, deve ser realizada a medida da concentração do antibiótico nos lavados coletados. A estimativa do

total depositado em todo o circuito será obtida pela somatória das quantidades mensuradas após a quantificação do analito (72, 75). Assim, como a dose do fármaco nebulizado sofre deposição nas várias partes do circuito, parte da medicação não atinge as vias aéreas; sugere-se então que esta deve ser acrescida à dose intravenosa, obtendo-se uma dose equivalente de administração da vancomicina via trato respiratório (41).

Figura 1. Nebulizador Aeroneb Pro Nebulizer. O nebulizador consiste no módulo controle e da câmara de nebulização na parte superior acoplado à peça T.

Figura 2. Desenho experimental para nebulização da vancomicina com nebulizador de placa vibratória.

Os parâmetros ventilatórios devem ser ajustados durante a nebulização para que se obtenha um fluxo inspiratório menos turbulento. Para isso deve-se empregar o modo ventilatório controlado a volume (VCV), com fluxo inspiratório constante, volume minuto menor que 6L/min, frequência respiratória de 12 a 15 movimentos/minuto, relação I/E < 0,5 e pausa inspiratória de 20% (72, 84, 85). Devido a estes ajustes, pode ser requerida sedação profunda desses pacientes, o que pode levar a um aumento do tempo de ventilação mecânica (16).

A localização dos nebulizadores no circuito deve ser de 15 a 45 cm antes da peça Y na porção inspiratória, e a distância ótima depende dos vieses do fluxo e do circuito respiratório. Infelizmente, a nebulização contínua por parte dos aparelhos leva à passagem de parte dos aerossóis direto para a porção expiratória do circuito respiratório, e o posicionamento acima descrito do aparelho é importante a fim de minimizar esta perda. Os nebulizadores que atuam sincronizadamente com a insuflação pulmonar poderiam oferecer maior vantagem com relação à menor perda expiratória dos fármacos.

A diluição da medicação e o volume de preenchimento da câmara de nebulização também influenciam no tamanho da partícula e na entrega do fármaco ao pulmão. Para determinada dose, o volume maior de solução obtido pela diluição pode reduzir o antibiótico residual na câmara de nebulização. No entanto, isto aumenta o tempo de nebulização, o que pode desestabilizar algumas moléculas. Tem-se como exemplo o colistimetato sódio, que não é uma molécula estável ao ser solubilizada. Por outro lado, soluções viscosas podem obstruir ou danificar o nebulizador e também ter como resultado gotículas de aerossol de tamanho maior, o que prejudica a entrega pulmonar (77).

2.3.4 Características de um antibiótico ideal para nebulização

As formulações para administração intravenosa não são otimizadas para aerossolização e podem apresentar propriedades não adequadas para sua nebulização. A presença de conservantes como os fenóis na composição do antibiótico e uma osmolaridade subótima (menor que 150 a 1200 mOsm/L) podem aumentar a ocorrência de broncoespasmo e tosse. Para a aerossolização, a

formulação deve ser estéril, sem conservantes, não pirogênica, tendo pH ideal entre 4,0 e 8,0. A solução a ser nebulizada que apresentar essas características ideais leva à menor irritação das vias aéreas e aumento da eficácia da nebulização (16, 37). Atualmente a colistina, aztreonam e tobramicina são os únicos antibióticos com formulação específica para nebulização com uso aprovado para casos de fibrose cística (16). No entanto, nas diretrizes do consenso da “Society of Infectious Diseases Pharmacists” de agentes antibióticos aerossolizados outros antibióticos são descritos na utilização de terapia por nebulização incluindo aminoglicosídeos e ceftazidima (37). Azevedo e col. também listam estes antibióticos na rotina clínica, descrevendo frequência e dose a ser utilizada (86).

2.3.5 Terapia inalatória: diretrizes, prática e desenvolvimento atuais

Antibióticos aerossolizados foram introduzidos na rotina clínica em pacientes críticos há cerca de 40 anos, inicialmente sem aprovação de um consenso ou sem produtos para aerossolização aprovados pelo FDA (Food Drug Administration) nos Estados Unidos. Em 2016, O IDSA (Infectious Diseases Society of America) nos Estados Unidos publicou diretrizes quanto ao tratamento da PAV, e incluiu orientações quanto à administração de antibióticos por nebulização no paciente crítico (12). Entre as orientações, sugere-se que pacientes acometidos de PAV por bacilos Gram negativos que sejam suscetíveis apenas a aminoglicosídeos ou polimixina (colistina ou polimixina B) sejam tratados com antibiótico nebulizado em associação ao antibiótico sistêmico. A recomendação é descrita como fraca, com evidência de baixa qualidade, com valor alto para cura clínica e sobrevivência e baixo valor quanto aos custos e inconvenientes envolvidos. Nesta diretriz também é referido ser razoável considerar a inalação de antibiótico na estratégia adjuntiva como um último recurso no tratamento de pacientes que não estão respondendo a terapia intravenosa, independente do patógeno ser ou não ser multirresistente. Quanto aos patógenos resistentes aos carbapenêmicos e sensíveis apenas às polimixinas, as diretrizes recomendam o tratamento com polimixina intravenosa associada à colistina inalada adjuntiva, sendo também uma recomendação fraca e

de baixa qualidade. A discussão final colocada nas diretrizes pelo grupo de autores justifica em que foi baseada a recomendação da terapia adjuntiva. Observou-se que a eficácia dos antibióticos contra bactérias presentes em secreções purulentas pode requerer concentrações tão elevadas quanto 10 a 25 vezes a CIM de um patógeno, níveis estes que não podem ser atingidos apenas com terapia intravenosa; portanto a adição de antibioticoterapia inalatória poderia ser benéfica. Devido ao fato da reduzida penetração de aminoglicosídeos e colistina no tecido pulmonar após administração intravenosa e consequente falha terapêutica, o uso contínuo pode levar à seleção de cepas resistentes a estes antibióticos; nesses casos justifica-se também a indicação desses antibióticos através da nebulização.

Um estudo quanto à maneira com que a prática clínica de nebulização de antibióticos tem sido conduzida pelos intensivistas na atualidade foi descrito por Ehrman em col. (83) em 2016. A pesquisa foi coletada eletronicamente entre 816 intensivistas de 81 unidades de terapia intensiva em 22 países, avaliando dados quanto ao tratamento de 2808 pacientes. A pesquisa concluiu que um em cada 5 pacientes intubados receberam terapia por nebulização de diferentes fármacos e somente em 5% das nebulizações foram utilizados antibióticos, já que a maior parte das nebulizações (88%) são feitas com corticosteroides e broncodilatadores. O antibiótico mais utilizado foi a colistina (79%), seguido de amicacina (10%) para tratamento de pneumonia nosocomial. Detectou-se que, em um número significativo de casos, a nebulização não foi realizada otimizada. De 509 eventos de aerossolização com antibiótico registrados, somente 30% das nebulizações de antibióticos foram realizadas com ajustes ventilatórios para a aerossolização, em apenas 33,9% dos casos o nebulizador foi colocado na porção inspiratória do circuito do ventilador com distância adequada da peça Y, o umidificador foi desligado em 59% dos casos, o filtro expiratório foi usado em 66% das vezes e quando utilizado foi pouco frequentemente trocado. Adicionalmente, o nebulizador mais utilizado foi a jato (62%) seguido do ultrassônico (29%) e o de placa vibratória (9%). Estes dados indicam que ações educacionais podem levar a um aumento da eficácia do tratamento por aerossolização em pacientes críticos.

Quanto ao desenvolvimento atual da terapia com aerossol, um nebulizador chamado PARI e-flow tem sido avaliado para uma associação de nebulização de amicacina-fosfomicina, e está em fase 1 de estudo para o tratamento de pneumonia; adicionalmente um estudo para o desenvolvimento de um inalador especificamente formulado para amicacina ("Amikacin Inhale") voltado para pacientes intubados acometidos de PAV por bactérias Gram negativas também está descrito na literatura (16).

2.4 Penetração de Antibióticos no Tecido Pulmonar

Os mecanismos de penetração de antibióticos no pulmão incluem difusão passiva, permeação e transporte ativo, sendo que as propriedades físico químicas do fármaco determinam a concentração a ser atingida nos vários tecidos pulmonares. A maior ligação às proteínas dificulta a passagem do antibiótico do sangue para o tecido. Já a lipofilicidade em geral leva a um aumento da penetração pulmonar em comparação com antibióticos insolúveis em lipídeos como penicilinas e cefalosporinas. A penetração dos antibióticos farmacologicamente ativos (não ligadas às proteínas) e em concentrações efetivas (acima da CIM) é determinante para o sucesso da terapia (16, 20, 87). O tratamento intravenoso bem sucedido de infecções intrabrônquicas depende do transporte adequado dos antibióticos na corrente sanguínea através da barreira alvéolo capilar até a região alveolar (20, 87). No entanto, em pacientes críticos, esta efetividade pode ser ainda menor pois podem ocorrer alterações farmacocinéticas, as quais estão, principalmente, relacionadas à distribuição e eliminação (16). Essa variação, associada às concentrações inibitórias mínimas mais elevadas de bactérias resistentes, faz a dose adequada ser um desafio e resultar em uma entrega de uma concentração que pode ser subterapêutica (88, 89).

A concentração de antibióticos no pulmão também resulta de um processo dinâmico de penetração e clearance do fármaco. Se uma única dose do antibiótico é dada, o nível do pico no tecido ficará abaixo da concentração sérica. No entanto, após fornecer muitas doses de um antibiótico com uma longa meia vida atinge-se

o estado de equilíbrio dinâmico no tecido e no plasma. Alterações da função renal ou hepática também levam a um aumento da concentração do fármaco no organismo. No entanto, o metabolismo de fármacos pode ocorrer também no pulmão, como por exemplo por meio das células de Clara, podendo teoricamente alterar também a concentração tecidual atingida (21).

2.5 Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico que foi introduzido na rotina médica em 1956 (90). Assim, seu uso clínico ocorre há aproximadamente 60 anos como uma alternativa à penicilina após o surgimento de cepas de *S. aureus* produtoras de penicilinase. É um dos antibióticos mais usados nos Estados Unidos para tratamento de infecções graves por SARM. As primeiras formulações, por provável presença de impurezas, causaram muitos efeitos adversos e a vancomicina tornou-se menos utilizada por muitos anos com o desenvolvimento de penicilinas semissintéticas (metecilina, oxacilina, nafcilina) por serem consideradas menos tóxicas. No entanto, com o surgimento de cepas SARM por volta de 1980 houve o retorno do uso de vancomicina para o tratamento deste tipo de infecção (22).

A vancomicina apresenta grande peso molecular e é um composto hidrofílico extremamente estável (91). Embora os fabricantes indiquem que soluções reconstituídas sejam estáveis por 96 horas sob refrigeração, outros pesquisadores tem documentado que soluções reconstituídas podem permanecer viáveis por até 14 dias em temperatura ambiente (90). Diferentemente de outros agentes antibióticos, a atividade de vancomicina não é significativamente influenciado pelo pH de fluidos biológicos.

A absorção gastrointestinal da vancomicina é baixa quando administrada por via oral. Os fatores que podem alterar sua atividade clínica incluem variáveis como a distribuição no tecido e a ligação às proteínas, sendo sua distribuição e perfil tempo-concentração da vancomicina sérica apresentados de maneira complexa. A vancomicina pode se ligar à imunoglobulina A e à albumina, sendo, em média, a porcentagem não ligada de 55% (92) e apresenta modelos farmacocinéticos de um-

dois - e três compartimentos (93-97). Após a infusão, há uma fase inicial com meia vida de aproximadamente 7 minutos, uma segunda fase de diminuição da concentração sérica com meia vida de aproximadamente 0,5 a 1 hora e por fim a terceira meia vida com queda da concentração sérica variando de 2,9 a 9,1 horas, em caso de uma função renal normal (90). Em pacientes com função renal normal, a fase de distribuição varia de 30 minutos até uma hora, e a meia vida de eliminação em média varia de 6 a 12 horas, com um volume de distribuição grande, cerca de $0,4-1\text{L.kg}^{-1}$ (22, 91).

Após a administração intravenosa de vancomicina, existe uma relação significativa entre a depuração da vancomicina e depuração de creatinina. Apesar desta correlação, existe grande variabilidade da concentração sérica de vancomicina atingida. Assim, medir as concentrações no soro e individualizar a dose são medidas recomendadas (90). O monitoramento do nível sérico da vancomicina também é recomendado a fim de evitar resistência bacteriana (subdosagem) e toxicidade (doses elevadas), especialmente em pacientes tratados com outros agentes nefrotóxicos ou ototóxicos, e também pacientes com função renal instável ou sob terapia prolongada. As concentrações séricas devem ser determinadas em condições de equilíbrio ("steady state") o que é atingido após a quarta dose administrada (98). A fim de evitar resistência bacteriana, a concentração sérica deve estar acima de 10 mg.L^{-1} . E a concentração sérica ótima recomendada é de $15-20\text{mg.L}^{-1}$ se a CIM de vancomicina for de 1 mg.L^{-1} (98). Geralmente, as doses padrão são baseadas no peso corporal (15 mg.Kg^{-1}), sendo que a dose diária utilizada de vancomicina para adultos com função renal normal é de 2 g dividida em doses administradas a intervalos de 6 ou 12h, atingindo pico de concentração plasmática que varia de $30-35\text{mg.L}^{-1}$ e concentração plasmática mínima variando entre $5-10\text{ mg.L}^{-1}$ (91, 99, 100). Dados de estudos recentes sugerem que a vancomicina apresenta pequeno potencial de nefrotoxicidade quando usado em doses convencionais (1 g a cada 12 horas ou 15 mg.kg^{-1} a cada 12 horas), a menos que usada em associação com outro fármaco nefrotóxico ou ototóxico (26).

No tocante à excreção, 80-90% da vancomicina é excretada por filtração glomerular em sua forma inalterada e aproximadamente 75% da dose administrada de vancomicina é excretada na urina dentro de 24 horas de sua administração (98).

A vancomicina é um antibiótico de ação tempo dependente. Os parâmetros farmacocinéticos que podem ser medidos após a administração sérica incluem pico de concentração plasmática, concentração plasmática mínima, meia vida e volume de distribuição. Também podem ser mensurados o tempo que a concentração de vancomicina permanece acima da concentração inibitória mínima ($t > \text{CIM}$), a razão da área sob a curva (de um gráfico que apresente a concentração sérica versus tempo) pela CIM (ASC/CIM) e o pico da concentração plasmática dividida pela CIM ($\text{C}_{\text{max}}/\text{CIM}$) (22).

Revisões de farmacocinética e farmacodinâmica descrevem que o parâmetro mais recomendado para o monitoramento do tratamento sérico com vancomicina é o ASC/CIM (22). As orientações recentemente publicadas sobre a monitorização terapêutica da vancomicina defendem uma razão $\text{ASC}/\text{CIM} \geq 400$ para infecções por SARM graves inclusive em quadros de pneumonia (PAV), no caso da cepa bacteriana *S. aureus* ter CIM de $0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (22, 101). Porém, meta de $\text{ASC}/\text{CIM} \geq 400$ não é provável de ser alcançada em pacientes com infecções por *S. aureus* que apresentem uma CIM $\geq 2 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ com doses convencionais, mas somente com aumento significativo da dose de administração da vancomicina. Moise-Broder e col. relataram taxas de falhas de vancomicina de 22%, 27%, e 51% para pacientes com infecções por SARM com valores de CIM de 0,5, 1,0, e 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (101). A fim de melhores resultados terapêuticos para pacientes com pneumonia nosocomial, Georges e col. (23) definiram como meta terapêutica para a vancomicina atingir e manter níveis no fluido de revestimento epitelial alveolar acima de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para bactérias SARM suscetíveis à vancomicina (23). Assim, a relevância clínica de pequenos aumentos na CIM das diferentes cepas de *S. aureus* pode ser particularmente importante para os fármacos com baixa penetração nos tecidos; um aumento mínimo na CIM poderia, presumivelmente, resultar na concentração subterapêutica do antibiótico no local da infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

- Comparar a concentração tecidual pulmonar da vancomicina após administração intravenosa e por nebulização após 1 hora e 12 horas do término da administração.

3.2 Objetivo Secundário

- Comparar as concentrações séricas atingidas após a administração da vancomicina pelas vias de administração intravenosa e por nebulização

4 MÉTODOS

4.1 Local de Realização e Comissão de Ética

O estudo da administração de vancomicina por nebulização e por via intravenosa em modelo suíno sob ventilação mecânica foi realizado no Laboratório de Anestesiologia (LIM08) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As dosagens de vancomicina no soro e no tecido pulmonar foram realizadas no Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental (LaFaCE) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o registro CEUA nº 1001/18 (Anexo A).

4.2 Preparo Animal

Vinte e oito suínos Large White e Landrace saudáveis, de 3 a 4 meses de idade, sexo feminino, com peso médio de $26,5 \pm 3,7$ kg, em jejum de 8 horas com livre acesso à água, foram utilizados para o estudo. Um animal foi utilizado para o cálculo da dose de nebulização por meio do acesso à deposição extrapulmonar conforme descrito no item 4.3. Três animais foram alocados no grupo controle e vinte quatro animais receberam uma única dose de vancomicina por via intravenosa ou por nebulização, sendo eutanasiados uma hora ou doze horas após a administração, conforme descrição abaixo. Assim, vinte e sete animais foram divididos em cinco grupos.

1. Grupo controle negativo (n=3)– os animais não receberam antibiótico e foram eutanasiados após trinta minutos do preparo.
2. Grupo IV 1h (n=6) – os animais receberam 15 mg.kg^{-1} de vancomicina intravenosa e foram eutanasiados após 1 hora da administração.

3. Grupo IV 12h (n=6)- os animais receberam 15 mg.kg^{-1} de vancomicina intravenosa e foram eutanasiados 12 horas após a administração.
4. Grupo NEB 1h (n=6)- os animais receberam $37,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de vancomicina por nebulização e foram eutanasiados 1 hora após administração.
5. Grupo NEB 12h (n=6)- os animais receberam $37,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de vancomicina e foram eutanasiados 12 horas após a administração.

A sedação foi realizada com cetamina (5 mg.kg^{-1} - Ketamin, Cristália, Itapira-SP) e midazolam ($0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$ - Dormire Cristália, Itapira-SP) por via intramuscular, subsequente indução com propofol (3 mg.kg^{-1} - Propovan Cristália, Itapira-SP) e intubação orotraqueal. A anestesia intravenosa foi mantida com midazolam ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ - Dormire Cristália, Itapira- SP), fentanil ($16 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ -Fentanest Cristália, Itapira-SP), propofol ($100 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ Cristália, Itapira-SP) e pancurônio ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ - Pancuron Cristália, Itapira-SP). Os animais foram conectados ao ventilador mecânico Servo i (Maquet® Solna- Suécia) e a ventilação mecânica foi mantida na modalidade volume controlado com volume corrente de $8\text{-}9 \text{ ml.kg}^{-1}$, FiO_2 de 0,50 e PEEP de $5 \text{ cmH}_2\text{O}$.

Em posição supina, foi inserido um cateter na veia femoral para infusão de fluidos e a hidratação venosa foi mantida com solução balanceada de Ringer-lactato a 3 ml/kg/h . A artéria femoral foi canulada com cateter PICCO Benutzer PV2015L20 5F de 20cm para monitoramento da pressão e coleta de amostras sanguíneas. Foi realizada também a sondagem uretral para acompanhamento do débito urinário. Após, os animais foram então colocados em posição prona.

Após a preparação, os animais foram estabilizados durante a anestesia intravenosa por um período de 30 minutos e os procedimentos foram realizados de acordo com grupo em que foram alocados.

Foram realizadas coletas basais das variáveis hemodinâmicas e ventilatórias e hemogasométricas após anestesia e preparo, e de hora em hora durante todo o experimento. As coletas de sangue para dosagem de vancomicina foram realizadas no início da anestesia para amostragem basal (amostra branca) e também aos 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas após o término da administração

de vancomicina, conforme descrito no diagrama abaixo. As coletas de sangue para análise hemogasométrica foram feitas no momento basal e T12h.

Figura 3. Diagrama do delineamento experimental e coletas de sangue para dosagem sérica de vancomicina.

Os animais foram eutanasiados por exsanguinação por meio da canulação da artéria carótida, estando sob ventilação mecânica. Após a eutanásia foi realizada esternotomia e os pulmões foram retirados. Foram coletados cinco fragmentos pulmonares do lado esquerdo do pulmão, com tamanho de 1 a 2 cm³, sendo eles os lobos apical, médio, diafragmático segmento apical, diafragmático segmento anterior e diafragmático segmento posterocaudal, conforme figura 4. Os fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 ° C (82). As amostras de pulmão, bem como amostras de soro e amostras dos lavados do circuito respiratório foram processadas para dosagem da concentração de vancomicina por cromatografia líquida de alta eficiência. Os animais do grupo controle tiveram também amostras de tecido pulmonar coletadas e processadas como amostras brancas para cromatografia líquida. A partir das concentrações séricas de vancomicina, a concentração plasmática pico ($C_{\text{máx}}$) e a concentração plasmática de vale (C_{min}) foram obtidas por observação direta dos dados farmacocinéticos individuais dos animais. A área

sob a curva (ASC_{0-12h}) foi calculada por meio da somatória das áreas trapezoidais do gráfico tempo por concentração sérica obtida.

O descarte das carcaças foi realizado de acordo com as recomendações do Grupo de Gerenciamento de Resíduos da FMUSP, devidamente acondicionados, identificados e encaminhados ao setor de coleta de resíduos infectantes da instituição para posterior incineração.

Figura 4 Pulmão suíno com representação das regiões coletadas (lado esquerdo, posição prona). A. Lobo apical B. Lobo médio C. Lobo diafragmático apical D. Lobo diafragmático anterior E. Lobo diafragmático posterocaudal

4.3 Geração do Aerossol e Acesso à Deposição Extrapulmonar

A geração do aerossol foi realizada por meio do nebulizador Aeroneb Pro Nebulizer (Aeroneb Pro ®; Aerogen Ltd, Galway, Ireland) acoplado na porção inspiratória do circuito respiratório 30 centímetros antes da peça Y (Figura 4). Durante a nebulização, com duração de até 30 minutos, foi utilizado um filtro microbiológico (Servo Duo Guard – Maquet®) colocado ao fim do ramo expiratório e o modo ventilatório foi volume controlado, volume corrente de 8-9 ml/kg, fluxo inspiratório constante menor que 43 L.min^{-1} , frequência respiratória

de 12 movimentos por minuto, relação inspiração:expiração $\leq 50\%$, pausa inspiratória de 20%, PEEP de 5 cmH₂O e ausência de umidificação ou aquecimento dos gases.

A vancomicina (ABL®) utilizada foi uma formulação para administração intravenosa, sem compostos fenólicos, osmolaridade de 57 mOsm.mL⁻¹, diluído na concentração de 100 mg.mL⁻¹.

Para o cálculo da dose a ser administrada por nebulização, foi realizada a análise da deposição extrapulmonar de vancomicina em um animal. Após preparação do suíno conforme o item 4.2, a vancomicina foi nebulizada com a dose intravenosa de 15 mg.kg⁻¹, que foi baseada em um estudo recente (102). O total nebulizado foi 600mg e ao término as partes do circuito ventilatório foram lavadas separadamente com um litro de água destilada cada. Amostras foram aliquotadas e armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise. Os dados preliminares obtidos dos lavados do animal são descritos no quadro 1:

Quadro 1. Resultados do lavado do animal utilizado para padronização da dose de nebulização, sendo nebulizado 600 mg de vancomicina.

Parte do circuito	Concentração Média(ug/mL)	Desvio Padrão
Tubo Inspiratório	59,82	9,0755
Tubo Expiratório	19,81	6,9936
Peça Y	24,29	3,7039
Tubo Endotraqueal	69,52	7,9678
Filtro	101,98	12,2243
Câmara de nebulização+PeçaT	86,94	9,7857
Total de vancomicina no circuito	362,36 mg	

A deposição extrapulmonar total obtida representou 60% da dose colocada na câmara de nebulização e por conseguinte uma entrega de 40% da dose ao tecido pulmonar. Esta proporção de 60% foi acrescida à dose intravenosa de 15 mg/Kg sendo a dose de nebulização no experimento padronizada em 37,5 mg/Kg

A deposição extrapulmonar também foi analisada em cada animal que recebeu vancomicina por nebulização, a fim de confirmar a dose efetivamente entregue ao tecido pulmonar. Foi realizada a troca do circuito respiratório após o término da nebulização para efetuar o lavado, enquanto os animais permaneceram sob ventilação mecânica até o fim do experimento. Para otimização da entrega do antibiótico ao pulmão, após a colocação da dose na câmara de nebulização, o volume na câmara foi completado com água de injeção até o limite de 10 mL.

4.4 Avaliações Hemodinâmicas, Hemogasométricas e Respiratórias

Os animais foram submetidos à monitorização da saturação periférica de oxigênio (SaO_2), eletrocardiograma, pressão arterial invasiva e cateter de artéria pulmonar.

A pressão arterial invasiva foi obtida por mensuração direta através do cateter da artéria femoral acoplado a um monitor multiparamétrico (PHILIPS Intellivue MP50, EUA), obtendo-se desta forma, a pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD).

A monitorização com cateter de artéria pulmonar (Swan-Ganz 774HF75 Edwards Lifesciences) foi realizada por meio da introdução do cateter na veia jugular direita após dissecação sob plano anestésico e realização de anestesia local, fornecendo de maneira contínua a pressão de artéria pulmonar (PAP média, sistólica e diastólica), pressão de oclusão da artéria pulmonar (PoAP), pressão venosa central (PVC), saturação venosa contínua de sangue misto (SVO_2), débito cardíaco contínuo (DCC), frequência cardíaca (FC), débito cardíaco por termodiluição e temperatura central por meio do monitor Vigilance II (Edwards Lifesciences, . Irvine, EUA)

Para o cálculo da área de superfície corpórea (ASC), foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{SC} = K \cdot p^{2/3}$$

Sendo $K = 0,09$ para suínos; p = peso do suíno, em quilogramas (kg).

Os seguintes parâmetros foram calculados a partir das fórmulas padrão, diretamente no monitor de débito cardíaco:

- Índice Cardíaco: $IC = DC \cdot SC^{-1}$

Sendo o IC= índice cardíaco ($L \cdot min^{-1} \cdot m^{-2}$); DC=débito cardíaco ($L \cdot min^{-1}$) e
SC= superfície corpórea em m^2 .

- Índice de Resistência Vascular Sistêmica (IRVS):

$$IRVS = (PAM - PVC) \cdot IC \times 80^{-1}$$

Sendo PAM= pressão arterial média em mmHg e PVC= pressão venosa central em mmHg; 80= fator de correção de $mmHg \cdot L^{-1}$ para $dina \cdot seg \cdot cm^{-5}$

- Índice de Trabalho Sistólico do Ventrículo Direito (ITSVD)

$$ITSVD = IVS \cdot PAPm \times 0,0144$$

Sendo IVS= índice de volume sistólico; PAPm= pressão da artéria pulmonar média;
0,0144= equaliza as unidades

Para as variáveis hemogasométricas e de eletrólitos, a coleta de sangue arterial foi realizada pelo próprio cateter de mensuração da pressão arterial direta, permitindo a obtenção dos valores da PaO_2 , SaO_2 , $PaCO_2$, pH, íon bicarbonato, lactato, íon sódio, íon potássio, excesso de base, hemoglobina e hematócrito. As coletas de sangue venoso misto para a gasometria foram realizadas através da extremidade distal do cateter da artéria pulmonar. Estes parâmetros foram obtidos através do analisador de gases sanguíneos e pH (ABL 800, Radiometer, Copenhagen).

As variáveis respiratórias obtidas e controladas a partir do ventilador Servo-i foram frequência respiratória, pressão de vias aéreas (pico, platô e média), PEEP, complacência pulmonar dinâmica, volume corrente, volume minuto e fração inspirada de oxigênio (FiO_2).

4.5 Condições Cromatográficas Para Detecção e Quantificação da Vancomicina por Cromatografia Líquida

4.5.1 Padronização das condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas pelo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) Waters e2695 composto por bomba

quaternária modelo 1525, *degasser* de fase móvel, forno, injetor automático de amostras e detector ultravioleta/visível (UV/Vis), duplo canal (Modelo 2489, Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Como fase estacionária utilizou-se coluna Shimadzu Shim-pack CLC-ODS C18 (150 x 6,0mm; 5 µm). Após extensa aplicação de variadas composições de fase móvel, obtivemos melhor resolução aplicando as seguintes condições cromatográficas, separadas por matriz:

Condições Cromatográficas			
	Lavados	Soro	Tecido Pulmonar
Eluição	Isocrática	Isocrática	Gradiente
Fase móvel	solução de fosfato de sódio dibásico e de potássio monobásico 50 mM, pH 5,5 (A) e acetonitrila (B)	solução de fosfato de sódio dibásico e de potássio monobásico 50 mM, pH 5,5 (A) e acetonitrila (B)	solução de fosfato de amônio monobásico 50 mM, pH 4,5 (A) e acetonitrila (B)
Condição	A:B → 85:15	A:B → 90:10 – 1ª coluna A:B → 91:9 – 2ª coluna	A:B → 90:10 (0 a A:B → 91:9 A:B → 90:10 A:B → 91:9 A:B → 90:10 A:B → 91:9
Fluxo	1 mL/min	1 mL/min 0,8 mL/min	1 mL/min
T°C do forno (coluna)	35°C ± 5°C	35°C ± 5°C	40°C ± 5°C
Coluna	Shimadzu Shim-pack C ₁₈ (150 x 6,0mm; 5 µm)	Shimadzu Shim-pack C ₁₈ (150 x 6,0mm; 5 µm) e Symmetry C18 (75 x 4,6mm; 3,5 µm)	Shimadzu Shim-pack C ₁₈ (150 x 6,0mm; 5 µm)
Volume de injeção	30 µL	30 µL	20 µL
Comprimento de onda	205nm	205nm	205nm

Figura 5. Condições cromatográficas utilizadas na detecção de vancomicina nas matrizes lavado, soro e tecido pulmonar em aparelho de cromatografia líquida

Nessas condições, o tempo de retenção da vancomicina foi de aproximadamente 4,3 minutos para as amostras de lavado, 2,1 minutos para as amostras de soro e 6,5 minutos para amostras de pulmão. Para assegurar a confiabilidade dos métodos utilizados, os mesmos foram validados e realizados

testes de linearidade, precisão, exatidão e especificidade. Foram realizadas análises em vários dias com a construção de curvas de calibração independentes para os três tipos de amostras. As injeções de soluções de trabalho para as curvas das amostras de lavados foram preparadas nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 12,5; 25; 50; 100; 250 e 500 µg/mL. As injeções de soluções de trabalho para as curvas das amostras de soros foram preparadas nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 12,5; 25; 50; 100 e 250 µg/mL e as injeções para as curvas das amostras de tecidos foram preparadas nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 e 250 µg/mL. As concentrações possibilitaram a construção das curvas de calibração apresentadas na figura 8, cujas equações da reta foram utilizadas para estimar as concentrações de vancomicina nas amostras dos lavados, soro e tecido pulmonar.

Figura 6. Curvas de calibração para as amostras de lavado (a), soro (b) e tecido pulmonar (c).

O preparo das amostras de lavado do circuito respiratório consistiu em centrifugação das amostras a 10.000 RPM, 25°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e 30 µL foram injetados no cromatógrafo líquido (Figura 7).

Figura 7. Cromatograma referente à solução aquosa de vancomicina 100µg/mL e amostra de lavado da câmara de nebulização. Condições: Tempo de retenção da vancomicina= 4,3 min. Eluição isocrática. FM: solução de fosfato de sódio dibásico e de potássio monobásico 5

Níveis significativos de vancomicina foram detectados nas amostras de lavados conforme está apresentado no item 5.1. Esses níveis foram estimados através das equações da reta obtidas.

O preparo das amostras de soro consistiu em adicionar aos 200 µL de amostra, 100 µL de PI (cafeína) e 400 µL de acetonitrila. As amostras foram homogeneizadas, em vórtex, por 1 minuto e centrifugadas a 10.000 RPM, 25°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e 30 µL foram injetados no cromatógrafo líquido (Figura 8). As condições cromatográficas para dosagem de vancomicina foram: tempo de retenção da vancomicina $\approx$ 2,1 min; eluição isocrática. FM: solução de fosfato de sódio dibásico e de potássio monobásico 50 mM, pH 5,5 e acetonitrila (90:10); Fluxo: 1 mL.min⁻¹; Temperatura do forno da coluna: 35°C; Volume de injeção: 30 µL.

Figura 8. Cromatograma referente às amostras de soros dos animais analisados. A: Vancomicina acrescentada ao soro branco; B: Soro branco; C. Padrão interno: cafeína.

O preparo das amostras de tecido pulmonar consistiu em adicionar aos 200 mg de amostra triturada, 100 μ L de água ultrapura, 40 μ L de padrão interno (cafeína). As amostras foram homogeneizadas, em vórtex, por 1 minuto e acrescidas de 100 μ L de ácido trifluoroacético 50%. As amostras foram novamente homogeneizadas, em vórtex, por 1 minuto e centrifugadas a 5.000 RPM, 25°C, por 3 minutos. O sobrenadante foi recolhido, filtrado e 20 μ L foram injetados no cromatógrafo (Figura 9). As condições cromatográficas para dosagem de vancomicina pulmonar foram: tempo de retenção da vancomicina $\approx$ 6,5 min; eluição gradiente; FM: solução de fosfato de amônio monobásico 50 mM, pH 4,5 (A) e acetonitrila (B); A:B (90:10); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura do forno da coluna: 40°C; Volume de injeção: 20 μ L.

Figura 9. Cromatograma referente à amostra de tecido pulmonar. A: Amostra de pulmão branco adicionado com solução de vancomicina 10 mg.mL^{-1} . B: Amostra de pulmão Branco. C: Padrão interno cafeína $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.7 Correção da Contaminação Sanguínea no Tecido Pulmonar

A concentração de vancomicina no pulmão foi corrigida quanto à presença de sangue residual (41, 72), uma vez que a concentração sérica do antibiótico poderia interferir na sua concentração tecidual. Para correção da contaminação sanguínea foram obtidos os valores das concentrações de hemoglobina (Hb) no sangue e nas amostras de tecido pulmonar.

Os tecidos de pulmão congelados em -80°C foram pesados e homogenizados (com aparelho Polytron®) em uma solução de K-Hepes (200mM Mannitol, 80mM Hepes, 41mM KOH; pH 7.5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Todo o procedimento foi feito no gelo. O homogenato foi então centrifugado a 4000g por 30 minutos a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70°C para a análise da concentração de hemoglobina. A medida da concentração de hemoglobina foi feita por método colorimétrico pelo kit Hemoglobina (Labtest®), seguindo as instruções do fabricante.

A partir da concentração de hemoglobina no sobrenadante, corrigida pelas diluições realizadas (solução K-Hepes), obteve-se a quantidade de hemoglobina em cada amostra do pulmão por grama de tecido.

Os volumes de sangue ($V_{\text{sangue-pulm}}$) e plasma ($V_{\text{plasma-pulm}}$) presentes na amostra de pulmão foram calculados da seguinte maneira:

$V_{\text{sangue-pulm}} = Q_{\text{hb}} / H_{\text{b}}$ (sendo Q_{hb} a quantidade de hemoglobina na amostra de pulmão e H_{b} a hemoglobina no plasma)

$$V_{\text{plasma-pulm}} = V_{\text{sangue-pulm}} \times (1 - H_{\text{t}})$$

A quantidade do antibiótico presente no $V_{\text{plasma-pulm}}$ ($Q_{\text{atb plasma-pulm}}$) foi calculado: $Q_{\text{atb plasma-pulm}} = C_{\text{atb plasma}} \times V_{\text{plasma-pulm}}$

onde $C_{\text{atb plasma}}$ = concentração plasmática do antibiótico medida no último momento da avaliação antes da coleta do tecido pulmonar

A concentração efetiva de antibiótico no tecido pulmonar ($C_{\text{atb pulm}}$) será calculada : $C_{\text{atb pulm}} = (Q_{\text{atb pulm}} - Q_{\text{atb plasma-pulm}}) / \text{em } \mu\text{g/grama de tecido}$ (41, 72).

4.8 Cálculo Amostral e Análise Estatística

No trabalho de Martinez-Olondris e col. (102), estudou-se a eficácia da administração da vancomicina em um modelo experimental de pneumonia por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Neste estudo foi observada uma concentração pulmonar de 10 mg.L^{-1} de vancomicina (mediana) após administração intravenosa. Sabendo que a variabilidade estimada dessa concentração foi de aproximadamente 3 mg.L^{-1} (desvio padrão= 3 mg/L) e supondo encontrar uma concentração pulmonar de vancomicina pelo menos 50% maior no grupo que receberá este antibiótico por nebulização, com poder de 80%, a amostra necessária para a realização do estudo calculada foi de 6 animais em cada um dos grupos.

A distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados por meio de testes não paramétricos.

As concentrações séricas de vancomicina ao longo do tempo em cada grupo foram comparadas por meio do teste de Friedman (ANOVA não paramétrico), com pós teste de Dunn. As comparações entre os grupos IV e NEB foram realizadas em cada momento por meio do teste de Mann Whitney. As concentrações de pulmonares de vancomicina dos quatro grupos foram comparadas por meio do teste de Kruskal Wallis e pós teste de Dunn. As alterações ao longo do tempo das variáveis hemodinâmicas e ventilatórias foram analisadas por meio do teste de Friedman com pós teste de Dunn.

As análises foram realizadas com o programa estatístico GraphPad Prism5. O grau de significância estabelecida foi de 5%. Os dados estão apresentados como mediana (intervalo interquartilico). Os gráficos boxplot representam as seguintes medidas estatísticas: limite superior da caixa = percentil 75; limite inferior da caixa =percentil 25; linha na caixa = mediana; os limites indicam os valores mínimo e máximo, a menos que valores outliers estejam presentes (> 1,5 vezes o intervalo interquartilico).

5 RESULTADOS

5.1 Deposição Extrapulmonar de Vancomicina

Da quantidade inicial de vancomicina inserida no nebulizador ($37,5 \text{ mg kg}^{-1}$), 6 (4-9)% foram retidos na câmara de nebulização, 40 (30-55)% no ramo inspiratório do circuito respiratório e 20 (17-21)% no filtro expiratório, conforme representado na figura 10. A deposição extrapulmonar total foi de 38 (30-42)% da dose inicial. Os valores da deposição por parte do circuito e por animal estão representados no apêndice A. Estes resultados representam a análise dos grupos NEB 1h e 12h em conjunto visto que os procedimentos de nebulização foram iguais entre os grupos e não houve diferença estatisticamente significativa quanto à deposição extrapulmonar, conforme representado no apêndice B.

Figura 10. Porcentagem de vancomicina retida por parte do circuito respiratório após nebulização de uma dose de $37,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ em doze suínos anestesiados submetidos à ventilação mecânica Estatística: dados expressos através de mediana e interquartil (IQ₂₅₋₇₅)

Somando as quantidades de vancomicina depositadas em cada parte do circuito nos animais nebulizados, a deposição extrapulmonar obtida variou de 224mg a 569 mg, conforme representado na tabela 1. A quantidade de vancomicina entregue ao tecido pulmonar variou de 441 mg a 813 mg. A fração resultante de vancomicina atingindo o trato respiratório foi de 62 (57-70)% dos 37,5 mg.kg-1 iniciais colocados na câmara de nebulização, representando uma dose equivalente a 23 (21-26) mg.kg-1 do trato respiratório, valor aproximadamente 50% maior que a dose intravenosa (15 mg.kg-1).

Tabela 1 - Cálculos relacionados ao resultado da deposição extrapulmonar de Vancomicina (n=12 animais) apresentando a dose final entregue ao tecido pulmonar.

Animal	Peso (kg)	Vancomicina na câmara de nebulização (mg)	Deposição extrapulmonar (mg)	Quantidade entregue ao pulmão (mg)	Percentual da dose inicial entregue ao pulmão	Dose final de vancomicina entregue ao pulmão (mg.kg ⁻¹)
1	26,7	987,9	460,5	527,4	53,4%	19,7
2	28,0	1036,0	569,3	466,6	45,1%	16,6
3	23,7	876,9	361,3	515,5	58,8%	21,7
4	24,3	899,1	363,4	535,7	59,5%	22,0
5	30,5	1128,5	314,5	813,9	72,1%	26,7
6	23,0	851,0	338,2	512,7	60,2%	22,3
7	26,1	965,7	246,4	719,2	74,5%	27,5
8	26,6	984,2	360,1	624,0	63,4%	23,5
9	23,0	851,0	248,6	602,4	70,8%	26,1
10	18,0	666,0	224,5	441,5	66,3%	24,5
11	31,1	1150,7	416,3	734,3	63,8%	23,6
12	23,6	873,2	373,7	499,5	57,2%	21,1
Mediana	25,2	932	360	531	62	23
IQ (25-75)	(23-27)	(856-1024)	(265-406)	(503-695)	(57-70)	(21-26)

5.2 Deposição Pulmonar de Vancomicina

Neste estudo foram encontradas concentrações significativas de vancomicina no tecido pulmonar dos diferentes grupos analisados. A mediana da concentração pulmonar de vancomicina uma hora após o término da administração foi treze vezes maior no grupo aerossolizado (NEB 1h) em comparação com o grupo intravenoso (IV 1h); mediana (IQ₂₅₋₇₅) de 161 (71-301) vs. 12 (4-42) $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($p<0,05$), conforme representado na figura 11. Os resultados da mensuração de vancomicina por segmento pulmonar de cada animal estão apresentados no apêndice C.

A mediana da concentração pulmonar de vancomicina doze horas após o término da administração no grupo aerossolizado (NEB 12h) foi de 63 (23-119) $\mu\text{g.g}^{-1}$ e a mediana do grupo intravenoso (IV 12h) foi de nível indetectável 0 (0-19) $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($p<0,05$).

Figura 11. Vancomicina tecidual pulmonar após administração intravascular (15 mg.kg^{-1}) vs. nebulização 23 (21-26 mg.kg^{-1}) dos animais dos grupos que receberam uma dose do fármaco e foram eutanasiados 1 ou 12 horas após a administração. • valores outliers

A distribuição da vancomicina foi homogênea entre os segmentos pulmonares em todos os grupos analisados, não tendo sido encontrada diferença estatisticamente significativa quanto à deposição entre as regiões anatômicas. Após uma hora da administração de vancomicina por nebulização também não houve diferença de deposição entre regiões dependentes e não dependentes do pulmão; 156 (65-326) vs. 196 (79-402) $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente.

As medianas e intervalo interquartilico das concentrações de vancomicina obtidas por segmento pulmonar analisado estão representadas na tabela 2 e nas figuras 12 e 13.

Comparando a deposição de vancomicina por região pulmonar coletada entre os grupos IV 1h e NEB 1h, o grupo nebulizado apresentou concentrações significativamente maiores nos lobos médio, diafragmático apical, diafragmático anterior e diafragmático pósteros caudal (figura 12).

Quanto a comparação da deposição de vancomicina por região pulmonar entre os grupos IV 12h e NEB 12h, o grupo nebulizado apresentou concentrações significativamente maiores nos lobos apical, diafragmático anterior e diafragmático apical (figura 13).

Tabela 2 - Concentração de vancomicina ($\mu\text{g.g}^{-1}$) obtida por região pulmonar nos grupos em suínos após administração de uma dose. Mediana (interquartil IQ_{25-75})

Grupo	Região pulmonar				
	Lobo Apical	Lobo Médio	Lobo Diafr. Apical	Lobo Diafr. Anterior	Lobo Diafr. caudal
IV 1h	8 (2-38)	9(0-38)	18(3-53)	14(4-25)	38(7-78)
NEB 1h	164(54-466)	93(63-241) †	221(56-537) †	214(109-400) †	179(111-517) †
Valor p	ns (0,06)	0,005	0,01	0,002	0,01
IV 12h	0 (0-5)	5 (0-32)	0 (0-18)	0 (0-19)	14 (0-23)
NEB12h	98 (69-259) †	100 (4-140)	46 (27-130) †	60 (34-95) †	17 (6-60)
Valor p	0,006	ns (0,06)	0,02	0,01	ns (0,29)

IV intravenoso; NEB nebulização; Diafr: diafragmático; p: probabilidade; † p <0,05 vs IV

Analisando a concentração tecidual de vancomicina dos grupos NEB 12h e IV 12h, 80% dos fragmentos pulmonares no grupo NEB 12h apresentaram concentração de vancomicina acima da concentração inibitória mínima (CIM) de

uma cepa *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) com CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$, enquanto 26% dos fragmentos pulmonares coletados no grupo IV 12h apresentaram concentração de vancomicina acima da CIM do VRSA.

Figura 12. Concentração de vancomicina tecidual após administração intravascular (n=6) vs. nebulização (n=6) por região pulmonar dos animais que receberam uma dose de vancomicina e foram eutanasiados 1 hora após o término administração.

Figura 13. Concentração de vancomicina tecidual após administração intravascular (n=6) vs. nebulização (n=6) por região pulmonar dos animais que receberam uma dose de vancomicina e foram eutanasiados 12 horas após o término da administração. • valores outliers.

5.3 Dosagem Sérica de Vancomicina e Parâmetros Farmacocinéticos

As concentrações séricas de vancomicina nos grupos intravenoso e nebulizado, eutanasiados 12 horas após o término da administração de vancomicina, demonstraram variabilidade no decaimento plasmático. Os valores por animal estão descritos no apêndice D.

Analizando as concentrações séricas medianas dos grupos IV 12h e NEB 12h nos diferentes tempos, foi encontrada diferença estatisticamente significativa na concentração sérica pico aos 30 minutos após o término da administração de vancomicina, conforme representado na figura 14 e na tabela 3.

Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração sérica vale de vancomicina entre os grupos intravenoso (IV 12h) e o grupo nebulizado (NEB 12h), conforme apresentado na tabela 3.

Figura 14. Concentração sérica de vancomicina dos suínos do grupo IV 12h após administração de uma dose de vancomicina (15 mg.Kg^{-1}) e do grupo NEB 12 horas após administração de uma dose mediana (IQ_{25-75}) de $23 (21-26) \text{ mg.Kg}^{-1}$. * $p < 0,05$

Tabela 3 - Mediana e intervalo interquartil das concentrações séricas de vancomicina nos grupos IV 12h e NEB 12h dos animais eutanasiados 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina.

Tempo	Grupo		Valor p
	IV 12h ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	NEB 12h ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
T30'	36 (26-40)	18 (7-21) [†]	0,007
T1h	23 (13-31)	15 (13-18)	ns (0,09)
T2h	19 (9-33)	16 (9-25)	ns (0,58)
T4h	18 (9-25)	13 (11-19)	ns (0,59)
T6h	17 (8-23)	13 (4-17)	ns (0,48)
T8h	17 (10-20)	10 (3-22)	ns (0,42)
T12h	16 (14-21)	10 (1-20)	ns (0,43)

IV intravenoso; NEB nebulização; p: probabilidade; ns: não significante

[†] p <0,05 vs. IV

Ainda que a dose de vancomicina no grupo nebulizado tenha sido 50% maior que a dose intravenosa, não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros farmacocinéticos avaliados comparando os grupos IV 12h e NEB 12h, conforme representado na tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre o grupo IV 12h e NEB 12 h dos parâmetros farmacocinéticos obtidos por observação dos dados da concentração sérica de vancomicina. Mediana (Interquartis IQ₂₅₋₇₅)

Parâmetro Farmacocinético	IV 12h	NEB 12h	Valor de p
Cmax-pico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	35 (21- 40)	23 (18- 28)	ns (0,13)
Cmin-vale ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	9 (3-19)	4 (0- 5)	ns (0,12)
ASC _{0-12h}	188 (157-278)	154 (107-192)	ns (0,32)

Cmax-pico= concentração sérica máxima atingida, Cmin- vale= concentração sérica mínima atingida. ASC_{0-12h} área sob a curva integração 0 a 12 horas após a administração; ns= não significante.

5.4 Avaliação hemodinâmica, ventilatória e hemogasométrica

No que se refere às variáveis hemodinâmicas, a pressão arterial média ao término da nebulização (T0) do grupo NEB 12h foi significativamente menor comparado ao grupo IV 12h e a frequência cardíaca não foi diferente entre os grupos, conforme representado na figura 15 e tabela 5.

Figura 15. Pressão arterial média e frequência cardíaca dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de vancomicina por intravenosa (IV 12h) em azul ou por nebulização (NEB 12h) em laranja

Tabela 5. Variáveis hemodinâmicas dos animais avaliados dos grupos IV 12h ou NEB 12h. Mediana (IQ₂₅₋₇₅)

Variável	Grupo	Tempo					
		Basal	T0	3h	6h	9h	12h
FC bpm	IV 12h	95 (81-116)	101 (93;135)	108 (91-135)	105 (94-128)	101 (82-112)	101 (91-111)
	NEB 12h	90 (83-98)	103 (88-106)	86 (74-107)	115(104-141)	91 (74-130)	73 (68-112)
PAS mmHg	IV 12h	118 (89-144)	142 (108-159)	130 (100-145)	119 (106-134)	116 (95-137)	125 (98-129)
	NEB 12h	97 (92-106)	108 (99-112)	112 (98-121)	116 (106-134)	105 (96-111)	108 (105-143)
PAD mmHg	IV 12h	89 (61-101)	112 (77-118)	78 (72-88)	88 (80-92)	78 (75-91)	80 (77-82)
	NEB 12h	61 (54-65)	65 (61-70) †	78 (68-86)	78 (73-89)	72 (60-88)	66 (60-97)
PAM mmHg	IV 12h	100 (71-115)	122 (87-132)	104 (85-115)	95 (88-105)	91 (80-108)	94 (83-98)
	NEB 12h	75 (67-81)	80 (75-86)†	88 (82-97)	90 (84-103)	79 (73-91)	77 (73-112)
PAPm mmHg	IV 12h	20 (19-21)	19 (17-21)	21 (19-21)	20 (18-23)	20 (16-21)	21 (19-22)
	NEB 12h	20 (20-21)	21 (20-22)	20 (18-22)	23 (21-28)	21 (16-28)	25 (19-34)
PVC mmHg	IV 12h	8 (6-9)	8 (7-9)	7 (6-8)	6 (6-8)	6 (6-9)	7 (6-8)
	NEB 12h	7 (6-8)	7 (6-8)	5 (5-7)	6 (5-6)	6 (5-7)	6 (5-9)
IC l/min/m ²	IV 12h	4,1 (3,9-4,6)	-	-	-	-	3,6 (3,1-3,9)*
	NEB 12h	4,2 (3,6-4,8)	-	-	-	-	2,6(2,4-2,8)* †
IRVS dns.m ² /cm ⁵	IV 12h	1769(1062-1988)	-	-	-	-	2069(1710-2196)
	NEB 12h	1130(1029-1391)	-	-	-	-	2241(2033-2375)*
ITSVD g-m/m ² /b	IV 12h	7 (7-10)	-	-	-	-	7 (3-7)
	NEB 12h	7 (5-11)	-	-	-	-	7 (5-11)
iCEVAP mL/Kg	IV 12h	9,9(8,4-12,5)	-	-	-	-	10,3(9-11,6)
	NEB 12h	11 (9,7-14,6)	-	-	-	-	16(13-19,3) †
Temperatura °C	IV 12h	38,6(38-38,8)	-	-	-	-	38,3(38-38,6)
	NEB 12h	38,8 (38-39)	-	-	-	-	38,9(38-39)

FC: Frequência Cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; PAPm: pressão média da artéria pulmonar; PVC: pressão venosa central; IRVS:Índice de resistência vascular sistêmica; IC: índice cardíaco por termodiluição; ITSVD: índice de trabalho sistólico de ventrículo direito; iCEVAP índice do controle extravascular de água dos pulmões; T0, 3h, 6h, 9h, 12h: horas após o término da administração de vancomicina. *p<0,05 vs Basal; † p <0,05 vs IV 12h

Os grupos IV 12h e NEB 12h apresentaram diminuição significativa do índice cardíaco. O grupo NEB 12h apresentou um aumento do índice de resistência vascular sistêmica. Foi observado também um aumento do conteúdo extravascular de água pulmonar do grupo NEB 12h em comparação com o grupo IV 12h (figura 16, tabela 5).

Figura 16. Variáveis hemodinâmicas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h)

Em relação às variáveis ventilatórias, houve um aumento significativo da pressão de pico das vias aéreas (T6h, T9h e T12h) e diminuição da complacência pulmonar (T9h e T12h) nos grupos IV 12h e NEB 12h. A pressão de plateau das vias aéreas foi significativamente maior no grupo NEB 12h em comparação com o grupo IV 12h nos tempos 6h, 9h e 12h. Estes resultados estão representados nas figuras 17, 18 e 19 e na tabela 6.

Figura 17. Pressão de pico das vias aéreas dos animais durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). *p<0,05 vs Basal.

Figura 18. Complacência pulmonar dinâmica dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). *p<0,05 vs Basal.

Figura 19. Pressão de plateau das vias aéreas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). *p<0,05 vs Basal.

Tabela 6. Variáveis ventilatórias das vias aéreas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). Mediana (IQ₂₅₋₇₅)

Variável	Grupo	Tempo					
		Basal	T0	3h	6h	9h	12h
Complacência cmH ₂ O	IV 12h	26 (22-32)	25(21-28)	24(22-29)	23(21-29)	23(19-26)*	22,5(18-25)*
	NEB 12h	23 (19-29)	20(17-28)	17(15-17)	17(14-24)	17(13-23)*	16,4(14-22)*
Ppico cmH ₂ O	IV 12h	16 (15-18)	17(15-18)	18(16-19)	18(16-20)	19(18-21)*	20(18-21)*
	NEB 12h	17 (15-17)	18(16-19)	19(16-20)	20(17-21)	21(18-22)*	21(19-22)*
Pplateau cmH ₂ O	IV 12h	15(13-17)	15(14-17)	15(14-17)	15(12-16)	16(14-17)	16(15-18)
	NEB 12h	15(14-16)	15(13-17)	17(15-18)	18(16-19) †	18(17-21)* †	19(18-21)* †
Pmédia cmH ₂ O	IV 12h	15(13-17)	15(14-17)	15(14-17)	15(12-16)	16(14-17)	16(15-18)
	NEB 12h	8 (8-9)	9 (8-9)	9(8-9)	9(8-10)	9(9-9)	9,5(9-10)

Complacência.: complacência pulmonar dinâmica; Ppico: pressão de pico das vias aéreas, Pplateau: pressão plateau das vias aéreas; Pmédia: pressão média das vias aéreas; T0, T3h, T6h, T9h, T12h: horas após o término da administração de vancomicina. Dados expressos através de medianas e interquartis (IQ₂₅₋₇₅). *p<0,05 vs Basal; † p <0,05 vs IV 12h.

Quanto às variáveis hemogasométricas, o grupo NEB 12h apresentou um aumento significativo do pH e do potássio sérico. Concomitantemente, este grupo apresentou diminuição significativa da PaCO_2 arterial e do lactato sérico, conforme representado na figura 20 e tabela 7.

Figura 20. Variáveis hemogasométricas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h)

Tabela 7. Variáveis hemogasométricas dos animais avaliados durante 12 horas após a administração de uma dose de vancomicina por via intravenosa (IV 12h) ou por nebulização (NEB 12h). Mediana (IQ₂₅₋₇₅). IQ: interquartil

Variável	Grupo	Tempo (h)	
		Basal	12h
pH arterial	IV 12h	7,43(7,38-7,49)	7,54(7,47-7,56)
	NEB 12h	7,41(7,31-7,41)	7,50 (7,47-7,53)*
PaO ₂ /FiO ₂	IV 12h	360(344-380)	405(347-669)
	NEB 12h	390(365-405)	410(350-432)
PaO ₂ mmHg	IV 12h	180(172-190)	202(174-335)
	NEB 12h	195 (182-203)	205(175-216)
PaCO ₂ mmHg	IV 12h	38(36-45)	28(22-36)
	NEB 12h	42 (39-57)	31 (29-36)*
SaO ₂ %	IV 12h	100(99-100)	100(99-100)
	NEB 12h	99(99-100)	99(99-100)
SvO ₂ %	IV 12h	63(55-71)	71(62-73)
	NEB 12h	67(59-74)	67(59-74)
HCO ₃ ⁻ mmol/L	IV 12h	25,3(23,5-26,2)	25,5(19,4-26,4)
	NEB 12h	25,4(24,1-26,9)	25,2(23,6-26,8)
Na ⁺ mmol/L	IV 12h	135(132-139)	133(127-137)
	NEB 12h	136(134-138)	134(133-135)
K ⁺ mmol/L	IV 12h	3,7(3,4-3,8)	3,8(3,5-6,4)
	NEB 12h	3,5(3,2-3,7)	3,8(3,6-4)*
BE mmol/L	IV 12h	2,2(-0,6-3,4)	2,2(-2,6-2,9)
	NEB 12h	1,3(0,3-2,2)	2,6(0,6-4,2)
Lactato arterial mmol/L	IV 12h	2,6(0,9-3,9)	0,7(0,6-3,5)
	NEB 12h	2,6(2,0-3,8)	1,0(0,8-1,0)*
Ht %	IV 12h	33 (33-37)	33 (30-35)
	NEB 12h	33 (31-35)	35 (32-38)
Hb g/L	IV 12h	10,8 (10,6-11)	10,6 (10-11,4)
	NEB 12h	10,7 (10-10,7)	10,7(10,1-11)

PaO₂/FiO₂: relação pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e fração inspirada de oxigênio; PaCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial; SaO₂: saturação de oxigênio no sangue arterial; SvO₂: saturação de oxigênio no sangue venoso misto; HCO₃⁻: íon bicarbonato; Na⁺: íon sódio; K⁺: íon potássio; BE: excesso de base; Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina ; *p<0,05 vs Basal;

6 DISCUSSÃO

A utilização do modelo experimental suíno para o estudo da nebulização de antibióticos é relevante para a medicina humana. O tamanho deste animal é suficiente para se aproximar da complexidade das vias aéreas do homem. Em modelos menores como o murino, a árvore traqueobrônquica é demasiadamente diminuta, havendo menos brônquios, menor simetria entre eles, além de terminações abruptas das vias aéreas em ductos alveolares, sem passar por bronquíolos respiratórios. Estas características facilitariam a deposição pulmonar de antibióticos aerossolizados, gerando resultados superestimados. Portanto, a distância entre a traqueia proximal e os compartimentos alveolares, diâmetros aéreos, e um número de divisões brônquicas são fatores críticos que afetam a deposição pulmonar de partículas aerossolizadas.

Os suínos são também animais passíveis de serem submetidos à ventilação mecânica por vários dias e aos ajustes ventilatórios que são utilizados em humanos na posição prona fisiológica. A possibilidade de realizar o estudo neste modelo também auxilia na dificuldade em se obter tecido pulmonar humano a fim de verificar a deposição de antibióticos nebulizados na vias aéreas e no compartimento alveolar. A partir deste modelo animal é possível portanto aprofundar o entendimento da eficácia de tratamentos com a nebulização de antibióticos (72).

6.1 Deposição extrapulmonar de vancomicina

A fração resultante de vancomicina que alcançou o trato respiratório foi de 62 (57-70) % da dose inicial de 37,5 mg.Kg⁻¹ depositada na câmara de nebulização, representando uma dose mediana de 23 (21-26) mg.Kg⁻¹ entregue ao trato respiratório, um valor 1,5 vez maior que a dose intravenosa administrada (15mg.Kg⁻¹).

Esta proporção de vancomicina entregue ao sistema respiratório diferiu da obtida no animal do estudo utilizado para padronização da dose, o qual havia

apresentado uma entrega de 40% da dose nebulizada. A entrega de vancomicina foi, portanto, mais otimizada nos animais do estudo, gerando uma dose pulmonar efetiva maior que a esperada. Na literatura esta variação da eficiência do nebulizador de placa vibratória é prevista, sendo relatada uma deposição pulmonar de fármacos nebulizados de 40 a 60% da dose inicial colocada na câmara de nebulização (41, 72, 82).

Uma explicação para as altas concentrações pulmonares de vancomicina obtidas por nebulização foi a otimização da técnica de aerossolização. O preenchimento do volume na câmara de nebulização, a retenção baixa de vancomicina na câmara, o uso do tempo inspiratório de 50% do ciclo respiratório, ausência de umidificação e a posição do nebulizador 30 cm antes da peça Y foram fatores contribuintes para a eficiência da entrega pulmonar de vancomicina. Esta posição da peça Y permite a formação de um bolus de aerossóis que é levado para as vias aéreas a cada inspiração e diminui a passagem de aerossóis diretamente para a porção expiratória do circuito respiratório.

A retenção da dose de vancomicina na câmara de nebulização foi de 6 (4-9)% da dose inicial, o que é na literatura descrito como uma vantagem do nebulizador de placa vibratória (72). Outros tipos de nebulizador podem apresentar porcentagens de retenção do antibiótico na câmara de nebulização tão elevadas quanto $22 \pm 6\%$ da dose inicial (40). As partes do circuito que apresentaram maior deposição de vancomicina foram semelhantes às encontradas na literatura, sendo o ramo inspiratório, o filtro e o ramo expiratório do circuito ventilatório (40, 82). Esta similaridade é justificada decorrente da posição do nebulizador no circuito respiratório, semelhante a indicada na literatura, sendo 15 a 40 centímetros de distância da peça Y.

6.2 Deposição pulmonar de vancomicina após aerossolização

Este estudo foi realizado em suínos anestesiados e ventilados com pulmões saudáveis e demonstrou alta deposição de vancomicina no tecido pulmonar após nebulização, tanto uma quanto doze horas após o término da

administração de uma dose única de vancomicina. A concentração mediana de vancomicina no tecido pulmonar do grupo nebulizado de uma hora foi treze vezes maior que o grupo intravenoso de uma hora, com uma dose nebulizada 1,5 vezes superior que a dose intravenosa [(23 (21-26) vs. 15 mg.Kg⁻¹)]. A mediana da concentração de vancomicina no tecido pulmonar no grupo intravenoso de doze horas foi indetectável, enquanto uma alta concentração de vancomicina no tecido pulmonar foi encontrada no grupo nebulizado de doze horas.

Os resultados da deposição pulmonar de vancomicina no grupo nebulizado de doze horas demonstraram excelente cobertura da CIM de 2 µg.mL⁻¹ de cepas SARM em todos os segmentos pulmonares analisados, cujas concentrações encontradas foram de 8,5- 49 vezes maiores que este valor. Sendo a vancomicina um antibiótico tempo-dependente, os resultados dos grupos eutanasiados em doze horas são considerados clinicamente mais relevantes, uma vez que a deposição pulmonar deve ser mantida igual ou superior à CIM no intervalo entre doses para a ocorrência da eliminação bacteriana (76).

As concentrações pulmonares de vancomicina por segmento pulmonar também podem ser comparadas com a CIM de cepas resistentes à vancomicina, como as cepas VISA (CIM=4 a 8 µg.mL⁻¹) ou a cepas VRSA (CIM ≥ 16 µg.mL⁻¹), apresentando concentrações pulmonares de vancomicina uma a seis vezes maiores que a CIM das cepas VRSA e concentrações de 2 a 25 vezes maiores que a CIM das cepas VISA. No entanto, até 2005 ainda não havia sido descrita a ocorrência de PAV por estas cepas (4, 12). Em uma metanálise de 2015, descreve-se que cepas VISA representam de 2 a 9% das cepas SARM, e que a maior parte dos isolados são provenientes de hemoculturas. O isolamento destas cepas em outros tipos de amostras clínicas como escarro, pus e urina foi realizado, porém sem diferenciação das enfermidades nos trabalhos incluídos, não sendo possível identificar os casos de PAV por estas cepas (64, 103). Estudos em 27 unidades de terapia intensiva na Europa relatam dados sobre a ocorrência de PAV por SARM suscetível à vancomicina, não havendo relatos de PAV por VISA ou VRSA (103).

Os lobos apical, diafragmático apical e diafragmático anterior obtiveram maior deposição de vancomicina no grupo nebulizado de doze horas quando comparado com o grupo intravenoso de doze horas, enquanto os lobos médio e posterocaudal não apresentaram diferença entre os grupos. Os valores dos grupos NEB 12h e IV 12h no lobo médio foram 100 (4-140) vs 5 (0-32) $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($p=0,06$) respectivamente. É possível que um estudo com um número maior de animais por grupo poderia demonstrar maior deposição de vancomicina no lobo médio por nebulização. Já as concentrações de vancomicina obtidas no lobo diafragmático posterocaudal por via intravenosa e por nebulização foram as que demonstraram maior proximidade nas concentrações pulmonares obtidas, sendo este o lobo mais distante do aparato de nebulização, o que pode ter levado a menor deposição de vancomicina por aerossolização.

Devido a nebulização ter sido realizada em pulmões saudáveis, uma distribuição homogênea de vancomicina foi encontrada no grupo nebulizado de uma hora, não havendo diferença estatisticamente significativa entre a deposição em regiões dependentes e não dependentes do pulmão. Diferente deste estudo em que foi nebulizada apenas uma dose de vancomicina, outros autores realizaram nebulizações consecutivas de amicacina em animais saudáveis sob ventilação mecânica prolongada e obtiveram menor deposição de antibiótico nas regiões pulmonares dependentes. Este resultado provavelmente é explicado pela redução tempo-dependente da aeração pulmonar, havendo a ocorrência de atelectasias (104).

A frequência de administração por nebulização de doses de antibióticos tempo-dependentes é uma preocupação descrita na literatura. A necessidade de realizar muitas nebulizações diárias para manter a concentração pulmonar adequada representa pouca viabilidade da aplicação prática da técnica da nebulização. Estudos com a nebulização de ceftazidima em pulmões infectados, sendo um antibiótico tempo-dependente, demonstraram a necessidade de oito nebulizações diárias para manter a concentração adequada no pulmão (39), o que dificulta seu uso clínico. A manutenção de concentrações significativas após a nebulização de vancomicina ao longo das doze horas do experimento pode

significar uma frequência de nebulização viável na prática clínica. No entanto, estudos de nebulização com vancomicina em pulmões infectados serão importantes, uma vez que a deposição de antibióticos após a nebulização pode ser significativamente menor em segmentos com pneumonia grave. Há relatos na literatura de concentrações pulmonares de antibióticos obtidas por nebulização até cinco vezes menores em pulmões infectados quando comparados a deposição em pulmões saudáveis (38, 40). A menor quantidade de deposição pulmonar do antibiótico, portanto, poderia representar a necessidade de um maior número de nebulizações diárias.

A vancomicina inalada tem sido considerada uma prática segura e bem tolerada, conforme indicado por alguns dados disponíveis na literatura (34, 42, 105-109). A vancomicina nebulizada foi utilizada com sucesso no tratamento da infecção crônica por SARM em um paciente com fibrose cística (106). A nebulização de vancomicina também foi utilizada como tratamento para traqueobronquite associada à ventilação mecânica (TAV) em dois estudos controlados e randomizados ($n = 85$ pacientes, $n = 9$ pacientes com VAT MRSA) (34, 42). Uma redução acentuada no crescimento bacteriano foi obtida na maioria dos pacientes, e apenas um paciente permaneceu infectado com TAV por MRSA ao final do tratamento. Nenhum desses estudos descreve a aerossolização da vancomicina para o tratamento da PAV, o que exige uma deposição de vancomicina efetiva nos compartimentos alveolares do pulmão ao invés das vias aéreas mais proximais (72).

Verificando a dose nebulizada em cada animal, calculada após a mensuração da deposição extrapulmonar de vancomicina, a variação foi de 16,6 mg.Kg⁻¹ a 27,5 mg.Kg⁻¹. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as doses administradas e as concentrações pulmonares obtidas nos grupos nebulizados (por lobo ou em conjunto), impossibilitando a correção dos dados pulmonares para doses equipotentes. No entanto, em uma simulação, o acerto das concentrações em uma suposta relação linear por meio de redução na concentrações pulmonares obtidas de vancomicina da proporção excedente em cada dose com relação a dose padrão de 15 mg.Kg⁻¹, ainda demonstrou as

mesmas diferenças estatisticamente significantes com os mesmos valores de probabilidade de erro entre os grupos nebulizado e intravenoso.

As concentrações teciduais foram corrigidas quanto à contaminação sanguínea. A concentração de hemoglobina no tecido e a concentração de sérica vancomicina no momento do sacrifício interferiram no quanto o resultado obtido se apresentou superestimado. Nos grupos intravenosos a contaminação sanguínea superestimou a concentração pulmonar de vancomicina em 5,8% e nos grupos aerossolizados superestimou em 1,2%. Assim, a mensuração de hemoglobina tecidual mostrou baixa contaminação, uma vez que os animais foram exsanguinados antes da coleta da amostra pulmonar.

6.3 Deposição pulmonar de vancomicina após administração intravenosa

Na literatura, um estudo prévio descreve que a administração de uma dose de vancomicina (1 g) por via intravenosa em humanos não possibilitou a manutenção adequada da concentração pulmonar de vancomicina por doze horas, com concentração pico e vale pulmonares obtidas de mediana (IQ₂₅₋₇₅) 9,6 (6-10) vs. 0,85 (0-1,2) $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente (20). Neste estudo, os resultados foram semelhantes no grupo intravenoso de doze horas, com concentração de tecido pulmonar de vancomicina de 12 (4-42) $\mu\text{g.g}^{-1}$ uma hora após o término da administração e 0 (0-19) $\mu\text{g.g}^{-1}$ em doze horas. Mais doses de vancomicina por via intravenosa seriam necessárias para atingir a concentração sérica do estado de equilíbrio, a fim de obter concentrações mais significativas de vancomicina no tecido pulmonar. Um estudo em suínos acometidos de broncopneumonia por SARM em que as dosagens de vancomicina pulmonar foram realizadas já em estado de equilíbrio deste fármaco, as medianas de concentração após doze horas foram mais elevadas, de mediana $\leq 10 \text{ mg.g}^{-1}$ nos diferentes segmentos pulmonares (102). Em contraposição, no presente estudo, a nebulização resultou em altas concentrações após doze horas com uma única dose, uma vez que a terapia por aerossolização tem as vias aéreas como um alvo direto.

A penetração pulmonar de antibióticos após administração intravenosa é influenciada por vários fatores como tamanho molecular, ligação às proteínas e lipofilicidade do fármaco (91). Espera-se que o leito capilar pulmonar fenestrado permita a difusão passiva de antibióticos com um peso molecular de até 1.000 daltons (110). Moléculas lipofílicas tem a difusão facilitada pela barreira alvéolo-capilar. A vancomicina é um composto glicopeptídico grande, com peso molecular de aproximadamente 1450 daltons, e é uma molécula com alta hidrofílicidade, apresentando baixa penetração pulmonar após administração intravenosa (20, 24). Um estudo experimental anterior em ratos indicou que a vancomicina tem uma capacidade limitada para atravessar a membrana alvéolo-capilar, mesmo após a administração por aerossolização. Para as vias de administração intravenosa ou por aerossolização, a vancomicina permanece largamente do lado em que foi administrada (111).

6.4 Farmacocinética plasmática

A farmacocinética da vancomicina após a administração intravenosa é vastamente apresentada na literatura. Um estudo prévio em suínos após administração da dose de 15 mg.Kg⁻¹ de vancomicina por via intravenosa obteve concentração sérica vale de mediana 17 (7-28) µg.mL⁻¹, que foi similar a obtida neste estudo; 16 (14-21) µg.mL⁻¹(102).

Após a administração da vancomicina por nebulização não houve ocorrência de pico plasmático aos trinta minutos do término da administração de vancomicina, em comparação com o grupo intravenoso, ainda que a dose de nebulização tenha sido 1,5 vezes superior. Concomitantemente, altas concentrações pulmonares de vancomicina foram obtidas após nebulização, o que demonstra uma tendência de restrição da deposição de vancomicina em outros órgãos que não sejam o pulmão. Isso ocorre porque, em animais com pulmões saudáveis, a integridade da membrana alvéolo-capilar oferece alta resistência à difusão sistêmica da vancomicina (104).

A concentração sérica vale de vancomicina é um parâmetro importante para a avaliação da toxicidade, sendo que neste estudo as concentrações séricas vale obtidas nos grupos nebulizado e intravenoso de doze horas foram estatisticamente semelhantes. Uma vez que a dose administrada de vancomicina no grupo nebulizado foi 1,5 vezes maior, verifica-se que em pulmões saudáveis é possível administrar doses mais elevadas por nebulização sem aumentar a toxicidade sistêmica da vancomicina, relacionada com insuficiência renal e ototoxicidade (40).

O parâmetro farmacocinético área sob a curva (ASC) foi de mediana menor no grupo nebulizado doze horas em relação ao intravenoso doze horas, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa. Na razão ASC nebulizado/ASC intravenoso tem-se o resultado de 0,85, significando um valor da ASC do grupo nebulizado 15% menor que este parâmetro intravenoso.

Em uma simulação de correção proporcional nas concentrações séricas de vancomicina do grupo nebulizado 12 horas, já que a dose nebulizada foi 1,5 vez maior, os parâmetros farmacocinéticos do grupo nebulizado de doze horas passariam a ser estatisticamente menores comparados aos parâmetros obtidos no grupo intravenoso. Isto poderia representar menor toxicidade da vancomicina nebulizada a partir da administração de doses equipotentes.

6.5 Alterações hemodinâmicas, ventilatórias e hemogasométricas

As alterações ventilatórias dos suínos anestesiados e sob ventilação mecânica foram aumento de pressão de pico e plateau das vias aéreas e diminuição da complacência. Estas alterações são decorrentes das mudanças na mecânica respiratória resultantes do tempo de anestesia. Durante a administração dos anestésicos, há uma queda na capacidade residual funcional dos pulmões, levando a uma perda do tônus muscular e alterações da força do tecido elástico pulmonar. Estes efeitos levam a diminuição da complacência pulmonar e o aumento da resistência respiratória. A queda na capacidade residual funcional do pulmão promove fechamento das vias aéreas, levando a formação de atelectasias,

agravada pelo uso de uma maior fração de oxigênio inspirado (112). Manobras de recrutamento poderiam auxiliar quanto às atelectasias, porém não faziam parte do protocolo deste estudo.

Nos doze animais dos grupos intravenoso e nebulizado monitorados por doze horas, os parâmetros hemodinâmicos permaneceram essencialmente estáveis ao longo do período do estudo. Ainda que a pressão arterial média do grupo nebulizado logo após o término da administração da vancomicina por nebulização tenha sido relativamente menor que a pressão média do grupo intravenoso, os valores encontrados apresentaram-se dentro da normalidade.

A fluidoterapia dos animais foi mantida em 3 mL.Kg^{-1} , o que pode ter levado a certo grau de desidratação dos animais. Foi observado uma queda no índice cardíaco nos grupos intravenoso e nebulizado e aumento do índice de resistência vascular sistêmica no grupo nebulizado.

No grupo nebulizado foi encontrada maior índice de conteúdo extravascular de água nos pulmões, o que é um achado compatível com o procedimento de aerossolização pulmonar. Os animais monitorados por doze horas apresentaram alcalose respiratória ao final do experimento por hiperventilação, com concentração arterial de dióxido de carbono diminuída ao fim do experimento. Os parâmetros ventilatórios foram mantidos durante todo o experimento, não sendo realizado ajustes da frequência respiratória ao longo do período da anestesia, o que pode ter levado a estas alterações na hemogasometria final. Os valores de potássio encontrados permaneceram dentro dos limites de normalidade e a concentração sérica lactato apresentou uma tendência de queda ao fim do experimento, uma vez que os valores altos no início do estudo podem ser devido ao estresse do transporte animal.

6.6 Limitações

Este estudo possui limitações por ser um estudo experimental em suínos, e os resultados não podem ser automaticamente extrapolados para humanos. Primeiramente foi realizado com a administração de uma dose única, não sendo

possível a avaliação sobre a ocorrência de acúmulo pulmonar de vancomicina em um período longo de administração, não permitindo melhor avaliação da toxicidade sistêmica. Em segundo lugar, as doses administradas não foram equipotentes, o que pode ter superestimado as concentrações pulmonares e séricas obtidas. Terceiro, os presentes dados não podem ser extrapolados para o tratamento da broncopneumonia confluenta, o que dificulta a ventilação mecânica e as concentrações teciduais de vancomicina em um parênquima pulmonar pobremente aerado e infectado podem ser menores. Sendo este estudo realizado em pulmão saudável, suas implicações clínicas remetem-se à prevenção de infecções pulmonares e no tratamento de broncopneumonia nos primeiros estágios em que o pulmão permanece bem aerado (40, 113). Portanto, mais estudos são requeridos para investigar a deposição pulmonar de vancomicina em um parênquima pulmonar infectado com cepas SARM com CIM igual ou superior a $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (19).

7 CONCLUSÃO

A concentração pulmonar de vancomicina obtida por meio de nebulização foi superior a concentração pulmonar obtida após a administração intravenosa, tanto na comparação entre os grupos de uma hora quanto entre os grupos de doze horas após o término da administração.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações séricas de vancomicina nos animais dos grupos intravenoso e nebulizado doze horas após término da administração.

8 ANEXOS E APÊNDICES

8.1 Anexo A- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“Estudo comparativo da administração intravenosa e por nebulização de vancomicina em pulmão saudável de suínos sob ventilação mecânica”**, registrada com o nº **1001/2018**, sob a responsabilidade de **Denise Aya Otsuki e Cristiane Luchesi de Mello Morais**, apresentada pelo Departamento de Cirurgia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 21.02.18.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 15-02-2018 Término: 15-02-2019
Espécie/linhagem/raça	Suíno
Nº de animais	29
Peso/Idade	25 kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Granja RG

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 21 de Fevereiro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

8.2 Apêndice A –Quantidade de vancomicina retida nas partes do circuito e somatória representando a retenção total do fármaco no circuito ventilatório de cada animal dos grupos NEB 1h e NEB 12h. As concentrações foram obtidas a partir dos dados das áreas de vancomicina dos Cromatogramas. VANC; vancomicina

Grupo	Animal	Amostra do Lavado	Área Vancomicina	VANC lavado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Somatória (mg) (vancomicina em 1L)
Grupo NEB 1h	1	Ramo Inspiratório	31606008	262,69	460,50
		Ramo Expiratório	1798766	10,08	
		Câmara T	3883503	27,75	
		Filtro	11890822	95,61	
		Peça Y	1987886	11,69	
		Tubo endotraqueal	6825579	52,68	
	2	Ramo Inspiratório	28066837	232,70	569,39
		Ramo Expiratório	20074103	164,96	
		Câmara T	3849879	27,46	
		Filtro	12748184	102,88	
		Peça Y	1151998	4,60	
		Tubo endotraqueal	4950329	36,79	
	3	Ramo Inspiratório	24401654	201,63	361,33
		Ramo Expiratório	2216386	13,62	
		Câmara T	3556814	24,98	
		Filtro	7891514	61,72	
		Peça Y	1457616	7,19	
		Tubo endotraqueal	6766923	52,19	
	4	Ramo Inspiratório	20146870	165,58	363,39
		Ramo Expiratório	5552422	41,89	
		Câmara T	3823862	27,24	
		Filtro	8901877	70,28	
		Peça Y	1189847	4,92	
		Tubo endotraqueal	6919527	53,48	
	5	Ramo Inspiratório	22252903	183,43	338,25
		Ramo Expiratório	7454090	58,01	
		Câmara T	2375447	14,97	
		Filtro	9049218	71,53	
		Peça Y	823355	1,82	
		Tubo endotraqueal	1611657	8,5	
	6	Ramo Inspiratório	14494116	117,67	314,54
		Ramo Expiratório	3981940	28,58	
		Câmara T	3982948	28,59	
		Filtro	12641837	101,97	
		Peça Y	1450325	7,13	
		Tubo endotraqueal	4218878	30,59	

	Amostra do Lavado	Área	$(\mu\text{g.mL}^{-1})$	Somatória (mg) (em 1L)
		Vancomicina		
Grupo NEB 12h	1	Ramo Inspiratório	10504768	83,86
		Ramo Expiratório	7649329	59,66
		Câmara T	3889379	27,80
		Filtro	1176856	4,81
		Peça Y	1620869	8,57
		Tubo endotraqueal	7891049	61,71
	2	Ramo Inspiratório	7745922	60,48
		Ramo Expiratório	18670696	153,07
		Câmara T	4377129	31,93
		Filtro	7941145	62,14
		Peça Y	1193644	4,95
		Tubo endotraqueal	6224168	47,59
	3	Ramo Inspiratório	9116930	72,10
		Ramo Expiratório	5289508	39,67
		Câmara T	4337144	31,59
		Filtro	8358042	65,67
		Peça Y	1549944	7,97
		Tubo endotraqueal	4338179	31,60
	4	Ramo Inspiratório	11258542	90,25
		Ramo Expiratório	68068	-4,58
		Câmara T	2517421	16,17
		Filtro	6338852	48,56
		Peça Y	5228407	39,15
		Tubo endotraqueal	4735171	34,97
	5	Ramo Inspiratório	12252693	98,68
		Ramo Expiratório	20290463	166,79
		Câmara T	2906555	19,47
		Filtro	10763249	86,05
		Peça Y	1074164	3,94
		Tubo endotraqueal	5497922	41,43
	6	Ramo Inspiratório	29931974	248,50
		Ramo Expiratório	4816444	35,66
		Câmara T	3047920	20,67
		Filtro	6673410	51,39
		Peça Y	920328	2,64
		Tubo endotraqueal	2360244	14,84

8.3 Apêndice B- Comparação dos resultados da quantidade de vancomicina nos lavados das partes do circuito respiratório dos grupos NEB 1h e NEB 12h. (n=12) IQ: interquartil

Grupos (eutanásia 1h vs. 12 h) (NEB 1h vs. NEB 12h) e Parte do Circuito respiratório	Quantidade (mg) Mediana (IQ ₂₅₋₇₅)	% retida Mediana (IQ ₂₅₋₇₅)	Valor de p
Circuito – Ramo Inspiratório			
NEB 1h	184 (106-240)	43(35-56)	ns (0,30)
NEB 12h	94(78-200)	37(22-57)	
NEB 1h e 12h	141 (88-209)	40 (30-55)	
Circuito - Filtro Expiratório			
NEB 1h	83 (65-102)	20(18-28)	ns (0,09)
NEB 12h	56(37-75)	19(11-21)	
NEB 1h e 12h	68 (59-88)	20 (17-21)	
Circuito – Tubo endotraqueal			
NEB 1h	44(31-53)	12(9-14)	ns (0,58)
NEB 12h	38(13-51)	11(3-18)	
NEB 1h e 12h	39 (31-52)	11 (4-15)	
Circuito – Ramo Expiratório			
NEB 1h	34 (13-72)	10 (3-19)	ns (0,39)
NEB 12h	59 (27-156)	20 (7-40)	
NEB 1h e 12h	40 (25-83)	14 (5-27)	
Câmara Nebulização e Peça T			
NEB 1h	27(26-29)	7 (6-10)	ns (0,24)
NEB 12h	20 (16-29)	6(4-9)	
NEB 1h e 12h	27(20-28)	6 (4-9)	
Circuito – Peça Y			
NEB 1h	7 (5-9)	2 (1-3)	ns (0,48)
NEB 12h	4 (2-16)	11(1-7)	
NEB 1h e 12h	6(4-8)	1 (1-3)	
Circuito- somatória das partes			
NEB 1h	362 (298-488)	-	ns (0,39)
NEB 12h	349 (241-384)	-	
NEB 1h e 12h	360 (265-406)	-	

8.4 Apêndice C – Dosagem de vancomicina pulmonar por cromatografia líquida de alta eficiência (dados da área de vancomicina no cromatograma: razão das áreas de vancomicina pela área PI: padrão interno) e concentração pulmonar de vancomicina corrigida quanto à contaminação sanguínea ($\mu\text{g.g}^{-1}$) por meio das concentrações séricas obtidas de vancomicina no momento da eutanásia. Diaf: diafragmático, ND- não detectável

Grupo	Animal	Segmento	Área Vancomicina/PI	$\mu\text{g.g}^{-1}$	$\mu\text{g.g}^{-1}$
					corrigida
Grupo IV 1h	1	Apical	ND	0	0
		Médio	1.1110	47.4	46.1
		Diaf. apical	1.0708	42.9	41.5
		Diaf.anterior	0.8023	13.1	11.7
		Diaf.Posterocaudal	1.4719	87.3	85.9
	2	Apical	ND	0	0
		Médio	0.3211	0	0
		Diaf. apical	0.3928	0	0
		Diaf.anterior	0.2633	0	0
		Diaf.Posterocaudal	0.4007	0	0
	3	Apical	0,0203	6.2	4.8
		Médio	ND	0	0
		Diaf. apical	0,0221	8.1	6.7
		Diaf.anterior	0,0311	17.15	15.7
		Diaf.Posterocaudal	0,0245	10.45	9.0
	4	Apical	0,0392	25.15	23.4
		Médio	0,0207	6.65	4.9
		Diaf. apical	0,1169	90.65	88.9
		Diaf.anterior	0,0353	21.35	19.6
		Diaf.Posterocaudal	0,0414	27.8	26.1
	5	Apical	0,0398	53.65	52.9
		Médio	0,0418	36.6	35.9
		Diaf. apical	0,0322	29.95	29.2
		Diaf.anterior	0,0506	44.2	43.5
		Diaf.Posterocaudal	0,0604	50.1	49.9
	6	Apical	0,0233	9.2	7.9
		Médio	0,0094	13.95	12.5
		Diaf. apical	0,0192	5.1	3.8
		Diaf.anterior	0,0207	6.7	5.4
		Diaf.Posterocaudal	0,0963	77.05	75.7
Grupo IV 12h	1	Apical	0,0195	21.05	19.1
		Médio	0,0343	61.05	59.1
		Diaf. apical	ND	0	0
		Diaf.anterior	0,0691	55.1	53.1
		Diaf.Posterocaudal	0,0029	9.15	7.2
	2	Apical	ND	0	0
		Médio	ND	0	0
		Diaf. apical	ND	0	0
		Diaf.anterior	0,0229	8.7	7.5
		Diaf.Posterocaudal	0,0390	24.95	23.8

	3	Apical	0.0015	0	0
		Segmento	Área		
			Vancomicina/PI	$\mu\text{g.g}^{-1}$	Corrigido
		Médio	0.0017	0	0
		Diaf. apical	0.0039	0	0
		Diaf.anterior	0.0022	0	0
		Diaf.Posterocaudal	0.0360	22.1	20.7
	4	Apical	0.0045	0	0
		Médio	0.0258	11.8	10.3
		Diaf. apical	0.0072	0	0
		Diaf.anterior	0.0014	0	0
		Diaf.Posterocaudal	0.0017	0	0
	5	Apical	0.0017	0	0
		Médio	0.0262	24.84	23.5
		Diaf. apical	0.0152	1.17	0
		Diaf.anterior	ND	0	0
		Diaf.Posterocaudal	0.0247	24.6	23.3
	6	Apical	0.0023	0	0
		Médio	ND	0	0
		Diaf. apical	0.0944	73.7	71.8
		Diaf.anterior	0.0064	0	0
		Diaf.Posterocaudal	0.0082	0	0
Grupo NEB 1h	1	Apical	0.2466	230.8	230.1
		Médio	0.0671	55	54.9
		Diaf. apical	0.5590	546.05	545.4
		Diaf.anterior	0.8770	621.4	620.8
		Diaf.Posterocaudal	1.1177	794.3	793.7
	2	Apical	0.5920	580.3	580.3
		Médio	0.2573	240.6	240.6
		Diaf. apical	0.1640	149.3	149.3
		Diaf.anterior	0.1395	123.01	123.01
		Diaf.Posterocaudal	0.2096	194.58	194.58
	3	Apical	0.1158	101.32	98.5
		Médio	0.2607	244.94	242.1
		Diaf. apical	0.3598	295.82	293.0
		Diaf.anterior	0.1821	165.5	162.7
		Diaf.Posterocaudal	0.1795	166.07	163.3
	4	Apical	0.0884	73.24	72.5
		Médio	0.0820	66.78	66.0
		Diaf. apical	0.0789	64.9	64.1
		Diaf.anterior	0.0834	68.2	67.5
		Diaf.Posterocaudal	0.0568	42.57	41.8
	5	Apical	ND	0	0
		Médio	0.1252	109.18	108.7
		Diaf. apical	0.5573	535.27	534.8
		Diaf.anterior	0.3372	326.45	325.9
		Diaf.Posterocaudal	0.4402	425.9	425.4
	6	Apical	0.4594	432.38	428.6
		Médio	0.0981	82.42	78.6
		Diaf. apical	0.0506	36.38	38.1
		Diaf.anterior	0.2730	269.74	265.9
		Diaf.Posterocaudal	0.1509	137.54	133.7

Grupo	Animal	Segmento	Área Vancomicina/PI	$\mu\text{g.g}^{-1}$	$\mu\text{g.g}^{-1}$ corri gida
Grupo NEB 12h	1	Apical	0.1067	91.64	90.7
		Médio	0.0869	71.08	70.1
		Diaf. apical	0.0534	38.75	37.8
		Diaf.anterior	0.0566	42.18	41.2
		Diaf.Posterocaudal	0.0256	11.52	10.6
	2	Apical	0.6328	621.91	621.9
		Médio	0.1445	130.11	130.1
		Diaf. apical	0.0442	30.34	30.3
		Diaf.anterior	0.1235	109.03	109.0
		Diaf.Posterocaudal	0.0560	41.37	41.3
	3	Apical	0.1053	90.69	89.9
		Médio	0.1778	159.7	159.0
		Diaf. apical	0.3550	262.02	261.3
		Diaf.anterior	0.0928	78.92	78.2
		Diaf.Posterocaudal	ND	0	0
	4	Apical	0.1523	138.08	137.8
		Médio	0.0176	3.6	3.3
		Diaf. apical	0.0708	55.7	55.5
		Diaf.anterior	0.1071	91.34	91.1
		Diaf.Posterocaudal	0.1314	116.21	115.9
	5	Apical	0.0213	7.1	6.9
		Médio	0.0190	5.02	4.8
		Diaf. apical	0.0309	17.13	17.0
		Diaf.anterior	0.0357	21.12	20.9
		Diaf.Posterocaudal	0.0222	8.21	8.1
	6	Apical	0.1204	106.2	105.3
		Médio	0.1787	134.08	133.2
		Diaf. apical	0.0958	87.86	86.9
		Diaf.anterior	0.0534	39.04	38.1
		Diaf.Posterocaudal	0.0398	25.05	24.1

8.5 Apêndice D- Concentrações séricas de vancomicina obtidas nos animais dos grupos intravenoso e nebulizado, eutanasiados 1 hora ou 12 horas após receberem uma dose deste fármaco. Área VANC/PI: razão área vancomicina/ área PI obtidas a partir dos cromatogramas da técnica de dosagem por cromatografia líquida de alta eficiência. (VANC: vancomicina; PI: padrão interno, Cont: continuação); ND: não detectável

Grupo	Animal	Tempo	Área VANC/PI	Conc. sérica $\mu\text{g.mL}^{-1}$
IV 1h	1	T30	0,1212	26,42
		T1h	0,1062	21,41
	2	T30	ND	ND
		T1h	0,0528	3,59
	3	T30	0,0977	18,55
		T1h	0,0811	13,04
	4	T30	0,0909	16,29
		T1h	0,0825	13,50
	5	T30	0,1050	21,00
		T1h	0,1025	20,18
IV 12h	1	T30	0,1047	20,90
		T1h	0,0924	16,82
	2	T1h	0,0957	17,90
		T2h	0,0960	17,99
		T4h	0,0588	5,59
		T6h	0,0988	18,93
		T8h	0,0982	18,75
		T12h	0,0957	17,90
	3	T30	0,1614	39,81
		T1h	0,1365	31,49
		T2h	0,1398	32,61
		T4h	0,1087	22,23
		T6h	0,0562	4,72
		T8h	0,0693	9,11
	4	T12h	0,0858	14,59
		T30	0,1499	35,97
		T1h	0,1213	26,43
		T2h	0,0780	12,00
		T4h	0,0827	13,58
		T6h	0,0915	16,49
	5	T8h	0,0872	15,08
		T12h	0,0875	15,16
		T30	0,1306	29,53
		T1h	0,1342	30,73
		T2h	0,1003	19,42
		T4h	0,1464	34,81
	6	T6h	0,1112	23,07
		T8h	0,0993	19,09
		T12h	0,0990	19,02
		T30	0,1092	22,40
	7	T1h	ND	ND
		T2h	ND	ND
		T4h	0,0725	10,16
		T6h	0,0725	10,16

Grupo	Animal	Tempo	Área VANC/PI	Conc. sérica $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Cont. IV12h	Cont .5	T6h	0,0714	9,80
		T8h	0,0720	10,00
		T12h	0,0757	11,24
	6	T30	0,1663	41,43
		T1h	0,1043	20,78
		T2h	0,1512	36,39
		T4h	0,1091	22,38
		T6h	0,1111	23,04
		T8h	0,1128	23,60
		T12h	0,1285	28,84
NEB 1h	1	T30	0,0349	16,93
		T1h	0,0289	10,93
	2	T30	0,1862	168,21
		T1h	ND	ND
	3	T30	0,0405	22,54
		T1h	0,0641	46,13
	4	T30	0,0371	19,08
		T1h	0,0244	6,40
	5	T30	0,0414	23,44
		T1h	0,0342	16,20
NEB 12h	1	T30	0,0750	56,96
		T30	0,0226	4,64
		T1h	0,0337	15,74
		T2h	0,0337	15,66
		T4h	0,0398	21,76
		T6h	0,0313	13,31
		T8h	0,0290	10,98
		T12h	0,0391	21,13
	2	T30	0,0402	22,21
		T1h	0,0308	12,83
		T2h	0,0446	26,61
		T4h	0,0326	14,60
		T6h	0,0415	23,49
		T8h	0,0235	5,54
		T12h	ND	ND
	3	T30	0,0365	18,53
		T1h	0,0364	18,37
		T2h	0,0430	24,98
		T4h	0,0305	12,50
		T6h	0,0235	5,52
	4	T30	0,3294	311,35
		T1h	0,0325	14,48
		T2h	0,0287	10,70
		T4h	0,0279	9,93
		T6h	ND	ND
		T8h	0,0189	0,90
		T12h	0,0279	9,87
	5	T30	0,0372	19,21
		T1h	0,0356	17,57
		T2h	0,0346	16,63
		T4h	0,0299	11,85

Grupo	Animal	Tempo	Área VANC/PI	Conc. sérica $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Cont.NEB12h	Cont. 5	T6h	0,0334	15,36
		T8h	0,0512	33,17
		T12h	0,0211	3,10
		T30	0,0272	9,22
	6	T1h	0,0308	12,77
		T2h	0,0246	6,55
		T4h	0,0369	18,94
		T6h	0,0307	12,73
		T8h	0,0280	10,04
		T12h	0,0374	19,40

9 REFERÊNCIAS

1. Kalanuria AA, Ziai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Crit Care*. 2014;18(2):208.
2. Bassetti M, Vena A, Castaldo N, Righi E, Peghin M. New antibiotics for ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(2):177-86.
3. Bercault N, Boulain T. Mortality rate attributable to ventilator-associated nosocomial pneumonia in an adult intensive care unit: a prospective case-control study. *Crit Care Med*. 2001;29(12):2303-9.
4. American Thoracic S, Infectious Diseases Society of A. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(4):388-416.
5. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*. 1995;274(8):639-44.
6. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(7):867-903.
7. Jarvis WR. The Lowbury Lecture. The United States approach to strategies in the battle against healthcare-associated infections, 2006: transitioning from benchmarking to zero tolerance and clinician accountability. *J Hosp Infect*. 2007;65 Suppl 2:3-9.
8. Metersky ML, Wang Y, Klompas M, Eckenrode S, Bakullari A, Eldridge N. Trend in Ventilator-Associated Pneumonia Rates Between 2005 and 2013. *JAMA*. 2016;316(22):2427-9.
9. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med*. 2010;362(19):1804-13.
10. Melsen WG, Rovers MM, Koeman M, Bonten MJ. Estimating the attributable mortality of ventilator-associated pneumonia from randomized prevention studies. *Crit Care Med*. 2011;39(12):2736-42.
11. Bouadma L, Sonnevile R, Garrouste-Orgeas M, Darmon M, Souweine B, Voiriot G, et al. Ventilator-Associated Events: Prevalence, Outcome, and Relationship With Ventilator-Associated Pneumonia. *Crit Care Med*. 2015;43(9):1798-806.
12. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 2016;63(5):e61-e111.
13. Bouadma L, Wolff M, Lucet JC. Ventilator-associated pneumonia and its prevention. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(4):395-404.
14. Safdar N, Dezfulian C, Collard HR, Saint S. Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review. *Crit Care Med*. 2005;33(10):2184-93.
15. Muscedere JG, Martin CM, Heyland DK. The impact of ventilator-associated pneumonia on the Canadian health care system. *J Crit Care*. 2008;23(1):5-10.
16. Bassetti M, Luyt CE, Nicolau DP, Pugin J. Characteristics of an ideal nebulized antibiotic for the treatment of pneumonia in the intubated patient. *Ann Intensive Care*. 2016;6(1):35.

17. Lam AP, Wunderink RG. Methicillin-Resistant *S. aureus* Ventilator-Associated Pneumonia: Strategies to Prevent and Treat. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27(1):92-103.
18. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin Infect Dis*. 2011;52(3):285-92.
19. Choi EY, Huh JW, Lim CM, Koh Y, Kim SH, Choi SH, et al. Relationship between the MIC of vancomycin and clinical outcome in patients with MRSA nosocomial pneumonia. *Intensive Care Med*. 2011;37(4):639-47.
20. Cruciani M, Gatti G, Lazzarini L, Furlan G, Broccali G, Malena M, et al. Penetration of vancomycin into human lung tissue. *J Antimicrob Chemother*. 1996;38(5):865-9.
21. Honeybourne D. Antibiotic penetration into lung tissues. *Thorax*. 1994;49(2):104-6.
22. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, Moellering R, Jr., Craig W, Billeter M, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm*. 2009;66(1):82-98.
23. Georges H, Leroy O, Alfandari S, Guery B, Roussel-Delvallez M, Dhennain C, et al. Pulmonary disposition of vancomycin in critically ill patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997;16(5):385-8.
24. Rybak MJ. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. *Clin Infect Dis*. 2006;42 Suppl 1:S35-9.
25. Stevens DL. The role of vancomycin in the treatment paradigm. *Clin Infect Dis*. 2006;42 Suppl 1:S51-7.
26. Lodise TP, Patel N, Lomaestro BM, Rodvold KA, Drusano GL. Relationship between initial vancomycin concentration-time profile and nephrotoxicity among hospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2009;49(4):507-14.
27. Moise PA, Sakoulas G, Forrest A, Schentag JJ. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(7):2582-6.
28. Moise PA, Schentag JJ. Vancomycin treatment failures in *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;16 Suppl 1:S31-4.
29. Moise PA, Smyth DS, El-Fawal N, Robinson DA, Holden PN, Forrest A, et al. Microbiological effects of prior vancomycin use in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(1):85-90.
30. Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J, Forrest A, Moellering RC, Jr., Eliopoulos GM. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2398-402.
31. Wenzler E, Fraidenburg DR, Scardina T, Danziger LH. Inhaled Antibiotics for Gram-Negative Respiratory Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):581-632.
32. Lu Q, Luo R, Bodin L, Yang J, Zahr N, Aubry A, et al. Efficacy of high-dose nebulized colistin in ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Anesthesiology*. 2012;117(6):1335-47.

33. Lu Q, Yang J, Liu Z, Gutierrez C, Aymard G, Rouby JJ, et al. Nebulized ceftazidime and amikacin in ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(1):106-15.
34. Palmer LB, Smaldone GC. Reduction of bacterial resistance with inhaled antibiotics in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(10):1225-33.
35. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med*. 1999;340(1):23-30.
36. Zampieri FG, Nassar AP, Jr., Gusmao-Flores D, Taniguchi LU, Torres A, Ranzani OT. Nebulized antibiotics for ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2015;19:150.
37. Le J, Ashley ED, Neuhauser MM, Brown J, Gentry C, Klepser ME, et al. Consensus summary of aerosolized antimicrobial agents: application of guideline criteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2010;30(6):562-84.
38. Elman M, Goldstein I, Marquette CH, Wallet F, Lenaour G, Rouby JJ, et al. Influence of lung aeration on pulmonary concentrations of nebulized and intravenous amikacin in ventilated piglets with severe bronchopneumonia. *Anesthesiology*. 2002;97(1):199-206.
39. Ferrari F, Lu Q, Girardi C, Petitjean O, Marquette CH, Wallet F, et al. Nebulized ceftazidime in experimental pneumonia caused by partially resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med*. 2009;35(10):1792-800.
40. Goldstein I, Wallet F, Robert J, Becquemin MH, Marquette CH, Rouby JJ. Lung tissue concentrations of nebulized amikacin during mechanical ventilation in piglets with healthy lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(2):171-5.
41. Lu Q, Girardi C, Zhang M, Bouhemad B, Louchahi K, Petitjean O, et al. Nebulized and intravenous colistin in experimental pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med*. 2010;36(7):1147-55.
42. Palmer LB, Smaldone GC, Chen JJ, Baram D, Duan T, Monteforte M, et al. Aerosolized antibiotics and ventilator-associated tracheobronchitis in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2008;36(7):2008-13.
43. Infecções do trato respiratório. Orientações para prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde. ANVISA, Unidade de Investigação e Prevenção de das Infecções e dos Eventos adversos, Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde-GGTES; 2009. [citado 17nov2016] Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/manual_%20trato_respirat%F3rio.pdf
44. Niederman MS. The clinical diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care*. 2005;50(6):788-96; discussion 807-12.
45. Weers J. Inhaled antimicrobial therapy - barriers to effective treatment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;85:24-43.
46. Johanson WG, Dever LL. Nosocomial pneumonia. *Intensive Care Med*. 2003;29(1):23-9.
47. Spencer H. Pathology of the lung. 4th ed. New York: Pergamon Press; 1985. p.160-64

48. Kock R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill*. 2010;15(41):19688.
49. Santos AL OD, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2007;43(6):413-23.
50. Taylor AR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Prim Care*. 2013;40(3):637-54.
51. Gidengil CA, Gay C, Huang SS, Platt R, Yokoe D, Lee GM. Cost-effectiveness of strategies to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and infection in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36(1):17-27.
52. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008;46 Suppl 5:S344-9.
53. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 2007;298(15):1763-71.
54. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med*. 2017;90(1):135-45.
55. Dauner DG, Nelson RE, Taketa DC. Ceftobiprole: A novel, broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Health Syst Pharm*. 2010;67(12):983-93.
56. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;46(1):8-20.
57. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(6):1449-58.
58. Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, et al. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) analysis of MRSA. *Methods Mol Biol*. 2014;1085:131-48.
59. Brooks GFC, K. C.; Butel, J. S.; Morse, S. A.; Mietzner, T. A. *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 25^a ed, Porto Alegre:AMGH; 2012. p. 246.
60. Sampedro GR, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* in the Intensive Care Unit: Are These Golden Grapes Ripe for a New Approach? *J Infect Dis*. 2017;215(suppl_1):S64-S70.
61. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40(1):135-6.
62. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard. 10th 2015.
63. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(3):147-55.
64. Zhang S, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X. Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136082.

65. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*. 2017;90(2):269-81.
66. Tiffeneau R, Pinelli A. Circulation air and captive air in the exploration of pulmonary ventilator function. *Paris Med*. 1947;37(52):624-8.
67. Feeley TW, Du Moulin GC, Hedley-Whyte J, Bushnell LS, Gilbert JP, Feingold DS. Aerosol polymyxin and pneumonia in seriously ill patients. *N Engl J Med*. 1975;293(10):471-5.
68. Farber JE, Ross J. The use of aerosol penicillin and streptomycin in bronchopulmonary infections. *Calif Med*. 1950;73(3):214-7.
69. Mearns MB, Hunt GH, Rushworth R. Bacterial flora of respiratory tract in patients with cystic fibrosis, 1950-71. *Arch Dis Child*. 1972;47(256):902-7.
70. Klastersky J, Huysmans E, Weerts D, Hensgens C, Daneau D. Endotracheally administered gentamicin for the prevention of infections of the respiratory tract in patients with tracheostomy: a double-blind study. *Chest*. 1974;65(6):650-4.
71. Klick JM, du Moulin GC, Hedley-Whyte J, Teres D, Bushnell LS, Feingold DS. Prevention of gram-negative bacillary pneumonia using polymyxin aerosol as prophylaxis. II. Effect on the incidence of pneumonia in seriously ill patients. *J Clin Invest*. 1975;55(3):514-9.
72. Rouby JJ, Bouhemad B, Monsel A, Brisson H, Arbelot C, Lu Q, et al. Aerosolized Antibiotics for Ventilator-associated Pneumonia Lessons from Experimental Studies. *Anesthesiology*. 2012;117(6):1364-80.
73. Palmer LB, Smaldone GC, Simon SR, O'Riordan TG, Cuccia A. Aerosolized antibiotics in mechanically ventilated patients: delivery and response. *Crit Care Med*. 1998;26(1):31-9.
74. Niederman MS, Chastre J, Corkery K, Fink JB, Luyt CE, Garcia MS. BAY41-6551 achieves bactericidal tracheal aspirate amikacin concentrations in mechanically ventilated patients with Gram-negative pneumonia. *Intensive Care Med*. 2012;38(2):263-71.
75. Goldstein I, Wallet F, Nicolas-Robin A, Ferrari F, Marquette CH, Rouby JJ. Lung deposition and efficiency of nebulized amikacin during *Escherichia coli* pneumonia in ventilated piglets. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(10):1375-81.
76. Tonnellier M, Ferrari F, Goldstein I, Sartorius A, Marquette CH, Rouby JJ. Intravenous versus nebulized ceftazidime in ventilated piglets with and without experimental bronchopneumonia: comparative effects of helium and nitrogen. *Anesthesiology*. 2005;102(5):995-1000.
77. Ehrmann S, Chastre J, Diot P, Lu Q. Nebulized antibiotics in mechanically ventilated patients: a challenge for translational research from technology to clinical care. *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):78.
78. Marchand S, Gregoire N, Brillault J, Lamarche I, Gobin P, Couet W. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 3. Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6646-7.
79. Marchand S, Gregoire N, Brillault J, Lamarche I, Gobin P, Couet W. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats. 4. Aztreonam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):3196-8.
80. Hallal A, Cohn SM, Namias N, Habib F, Baracco G, Manning RJ, et al. Aerosolized tobramycin in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a pilot study. *Surg Infect (Larchmt)*. 2007;8(1):73-82.

81. Sole-Lleonart C, Rouby JJ, Blot S, Poulakou G, Chastre J, Palmer LB, et al. Nebulization of Antiinfective Agents in Invasively Mechanically Ventilated Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anesthesiology*. 2017;126(5):890-908.
82. Ferrari F, Liu ZH, Lu Q, Becquemin MH, Louchahi K, Aymard G, et al. Comparison of lung tissue concentrations of nebulized ceftazidime in ventilated piglets: ultrasonic versus vibrating plate nebulizers. *Intensive Care Med*. 2008;34(9):1718-23.
83. Ehrmann S, Roche-Campo F, Bodet-Contentin L, Razazi K, Dugernier J, Trenado-Alvarez J, et al. Aerosol therapy in intensive and intermediate care units: prospective observation of 2808 critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2016;42(2):192-201.
84. Dhand R. Maximizing aerosol delivery during mechanical ventilation: go with the flow and go slow. *Intensive Care Med*. 2003;29(7):1041-2.
85. Hess DR, Dillman C, Kacmarek RM. In vitro evaluation of aerosol bronchodilator delivery during mechanical ventilation: pressure-control vs. volume control ventilation. *Intensive Care Med*. 2003;29(7):1145-50.
86. Ranzani OT. Pneumonia associada à ventilação mecânica. In: Azevedo LCP, Taniguchi LU, Ladeira J. P. *Medicina Intensiva Abordagem Prática*. 2ed. ed: Manole; 2015. 247-65. (Série abordagem prática).
87. Pennington JE. Penetration of antibiotics into respiratory secretions. *Rev Infect Dis*. 1981;3(1):67-73.
88. Blot SI, Pea F, Lipman J. The effect of pathophysiology on pharmacokinetics in the critically ill patient--concepts appraised by the example of antimicrobial agents. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;77:3-11.
89. Smith BS, Yogaratnam D, Levasseur-Franklin KE, Forni A, Fong J. Introduction to drug pharmacokinetics in the critically ill patient. *Chest*. 2012;141(5):1327-36.
90. Matzke GR, Zhanel GG, Guay DR. Clinical pharmacokinetics of vancomycin. *Clin Pharmacokinet*. 1986;11(4):257-82.
91. Stein GE, Wells EM. The importance of tissue penetration in achieving successful antimicrobial treatment of nosocomial pneumonia and complicated skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vancomycin and linezolid. *Curr Med Res Opin*. 2010;26(3):571-88.
92. Sun H, Maderazo EG, Krusell AR. Serum protein-binding characteristics of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(5):1132-6.
93. Blouin RA, Bauer LA, Miller DD, Record KE, Griffen WO, Jr. Vancomycin pharmacokinetics in normal and morbidly obese subjects. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;21(4):575-80.
94. Golper TA, Noonan HM, Elzinga L, Gilbert D, Brummett R, Anderson JL, et al. Vancomycin pharmacokinetics, renal handling, and nonrenal clearances in normal human subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1988;43(5):565-70.
95. Matzke GR, McGory RW, Halstenson CE, Keane WF. Pharmacokinetics of vancomycin in patients with various degrees of renal function. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984;25(4):433-7.
96. Rodvold KA, Blum RA, Fischer JH, Zokufa HZ, Rotschafer JC, Crossley KB, et al. Vancomycin pharmacokinetics in patients with various degrees of renal function. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(6):848-52.

97. Rotschafer JC, Crossley K, Zaske DE, Mead K, Sawchuk RJ, Solem LD. Pharmacokinetics of vancomycin: observations in 28 patients and dosage recommendations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22(3):391-4.
98. Javorska L, Krcmova LK, Solichova D, Solich P, Kaska M. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography - A review. *Journal of Separation Science.* 2016;39(1):6-20.
99. Cohen E, Dadashev A, Drucker M, Samra Z, Rubinstein E, Garty M. Once-daily versus twice-daily intravenous administration of vancomycin for infections in hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(1):155-60.
100. Healy DP, Polk RE, Garson ML, Rock DT, Comstock TJ. Comparison of steady-state pharmacokinetics of two dosage regimens of vancomycin in normal volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(3):393-7.
101. Moise-Broder PA, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Schentag JJ, Forrest A, Moellering RC, Jr. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis.* 2004;38(12):1700-5.
102. Martinez-Olondris P, Rigol M, Soy D, Guerrero L, Agusti C, Quera MA, et al. Efficacy of linezolid compared to vancomycin in an experimental model of pneumonia induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ventilated pigs. *Crit Care Med.* 2012;40(1):162-8.
103. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(11):1999-2006.
104. Ferrari F, Goldstein I, Nieszkowszka A, Elman M, Marquette CH, Rouby JJ, et al. Lack of lung tissue and systemic accumulation after consecutive daily aerosols of amikacin in ventilated piglets with healthy lungs. *Anesthesiology.* 2003;98(4):1016-9.
105. Gradon JD, Wu EH, Lutwick LI. Aerosolized vancomycin therapy facilitating nursing home placement. *Ann Pharmacother.* 1992;26(2):209-10.
106. Maiz L, Canton R, Mir N, Baquero F, Escobar H. Aerosolized vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1998;26(4):287-9.
107. Shirai M, Ide K, Sato M, Murakami M, Tanaka Y, Sato A, et al. [Effect of inhaled vancomycin hydrochloride on elimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1995;33(11):1233-9.
108. Weathers L, Riggs D, Santeiro M, Weibley RE. Aerosolized vancomycin for treatment of airway colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J.* 1990;9(3):220-1.
109. Hayes D, Jr., Murphy BS, Mullett TW, Feola DJ. Aerosolized vancomycin for the treatment of MRSA after lung transplantation. *Respirology.* 2010;15(1):184-6.
110. Kiem S, Schentag JJ. Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(1):24-36.
111. Valle MJD, Lopez FG, Hurle ADG, Navarro AS. Pulmonary versus systemic delivery of antibiotics: Comparison of vancomycin dispositions in the isolated rat lung. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007;51(10):3771-4.
112. Hedenstierna G, Rothen HU. Respiratory function during anesthesia: effects on gas exchange. *Compr Physiol.* 2012;2(1):69-96.

-
113. Rouby JJ, Poete P, Martin de Lassale E, Nicolas MH, Bodin L, Jarlier V, et al. Prevention of gram negative nosocomial bronchopneumonia by intratracheal colistin in critically ill patients. Histologic and bacteriologic study. *Intensive Care Med.* 1994;20(3):187-92.