

ADRIANA DE OLIVEIRA AFONSO

**Avaliação da eficácia de ceftriaxona em camundongos infectados
experimentalmente por amostras de *Klebsiella pneumoniae*
produtoras ou não de beta-lactamase de espectro estendido**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre na Área de Investigação Biomédica. Programa de pós-graduação stricto sensu: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Martinez

Ribeirão Preto
2005

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Afonso, Adriana de Oliveira

Avaliação da eficácia de ceftriaxona em camundongos infectados experimentalmente por amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras ou não de beta-lactamase de espectro estendido./ Adriana de Oliveira Afonso; Orientador: Martinez, Roberto – Ribeirão Preto, 2005.
107f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de Concentração: Investigação Biomédica) — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP da Universidade de São Paulo (USP).

1. Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) 2. *Klebsiella pneumoniae* 3. Resistência bacteriana 4. Modelo animal de infecção
5. Ceftriaxona

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana de Oliveira Afonso

Avaliação da eficácia de ceftriaxona em camundongos infectados experimentalmente por amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras ou não de beta-lactamase de espectro estendido

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de Investigação Biomédica. Programa de pós-graduação stricto sensu: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Martinez

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Martinez

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Góngora Rubio

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Fernando de Castro Figueiredo

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP

Assinatura: _____

À meus pais, *Aristides e Ana Elisa.*
À minha irmã, *Andresa.*
À *Valter Luiz.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A *Deus*... uno, santo e trino!!!

Pai... cheio de bondade e fonte inesgotável de sabedoria!

Agradeço imensamente pelo dom da vida, por minha família e pela conclusão deste trabalho.

À minha família, alicerce do que sou.

Meus pais, *Aristides Afonso* e *Ana Elisa de Oliveira Afonso*, mestres e doutores na arte de educar os filhos, além de exemplos de dedicação. Mesmo enfrentando dificuldades e algumas vezes, sem entenderem muito bem o que eu dizia, não pouparam esforços para me concederem esta oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Minha irmã, *Andresa de Oliveira Afonso*, meu maior exemplo de determinação.

Quero agradecê-los pelo sacrifício e luta diários até que a minha graduação fosse concluída.

E na pós-graduação... pelo incentivo, apoio, orações e paciência, especialmente, nos momentos mais difíceis.

À *Valter Luiz de Oliveira Júnior*, motivador nato. Obrigada pelo apoio e pela colaboração, principalmente, na arte-final dos gráficos deste trabalho. Agradeço também, suas palavras de entusiasmo, sua compreensão e paciência, em todos os momentos.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Roberto Martinez*

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina. (Cora Coralina)”

Sou grata pela oportunidade que me deu, quando aceitou-me como sua pós-graduanda e pelos inestimáveis ensinamentos oferecidos ao longo deste período. Expresso minha admiração por sua dedicação e pela paciência com a minha ignorância. Espero, sinceramente, não tê-lo decepcionado.

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste trabalho pude contar com a presença de pessoas importantes, que muito contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Agradecê-las é um ato de reconhecimento e uma forma de retribuição, que mesmo pequena demonstra toda minha gratidão.

Às funcionárias da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, *Maria Helena B. Malta, Lúcia Vitali e Margarida Maria P. do Nascimento* e à funcionária do Laboratório de Sorologia do HCFMRP-USP, *Leula Maria de A. Pinheiro*, quero agradecê-las pelo acolhimento, apoio, solidariedade e especialmente à *Maria Helena*, pela colaboração e pelos ensinamentos. Aprendi com vocês muito mais do que técnicas laboratoriais e experimentais e sou grata por tudo o que fizeram por mim durante este período de estudo.

Aos funcionários do Biotério da Clínica Médica, *Adalberto Valladas Verceze, Maurício Rodrigues Arantes e Roni Charles Fabbris*, pela assistência na condução dos experimentos e pelos ensinamentos.

Aos pós-graduandos *Luciene A. da Rocha Minarini* (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP), *Ana Carolina Frade Gomes* e *Fernando Bellíssimo Rodrigues* (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP), por terem cedido algumas das amostras bacterianas utilizadas neste estudo.

À equipe do Centro de Métodos Quantitativos (CEMEQ) - Prof. Dr. *Edson Zangiacomi Martinez*, às estagiárias *Clécia Ap. Garcia* e *Adriana de Fátima Lourençon*, pela análise estatística dos resultados e a secretária *Eliana Mian Spera Campos*, pela atenção.

Às funcionárias do Laboratório de Microbiologia da Unidade de Emergência do HCFMRP-USP, *Denissani Ap. F. dos Santos Lima, Elvira M. Magalhães Corrêa, Lidiane Ribeiro S. G. Silveira e Maria Cristina P. Menezes da Silva*. Cultivo um carinho especial por vocês, afinal foram dois anos juntas! Alguns erros, alguns acertos, mas acima de tudo, muito aprendizado. Agradeço os ensinamentos, o incentivo e a amizade.

Às pós-graduandas, com quem compartilhei momentos de aprendizado, descontração e dificuldades, *Érika Nascimento, Ana Carolina F. Gomes, Débora S. Lourenço, Maira P. Ferreira, Maria José F. Brochado, Adriana Cunha B. Rodrigues, Adriana Bussolo, Corina Bueno de C. Siqueira, Lilyan Walkyria C. de Freitas*, obrigada pela presença e estímulo.

A todas funcionárias dos Laboratórios de Microbiologia e Sorologia do HCFMRP-USP, Campus Universitário, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

À secretária do Programa de pós-graduação da Clínica Médica, *Adriana A. D. Ferreira* e a secretária da disciplina de Moléstias Infecciosas, *Julia Lacerda*, agradeço a atenção, o apoio e a paciência.

À *Rubens Ferracini Júnior*, professor e amigo, primeira pessoa a dar-me a oportunidade de enveredar pelos caminhos da pesquisa. Agradeço tudo o que fez e tem feito por mim, especialmente neste período.

Às amigas, *Rochele Azevedo* e *Daniele Maria Fraústo*, obrigada pela torcida e pela amizade.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

AFONSO, A. O. **Avaliação da eficácia de ceftriaxona em camundongos infectados experimentalmente por amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras ou não de beta-lactamase de espectro estendido.** 2005. 107f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas capazes de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam, sendo uma das causas mais comuns de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos β -lactâmicos. Este mecanismo de resistência é mais comumente encontrado em bacilos Gram-negativos, como *Klebsiella pneumoniae*, associando-se com infecção hospitalar. As cefalosporinas, associadas ou não a aminoglicosídeos, são opções terapêuticas em infecções graves provocadas por *Klebsiella* sp, recomendando-se evitá-las quando a amostra bacteriana é produtora de ESBL, ainda que mostre sensibilidade *in vitro* a qualquer droga desse grupo de antimicrobianos. Porém, alguns relatos têm mostrado que infecções provocadas por amostras produtoras de ESBL, sensíveis *in vitro* a uma determinada cefalosporina, quando tratadas por este agente podem responder a terapêutica, com conseqüente cura clínica. Os modelos de infecção experimental são métodos úteis para o estudo da atividade *in vivo* de antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de uma cefalosporina de terceira geração - ceftriaxona - em modelo murino de infecção por *Klebsiella pneumoniae* produtora ou não de beta-lactamase de espectro estendido. Para isso, utilizamos 8 amostras bacterianas de *K. pneumoniae*, 4 produtoras de ESBL, 2 resistentes, uma com sensibilidade plena e uma com sensibilidade intermediária a ceftriaxona *in vitro* e 4 não-produtoras de ESBL, todas sensíveis à ceftriaxona *in vitro*. Suspensões bacterianas de concentração 0,8 a 8×10^8 UFC/0,1ml foram inoculadas por via endovenosa em camundongos Swiss machos, previamente tratados com betametasona. Os animais receberam ceftriaxona por via intraperitoneal, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso ou 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso e foram observados durante 7 dias. Para a avaliação da eficácia do tratamento os grupos foram analisados por meio de curva de sobrevida e por determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no fígado e baço. Os animais infectados pelas amostras de *K. pneumoniae* não-produtoras de ESBL e sensíveis à ceftriaxona tiveram redução das contagens bacterianas nos tecidos e aumento na sobrevida quando tratados com esta cefalosporina. Nos animais infectados por amostras produtoras de ESBL, a atuação de ceftriaxona foi variável: amostras resistentes *in vitro* ao antibiótico – ausência de eficácia ou controle parcial da infecção; e amostras com sensibilidade plena ou intermediária ao antibiótico – controle parcial da infecção. O efeito antimicrobiano foi dependente do número de doses e da concentração de ceftriaxona, quer nos animais infectados por amostras produtoras, como por não-produtoras de ESBL. Concluiu-se que ceftriaxona pode ter efeito antimicrobiano *in vivo* nas infecções por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, principalmente, se a amostra bacteriana for sensível no teste de susceptibilidade *in vitro*, na dependência da dose administrada.

ABSTRACT

AFONSO, A. O. **Evaluation of the efficacy of ceftriaxone in mice experimentally infected with *Klebsiella pneumoniae* strains producing or not extended-spectrum beta-lactamase.** 2005. 107f. Master's Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) are enzymes that hydrolyze penicillins, broad-spectrum cephalosporins and aztreonam, being one of the most common causes of bacterial resistance to β -lactam antimicrobial agents. This resistance mechanism is more commonly found in Gram-negative bacilli such as *Klebsiella pneumoniae* and is associated with hospital infection. Cephalosporins combined or not with aminoglycosides are therapeutic options in severe infections induced by *Klebsiella* sp. However, the recommendation is to avoid them when the bacterial strain is a ESBL producer, even though the strain shows sensitivity to any drug in this group of antimicrobials *in vitro*. However, some reports have shown that infections induced by ESBL-producing strains with *in vitro* sensitivity to a given cephalosporin, when treated with this agent can respond to therapy, with consequent clinical cure. Experimental infection models are useful methods for the study of the *in vivo* activity of antimicrobial agents. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of a third generation cephalosporin - ceftriaxone – in a murine model of infection with *Klebsiella pneumoniae* producing or not ESBL. For this purpose, 8 bacterial strains of *K. pneumoniae* were used, 4 of them ESBL producers, 2 resistant, one fully sensitive and one with intermediate sensitivity to ceftriaxone *in vitro*, and 4 non-ESBL producers, all of them sensitive to ceftriaxone *in vitro*. Bacterial suspensions at $0,8$ to 8×10^8 UFC/0,1ml concentration were injected intravenously into male Swiss mice previously treated with betamethasone. The animals received ceftriaxone by the intraperitoneal route, 1 or 2 doses of 50mg/kg body weight or 1 to 3 doses of 100mg/kg body weight, and were observed for 7 days. For the evaluation of the efficacy of treatment the groups were analyzed on the basis of the survival curve and by the determination of colony forming units in the liver and spleen. The animals infected with non-ESBL-producing *K. pneumoniae* strains and sensitive to ceftriaxone had a reduction of bacterial counts in tissues and an increased survival when treated with this cephalosporin. In the animals infected with ESBL-producing strains, the action of ceftriaxone was variable: strains with *in vitro* resistance to the antibiotic – absence of efficacy or partial control of infection, and strains with full or intermediate sensitivity to the antibiotic – partial control of infection. The antimicrobial effect depended on the doses and concentrations both in the animals infected with ESBL-producing and non-ESBL-producing strains. We conclude that ceftriaxone can have an antimicrobial effect *in vivo* in infections induced by ESBL-producing *K. pneumoniae* strains, especially if the bacterial strain is sensitive to the *in vitro* susceptibility test, depending on the dose administered.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Padronização do modelo experimental. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido $\times 10^4$) e medianas (barras) no baço dos camundongos infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de ESBL. 51
- Figura 2.** Padronização do modelo experimental. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido $\times 10^5$) e medianas (barras) no fígado dos camundongos infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de ESBL. 51
- Figura 3.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente por oito amostras de *K. pneumoniae* (sendo elas, produtoras ou não de ESBL) e observados até o 7º dia após a inoculação. 52
- Figura 4.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae*. 55
- Figura 5.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 56
- Figura 6.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 291 de *K. pneumoniae*. 57
- Figura 7.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 291 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 58
- Figura 8.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 312 de *K. pneumoniae*. 59
- Figura 9.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 312 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 60
- Figura 10.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido

- (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 120 de *K. pneumoniae*. 63
- Figura 11.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 120 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 64
- Figura 12.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 455 de *K. pneumoniae*. 65
- Figura 13.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 455 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 66
- Figura 14.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 974 de *K. pneumoniae*. 67
- Figura 15.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 974 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 68
- Figura 16.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 1024 de *K. pneumoniae*. 69
- Figura 17.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 1024 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 70
- Figura 18.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 1131 de *K. pneumoniae*. 71
- Figura 19.** Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 1131 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 72
- Figura 20.** Avaliação da eficácia de ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no

baço (UFC/g de tecido 10^4) e no fígado (UFC/g de tecido 10^5) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae*. 74

Figura 21. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 75

Figura 22. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço (UFC/g de tecido 10^4) e no fígado (UFC/g de tecido 10^5) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 291 de *K. pneumoniae*. 77

Figura 23. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 291 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 78

Figura 24. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço (UFC/g de tecido 10^4) e no fígado (UFC/g de tecido 10^5) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 120 de *K. pneumoniae*. 79

Figura 25. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 120 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 80

Figura 26. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço (UFC/g de tecido 10^4) e no fígado (UFC/g de tecido 10^5) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 1131 de *K. pneumoniae*. 81

Figura 27. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 1131 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. 82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e susceptibilidade a ceftriaxona (CRO) das amostras de *Klebsiella pneumoniae*. 41
- Tabela 2** - Padronização do modelo experimental. Inóculo e mediana das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido encontradas nas vísceras dos camundongos infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de ESBL. 50
- Tabela 3** - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Inóculo e mediana das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço dos animais infectados experimentalmente por duas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). 54
- Tabela 4** - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Inóculo e mediana das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no fígado dos animais infectados experimentalmente por duas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). 54
- Tabela 5** - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço dos animais infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). 61
- Tabela 6** - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no fígado dos animais infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). 62
- Tabela 7** - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso. Inóculo e mediana das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido encontradas nas vísceras dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae*. 73
- Tabela 8** - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso. Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço dos animais infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtora de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). 76
- Tabela 9** - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso. Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no fígado dos animais infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtora de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). 76

LISTA DE SIGLAS

- BHI - abreviatura do termo na língua inglesa “**Brain heart infusion**” (Meio de cultura – Infusão de cérebro-coração)
- CRO - ceftriaxona
- DDS - teste de sinergia do duplo disco
- ESBL - abreviatura do termo na língua inglesa “**Extended-spectrum beta-lactamases**” (β -lactamases de espectro estendido ou ampliado)
- HCFMRP-USP- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- MYSTIC – abreviatura do termo na língua inglesa “**Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection**” (Programa de Vigilância Antimicrobiana)
- NCCLS - abreviatura do termo na língua inglesa “**National Committee for Clinical Laboratory Standards**”
- PBPs - abreviatura do termo na língua inglesa “**Penicillin-binding proteins**” (proteínas fixadoras de penicilina)
- SENTRY – Programa de vigilância epidemiológica e resistência bacteriana
- UFC – Unidades Formadoras de Colônias
- UFC/g de tecido – Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido
- NT - subgrupo experimental de animais não–tratados (controle)
- T1_{50mg} – subgrupo experimental de animais tratados com uma dose de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (Os animais receberam 50mg de ceftriaxona / Kg de peso, 1 hora após o inóculo, em 0,3 ml de água destilada estéril e 18 horas após a primeira dose receberam 0,3 ml de água destilada estéril)

- T_{250mg} – subgrupo experimental de animais tratados com 2 doses de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (Os animais receberam 50mg de ceftriaxona / Kg de peso, 1 hora após o inóculo e 18 horas após a primeira dose, em 0,3 ml de água destilada estéril)
- T_{1100mg} – subgrupo experimental de animais tratados com uma dose de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (Os animais receberam 100mg de ceftriaxona / Kg de peso, 1 hora após o inóculo, em 0,3 ml de água destilada estéril e 0,3 ml de água destilada estéril 3 horas e 18 horas após a dose de ceftriaxona)
- T_{2100mg} – subgrupo experimental de animais tratados com 2 doses de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (Os animais receberam 100mg de ceftriaxona / Kg de peso, 1 hora após o inóculo e 3 horas após a primeira dose de ceftriaxona, em 0,3 ml de água destilada estéril; e 0,3 ml de água destilada estéril 18 horas após a primeira dose de ceftriaxona)
- T_{3100mg} – subgrupo experimental de animais tratados com 3 doses de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (Os animais receberam 100mg de ceftriaxona / Kg de peso, 1 hora após o inóculo, 3 horas e 18 horas após a primeira dose de ceftriaxona, em 0,3 ml de água destilada estéril)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 BETA LACTAMASES	17
1.1.1 Definição, mecanismo de ação e histórico das beta-lactamases.....	17
1.1.2 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)	18
1.1.3 Classificação	19
1.1.4 Fatores de risco relacionados a infecções por organismos produtores de ESBL	20
1.1.5 Métodos de detecção.....	22
1.1.6 Frequência de isolamento	23
1.1.7 Significado clínico.....	26
1.1.8 Ceftriaxona e terapêutica de infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL.....	29
1.2 MODELOS ANIMAIS DE INFECÇÃO POR BACTÉRIAS RESISTENTES A CEFALOSPORINAS	31
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAL E MÉTODO	39
4.1 AMOSTRAS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
4.2 ANIMAIS.....	42
4.3 DROGAS	42
4.3.1 Betametasona.....	42
4.3.2 Ceftriaxona	43
4.4 PREPARO DO INOCULO	43
4.5 INOCULAÇÃO	44
4.6 QUANTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO	44
4.6.1 Sacrifício dos animais e preparação das vísceras	44
4.6.2 Cultura quantitativa	45
4.7 SOBREVIDA DOS ANIMAIS.....	45
4.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
4.8.1 Padronização do modelo experimental.....	45
4.8.2 Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso ...	46
4.8.3 Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso ...	46

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	49
5.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	50
5.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CEFTRIAXONA, 1 OU 2 DOSES DE 50mg/Kg de peso	53
5.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CEFTRIAXONA, 1 A 3 DOSES DE 100mg/Kg de peso	73
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO

Durante décadas, as penicilinas e cefalosporinas de primeira geração fizeram parte da primeira linha de defesa contra infecções bacterianas. Entretanto, o perfil de susceptibilidade destes microrganismos sofreu profundas mudanças desde a introdução da penicilina G, de 1939 até os dias atuais.

Dentre todos os mecanismos de resistência já descritos, podemos citar a hidrólise de antibióticos (β -lactâmicos), devido à produção de enzimas (β -lactamases), como um dos principais mecanismos de resistência encontrado em bactérias Gram-negativas. E, dentre os microrganismos Gram-negativos, os membros da família *Enterobacteriaceae*, como sendo patógenos hospitalares extremamente importantes, além de serem portadores de diversos mecanismos de resistência, especialmente a produção de enzimas β -lactamases (HSIUNG et al., 2000; MENDES et al., 2000).

1.1 BETA-LACTAMASES

1.1.1 Definição, mecanismo de ação e histórico das beta-lactamases

As β -lactamases são uma das causas mais comuns de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos β -lactâmicos, além de serem o mecanismo de resistência mais comumente encontrado em bacilos Gram-negativos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; RICE, 2001).

Constituem um grupo de enzimas heterogêneas que rompem, por hidrólise, o anel β -lactâmico de tais antibióticos e, no princípio, atuavam sobre penicilina e cefalosporinas de primeira geração. Algumas destas enzimas (classe B) utilizam íons zinco para romper o anel β -lactâmico dos antibióticos, mas a grande maioria (enzimas da classe A, C e D) atuam via serina. A enzima associa-se ao antibiótico (ligação não-covalente) e o anel β -lactâmico é atacado por uma hidroxila livre. A hidrólise libera a enzima ativa e a droga inativada, hidrolizada (LIVERMORE, 1995).

As β -lactamases podem ser produzidas tanto por bactérias Gram-positivas, e serem secretadas para o meio externo em grandes quantidades, quanto por bactérias Gram-negativas, sendo encontradas no espaço periplasmático situado entre a parede celular e a membrana externa, em pequenas quantidades (PITOUT; SANDERS; SANDERS Jr., 1997).

Elas ainda podem ser codificadas por cromossomos ou por plasmídeos; porém, é provável que todas as β -lactamases mediadas por plasmídeos tenham origem cromossomal. É admitido que as enzimas cromossomais possam ter algum papel fisiológico na camada de peptidoglicano ou estarem envolvidas na defesa bacteriana contra a produção de β -lactâmicos por bactérias ou fungos do meio ambiente (LIVERMORE, 1995; LIVERMORE, 1998).

A primeira β -lactamase mediada por plasmídeo, a TEM-1, foi descrita no começo dos anos 60, em uma amostra de *Escherichia coli* isolada de hemocultura de uma paciente grega chamada Temoniera, daí a sigla TEM, e logo espalhou-se para outros membros da família *Enterobacteriaceae*. Outra enzima amplamente distribuída é a SHV-1, que é cromossômica em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e codificada por plasmídeo em isolados de *Escherichia coli*, o que facilita a sua disseminação (BRADFORD, 2001).

1.1.2 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

Em meados dos anos 80, um outro grupo de enzimas β -lactamases foi descrito, sendo que estas conferiam resistência, além da penicilina e cefalosporinas de pequeno espectro, às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos (aztreonam), provocando hidrólise e a conseqüente inativação dos mais novos antibióticos β -lactâmicos disponíveis para uso clínico. Por este fato elas foram chamadas de β -lactamases de espectro estendido (ESBL - abreviatura do termo na língua inglesa “Extended-spectrum beta-lactamases”) (EMERY; WEYMOUTH, 1997; PITOUT; SANDERS; SANDERS Jr., 1997).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são definidas, segundo o modelo de classificação proposto por Bush, Jacoby e Medeiros (1995), como β -lactamases capazes de hidrolizar os mais novos antibióticos β -lactâmicos (cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos), sendo inibidas por inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) e colocadas dentro do grupo funcional 2be.

A maior parte das ESBL são derivadas das β -lactamases do tipo TEM e SHV e são codificadas por plasmídeos. Mutações nestas enzimas primárias, ocasionadas por substituições de aminoácidos, são suficientes para dar origem a uma variante com um novo padrão de susceptibilidade; muito embora, a mudança de apenas um aminoácido já seja suficiente para alterar o perfil hidrolítico das enzimas, levando a um novo padrão de resistência. É por este fato que o número de enzimas ESBL vem aumentando e disseminando-se, entre os bacilos Gram-negativos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Atualmente são conhecidas mais de 340 tipos de β -lactamases, sendo grande parte deste crescimento associado à proliferação das ESBL. Em 1995 havia, aproximadamente, 36 enzimas classificadas como enzimas de amplo espectro; em 2000, este número passou a cerca de 119 ESBL identificadas (BUSH, 2001).

1.1.3 Classificação

O esquema de classificação proposto por Bush, Jacoby e Medeiros, em 1995, é um dos mais usados para a classificação das β -lactamases. Entretanto, a classificação funcional das β -lactamases começou quando as cefalosporinases foram diferenciadas das penicilinas; assim, diversos esquemas de classificação com base nas funções de cada enzima foram propostos, desde 1963 até 1995.

O primeiro destes esquemas, em 1963, separava as enzimas entre penicilinas e cefalosporinas (FLEMING; GOLDNER; GLASS, 1963). Em 1973 foi proposto um novo

esquema, que incluía todas as β -lactamases de bactérias Gram-negativas descritas até aquele momento, classificando-as com base no perfil de substrato. Em 1976, a classificação anterior foi expandida, salientando as β -lactamases mediadas por plasmídeos que poderiam ser diferenciadas pelo ponto isoelétrico. Entretanto, este esquema de classificação tinha sido criado antes da identificação das β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e isto impedia a diferenciação entre as β -lactamases do tipo TEM e SHV e a suas respectivas enzimas de amplo espectro; por isso, em pouco tempo tornou-se ultrapassado devido à quantidade de enzimas de amplo espectro que iam sendo identificadas (BRADFORD, 2001; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Em 1989, foi proposto por Bush um esquema que incluía as enzimas de todos os gêneros bacterianos, sendo este o primeiro esquema a tentar relacionar substrato e inibidores com a estrutura molecular. Em 1995, Bush, Jacoby e Medeiros atualizaram este esquema principalmente devido ao fato do número de β -lactamases derivadas de TEM e SHV continuar aumentando, entre outros fatores. Decidiu-se classificar as enzimas derivadas de TEM e SHV em grupos que conservaram o prefixo “2b”. Assim, as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) foram colocadas dentro do grupo “2be”, para mostrar que estas enzimas eram derivadas das enzimas do grupo 2b e que tinham o seu espectro de atividade ampliado.

1.1.4 Fatores de risco relacionados a infecções por organismos produtores de ESBL

Diversos são os fatores que aumentam o risco de uma colonização ou infecção por bactérias Gram-negativas, especialmente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, produtoras de β -lactamases. Entretanto, segundo alguns autores, o fator principal é o uso prévio e/ou prolongado de antibióticos, especialmente cefalosporinas (LAUTENBACH et al., 2001; PATTERSON, 2002; RODRIGUES, 2004; SANDERS; SANDERS Jr., 1985).

É possível observar um aumento no número de casos de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL quando os indivíduos fazem uso de cefalosporinas de amplo espectro; mas não só elas, a utilização de aminoglicosídeos e cotrimoxazol também amplia o número desses casos. Isto ocorre porque a resistência a aminoglicosídeos e cotrimoxazol está associada com a presença de um plasmídeo conjugativo que confere resistência a essas drogas, além do perfil de ESBL (LAUTENBACH et al., 2001; PEREIRA et al., 2003).

A suposição de que alguns antibióticos que reduzem os níveis de anaeróbios intestinais (clindamicina, piperacilina-tazobactam, ceftriaxona e ceftazidima, por exemplo) também poderiam promover um super-crescimento de *K. pneumoniae* produtora de ESBL foi levantado por alguns autores. E, através de experimentos *in vivo* utilizando-se camundongos, esta hipótese foi confirmada. Os antibióticos com mínima atividade contra os anaeróbios intestinais (cefepime, aztreonam e levofloxacina) não promoviam a colonização por *K. pneumoniae* produtora de ESBL. Já, o efeito da piperacilina-tazobactam, ceftriaxona e ceftazidima mostrou um equilíbrio entre a atividade inibitória destas drogas contra a própria bactéria e a promoção desta devido à atividade antianaeróbica (HOYEN et al., 2003).

Outros fatores que também estão relacionados com casos de colonização e infecção provocados por bactérias produtoras de ESBL, especialmente *K. pneumoniae*, são o uso de dispositivos intravasculares, como cateteres arteriais e venosos centrais, bem como, o uso de sondas e cateteres urinários. Os pacientes submetidos à cirurgia abdominal de emergência, especialmente aqueles com perfurações gastro-intestinais, têm alto risco de infecção por bactérias produtoras de ESBL (GOMES, 2002; PATTERSON, 2002; PITOUT; SANDERS; SANDERS Jr., 1997; RODRIGUES, 2004).

Fatores de risco adicionais, mas não menos importantes incluem: a gravidade da doença, o tempo de permanência em unidades de terapia intensiva e o contato com profissionais da

área da saúde colonizados ou fômites contaminados por amostras produtoras de ESBL (LAUTENBACH et al., 2001).

1.1.5 Métodos de detecção

Um agravante do problema de resistência deve-se em muito a dificuldade na detecção laboratorial de amostras bacterianas resistentes. Detectar amostras produtoras de ESBL não é uma tarefa muito fácil com o antibiograma usual dos laboratórios de microbiologia. Um dos motivos dessa dificuldade está no fato de que algumas amostras produtoras de ESBL podem mostrar um baixo nível de resistência, não alcançando os “breakpoints” estabelecidos pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS - abreviatura do termo na língua inglesa). Podendo, assim, serem reportadas como não-produtoras de ESBL e sensíveis aos β -lactâmicos, quando na realidade não o são (BARBOSA et al., 2000).

Além disso, as variantes enzimáticas atuam melhor sobre um determinado substrato e não tão bem em outro. Geralmente, a ceftazidima é um dos melhores substratos para a identificação de amostras produtoras de ESBL, pois, este agente tem dificuldade para se acumular no espaço periplasmático e com isso tende a ser mais prontamente hidrolisada por estas enzimas quando comparada com outras cefalosporinas (RICE, 2001). Entretanto, algumas enzimas atuam melhor em outras drogas. Sendo assim, a escolha da cefalosporina utilizada para os testes de detecção poderá influenciar nos resultados obtidos, provocando o estabelecimento de terapêutica inadequada e gerando dados de prevalência incorretos (CORMICAN; MARSHALL; JONES, 1996; WINOKUR et al., 2001).

No geral, os testes utilizados em laboratórios de microbiologia clínica caracterizam as amostras bacterianas fenotipicamente, quanto à produção ou não de ESBL. Basicamente, eles buscam demonstrar uma redução da concentração inibitória mínima (CIM) da cefalosporina usada para o teste, quando em presença de inibidor de β -lactamase (ácido clavulânico,

sulbactam ou tazobactam), utilizando para isso a metodologia de disco-difusão. Alguns dos testes que utilizam essa metodologia são a sinergia do duplo disco (DDS), o teste tridimensional e o Etest para ESBL (EMERY; WEYMOUTH, 1997; HSIUNG et al., 2000; REIS; GALES; SADER, 2001). Porém, sistemas automatizados de identificação bacteriana, tais como: Vitek[®] (Biomériux, Hazlewood, MO) e Microscan[®] (Dade Behring, West Sacramento, CA, EUA) também identificam bactérias produtoras de ESBL, por detectarem uma redução no crescimento bacteriano no compartimento do painel onde há o antibiótico β -lactâmico associado ao inibidor de β -lactamase, comparado com aquele que contém somente a droga (β -lactâmico) (BRADFORD, 2001; REIS; GALES; SADER, 2001).

Além destes, os métodos moleculares também detectam e podem até diferenciar as variantes enzimáticas, mas esses não são usados em laboratórios de rotina, pois são de custo elevado e alguns são extremamente trabalhosos, dentre eles podemos citar: as sondas de DNA, a PCR com primers de oligonucleotídeos específicos, o método de oligotipagem que detecta variantes da enzima TEM, a PCR-RFLP que pode detectar as mudanças de nucleotídeos específicos, a PCR-SSCP que detecta variantes da enzima SHV, entre outros (BRADFORD, 2001).

1.1.6 Frequência de isolamento

As amostras bacterianas produtoras de ESBL foram primeiramente detectadas na Europa e logo depois nos Estados Unidos e, durante os anos noventa, transformaram-se em um problema global. E, embora tenha iniciado em Unidades de Cuidados Intensivos, expandiu-se para outros pacientes de cuidados agudos e até mesmo para pacientes em unidades de cuidados crônicos e sob atendimento domiciliar. Mesmo assim, a frequência de isolamento das amostras produtoras de ESBL varia significativamente de acordo com os países e hospitais.

Um estudo multicêntrico francês monitorou a evolução da resistência bacteriana a cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam durante um período de 3 anos (1988-1990), em 12 hospitais universitários. A resistência das enterobactérias devido à produção de ESBL variou de 11,5 a 15,2%. As amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram isoladas em 9 hospitais em 1988, 11 hospitais em 1989 e 12 hospitais em 1990 (SIROT et al., 1992).

Na Itália, um estudo de prevalência realizado de janeiro a junho de 1999, com a participação de 10 laboratórios de microbiologia, determinou 20% (189/946) dos isolados de *K. pneumoniae* e 1,2% (55/4604) dos isolados de *E. coli* como sendo produtores de ESBL (SPANU et al., 2002).

Segundo dados do SENTRY (Programa de Vigilância Antimicrobiana), de 1997 a 1999, para determinar diferenças na prevalência do fenótipo ESBL, foi possível constatar que as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL eram mais prevalentes na América Latina (45,4%), seguida pela região do Pacífico Ocidental (24,6%), Europa (22,6%), Estados Unidos (7,6%) e Canadá (4,9%) (WINOKUR et al., 2001).

No Brasil, o programa SENTRY, em 1997, detectou 42,1% das amostras de *K. pneumoniae* e 13,6% das amostras de *E. coli* como sendo produtoras de ESBL (SADER et al., 1999).

Um estudo multicêntrico brasileiro chamado Sentinela, realizado no segundo semestre de 1998, utilizou dados de 20 laboratórios e 36 hospitais localizados em diversos estados brasileiros. Os dados de prevalência obtidos pelo programa Sentinela foram 10% das amostras de *E. coli* e 48% das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (SADER, 2000); estes resultados são semelhantes àqueles reportados por Sader et al., (1999).

Dados alarmantes de produção de ESBL foram encontrados por um outro Programa de Vigilância Antimicrobiana – o MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection), no Brasil, de julho de 1998 a junho de 1999. Participaram desse estudo vários

hospitais nas cidades de São Paulo e Florianópolis, onde detectou-se 29,0% das enterobactérias como sendo produtoras de ESBL; destas, 59,2% (29/49) foram identificadas como *K. pneumoniae* e 14,6% (7/48) *E. coli* (MENDES et al., 2000).

Segundo Hsiung et al., (2000), em outro estudo para a detecção e a prevalência de ESBL em hospitais brasileiros, 44,1% (93/211) das amostras de *K. pneumoniae* e 5,6% (15/269) das amostras de *E. coli* eram positivas para a produção de tais enzimas.

De setembro de 2000 a março de 2001, foi realizado o primeiro estudo destinado a constatar a prevalência do fenótipo ESBL no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Para isso foram analisadas todas as amostras encaminhadas ao laboratório, não diferenciando-as em isolados vindos de pacientes internados ou não, infectados ou apenas colonizados pelo espécime em questão. O estudo indicou 3,2% (59/1872) das enterobactérias isoladas no período como sendo produtoras de ESBL; destas, 38,9% (23/59) foram amostras de *K. pneumoniae*, 30,5% (18/59) *E. coli* e 18,6% (11/59) *K. oxytoca* (GOMES, 2002).

Um segundo estudo de prevalência na mesma instituição foi realizado, de abril de 2002 a outubro de 2003. A diferença em relação ao estudo anterior foi à população estudada, nesta casuística foram consideradas apenas os isolados provindos de pacientes internados, com infecção comprovadamente causada pelo agente identificado no laboratório de microbiologia. Das 1324 amostras de *Klebsiella* spp identificadas pelo laboratório de microbiologia no período de estudo, 104 eram oriundas de pacientes que preenchiam todos os critérios de inclusão. A produção de ESBL foi confirmada em 45,2% (47/104) das amostras, dentre as amostras produtoras de ESBL 95,7% (45/47) pertenciam à espécie *K. pneumoniae* (RODRIGUES, 2004).

1.1.7 Significado clínico

O gênero *Klebsiella* está amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado no trato gastrointestinal de seres humanos e animais. *Klebsiella* sp pertence à família *Enterobacteriaceae*, apresenta-se como bacilos Gram-negativos, imóveis e geralmente encapsulados, o que dá característica mucóide as colônias (ABBOTT, 1999; KONEMAN et al., 2001).

A espécie de maior interesse médico e maior frequência de isolamentos clínicos é a *Klebsiella pneumoniae*, embora, outras espécies dentro do gênero já tenham sido identificadas em amostras biológicas. *K. pneumoniae* é bactéria oportunista e pode provocar tanto uma colonização assintomática dos tratos respiratório, urinário e intestinal, como também infecções graves, por exemplo, pneumonia, septicemia e meningite (FARMER III, 1999).

A grande maioria das infecções provocadas por *Klebsiella* está associada à hospitalização. E o aumento na incidência de infecções hospitalares causadas por espécies de *Klebsiella*, principalmente *K. pneumoniae*, está associada ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, (tanto pela infecção com HIV, como pelo uso de drogas anti-neoplásicas, por exemplo) ou que possuam outras condições pré-disponentes para tal infecção, como: diabetes melittus, obstrução pulmonar crônica, uso prolongado de antibióticos, consumo excessivo de álcool e outras drogas (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; KONEMAN et al., 2001).

O local de infecção mais comumente acometido por *Klebsiella* sp é o trato urinário. Entretanto, o gênero é o segundo nos casos de bacteremia por bactérias Gram-negativas, seguindo *E. coli*; as espécies de *Klebsiella* ainda estão geralmente envolvidas em sepsis neonatal (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Quanto à susceptibilidade a agentes antimicrobianos, todas as amostras de *K. pneumoniae* apresentam resistência intrínseca a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e

ticarcilina (FARMER III, 1999; LIVERMORE, 1998). Além disso, as espécies têm tendência a alojar plasmídeos que medeiam genes de resistência aos antimicrobianos (KONEMAN et al., 2001). Nos anos 70, as amostras de *Klebsiella* eram principalmente resistentes aos aminoglicosídeos. Mas, a partir de 1982, muitas tornaram-se resistentes às cefalosporinas de amplo espectro devido à produção de ESBL (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

O tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL quando é realizado à base de β -lactâmicos, especialmente aqueles dos grupos das penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, pode não levar a resultados satisfatórios. Porém, o contrário é verdadeiro; alguns trabalhos têm mostrado que mesmo infecções provocadas por amostras produtoras de ESBL, sensíveis *in vitro* a uma determinada cefalosporina, quando tratadas por este agente podem responder a terapêutica, com conseqüente cura clínica.

Paterson et al., (2001), analisaram o tratamento realizado com cefalosporinas em infecções sérias causadas por bactérias produtoras de ESBL que apresentavam uma aparente susceptibilidade nos testes *in vitro*. Nesse estudo foi observado que 54% (15/28) dos pacientes não obtiveram êxito no tratamento, apesar da CIM da cefalosporina estar na faixa de susceptível. Com bases nesses dados, seria prudente (quando o agente isolado é produtor de ESBL) reportar o resultado de resistente para todas as cefalosporinas, independente do resultado do teste de susceptibilidade *in vitro*, evitando assim a utilização de tais agentes e possíveis falhas terapêuticas, como já é determinado pelo NCCLS (NCCLS, 2000).

Ao contrário deste, outros estudos sugerem que o resultado do teste de susceptibilidade *in vitro* pode realmente predizer o resultado clínico. Quinn et al., (1989), descreveram o caso de 2 pacientes infectados por uma amostra de *K. pneumoniae* resistente *in vitro* a ceftazidima e aztreonam, mas susceptível a outras cefalosporinas (ceftriaxona e cefotaxima). Em um caso, o paciente desenvolveu uma peritonite e choque séptico sendo tratado empiricamente com antibióticos para os quais o isolado era resistente, e acabou morrendo. No outro, um quadro de

meningite foi curado após o tratamento com ceftriaxona e o paciente recuperou-se completamente.

Smith et al., (1990), apresentaram o caso de um paciente vítima de um grave acidente automobilístico, que após uma cirurgia desenvolveu um quadro de meningite e bacteremia; a terapia instituída incluía amicacina e ceftazidima. Foram colhidas amostras de líquido e sangue e em ambas o agente isolado foi identificado como *K. pneumoniae* produtora de ESBL, o teste de susceptibilidade *in vitro* apontou resistência à ceftazidima, mas, susceptibilidade a outras cefalosporinas, como por exemplo, cefotaxima. O esquema terapêutico foi então mudado, a ceftazidima foi trocada por cefotaxima e a amicacina foi mantida. O paciente melhorou e recuperou-se sem mais complicações.

Durante um período de 6 meses (agosto de 1995 a janeiro de 1996), foi realizado um estudo em um hospital de cuidados terciários da Virginia (The Medical College of Virginia), para determinar a prevalência de pacientes infectados por enterobactérias produtoras de ESBL e os resultados clínicos da terapêutica, em relação à produção da enzima associada ao teste de sensibilidade *in vitro*. Observou-se que 22 pacientes tinham infecção por enterobactérias produtoras de ESBL. Destes, apenas nove (40,9%) receberam como terapia cefalosporina de amplo espectro, entretanto, sete pacientes foram curados. Porém, esse número é baixo para se concluir alguma relação entre o resultado clínico e o resultado do teste de susceptibilidade *in vitro* (EMERY; WEYMOUTH, 1997).

Um estudo realizado no período de setembro de 2000 a março de 2001 no HCFMRP-USP, com o objetivo de avaliar a importância laboratorial e clínica de enterobactérias produtoras de ESBL, verificou que 70,2% das enterobactérias produtoras de ESBL isoladas no período apresentavam sensibilidade *in vitro* à cefoxitina, 40,4% à ceftazidima e 12,8% à ceftriaxona. E, assim como no estudo de Emery e Weymouth (1997), apesar do número de pacientes estudados não ter sido suficiente para esclarecer o significado clínico de tais

amostras bacterianas, houve casos de melhora clínica (6 casos - 42,9%) e cura (1 caso - 7,1%) com erradicação bacteriana (4 casos - 28,6%) durante a terapia antimicrobiana, mesmo que inadequada (GOMES, 2002).

1.1.8 Ceftriaxona e terapêutica de infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL

O grupo dos antibióticos β -lactâmicos que inclui as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos interferem na síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana; e, estão entre os antibióticos mais prescritos no mundo.

Os diversos antibióticos deste grupo possuem afinidades diferentes para as diversas PBPs (abreviatura do termo na língua inglesa “Penicillin-binding proteins” - proteínas fixadoras de penicilina), que estão envolvidas na síntese da parede celular bacteriana. Estas proteínas encontram-se ancoradas na membrana celular interna das bactérias Gram-negativas e são os alvos dos antibióticos β -lactâmicos (PITOUT; SANDERS; SANDERS Jr., 1997; RANG; DALE; RITTER, 2001).

É esta ligação específica, do antibiótico à PBP, que determinará o resultado da ação da droga levando à lise celular, ou à modificação na forma da célula, seja produzindo formas arredondadas ou longos filamentos, como acontece nos bacilos Gram-negativos (NEU, 1982).

Entretanto, existem três condições fundamentais para a perfeita atividade das penicilinas e cefalosporinas: 1. entrada das moléculas através da parede celular bacteriana; 2. estabilidade frente as β -lactamases, sendo este o principal fator necessário para a utilização de tais agentes contra bactérias Gram-negativas e 3. afinidade pelas enzimas envolvidas na síntese da parede celular (NEU, 1982). *In vivo*, o efeito antibacteriano de uma droga também depende da taxa de difusão e da concentração atingida no local infectado (PANGON et al., 1987). Assim, a eficácia do tratamento com antibióticos β -lactâmicos depende da manutenção adequada da

concentração do antibiótico no plasma durante o tratamento e não do elevado pico de concentração (BAKKER-WOUDENBERG; ROOSENDAL, 1990).

Especificamente quanto às cefalosporinas, elas são divididas em primeira, segunda, terceira e quarta gerações, segundo a ordem cronológica de produção. Os grupos são divididos por estrutura química e ordem de uso clínico; ao avançar da primeira a quarta geração, vai-se ampliando o espectro de atividade contra as bactérias Gram-negativas, ocorre perda de eficácia contra bactérias Gram-positivas, aumenta a eficiência contra microrganismos resistentes e eleva-se o custo (MANDELL; PETRI Jr., 1995).

As cefalosporinas associadas ou não a aminoglicosídeos, são consideradas drogas de escolha para o tratamento de infecções graves provocadas por *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Proteus* sp, *Providencia* sp, *Serratia* sp e *Haemophilus* sp (YAO; MOLLERING Jr., 1999).

Dentre as drogas de terceira geração, cefotaxima e ceftriaxona são as mais utilizadas para o tratamento de meningite bacteriana, graças ao seu espectro de atividade e a boa penetração no líquido (MANDELL; PETRI Jr., 1995). Também, devido à lenta eliminação da ceftriaxona, nas vegetações provocadas nos experimentos de endocardite, o nível bactericida é mantido por mais tempo do que para outras cefalosporinas impedindo assim, o crescimento bacteriano nos intervalos das doses (PANGON et al., 1987).

As diferenças farmacológicas entre as drogas de terceira geração dá-se pelo metabolismo, meia-vida e mecanismos pelos quais elas são excretadas. Entretanto, a maior vantagem do uso de ceftriaxona em relação às outras drogas da mesma geração é a sua meia-vida longa, o que permite um esquema posológico de dose única diária (NEU, 1982).

Muito embora, exista uma ampla variedade de cefalosporinas disponíveis no mercado; atualmente, a redução e até mesmo a eliminação do uso destes agentes e a substituição destas por drogas alternativas, tem sido sugerida como medida para reduzir o número de infecções provocadas por bactérias produtoras de ESBL (RICE, 2001).

Assim, o uso de agentes carbapenêmicos (como por exemplo, imipenem e meropenem) e a combinação de agentes β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases são alternativas para o tratamento de infecções provocadas por microrganismos produtores de ESBL. Entretanto, já foi detectada a produção de enzimas que degradam carbapenêmicos em enterobactérias (OSANO et al., 1994). Quanto aos inibidores de β -lactamases, eles atuam ligando-se às enzimas inativando-as e assim impedem a destruição dos antibióticos β -lactâmicos, sendo mais ativos contra β -lactamases codificadas por plasmídeos (MANDELL; PETRI Jr., 1995). As combinações de amoxicilina-ácido clavulânico e piperacilina-tazobactam são as mais ativas *in vitro* contra enterobactérias produtoras de ESBL (SADER, 2000; SPANU et al., 2002).

Outras classes de antimicrobianos, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluorquinolonas e sulfametoxazol-trimetoprim, também podem ser utilizadas, desde que o teste de susceptibilidade aponte sensibilidade a estes agentes; pois, tem sido observado casos de resistência cruzada (JONES; PFALLER, 1998; MENDES et al., 2000; PATTERSON, 2002; RICE, 2001; SPANU et al., 2002).

1.2 MODELOS ANIMAIS DE INFECÇÃO POR BACTÉRIAS RESISTENTES À CEFALOSPORINAS

Basicamente, os estudos realizados em modelos animais buscam analisar a eficácia de antibióticos β -lactâmicos ou não, associados ou não a inibidores de β -lactamases, no tratamento de infecções experimentais provocadas por bactérias produtoras de ESBL. E, apesar da extensa bibliografia sobre o assunto ESBL, poucos são os relatos de experimentos *in vivo*, relacionando a produção da enzima, o teste de susceptibilidade *in vitro* (especialmente

quando este apresenta sensibilidade a um agente que deveria ser reportado como resistente) e a resposta terapêutica.

Um modelo de endocardite experimental conduzido em coelhas, destinado a avaliar a atividade da combinação de sulbactam e ceftriaxona contra *K. pneumoniae* produtora de TEM-3, resistente *in vitro* a todos os β -lactâmicos, exceto cefamicinas e imipenem, demonstrou que tanto o sulbactam, quanto a ceftriaxona isolados eram ineficazes para o tratamento deste grave quadro de infecção. Além disso, mesmo quando associado a ceftriaxona, o sulbactam não foi capaz de restabelecer a completa atividade da ceftriaxona, a não ser que uma alta dose do inibidor (incompatível com a dose utilizada em humanos) fosse utilizada (CARON et al., 1990).

Modelo experimental idêntico foi utilizado por Mentec et al., (1992) a fim de avaliar a eficácia de piperacilina, tazobactam e gentamicina isolados ou combinados para o tratamento dos animais. Os resultados obtidos mostraram que o tazobactam foi capaz de restituir completamente a atividade da piperacilina *in vitro* e *in vivo*, e a gentamicina, mesmo que isolada, também mostrou-se efetiva para o tratamento devido a alta concentração plasmática. Constatou-se, ainda, que o efeito inibitório do tazobactam *in vitro* não era dependente da concentração e persistiu mesmo quando o inóculo foi maior.

Rice et al., (1991), desenvolveram um estudo *in vivo* para comparar a eficácia de vários antibióticos β -lactâmicos no tratamento de ratos com abscessos intra-abdominal provocados por *K. pneumoniae* produtora de YOU-1, uma enzima de amplo espectro que confere um alto nível de resistência à ceftazidima, mas não confere resistência à cefotaxima quando o inóculo utilizado era 10^5 UFC (Unidades Formadoras de Colônias)/ml. Foi possível constatar com base neste modelo, que os grupos de animais tratados com imipenem e com a combinação de cefoperazona-sulbactam tiveram uma significativa redução das UFC/g de abscesso, quando comparados com os outros grupos experimentais (que receberam cefoperazona, cefotaxima ou

cefpiroma). Com base nestes resultados, os autores sugerem evitar o uso isolado de cefalosporinas de amplo espectro para o tratamento de infecções sérias causadas por amostras produtoras de β -lactamase.

No estudo de Thauvin-Eliopoulos et al., (1997), o mesmo modelo experimental de abscessos intra-abdominal em ratos e a mesma amostra de *K. pneumoniae* utilizados por Rice et al., (1991) foi empregado com o objetivo foi avaliar a eficácia de piperacilina-tazobactam e cefepime. Os grupos experimentais incluíam além do controle não-tratado, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulânico, cefepime, cefotaxima, imipenem e ceftazidima. Exceto o grupo tratado com ceftazidima, todos os outros esquemas terapêuticos reduziram significativamente as UFC/g de abscesso; os melhores resultados foram observados com os grupos tratados com imipenem, cefotaxima e cefepime, respectivamente. Ainda assim, os pesquisadores sugeriram cautela quanto à conduta terapêutica em casos graves causados por isolados produtores de β -lactamases.

O efeito bactericida de ceftriaxona obtido *in vitro* foi concentração e dose-dependentes em um modelo de endocardite experimental conduzido em coelhas causado por *E. coli* plenamente sensível a ceftriaxona. E, embora tenham sido testadas outras cefalosporinas para as quais o isolado mostrava-se susceptível, ceftriaxona exibiu o mais alto efeito bactericida no referido modelo de infecção (PANGON et al., 1987). Também foi possível notar um efeito dose-dependente, para ceftriaxona associada ao sulbactam, mesmo quando a amostra bacteriana exibia uma reduzida susceptibilidade *in vitro* a esta droga, no mesmo modelo de endocardite experimental conduzido em coelhas, agora causado por *E. coli* produtora de SHV-2, enzima que confere uma reduzida susceptibilidade às cefalosporinas de amplo espectro (ceftriaxona e cefotaxima) (FANTIN et al., 1990).

Nos estudos de Fantin et al., (1990), Rice et al., (1991) e Thauvin-Eliopoulos et al., (1997) observou-se ainda um acentuado efeito inóculo *in vitro*, ou seja, à medida que se

aumenta o inóculo, aumenta-se também a CIM do antimicrobiano testado; o que explica, em parte, a ineficiência de alguns agentes antimicrobianos nestes tipos de infecções, já que os abscessos e as vegetações possuem uma grande quantidade de bactérias que produzem uma grande quantidade de enzima, além de tecido destruído, o que dificulta ainda mais o antibiótico alcançar o seu alvo (FANTIN et al., 1990).

2 JUSTIFICATIVA

Ainda existem dúvidas sobre a antibioticoterapia de pacientes infectados por enterobactérias produtoras de ESBL, particularmente aquelas cujo teste apresenta susceptibilidade *in vitro* a drogas presumidamente inativadas pela enzima (PATERSON et al., 2001). Nesse sentido, o uso de animais para a análise da eficiência de antimicrobianos, especialmente as cefalosporinas, no tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL pode contribuir para a definição do uso ou não desses antibióticos para a terapia dos pacientes.

Sendo assim, a proposta deste estudo é justamente avaliar a eficiência do tratamento com ceftriaxona, *in vivo*, para infecções causadas tanto por cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, quanto para as cepas não-produtoras, comparando com aquelas cujo teste de susceptibilidade *in vitro* aponta resistência ou sensibilidade a esse antibiótico.

3 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a eficácia de uma cefalosporina de terceira geração - ceftriaxona - em modelo murino de infecção por *Klebsiella pneumoniae* produtora ou não de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), com diferentes perfis de sensibilidade *in vitro* a este antimicrobiano.

Específicos:

1. Padronizar modelo animal de infecção generalizada por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos;
2. Verificar a resposta à ceftriaxona em animais inoculados com amostras de *Klebsiella pneumoniae* não-produtoras de ESBL e sensíveis à ceftriaxona;
3. Verificar a resposta à ceftriaxona em animais inoculados com amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, susceptíveis ou não ao antibiótico, em teste de sensibilidade *in vitro*, e
4. Averiguar o efeito da dosagem e do número de doses de ceftriaxona nos camundongos infectados com *Klebsiella pneumoniae*.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 AMOSTRAS DE *Klebsiella pneumoniae*

Foram utilizadas para o presente estudo 8 (oito) amostras bacterianas de *Klebsiella pneumoniae*, que estavam estocadas em Ágar Trypticase de Soja, à 4°C. Sete amostras foram isoladas a partir de urina, secreção traqueal e sangue de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e uma amostra foi isolada a partir de urina, de paciente de um laboratório de análises clínicas de Juiz de Fora, Minas Gerais.

A identificação em gênero e espécie foi executada pelo sistema automatizado Microscan[®] (Dade Behring, West Sacramento, CA, EUA).

Utilizando dois testes de sensibilidade *in vitro*, a microdiluição em caldo em painéis do sistema automatizado Microscan[®] e o teste de sensibilidade por disco difusão em ágar, todas as amostras foram avaliadas quanto ao perfil de susceptibilidade à ceftriaxona. A produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) foi avaliada por meio do teste de disco combinado de ceftazidima (Tabela 1). A interpretação dos testes de susceptibilidade, realizada por fotolorimetria pelo aparelho ou visualmente pelo microbiologista, bem como a interpretação do teste de disco combinado foi baseada nas normas do NCCLS (NCCLS, 2000).

As amostras foram suspensas em meio BHI (abreviatura do termo na língua inglesa “Brain heart infusion”) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e repicadas em ágar Müeller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), suplementado com 5% de sangue de carneiro e ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas por 18 a 24 horas. Procedeu-se então à inoculação de 3 a 5 colônias puras em meio BHI, ajustando-se a turbidez, visualmente em 0,5 da escala de McFarland e, em seguida por meio do uso de um aparelho acessório do sistema automatizado MicroScan[®] - Turbidímetro (Dade Behring, West

Sacramento, CA, EUA), ajustou-se a suspensão bacteriana para que tivesse uma leitura de absorvância de 0,10 – 0,11.

A suspensão foi homogeneizada e nela foi embebido um "swab" que, após a drenagem do excesso de líquido, foi utilizado para a semeadura em placas de ágar Müller-Hinton. Os discos de papel de filtro impregnados um, com uma cefalosporina de terceira geração (30µg de ceftazidima) e o outro, com a mesma droga acrescida de 10µg de clavulanato foram colocados na superfície do meio de cultura para a detecção da produção de ESBL, além do disco contendo ceftriaxona (todos os discos da marca Oxoid®); estas placas foram mantidas na estufa a 35°C durante 18 a 24 horas. Um aumento de 5mm na zona de inibição do disco contendo a cefalosporina com o clavulanato comparado à droga isolada foi considerado como teste positivo.

Tabela 1 - Produção de β-lactamase de espectro estendido (ESBL) e susceptibilidade à ceftriaxona (CRO) das amostras de *Klebsiella pneumoniae*.

Amostras bacterianas	Material clínico	ESBL*	Susceptibilidade a ceftriaxona		
			CIM (µg/ml)**	Halo (mm)***	Interpretação
120	Urina	Positiva	≤ 4 µg/ml	21 mm	Sensível
291	Secreção traqueal	Positiva	32 µg/ml	16 mm	Intermediária
158	Sangue	Positiva	≥ 32 µg/ml	0 mm	Resistente
312	Sangue	Positiva	≥ 32 µg/ml	0 mm	Resistente
455	Sangue	Negativa	≤ 4 µg/ml	31 mm	Sensível
974	Urina	Negativa	≤ 4 µg/ml	26 mm	Sensível
1024	Urina	Negativa	≤ 4 µg/ml	25 mm	Sensível
1131	Urina	Negativa	≤ 4 µg/ml	26 mm	Sensível

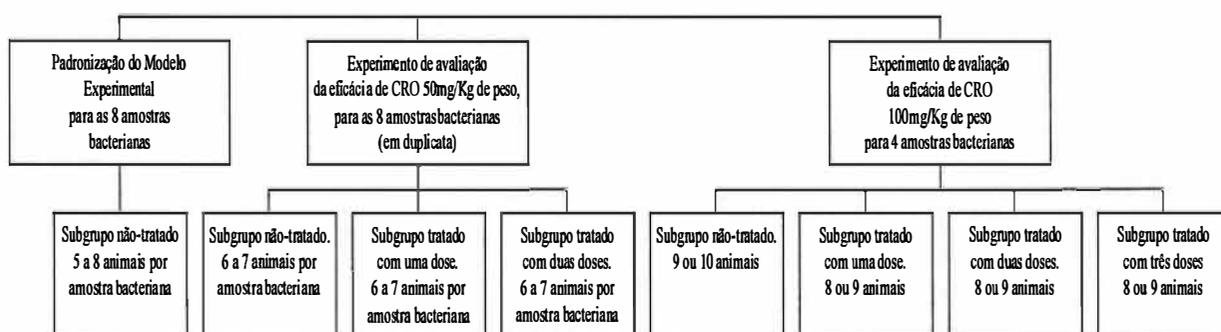
* Teste de disco-combinado

** Concentração Inibitória Mínima, pelo sistema automatizado MicroScan®;

*** Método de disco-difusão.

4.2 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos em camundongos *Mus musculus* (linhagem swiss), machos, com peso inicial de 20-25g, alojados em gaiolas de policarbonato e cama de maravalha, com 6 ou 7 animais em cada uma, sendo livre o acesso à ração e a água. Os animais foram distribuídos de acordo com o esquema abaixo.



4.3 DROGAS

4.3.1 Betametasona

Os camundongos receberam uma dose de 20mg de betametasona [(Dipropionato de Betametasona + Fosfato Dissódico de Betametasona) Diprosan[®], da Schering-Plough, lote n^o 323] / Kg de peso, 48 horas antes do inóculo bacteriano.

Os animais foram pesados um dia antes da administração da dose única de betametasona. Para cada subgrupo de animais, foi aplicada a mesma dose de 20mg/Kg de peso, calculada com base na média de peso dos animais de cada subgrupo.

A dose a ser administrada foi preparada no momento da utilização e aplicada por via subcutânea utilizando-se seringas descartáveis para volume de 1ml e agulha hipodérmica 13x45mm.

4.3.2 Ceftriaxona

A droga avaliada foi obtida comercialmente. Ceftriaxona marca Rocefim[®], (lote nº B2642 B1128) da Roche, frasco com 1000mg, foi pesada e suspensa em água destilada estéril.

Os animais foram pesados no dia da primeira dose de medicação. Para cada subgrupo de animais, foi aplicada a dose de ceftriaxona (50 ou 100mg/Kg de peso, de acordo com o delineamento experimental), calculada com base na média de peso dos animais de cada subgrupo e na quantidade de princípio ativo presente na medicação.

A dose a ser administrada foi preparada no momento da utilização e aplicada por via intraperitoneal, utilizando-se seringas descartáveis para volume de 1ml e agulha hipodérmica 13x45mm. As doses e os intervalos foram estabelecidos para cada experimento.

4.4 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO

As amostras bacterianas foram mantidas em Ágar Trypticase de Soja, sob refrigeração. Vinte e quatro horas antes da inoculação, foram repicadas em caldo BHI e mantidas em estufa a 35°C por aproximadamente 6 horas. Um novo repique foi feito, a partir deste caldo, em placas de Ágar MacConkey e estes, incubados em estufa a 35°C durante 24 horas, a fim de obtermos uma cultura jovem.

No dia do inóculo, algumas colônias foram retiradas da placa de Ágar MacConkey e coletadas em tubos de ensaio contendo 4,5ml de solução aquosa de NaCl 0,9%, sendo a turvação desta suspensão bacteriana comparada visualmente com a turvação do tubo 5 da escala de McFarland (LIMA e SILVA, 1970), que corresponde a $1,5 \times 10^9$ bactérias/ml. O ajuste final da concentração da suspensão foi realizado mediante leitura no Turbidímetro, tomando como padrão o tubo 5 da escala de McFarland padronizando-se o inóculo bacteriano para uma leitura de absorvância igual a 0,65 - 0,66.

Depois de ajustada a concentração bacteriana, realizamos diluições seriadas desta suspensão a partir de 1:10 até 1:1.000.000 e uma alíquota (100µl) das suspensões diluídas foram semeadas em placas de Ágar MacConkey e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C durante 18 horas, para determinação das Unidades Formadoras de Colônias por 0,1ml de suspensão inoculada (UFC/0,1ml) presentes no inóculo.

4.5 INOCULAÇÃO

Após 48 horas da aplicação da dose única de betametasona, cada camundongo foi inoculado com 0,1ml da suspensão bacteriana original de *K. pneumoniae*, por via endovenosa, puncionando-se uma veia da cauda com o auxílio de seringas para volume de 1ml e agulhas hipodérmicas 13x45mm. Conforme a amostra bacteriana e os subgrupos experimentais, o inóculo variou de 0,8 a 8×10^9 UFC/ml.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO

4.6.1 Sacrifício dos animais e preparação das vísceras

Os animais que morreram espontaneamente após o inóculo tiveram o baço e o fígado retirados imediatamente ou, após a refrigeração da carcaça, dentro de no máximo 30 horas. Os camundongos sobreviventes foram sacrificados no 7º e 8º dias após a inoculação. O baço e o fígado, retirados assepticamente, foram pesados, e colocados em frascos com 10 ml de solução fisiológica 0,9% estéril. As vísceras foram homogeneizadas em equipamento microtritador (modelo Turrax – MA 120, Marconi), o fígado durante um minuto, e o baço durante 30 segundos.

4.6.2 Cultura quantitativa

Foram realizadas diluições dos tecidos homogeneizados em solução aquosa de NaCl 0,9% estéril. O macerado do baço foi diluído a 1:10, 1:100 e 1:1000 e o macerado do fígado a 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000. De cada uma destas diluições foram retirados 100µl que foram semeados em quatro quadrantes de placas de Petri contendo Ágar MacConkey e a seguir incubadas a 35°C durante 18 horas, para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido).

4.7 SOBREVIDA DOS ANIMAIS

A análise da sobrevida dos animais foi feita em dias após a inoculação da suspensão bacteriana, até um período máximo de 7 dias. Em cada um dos experimentos, o dia da morte de cada animal foi anotado para posterior análise de sobrevivência. Os animais sobreviventes foram sacrificados no 7º e 8º dias após a inoculação. Em todos os experimentos os camundongos mortos espontaneamente ou sacrificados foram processados e procedemos à quantificação da infecção.

4.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.8.1 Padronização do modelo experimental

No total, 8 grupos experimentais foram avaliados, um grupo não-tratado para cada amostra bacteriana (4 produtoras e 4 não-produtoras de ESBL). Cada grupo experimental foi composto por 5 a 8 animais que receberam o inóculo das diferentes amostras de *K. pneumoniae*, após 48 horas da administração de corticosteróide. Observou-se a sobrevida dos animais infectados com cada uma das amostras, bem como, quantificou-se as Unidades

Formadoras de Colônias por grama de baço e fígado (UFC/g de tecido) nos animais mortos pela infecção e nos sobreviventes sacrificados no 7º e 8º dias após a inoculação.

4.8.2 Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso

Para cada uma das 8 amostras de *K. pneumoniae* incluídas neste experimento, utilizamos 3 subgrupos experimentais que foram assim divididos:

❑ Subgrupo não-tratado (controle), com 6 ou 7 animais.

- Os animais receberam 0,3ml de água destilada estéril, 1 hora após o inóculo e 18 horas após a primeira dose;

❑ Subgrupo T1_{50mg} (tratado com uma dose de ceftriaxona), com 6 ou 7 animais.

- Os animais receberam 50mg de ceftriaxona/Kg de peso, 1 hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 18 horas após a primeira dose receberam 0,3ml de água destilada estéril;

❑ Subgrupo T2_{50mg} (tratado com 2 doses de ceftriaxona), com 6 ou 7 animais.

- Os animais receberam 50mg de ceftriaxona/Kg de peso, 1 hora após o inóculo e 18 horas após a primeira dose de ceftriaxona, em 0,3ml de água destilada estéril.

A avaliação da eficácia de ceftriaxona 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso foi feita em duplicata para todas as 8 amostras de *K. pneumoniae* (Experimentos I e II).

4.8.3 Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso

Neste experimento utilizamos uma concentração maior de ceftriaxona (o dobro da dose utilizada nos experimentos anteriores) e diferentes intervalos de doses (1 hora, 3 e 18 horas após o inóculo).

Para este experimento selecionamos 4 amostras bacterianas de *K. pneumoniae* que haviam sido utilizadas nos experimentos anteriores (3 amostras produtoras de ESBL: • uma resistente, 158; • uma com sensibilidade intermediária, 291 e • uma plenamente sensível *in vitro* a ceftriaxona, 120 e uma amostra não-produtora de ESBL e plenamente sensível *in vitro* a ceftriaxona, 1131). Para cada uma das amostras testadas utilizamos 4 subgrupos experimentais que foram assim divididos:

▣ Subgrupo não-tratado (controle), com 9 ou 10 animais.

- Os animais receberam 0,3ml de água destilada estéril, 1 hora após o inóculo, 3 horas e 18 horas após a primeira dose;

▣ Subgrupo T1_{100mg} (tratado com uma dose de ceftriaxona), com 8 ou 9 animais.

- Os animais receberam 100mg de ceftriaxona/Kg de peso, 1 hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 0,3ml de água destilada estéril 3 horas e 18 horas após a dose de ceftriaxona;

▣ Subgrupo T2_{100mg} (tratado com 2 doses de ceftriaxona), com 8 ou 9 animais.

- Os animais receberam 100mg de ceftriaxona/Kg de peso, 1 hora após o inóculo e 3 horas após a primeira dose de ceftriaxona, em 0,3ml de água destilada estéril; e 0,3ml de água destilada estéril 18 horas após a primeira dose de ceftriaxona;

▣ Subgrupo T3_{100mg} (tratado com 3 doses de ceftriaxona), com 8 ou 9 animais.

- Os animais receberam 100mg de ceftriaxona/Kg de peso, 1 hora após o inóculo, 3 horas e 18 horas após a primeira dose de ceftriaxona, em 0,3ml de água destilada estéril;

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregamos os modelos lineares de efeitos mistos (aleatórios e fixos) (SCHALL, 1991) na análise da quantificação de UFC/g de tecido nos experimentos de avaliação da eficácia de ceftriaxona 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso e no experimento de avaliação da eficácia de ceftriaxona 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso.

Nos experimentos de padronização do modelo experimental, avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50 mg/Kg de peso (para as contagens obtidas nas vísceras dos animais inoculados pelas amostras 158 e 291 de *K. pneumoniae*) e avaliação da eficácia de ceftriaxona 1 a 3 doses de 100 mg/Kg de peso (para as contagens obtidas nas vísceras dos animais inoculados pela amostra 158 de *K. pneumoniae*) os resultados obtidos não puderam ser analisados por meio dos modelos lineares de efeitos mistos e, por isso, nestes casos empregamos o Teste de Kruskal-Wallis (CONOVER, 1999).

A sobrevida dos animais inoculados com as amostras bacterianas e tratados com ceftriaxona em diferentes doses foi analisada utilizando o método de Kaplan-Meier, 1958. Quando utilizada a dosagem de 50mg/Kg de peso/dose de ceftriaxona, os dados da sobrevida dos animais de dois experimentos realizados com cada amostra bacteriana foram juntados e então submetidos ao teste estatístico. O Teste de Wilcoxon também foi aplicado, a fim de comparar as funções de sobrevivência.

Em todos os experimentos, independente do teste estatístico empregado, considerou-se um nível de significância com valor de "p" igual ou menor que 5,0% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

A quantificação da infecção no baço e no fígado dos animais não apontou diferença estatisticamente significativa quando comparamos as contagens de UFC/g de tecido encontradas nos animais infectados por qualquer uma das 8 amostras de *K. pneumoniae* ($p = 0,1113$ e $p = 0,1893$, respectivamente) (Figura 2 e Tabela 2).

Tabela 2 - Padronização do modelo experimental. Inóculo e mediana das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido encontradas nas vísceras dos camundongos infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de ESBL. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Amostras bacterianas	Inóculo ($\times 10^8$ UFC)	Mediana das UFC/g de tecido	
		Baço (UFC/g de tecido $\times 10^4$)	Fígado (UFC/g de tecido $\times 10^5$)
Produtoras de ESBL			
158	2,52	278,89	36,88
312	0,86	111,18	45,51
291	2,06	23,74	19,97
120	0,91	46,16	26,55
Não-produtoras de ESBL			
455	2,09	1,4	18,34
974	0,8	0,64	4,14
1024	2,39	60,76	31,29
1131	1,67	3,64	24,11

Teste de Kruskal-Wallis: baço $p = 0,1113$ e fígado $p = 0,1893$

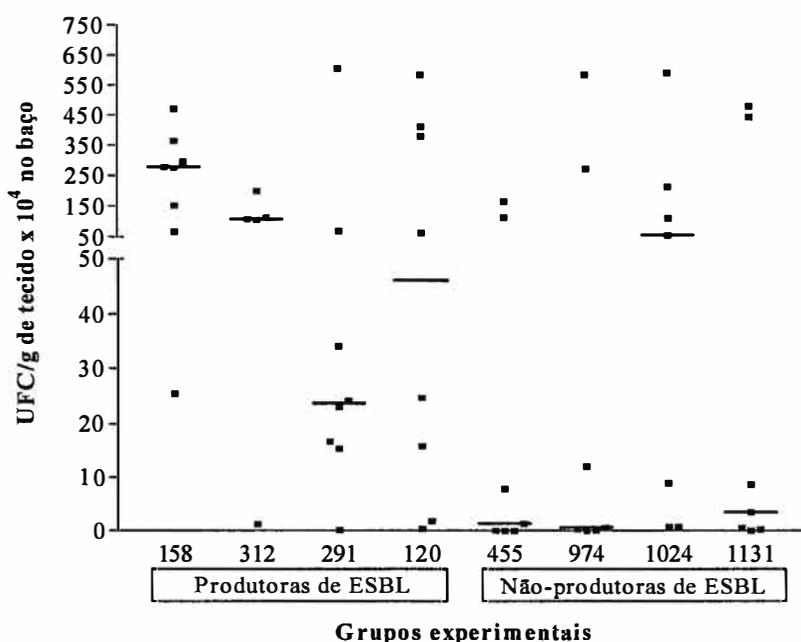


Figura 1. Padronização do modelo experimental. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido x 10⁴) e medianas (barras) no baço dos camundongos infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de ESBL. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação. Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,1113$).

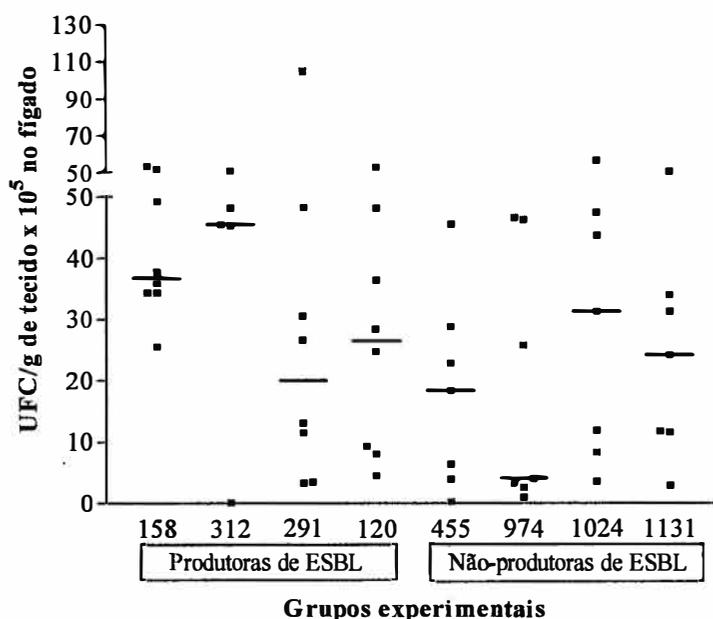


Figura 2. Padronização do modelo experimental. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido x 10⁵) e medianas (barras) no fígado dos camundongos infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de ESBL. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação. Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,1893$).

Também, não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevivência dos animais inoculados com qualquer uma das 8 amostras de *K. pneumoniae* ($p = 0,1802$) (Figura 3).

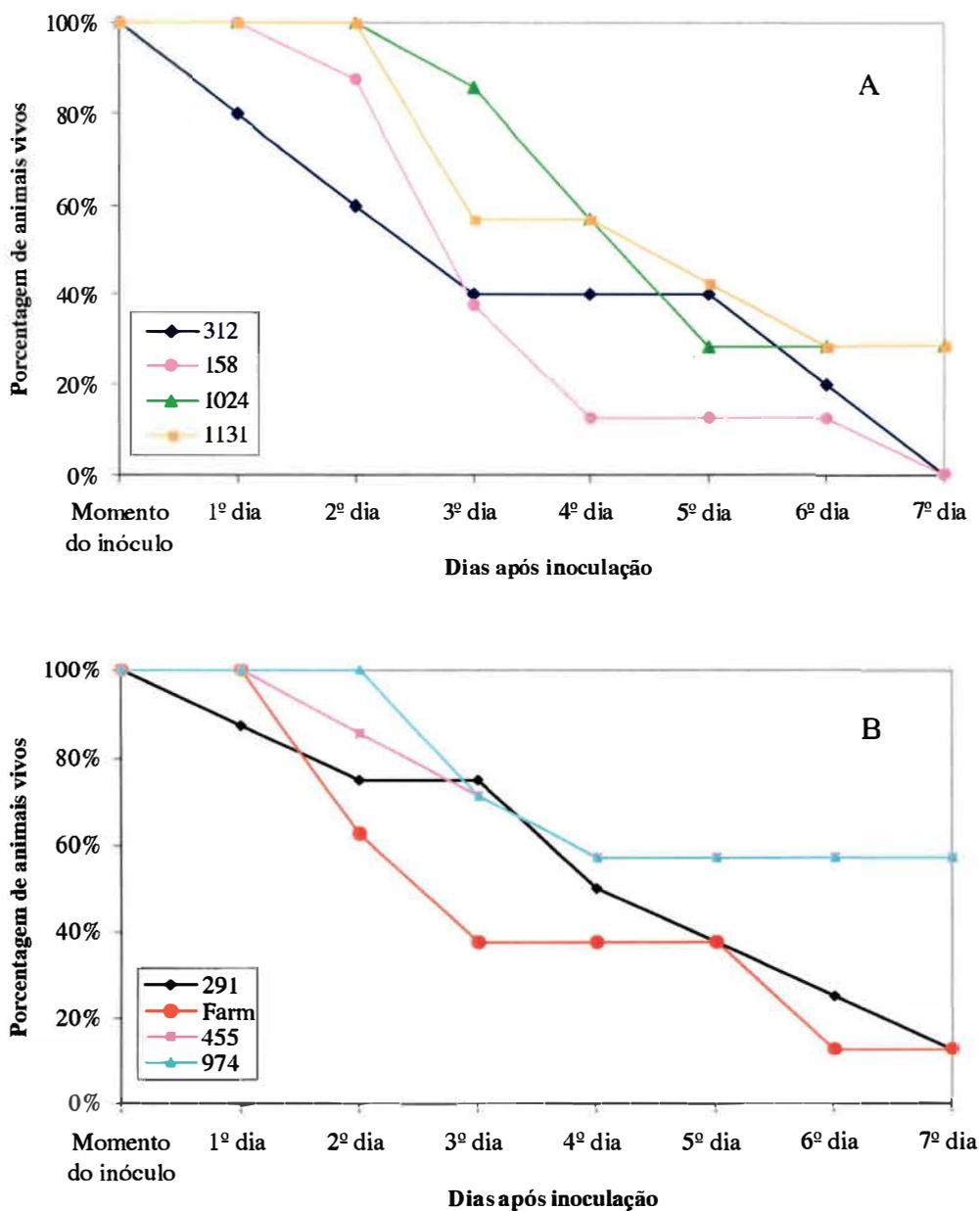


Figura 3. Sobrevivência dos camundongos infectados experimentalmente por oito amostras de *K. pneumoniae* (sendo elas, produtoras ou não de ESBL) e observados até o 7º dia após a inoculação. Quatro amostras na figura 3A e quatro amostras na figura 3B. Teste de Wilcoxon ($p = 0,1802$).

5.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CEFTRIAXONA, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso

Para os animais infectados pela amostra 158, produtora de ESBL e resistente *in vitro* a ceftriaxona, não houve resposta ao tratamento feito com ceftriaxona 50mg/Kg de peso (nos dois experimentos), tanto quando analisamos a contagem de UFC/g de tecido no baço ($p = 0,7741$ e $p = 0,1595$, respectivamente) quanto no fígado ($p = 0,1894$ e $p = 0,9526$, respectivamente) (Tabelas 3 e 4 e Figura 4).

Tabela 3 - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Inóculo e mediana das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço dos animais infectados experimentalmente por duas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Amostras bacterianas	Inóculo (UFCx10 ⁸)	Mediana das UFCx10 ⁴ de <i>K. pneumoniae</i> no baço			Inóculo (UFCx10 ⁸)	Mediana das UFCx10 ⁴ de <i>K. pneumoniae</i> no baço		
		Experimento I				Experimento II		
		Não-tratado	T1 _{50mg} ¹	T2 _{50mg} ²		Não-tratado	T1 _{50mg} ¹	T2 _{50mg} ²
158 *	2,82	105,21	107,98	209,49	5,46	18,19	0,81	22,59
291 **	5,24	0,12	0,33	1,6	4,73	1,96	1,02	53,39

1 - Subgrupos tratados com 1dose de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 18 horas após a primeira dose de CRO receberam 0,3ml de água destilada estéril).

2 - Subgrupos tratados com 2 doses de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo e 18 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril).

Teste de Kruskal-Wallis, para o baço:

* amostra 158, p = 0,7741 e p = 0,1595, respectivamente.

** amostra 291, p = 0,8255 e p = 0,5655, respectivamente.

Tabela 4 - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Inóculo e mediana das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no fígado dos animais infectados experimentalmente por duas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Amostras bacterianas	Inóculo (UFCx10 ⁸)	Mediana das UFCx10 ⁵ de <i>K. pneumoniae</i> no fígado			Inóculo (UFCx10 ⁸)	Mediana das UFCx10 ⁵ de <i>K. pneumoniae</i> no fígado		
		Experimento I				Experimento II		
		Não-tratado	T1 _{50mg} ¹	T2 _{50mg} ²		Não-tratado	T1 _{50mg} ¹	T2 _{50mg} ²
158 *	2,84	12,79	19,71	92,65	5,46	110,19	105,35	32,66
291 **	5,24	0,83	0,06	1,35	4,73	23,9	2,48	74,32

1 - Subgrupos tratados com 1dose de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 18 horas após a primeira dose de CRO receberam 0,3ml de água destilada estéril).

2 - Subgrupos tratados com 2 doses de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo e 18 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril).

Teste de Kruskal-Wallis, para o fígado:

* amostra 158, p = 0,1894 e p = 0,9526, respectivamente.

** amostra 291, p = 0,2813 e p = 0,4523, respectivamente.

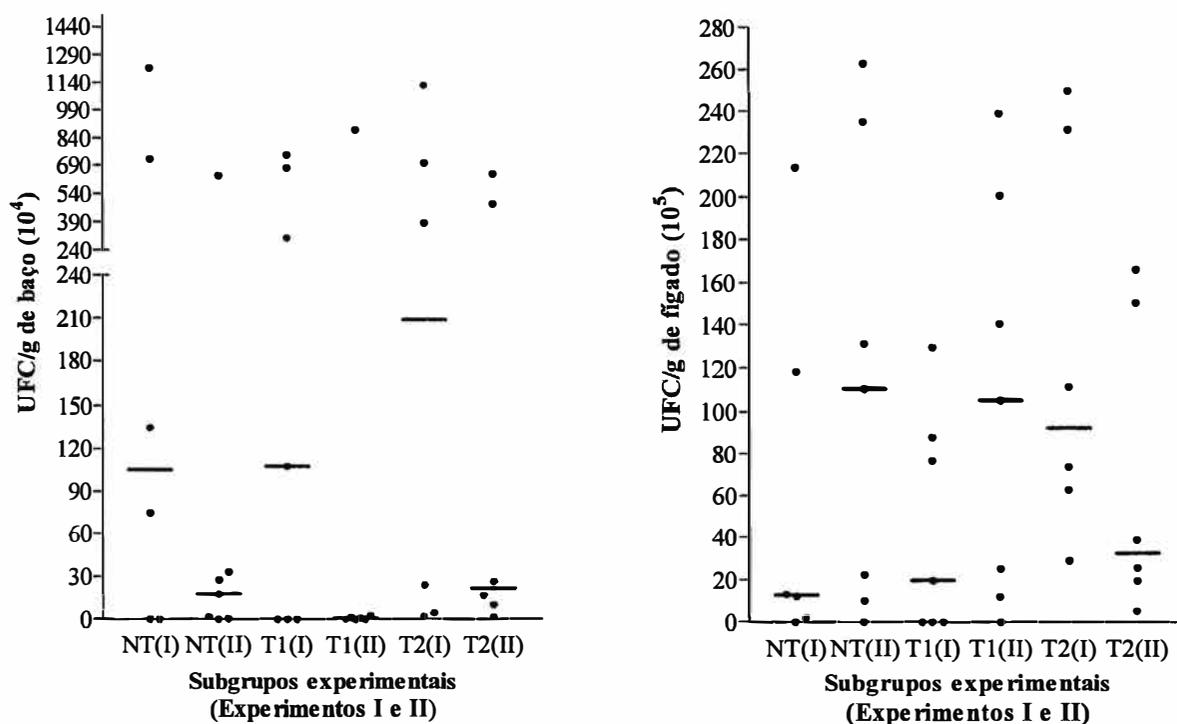


Figura 4. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação. As barras representam a mediana de cada subgrupo.

Teste de Kruskal-Wallis: no baço $p = 0,7741$ (Exp. I) e $p = 0,1595$ (Exp. II);

Teste de Kruskal-Wallis: no fígado $p = 0,1894$ (Exp. I) e $p = 0,9526$ (Exp. II).

Analisando a sobrevivência dos camundongos que receberam inóculo da amostra 158, por meio da curva de Kaplan Meier, verificamos que a ceftriaxona não teve qualquer efeito protetor. Pelo contrário, os animais tratados com duas doses do antibiótico sobreviveram menos tempo ($p = 0,0115$) (Figura 5).

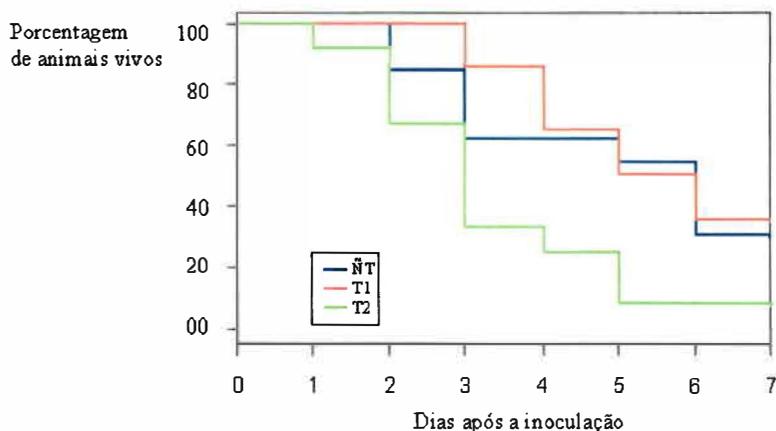


Figura 5. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. Os pontos representam dados conjuntos de dois experimentos. Teste de Wilcoxon ($p = 0,0115$).

A quantificação da infecção nas vísceras dos animais infectados pela amostra bacteriana 291 (produtora de ESBL e intermediária à ceftriaxona no teste de sensibilidade *in vitro*), também não mostrou diferenças estatisticamente significantes da carga bacteriana em nenhum dos dois experimentos, nem no baço ($p = 0,8255$ e $p = 0,5655$, respectivamente) e nem no fígado ($p = 0,2813$ e $p = 0,4523$, respectivamente) (Tabelas 3 e 4 e Figura 6).

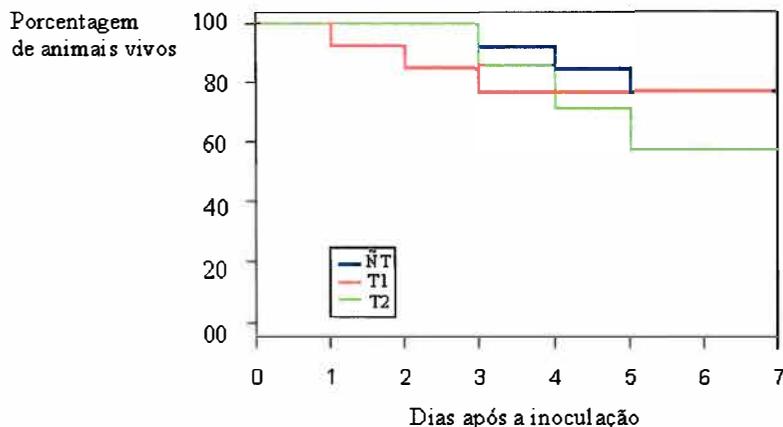


Figura 7. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 291 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. Os pontos representam dados conjuntos de dois experimentos. Teste de Wilcoxon ($p = 0,5937$).

Nos animais inoculados pela amostra 312, que é produtora de ESBL e resistente a ceftriaxona no teste de sensibilidade *in vitro*, observamos atividade do antimicrobiano. No experimento II, a redução das UFC/g de tecido no baço foi progressiva ao analisarmos os subgrupos partindo do controle não-tratado para os demais tratados, sendo estatisticamente significante: NT x T1_{50mg} ($p = 0,037$) e NT x T2_{50mg} ($p = 0,0003$). No experimento I, situação semelhante foi observada, porém, esta diminuição na carga bacteriana não foi estatisticamente significante (Tabela 5 e Figura 8).

Ação antimicrobiana também pôde ser observada através da análise da contagem de UFC/g de tecido no fígado dos animais inoculados com esta mesma amostra bacteriana. No experimento II, ocorreu uma diminuição da carga bacteriana quando comparamos os subgrupos, a significância foi detectada quando o subgrupo controle não-tratado foi comparado ao T2_{50mg} ($p = 0,0003$). No experimento I para a mesma amostra, apesar de ter havido uma redução progressiva da carga bacteriana, não houve diferença significativa entre os subgrupos (Tabela 6 e Figura 8).

Comparando os subgrupos T1_{50mg} e T2_{50mg} em pelo menos um dos dois experimentos (experimento II) com a amostra 312 houve tendência à ação dependente do número de doses de ceftriaxona, significativa no baço (T1_{50mg} x T2_{50mg} = p = 0,041).

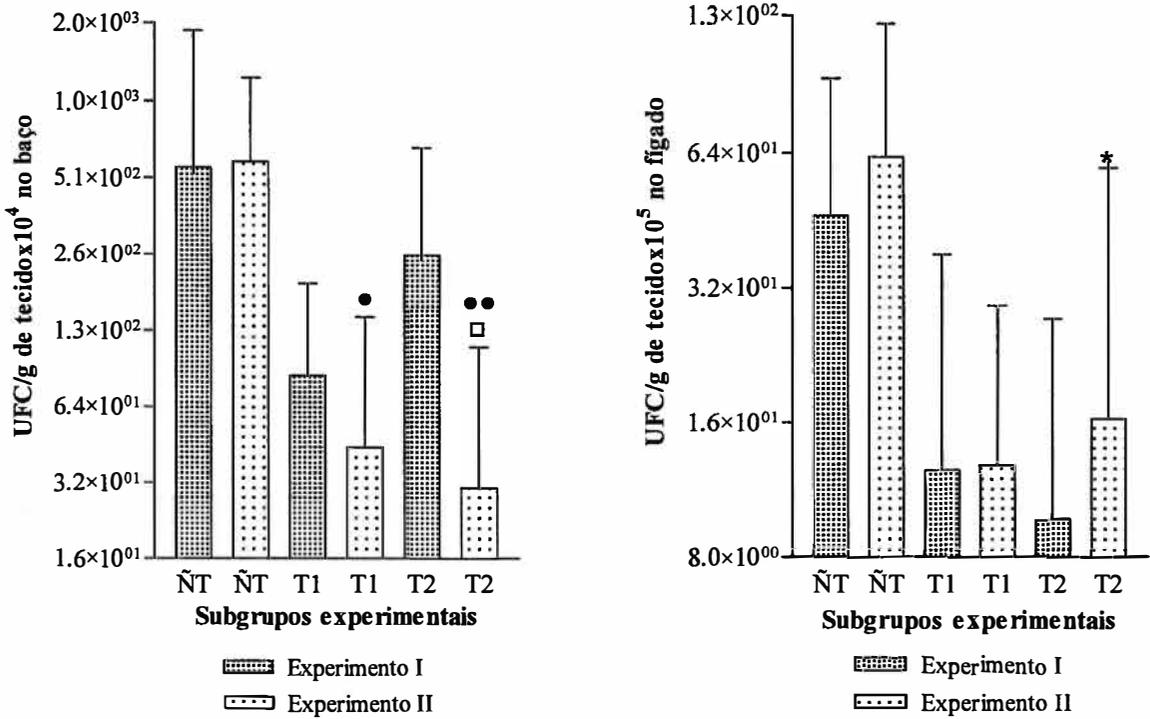


Figura 8. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 312 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos: ● não-tratado x T1_{50mg}: p = 0,037; ●● não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,0003; * não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,0003; □ T1_{50mg} x T2_{50mg}: p = 0,041.

Os animais inoculados com a amostra 312 tiveram sua sobrevivência aumentada quando tratados com ceftriaxona (p = 0,0205 pelo teste de Wilcoxon), conforme mostra a curva de Kaplan Meier (Figura 9).

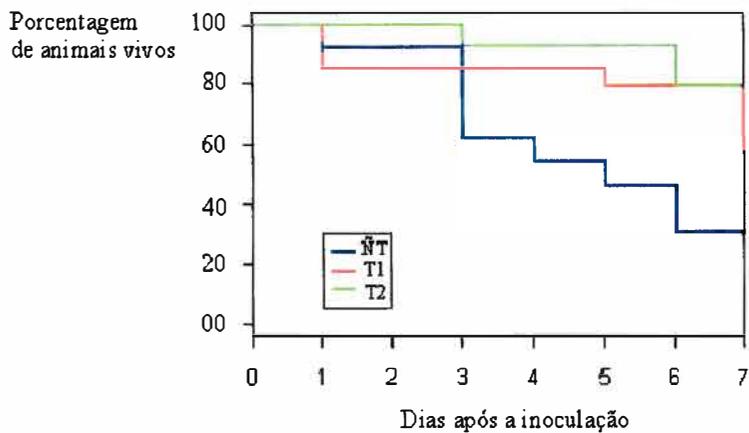


Figura 9. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 312 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7^o dia após a inoculação. Os pontos representam dados conjuntos de dois experimentos. Teste de Wilcoxon ($p = 0,0205$)

Tabela 5 - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço dos animais infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Amostras bacterianas	Inóculo (UFCx10 ⁸)	Média UFCx10 ⁴ ± DP de <i>K. pneumoniae</i> no baço			Inóculo (UFCx10 ⁸)	Média UFCx10 ⁴ ± DP de <i>K. pneumoniae</i> no baço		
		Experimento I				Experimento II		
		Não-tratado	T1 _{50mg} ¹	T2 _{50mg} ²		Não-tratado	T1 _{50mg} ¹	T2 _{50mg} ²
Produtoras de ESBL								
312	1,92	562,43 ± 1352,77	84,96 ± 111,3	253,8 ± 420,53	4,87	593,82 ± 660,48	43,85 ± 100,75 ^a	30,38 ± 80,18 ^a
120	5,62	12,01 ± 26,23	10,82 ± 28,4	20,02 ± 52,53	7,39	4,09 ± 8,56	2,29 ± 5,55	8,54 ± 20,52
Não-Produtoras de ESBL								
455	5,56	3,67 ± 9,49	33,26 ± 84,63	2,04 ± 5,29	8,12	0,15 ± 0,25	1,56 ± 4,05	26,65 ± 70,45
974	5,98	23,43 ± 44,03	0,007 ± 0,012 ^b	0,11 ± 0,29 ^b	1,27	183,0 ± 341,81	235,88 ± 334,89	8,95 ± 23,67 ^c
1024	3,68	1229,4 ± 1903,42	0,92 ± 2,39 ^d	58,39 ± 117,12	6,19	763,66 ± 798,11	67,22 ± 157,19 ^e	10,33 ± 25,84 ^e
1131	2,55	0,16 ± 0,28	4,86 ± 12,85	43,12 ± 113,41	7,77	75,57 ± 141,59	3,21 ± 8,37	2,72 ± 6,67

1 - Subgrupos tratados com 1 dose de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 18 horas após a primeira dose de CRO receberam 0,3ml de água destilada estéril).

2 - Subgrupos tratados com 2 doses de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo e 18 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril).

Teste de Efeitos mistos:

a - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,037), controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,0003) e T1_{50mg} x T2_{50mg} (p = 0,041);

b - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,003) e controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,001);

c - controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,035) e T1_{50mg} x T2_{50mg} (p = 0,053);

d - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,0001);

e - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,024), controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,0003) e T1_{50mg} x T2_{50mg} (p = 0,051).

Tabela 6 - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no fígado dos animais infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Amostras bacterianas	Inóculo (UFCx10 ⁸)	Média UFCx10 ⁵ ± DP de <i>K. pneumoniae</i> no fígado			Inóculo (UFCx10 ⁸)	Média UFCx10 ⁵ ± DP de <i>K. pneumoniae</i> no fígado		
		Experimento I				Experimento II		
		Não-tratado	T1 _{50mg} ¹	T2 _{50mg} ²		Não-tratado	T1 _{50mg} ¹	T2 _{50mg} ²
Produtoras de ESBL								
312	1,92	46,55 ± 46,57	12,51 ± 25,51	9,66 ± 17,63	4,87	62,72 ± 59,93	12,82 ± 16,40	16,3 ± 43,08 ^a
120	5,62	3,41 ± 8,01	2,87 ± 6,68	5,44 ± 13,84	7,39	6,4 ± 11,75	0,05 ± 0,07	1,45 ± 3,46
Não-produtoras de ESBL								
455	5,56	3,52 ± 5,12	3,42 ± 8,39	2,57 ± 6,79	8,12	4,09 ± 10,54	0,48 ± 1,25 ^b	0,11 ± 0,3 ^b
974	5,98	3,24 ± 4,53	0,21 ± 0,55 ^c	0,03 ± 0,09 ^c	1,27	45,72 ± 51,68	17,79 ± 30,63	8,14 ± 21,14 ^d
1024	3,68	45,14 ± 33,08	0,83 ± 2,13 ^e	8,95 ± 14,23 ^e	6,19	62,78 ± 47,93	5,79 ± 11,34 ^f	3,11 ± 8,13 ^f
1131	2,55	7,84 ± 19,60	0,002 ± 0,003 ^g	0,05 ± 0,09	7,77	48,72 ± 92,03	0,68 ± 1,74 ^h	0,01 ± 0,03 ^h

1 - Subgrupos tratados com 1 dose de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 18 horas após a primeira dose de CRO receberam 0,3ml de água destilada estéril).

2 - Subgrupos tratados com 2 doses de ceftriaxona de 50mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo e 18 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril).

Teste de Efeitos mistos:

a - controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,0003);

b - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,039) e controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,021);

c - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,003) e controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,002);

d - controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,025)

e - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,0001) e controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,043);

f - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,007) e controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,0005).

g - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,049);

h - controle não-tratado x T1_{50mg} (p = 0,029) e controle não-tratado x T2_{50mg} (p = 0,006).

Em relação aos animais infectados pela amostra 120, também produtora de ESBL, porém plenamente sensível a ceftriaxona no teste de sensibilidade *in vitro*, não houve resposta ao antibiótico, embora, se observasse certa redução das contagens bacterianas no fígado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos tratados e não-tratados com ceftriaxona, em qualquer dos experimentos (Tabela 5 e 6, Figura 10).

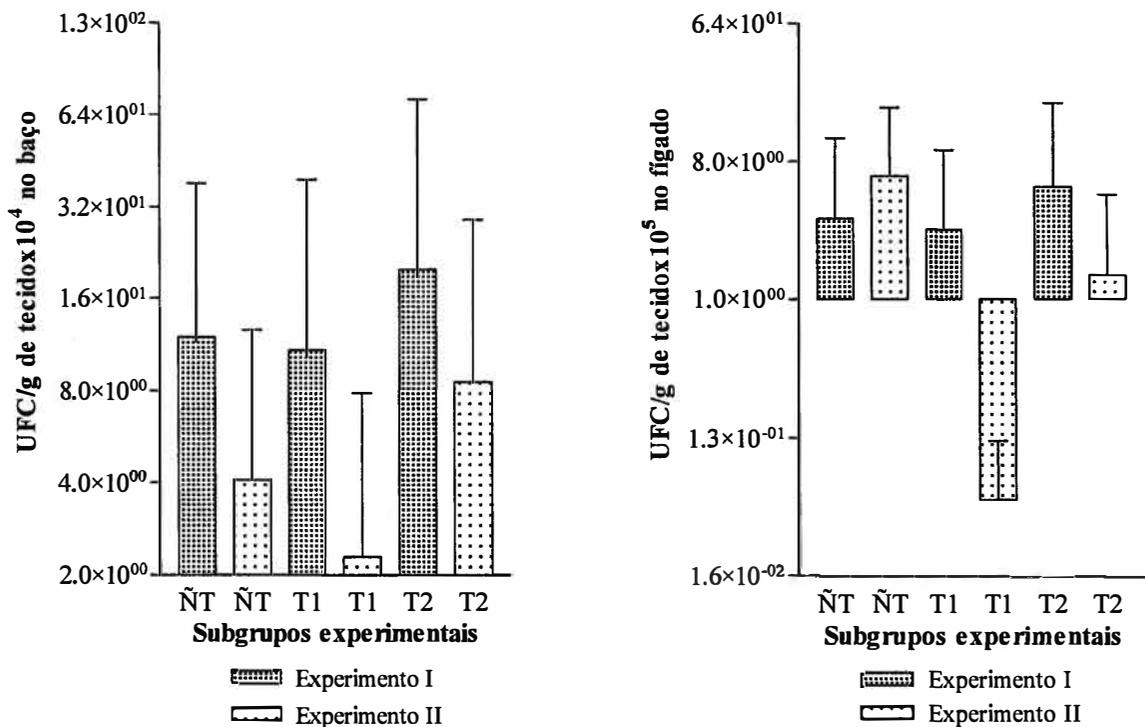


Figura 10. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 120 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos no baço: não-tratado x T1_{50mg}: $p = 0,941$ e $p = 0,439$ (Exp. I e II, respectivamente), não-tratado x T2_{50mg}: $p = 0,599$ e $p = 0,830$ (Exp. I e II, respectivamente) e T1_{50mg} x T2_{50mg}: $p = 0,549$ e $p = 0,549$ (Exp. I e II, respectivamente);

Teste de Efeitos Mistos no fígado: não-tratado x T1_{50mg}: $p = 0,903$ e $p = 0,141$ (Exp. I e II, respectivamente), não-tratado x T2_{50mg}: $p = 0,720$ e $p = 0,331$ (Exp. I e II, respectivamente) e T1_{50mg} x T2_{50mg}: $p = 0,812$ e $p = 0,606$ (Exp. I e II, respectivamente).

Através das estimativas de Kaplan Meier da função de sobrevivência não foi possível apontar nenhuma diferença estatisticamente significativa na sobrevivência dos animais inoculados com esta amostra bacteriana e tratados com as diferentes doses de ceftriaxona ($p = 0,7142$) (Figura 11).

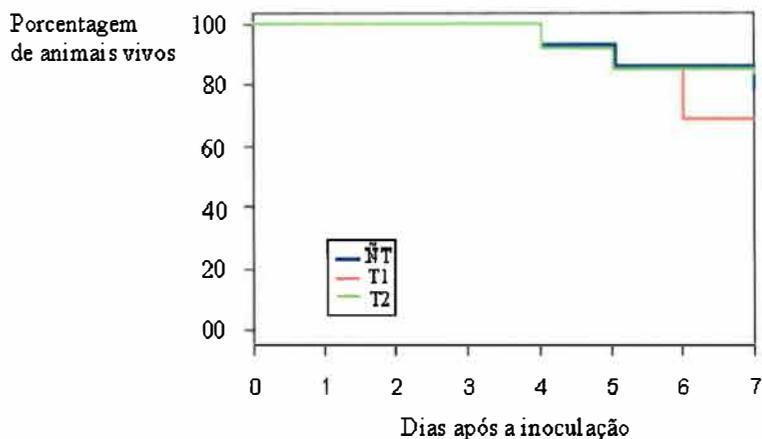


Figura 11. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 120 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7^o dia após a inoculação. Os pontos representam dados conjuntos de dois experimentos. Teste de Wilcoxon ($p = 0,7142$).

A quantificação da infecção no baço dos animais infectados pela amostra bacteriana 455 (não-produtora de ESBL) mostrou que os animais não responderam ao tratamento, apesar da sensibilidade à ceftriaxona, nos dois experimentos realizados com esta amostra bacteriana (Tabela 5 e Figura 12).

Quanto ao fígado, houve redução progressiva nas UFC/g de tecido nos subgrupos tratados em relação aos controles não-tratados, a qual alcançou significância estatística em um dos experimentos (Experimento II), diferenciando T1_{50mg} de não-tratado ($p = 0,039$) e T2_{50mg} de não-tratado ($p = 0,021$) (Tabela 6 e Figura 12).

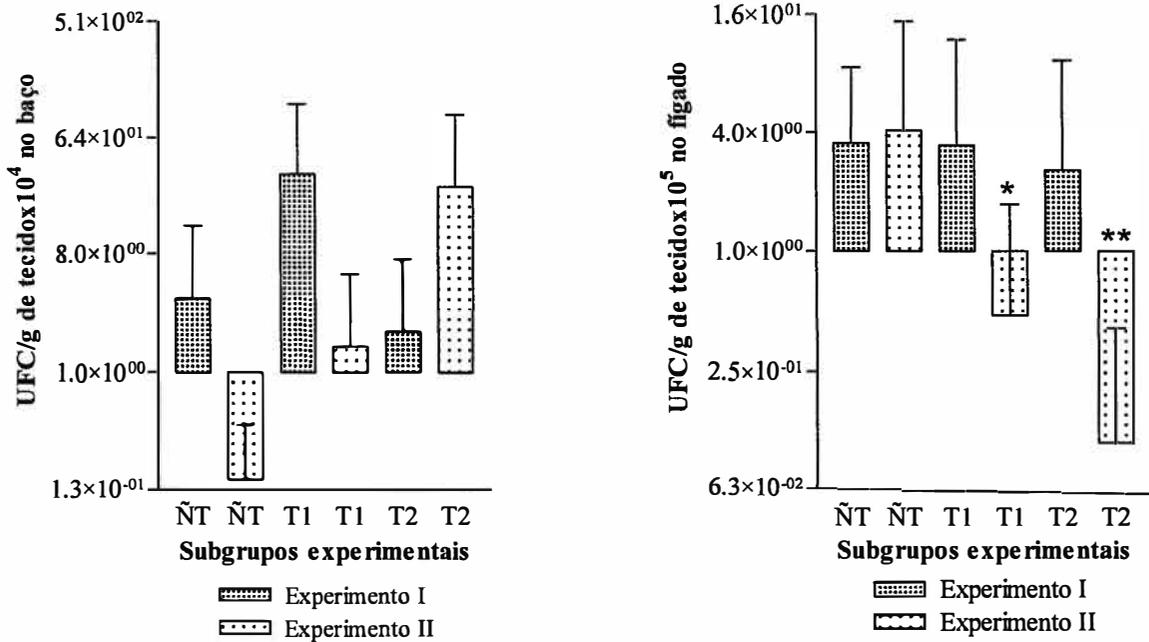


Figura 12. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 455 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos no baço: não-tratado x T1_{50mg}: $p = 0,924$ e $p = 0,220$ (Exp. I e II, respectivamente), não-tratado x T2_{50mg}: $p = 0,833$ e $p = 0,455$ (Exp. I e II, respectivamente) e T1_{50mg} x T2_{50mg}: $p = 0,908$ e $p = 0,618$ (Exp. I e II, respectivamente);

Teste de Efeitos Mistos no fígado: * não-tratado x T1_{50mg}: $p = 0,039$ e ** não-tratado x T2_{50mg}: $p = 0,021$.

Nenhuma diferença estatisticamente significante foi detectada na sobrevida dos animais infectados por esta amostra bacteriana, com relação ao tipo de tratamento recebido, segundo as estimativas de Kaplan Meier para a função de sobrevivência ($p = 0,8296$) (Figura 13).

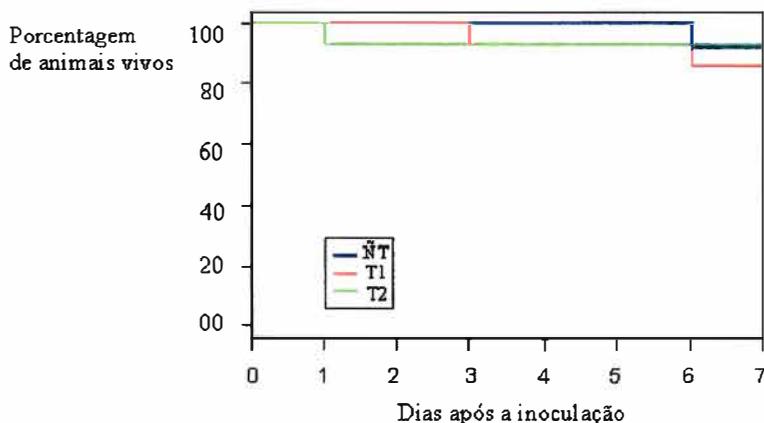


Figura 13. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 455 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7^o dia após a inoculação. Os pontos representam dados conjuntos de dois experimentos. Teste de Wilcoxon ($p = 0,8296$).

Analisando a contagem de colônias no baço dos animais inoculados pela amostra 974, no experimento I a carga bacteriana teve uma redução estatisticamente significante, especialmente, quando comparamos o subgrupo não-tratado com o T1_{50mg} ($p = 0,003$) e o não-tratado com o T2_{50mg} ($p = 0,001$). No experimento II, a carga bacteriana diminuiu significativamente quando comparamos o subgrupo T2_{50mg} com o controle ($p = 0,035$) e, também, com o T1_{50mg} ($p = 0,053$) (Tabela 5 e Figura 14).

Quanto ao fígado, nos dois experimentos a redução da carga bacteriana foi progressiva com o acréscimo das doses de ceftriaxona nos diferentes subgrupos, sugerindo efeito dependente do número de doses. Diferenças estatisticamente significantes puderam ser detectadas no experimento I, entre os subgrupos: não-tratado x T1_{50mg} ($p = 0,003$) e não-tratado x T2_{50mg} ($p = 0,002$) e no experimento II, entre o subgrupo não-tratado x T2_{50mg} ($p = 0,025$) (Tabela 6 e Figura 14).

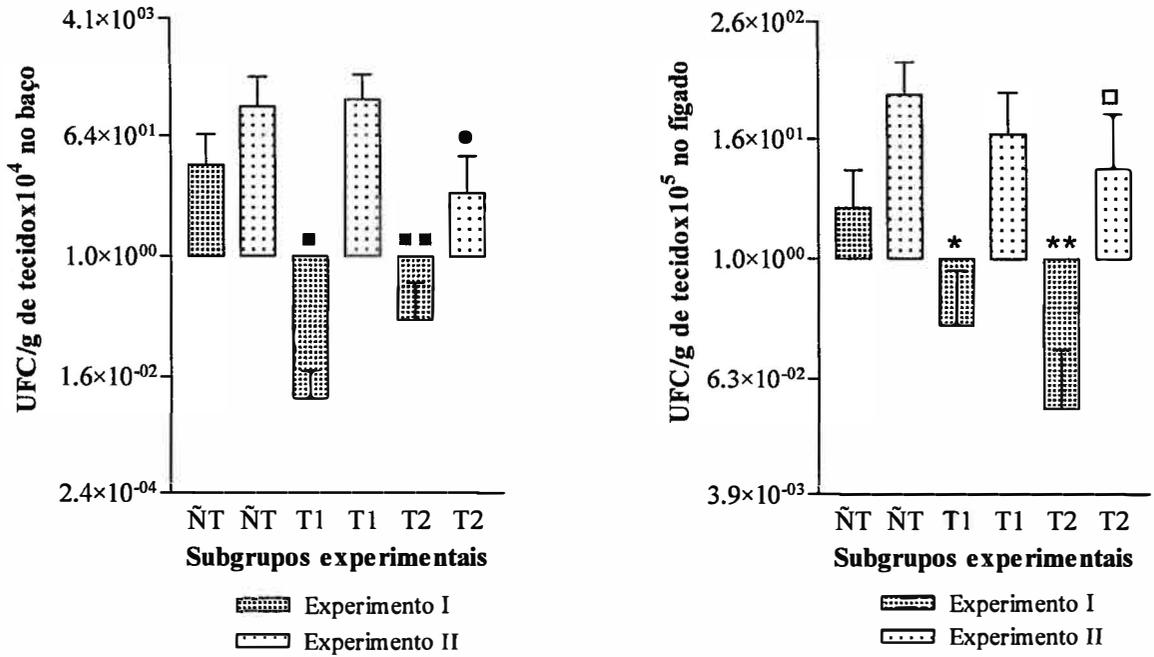


Figura 14. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 974 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos: ■ não-tratado x T1_{50mg}: p = 0,003; ■■ não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,001; ● não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,035; * não-tratado x T1_{50mg}: p = 0,003; ** não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,002, e □ não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,025.

Pode-se notar pela curva de Kaplan Meier mostrada na figura 15, que os animais tratados com duas doses de ceftriaxona (T2_{50mg}) tem a sua sobrevida discretamente maior que os animais não-tratados, sem alcançar significância estatística (p = 0,1443).

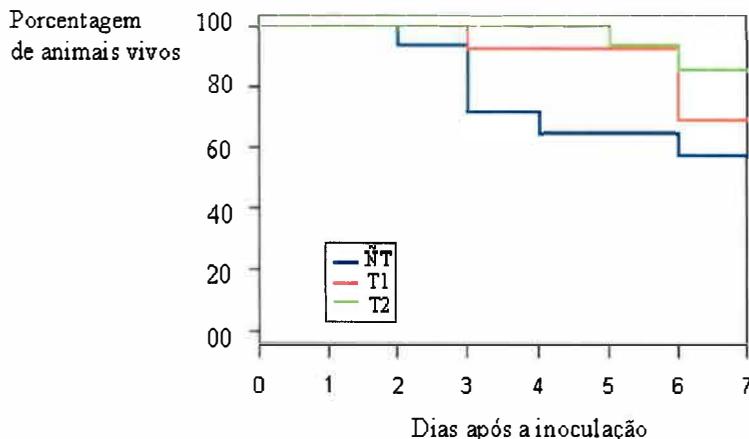


Figura 15. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 974 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. Os pontos representam dados conjuntos de dois experimentos. Teste de Wilcoxon ($p = 0,1443$).

Quanto aos animais inoculados com a amostra 1024, foi possível observar ação antibiótica por meio da redução de UFC/g de tecido no baço dos animais tratados em relação aos animais do subgrupo controle. No experimento I, a diminuição da carga bacteriana foi estatisticamente significativa quando comparamos o subgrupo controle com o subgrupo T1_{50mg} ($p = 0,0001$). No experimento II, a redução das UFC/g de tecido foi progressiva e estatisticamente significativa em todas as possíveis combinações: não-tratado x T1_{50mg} ($p = 0,024$), não-tratado x T2_{50mg} ($p = 0,0003$) e T1_{50mg} x T2_{50mg} ($p = 0,051$) (Tabela 5 e Figura 16).

A análise das contagens de UFC/g de tecido encontradas no fígado destes animais também indica resposta ao tratamento. No experimento I houve uma diminuição estatisticamente significativa da carga bacteriana quando comparamos o subgrupo não-tratado com o T1_{50mg} ($p = 0,0001$) e o não-tratado com o T2_{50mg} ($p = 0,043$). No experimento II, ocorreu uma redução progressiva das UFC/g de tecido sendo significantes as diferenças entre o subgrupo controle não-tratado e o T1_{50mg} ($p = 0,007$) e entre o subgrupo controle e o T2_{50mg} ($p = 0,0005$) (Tabela 6 e Figura 16).

Confrontando a carga bacteriana nos subgrupos T1_{50mg} e T2_{50mg} verificamos uma tendência ao efeito antibiótico dependente do número de doses, no experimento II com amostra 1024, tanto no baço (p = 0,051), como no fígado. No experimento I, este efeito não foi observado, as contagens de T2_{50mg}, embora menores do que as dos subgrupos controles eram superiores às de T1_{50mg}, no baço (p = 0,011) e no fígado (p = 0,048) (Tabela 5 e 6 e Figura 16).

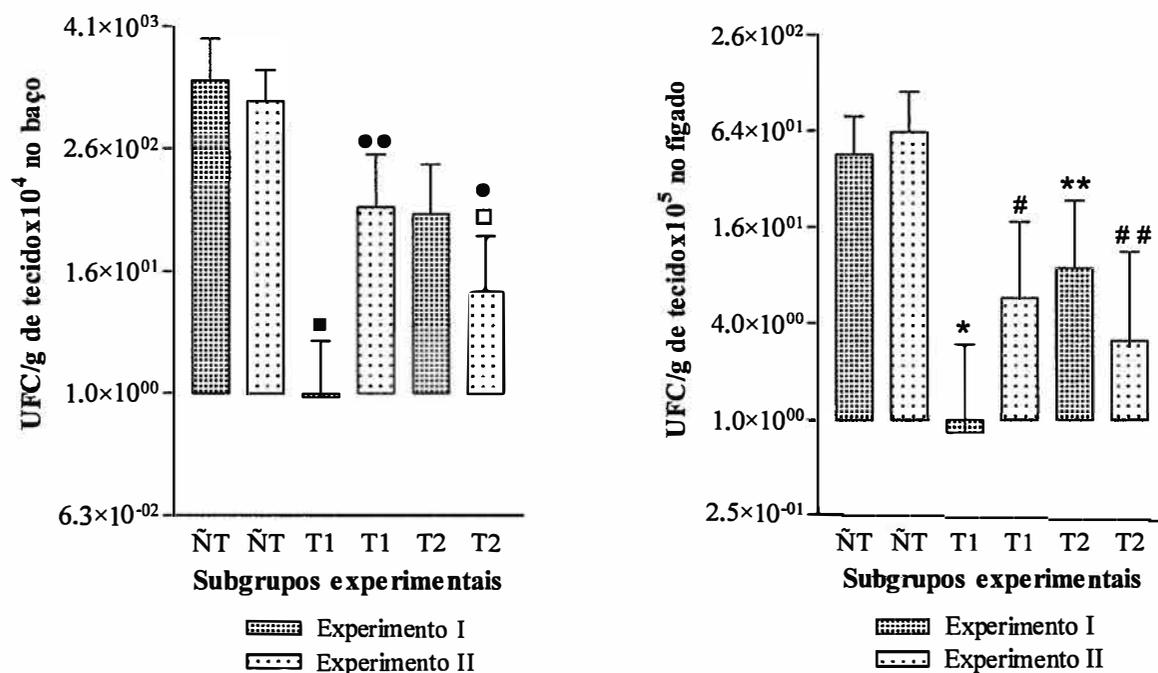


Figura 16. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço (x10⁴) e no fígado (x10⁵) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 1024 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos: ■ não-tratado x T1_{50mg}: p = 0,0001; ●● não-tratado x T1_{50mg}: p = 0,024; ● não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,0003; □ T1_{50mg} x T2_{50mg}: p = 0,051; * não-tratado x T1_{50mg}: p = 0,0001; ** não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,043; # não-tratado x T1_{50mg}: p = 0,007 e ## não-tratado x T2_{50mg}: p = 0,0005.

Na experimentação com a amostra 1024 houve aumento significativo da sobrevivência dos animais tratados em relação aos não-tratados; como demonstra a curva de Kaplan Meier (Figura 17) (p = 0,0037 no teste de Wilcoxon).

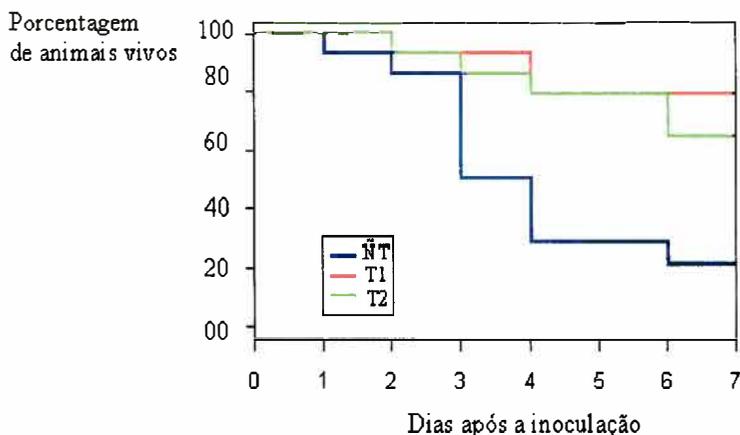


Figura 17. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 1024 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7^o dia após a inoculação. Os pontos representam dados conjuntos de dois experimentos. Teste de Wilcoxon ($p = 0,0037$).

Quando analisamos a eficácia do tratamento a base de ceftriaxona através da contagem UFC/g de tecido no baço dos animais infectados pela amostra 1131, nenhuma resposta à terapêutica empregada pôde ser confirmada estatisticamente. No experimento II houve diminuição da carga bacteriana, porém as diferenças não foram estatisticamente significantes (Tabela 5 e Figura 18).

Com respeito ao fígado, no experimento I houve uma diminuição estatisticamente significativa da carga bacteriana quando comparamos o subgrupo não-tratado com o T1_{50mg} ($p = 0,049$). No experimento II ocorreu uma redução significativa e progressiva das UFC/g do tecido hepático entre o subgrupo controle não-tratado e o T1_{50mg} ($p = 0,029$) e entre o subgrupo controle não-tratado e o T2_{50mg} ($p = 0,006$) (Tabela 6 e Figura 18).

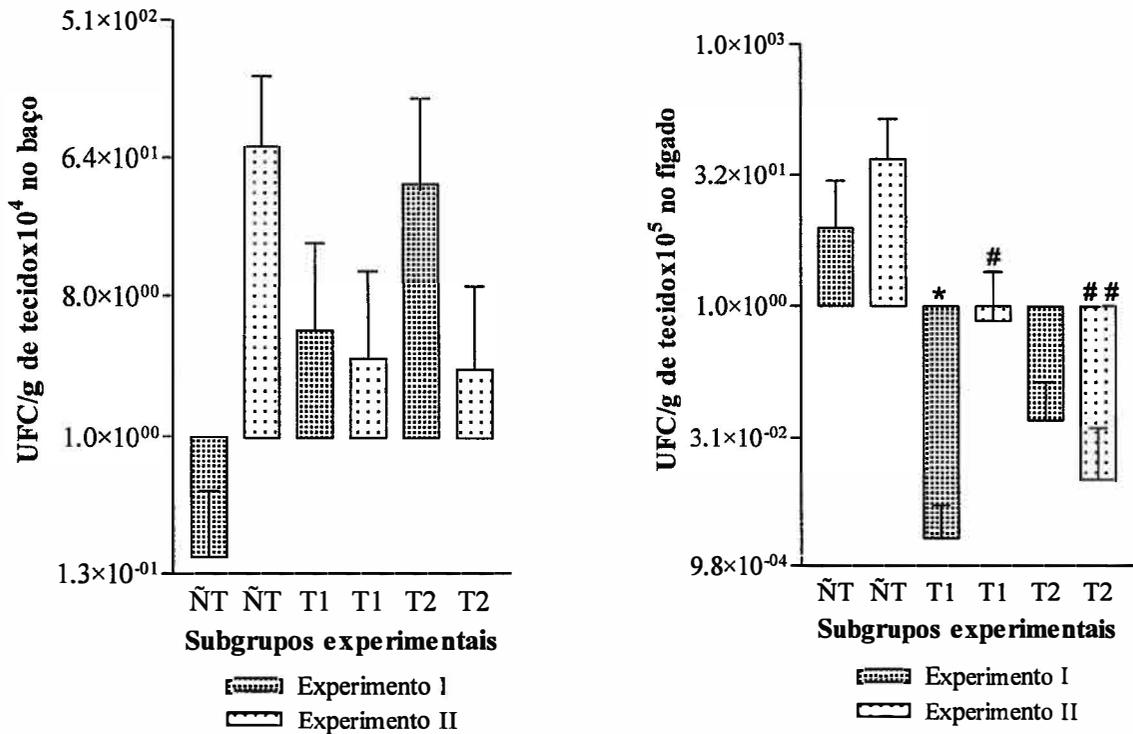


Figura 18. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 ou 2 doses de 50mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido (UFC/g de tecido) no baço ($\times 10^4$) e no fígado ($\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 1131 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos no baço: não-tratado x T1_{50mg}: $p = 0,996$ e $p = 0,173$ (Exp. I e II, respectivamente), não-tratado x T2_{50mg}: $p = 0,227$ e $p = 0,314$ (Exp. I e II, respectivamente) e T1_{50mg} x T2_{50mg}: $p = 0,226$ e $p = 0,705$ (Exp. I e II, respectivamente);

Teste de Efeitos Mistos no fígado: * não-tratado x T1_{50mg}: $p = 0,049$; # não-tratado x T1_{50mg}: $p = 0,029$ e ## não-tratado x T2_{50mg}: $p = 0,006$.

Por meio do método de Kaplan Meier da função de sobrevivência não foi possível apontar nenhuma diferença estatisticamente significativa na sobrevivência dos animais inoculados com esta amostra bacteriana, entre os não-tratados e os tratados com as duas doses de ceftriaxona ($p = 0,8979$) (Figura 19).

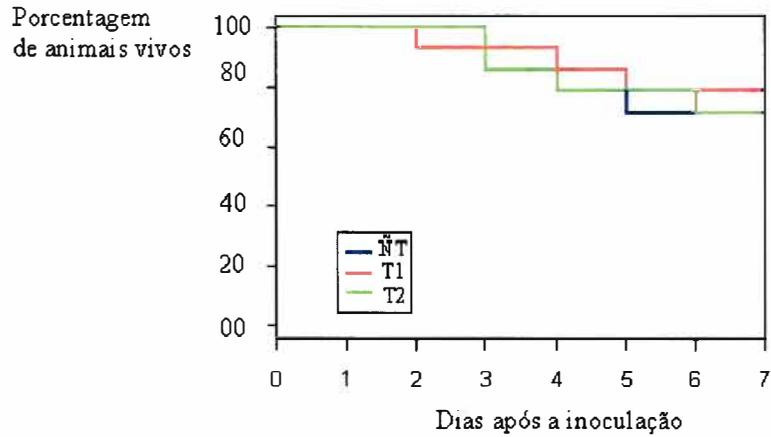


Figura 19. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 1131 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratados (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1) ou duas (T2) doses de 50mg/Kg de peso e observados até o 7^o dia após a inoculação. Os pontos representam dados conjuntos de dois experimentos. Teste de Wilcoxon ($p = 0,8979$).

5.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CEFTRIAXONA, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso

Os resultados obtidos nos experimentos em que utilizávamos 50mg de ceftriaxona/Kg de peso sugeriu-nos que talvez, o aumento na concentração de ceftriaxona e/ou o acréscimo de uma dose para o tratamento da infecção provocada por algumas amostras bacterianas produtoras de ESBL poderia surtir melhores efeitos, diminuindo a carga bacteriana nas vísceras dos animais e aumentando a sobrevida dos mesmos.

A quantidade das UFC/g de tecido no baço dos animais inoculados com a amostra 158 não diminuiu quando comparamos o subgrupo não-tratado com os demais subgrupos tratados ($p = 0,8856$) (Tabela 7 e Figura 20). No fígado, embora tenha havido uma redução da carga bacteriana quando comparamos o subgrupo controle com o subgrupo T3_{100mg}, nenhuma diferença estatisticamente significativa pôde ser constatada entre os subgrupos ($p = 0,9223$) (Tabela 7 e Figura 20).

Tabela 7 - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso. Inóculo e mediana das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido encontradas nas vísceras dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Amostra bacteriana 158	Inóculo 2,1x10 ⁸ UFC	Mediana de UFCx10 ⁴ de <i>K. pneumoniae</i> no baço *			
		Não-tratado	T1 _{100mg} ¹	T2 _{100mg} ²	T3 _{100mg} ³
		7,57	19,95	7,91	10,36
		Mediana de UFCx10 ⁵ de <i>K. pneumoniae</i> no fígado **			
		Não-tratado	T1 _{100mg} ¹	T2 _{100mg} ²	T3 _{100mg} ³
		77,16	81,04	108,53	41,96

1 - Subgrupo tratado com 1dose de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 0,3ml de água destilada estéril 3 horas e 18 horas após a dose de CRO).

2 - Subgrupo tratado com 2 doses de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo e 3 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril; e 0,3ml de água destilada estéril 18 horas após a primeira dose de CRO).

3 - Subgrupo tratado com 3 doses de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, 3 horas e 18 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril).

* Teste de Kruskal – Wallis, para o baço: $p = 0,8856$ e

** Teste de Kruskal – Wallis, para o fígado: $p = 0,9223$.

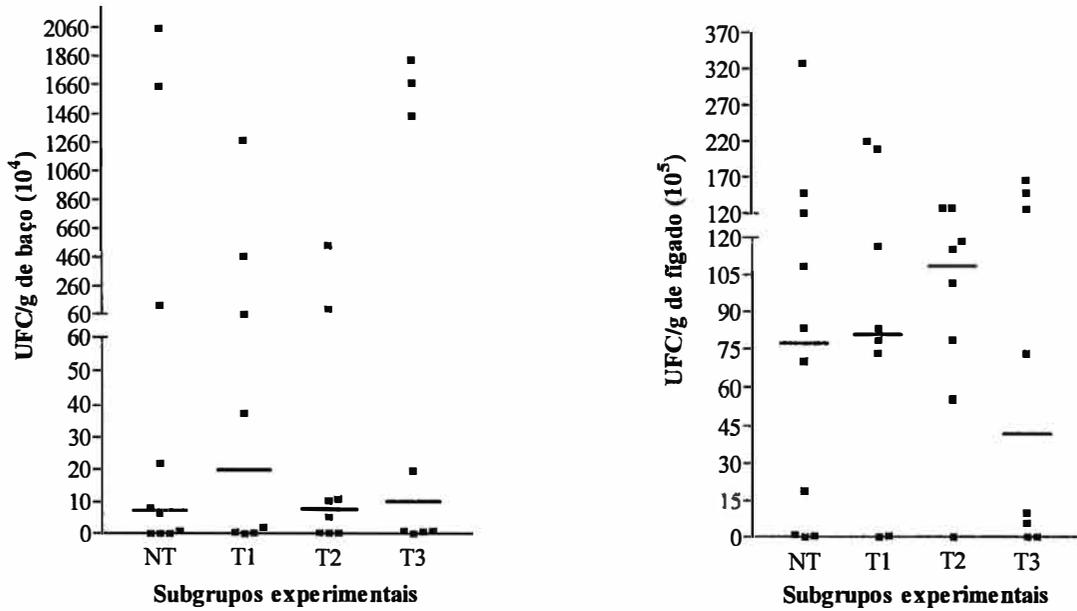


Figura 20. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso. Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço (UFC/g de tecido $\times 10^4$) e no fígado (UFC/g de tecido $\times 10^5$) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação. As barras representam a mediana de cada subgrupo.

Teste de Kruskal-Wallis no baço: $p = 0,8856$;

Teste de Kruskal-Wallis no fígado: $p = 0,9223$.

Segundo as estimativas de Kaplan Meier da função de sobrevivência, novamente nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na sobrevivência dos animais inoculados com a amostra bacteriana em questão e tratados com os diferentes esquemas propostos ($p = 0,8945$) (Figura 21).

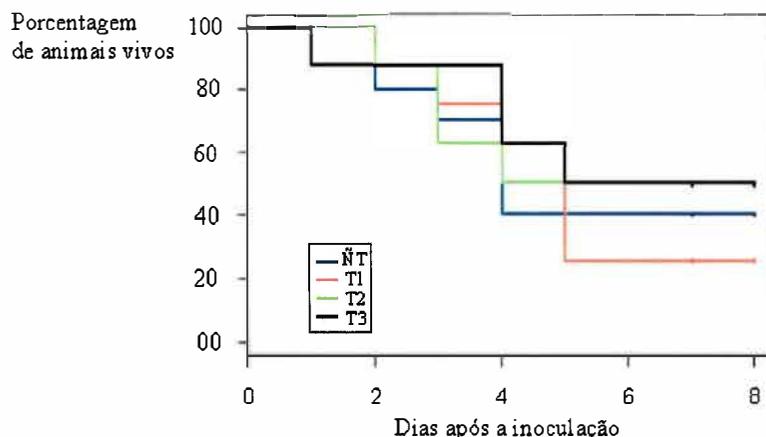


Figura 21. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 158 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso e observados até o 7º dia após a inoculação. Teste de Wilcoxon ($p = 0,8945$).

Para os animais infectados pela amostra 291 foi possível observar que a carga bacteriana diminuiu nos animais tratados com antibiótico, principalmente no baço; quanto ao fígado, esta redução apresentou-se mais discreta. Porém, as diferenças não foram estatisticamente significantes. (Tabelas 8 e 9 e Figura 22).

Tabela 8 - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso. Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço dos animais infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtora de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Amostras bacterianas	Inóculo (UFCx10 ⁸)	Média de UFCx10 ⁴ ± DP de <i>K. pneumoniae</i> no baço				
		Não-tratado	T1 _{100mg} ¹	T2 _{100mg} ²	T3 _{100mg} ³	
Produtoras de ESBL	291	4,7	316,97 ± 792,7	114,96 ± 185,9	67,39 ± 169,8	153,75 ± 306,4
	120	5,5	275,47 ± 477,5	49,62 ± 117,1	113,56 ± 339,2	0,43 ± 0,76 ^a
Não-produtora de ESBL	1131	2,3	24,75 ± 58,0	21,67 ± 45,4	223,4 ± 517,0	0,8 ± 2,1

1 - Subgrupo tratado com 1 dose de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 0,3ml de água destilada estéril 3 horas e 18 horas após a dose de CRO).

2 - Subgrupo tratado com 2 doses de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo e 3 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril; e 0,3ml de água destilada estéril 18 horas após a primeira dose de CRO).

3 - Subgrupo tratado com 3 doses de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, 3 horas e 18 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril).

Teste de Efeitos mistos:

a - controle não-tratado x T3_{100mg} (p = 0,02) e T1_{100mg} x T3_{100mg} (p = 0,04).

Tabela 9 - Avaliação da eficácia de ceftriaxona, 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso. Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no fígado dos animais infectados experimentalmente por amostras de *K. pneumoniae* produtoras e não-produtora de Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Amostras bacterianas	Inóculo (UFCx10 ⁸)	Média de UFCx10 ⁵ ± DP de <i>K. pneumoniae</i> no fígado				
		Não-tratado	T1 _{100mg} ¹	T2 _{100mg} ²	T3 _{100mg} ³	
Produtoras de ESBL	291	4,7	21,58 ± 29,8	19,3 ± 26,0	12,33 ± 30,2	15,94 ± 25,6
	120	5,5	28,63 ± 41,8	16,92 ± 50,3	5,63 ± 16,6 ^a	0,01 ± 0,02 ^a
Não-produtora de ESBL	1131	2,3	20,03 ± 59,0	0,83 ± 1,5	18,56 ± 44,0	0,37 ± 1,0 ^b

1 - Subgrupo tratado com 1 dose de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, em 0,3ml de água destilada estéril e 0,3ml de água destilada estéril 3 horas e 18 horas após a dose de CRO).

2 - Subgrupo tratado com 2 doses de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo e 3 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril; e 0,3 ml de água destilada estéril 18 horas após a primeira dose de CRO).

3 - Subgrupo tratado com 3 doses de ceftriaxona de 100mg/Kg de peso (1 hora após o inóculo, 3 horas e 18 horas após a primeira dose de CRO, em 0,3ml de água destilada estéril).

Teste de Efeitos mistos:

a - controle não-tratado x T2_{100mg} (p = 0,05), controle não-tratado x T3_{100mg} (p = 0,001) e T1_{100mg} x T3_{100mg} (p = 0,02);

b - controle não-tratado x T3_{100mg} (p = 0,04).

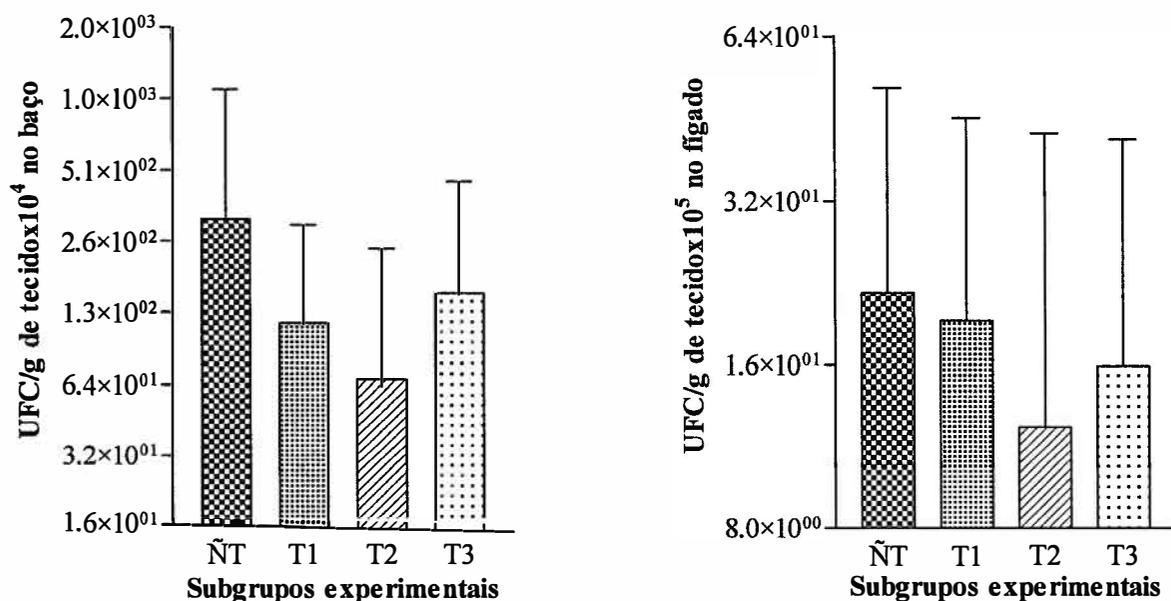


Figura 22. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço (UFC/g de tecidox10⁴) e no fígado (UFC/g de tecidox10⁵) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 291 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos no baço: não-tratado x T1_{100mg}: p = 0,40, não-tratado x T2_{100mg}: p = 0,15, não-tratado x T3_{100mg}: p = 0,45, T1_{100mg} x T2_{100mg}: p = 0,53; T1_{100mg} x T3_{100mg}: p = 0,93 e T2_{100mg} x T3_{100mg}: p = 0,48;

Teste de Efeitos Mistos no fígado: não-tratado x T1_{100mg}: p = 0,74, não-tratado x T2_{100mg}: p = 0,47, não-tratado x T3_{100mg}: p = 0,44, T1_{100mg} x T2_{100mg}: p = 0,70; T1_{100mg} x T3_{100mg}: p = 0,66 e T2_{100mg} x T3_{100mg}: p = 0,96.

As estimativas de Kaplan Meier da função de sobrevivência, para os animais infectados por esta amostra, também não apontaram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos tratados (p = 0,7092) (Figura 23).

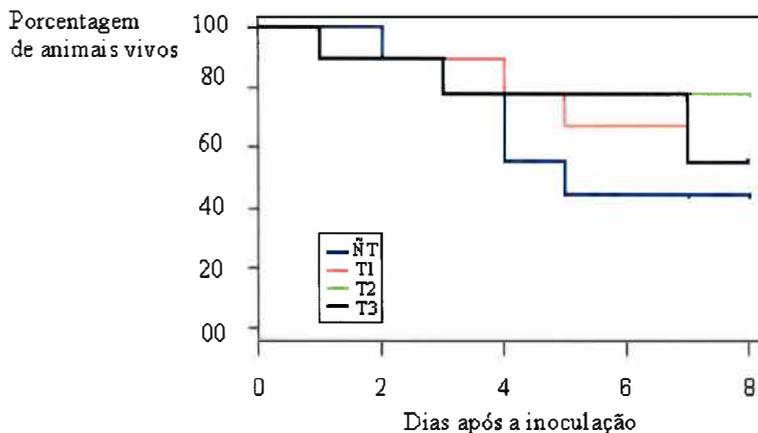


Figura 23. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 291 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso e observados até o 7^a dia após a inoculação. Teste de Wilcoxon ($p = 0,7092$).

Os animais inoculados com a amostra bacteriana 120 apresentaram redução na contagem de UFC/g de tecido no baço estatisticamente significativa quando comparamos o subgrupo T3_{100mg} com o controle não-tratado ($p = 0,02$) e com o subgrupo T1_{100mg} ($p = 0,04$) (Tabela 8 e Figura 24).

No fígado, a redução progressiva da carga bacteriana pôde ser observada a medida em que aumentávamos a quantidade de doses de ceftriaxona nos animais inoculados com esta mesma amostra, demonstrando efeito dose-dependente da ceftriaxona, as diferenças estatisticamente significantes estão entre o subgrupo não-tratado e o T3_{100mg} ($p = 0,001$), entre o não-tratado e o T2_{100mg} ($p = 0,05$) e entre o T1_{100mg} e o T3_{100mg} ($p = 0,02$) (Tabela 9 e Figura 24).

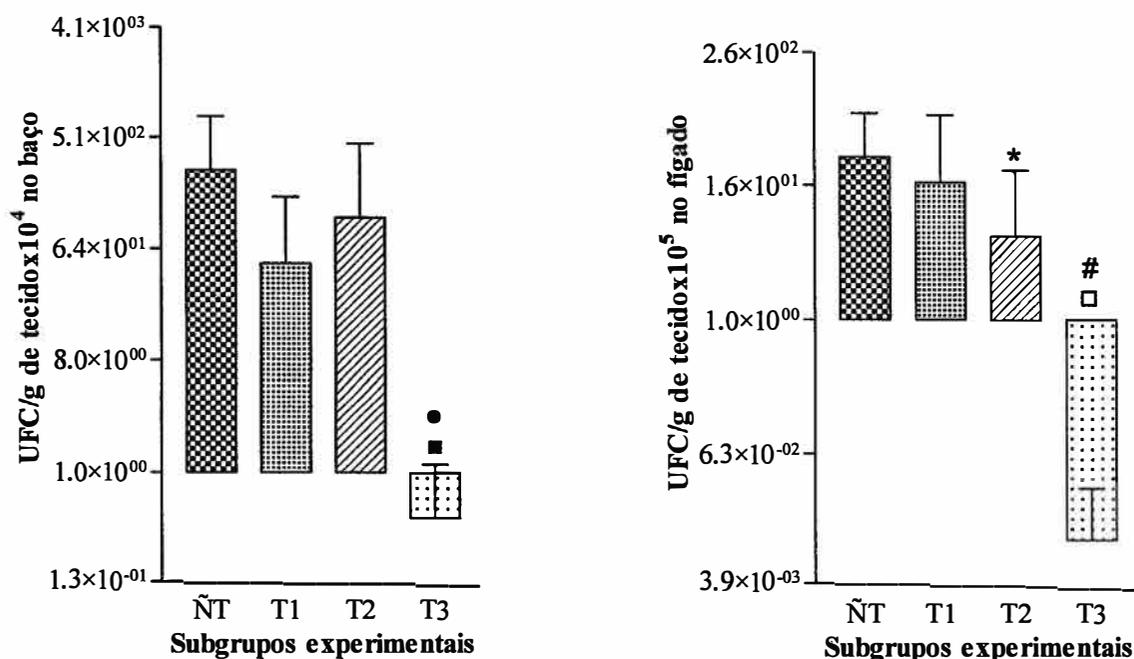


Figura 24. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço (UFC/g de tecido x 10⁴) e no fígado (UFC/g de tecido x 10⁵) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 120 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos: ● não-tratado x T3_{100mg}: p = 0,02; ■ T1_{100mg} x T3_{100mg}: p = 0,04; * não-tratado x T2_{100mg}: p = 0,05; # não-tratado x T3_{100mg}: p = 0,001 e □ T1_{100mg} x T3_{100mg}: p = 0,02.

Apesar da tendência à maior sobrevida dos animais tratados com três doses de ceftriaxona, não se constatou diferença entre animais tratados ou não-tratados com relação a este parâmetro (p = 0,6544) (Figura 25).

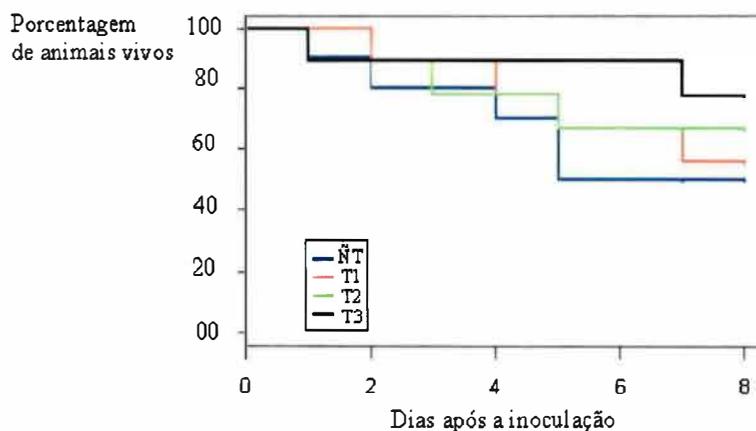


Figura 25. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 120 de *K. pneumoniae* (produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso e observados até o 7^o dia após a inoculação. Teste de Wilcoxon ($p = 0,6544$).

Uma amostra não-produtora de ESBL, a 1131 também foi testada neste mesmo delineamento experimental. No baço, embora houvesse redução da contagem média de $T3_{100mg}$, não se encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 8 e Figura 26). Quanto ao fígado, verificamos redução significativa na carga bacteriana entre os subgrupos controle (não-tratado) e o $T3_{100mg}$ ($p = 0,04$) (Tabela 9 e Figura 26).

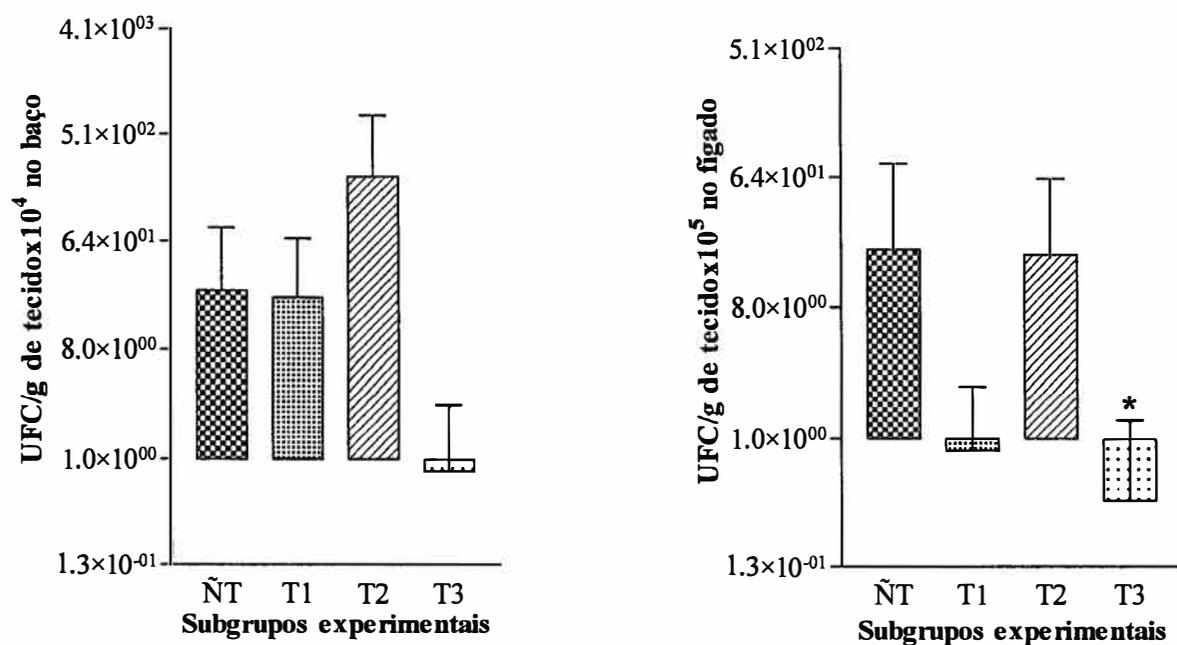


Figura 26. Avaliação da eficácia de ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso. Média e desvio padrão das Unidades Formadoras de Colônias por grama de tecido no baço (UFC/g de tecido 10^4) e no fígado (UFC/g de tecido 10^5) dos animais infectados experimentalmente pela amostra 1131 de *K. pneumoniae*. Animais mortos pela infecção ou sacrificados após 7 dias da inoculação.

Teste de Efeitos Mistos no baço: não-tratado x T1_{100mg}: p = 0,49, não-tratado x T2_{100mg}: p = 0,94, não-tratado x T3_{100mg}: p = 0,27, T1_{100mg} x T2_{100mg}: p = 0,57; T1_{100mg} x T3_{100mg}: p = 0,19 e T2_{100mg} x T3_{100mg}: p = 0,26;
 Teste de Efeitos Mistos no fígado: * não-tratado x T3_{100mg}: p = 0,04.

Não foi constatada diferença estatisticamente significativa na sobrevivência dos animais inoculados com esta amostra bacteriana, não-tratados ou tratados com uma a três doses de ceftriaxona, segundo as estimativas de Kaplan Meier (p = 0,2945) (Figura 27).

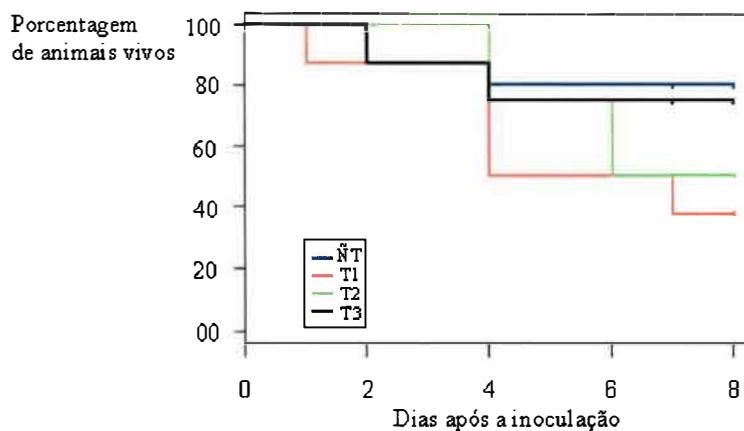


Figura 27. Sobrevida dos camundongos infectados experimentalmente pela amostra 1131 de *K. pneumoniae* (não-produtora de ESBL). Subgrupos não-tratado (NT) e tratados com ceftriaxona, uma (T1), duas (T2) ou três (T3) doses de 100mg/Kg de peso e observados até o 7^o dia após a inoculação. Teste de Wilcoxon ($p = 0,2945$).

6 DISCUSSÃO

A literatura científica a respeito de infecções humanas causadas por membros da família *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL é inconclusa sobre se um microrganismo para o qual um teste de susceptibilidade *in vitro* demonstre resistência a uma determinada cefalosporina pode de fato ser resistente clinicamente. Ou seja, a resistência *in vitro*, na grande maioria dos casos, prediz o resultado clínico de fracasso terapêutico, entretanto, susceptibilidade *in vitro* nem sempre assegura sucesso terapêutico. Fatores como a concentração do antibiótico encontrada no local da infecção e a competência imune do hospedeiro contribuem para o resultado clínico muitas vezes, independente da interpretação do teste de susceptibilidade *in vitro*.

Neste sentido, os modelos de infecção experimental, especialmente quando graves, são excelentes métodos para o estudo da eficácia dos agentes antimicrobianos. Nestes estudos podemos controlar variáveis como peso, “status” imune, inóculo e condições laboratoriais de temperatura, luz, água e comida a que os animais são submetidos.

O modelo de infecção sistêmica adotado neste trabalho foi resultado de diversos experimentos preliminares nos quais foram definidos a utilização e dosagem de um corticosteróide previamente à inoculação bacteriana, a concentração do inóculo, o tempo (em dias) de observação dos animais e as vísceras que seriam retiradas para a quantificação da infecção para a avaliação da eficácia do tratamento com ceftriaxona.

O corticosteróide, Diprospan[®], da Schering-Plough, foi utilizado a fim de imunodeprimir os animais. Este é composto por ésteres de betametasona, o dipropionato de betametasona, que dá atividade prolongada ao produto e o fosfato dissódico de betametasona, o qual possui atividade imediata, sendo rapidamente absorvido após a injeção. Em experimentos preliminares, sem a utilização de corticosteróide ou com o uso de concentrações menores (5, 10 ou 15mg/Kg de peso), não foi possível induzir e manter o processo infeccioso nos animais. Outros pesquisadores também utilizaram imunodepressores previamente ao

inóculo bacteriano em seus experimentos com camundongos (GERBER et al., 1983; LEGGETT et al., 1989).

Assim como aconteceu com a dose de betametasona, várias concentrações de inoculo bacteriano foram testadas (10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/0,1ml) a fim de obtermos a melhor concentração a ser inoculada nos animais. Segundo a bibliografia consultada, a concentração do inóculo variou de 10^5 a 10^9 UFC/ml, de acordo com o animal e o modelo de infecção empregado nos estudos (CHANDRASEKAR; SLUCHAK; KRUSE, 1993; MENTEC et al., 1992; RICE et al., 1991). Além disso, o pulmão, o baço, o fígado e os rins foram retirados dos camundongos nos experimentos prévios para definirmos quais vísceras representariam melhor comportamento da infecção.

Ao final destes experimentos preliminares foi possível definir o modelo experimental, por meio da utilização prévia do corticosteróide na concentração de 20mg/Kg de peso e inóculo de 10^8 UFC/0,1ml. O tempo de observação dos animais foi padronizado em 7 dias após a inoculação, onde cerca de 50% dos animais, inoculados com cada amostra bacteriana e não-tratados, morriam aproximadamente até o 4º dia após a inoculação. As vísceras que exibiram carga bacteriana mais acentuada foram o baço e o fígado.

Chandrasekar, Sluchak e Kruse (1993), utilizaram um modelo experimental semelhante. Após a indução da imunodepressão (por meio da utilização de ciclofosfamida), os camundongos eram infectados por via intraperitoneal com uma suspensão de 4×10^8 UFC/ml de *E. coli* produtora de ESBL e resistente *in vitro* a cefoperazona. A avaliação da eficácia do tratamento foi realizada a partir da cultura quantitativa de baço e fígado além, da análise de sobrevivência, porém os animais foram observados apenas 3 dias após a inoculação.

Selecionamos para este estudo 4 amostras de *K. pneumoniae* não-produtoras de ESBL e sensíveis *in vitro* a ceftriaxona (455, 974, 1024 e 1131), que serviram de controle, já que era esperada a atividade da ceftriaxona nos animais infectados por elas, e 4 amostras produtoras

de ESBL, sendo 2 resistentes *in vitro* a ceftriaxona (158 e 312) e, nestes casos, não esperávamos sucesso terapêutico e 2 amostras, uma com sensibilidade intermediária (291) e outra com sensibilidade plena (120) à ceftriaxona, as quais foram utilizadas a fim de responder a questão da utilização de cefalosporinas de amplo espectro no tratamento de infecções provocadas por amostras com estas características de susceptibilidade, apesar da produção de ESBL.

Os resultados obtidos no experimento de padronização do modelo (embora não tenha sido propósito da investigação avaliar virulência e patogenicidade) demonstraram que estatisticamente não houve diferença na contagem de Unidades Formadoras de Colônias (no baço e no fígado) e na sobrevivência dos animais inoculados com qualquer uma das oito (8) amostras de *K. pneumoniae* utilizadas no presente estudo, por meio deste modelo experimental.

Mentec et al., (1992) utilizou 2 amostras de *K. pneumoniae*, sendo uma produtora de ESBL e resistente *in vitro* a piperacilina e a outra, não-produtora de ESBL e sensível a piperacilina, em um modelo de endocardite aórtica que foi conduzido em coelhos. Estes autores não encontraram diferença estatisticamente significativa na contagem bacteriana das vegetações dos animais infectados por qualquer uma das 2 amostras bacterianas.

No presente estudo, quando analisamos a infecção provocada pelas amostras não-produtoras de ESBL e plenamente sensíveis a ceftriaxona, os resultados apontam eficácia do tratamento, ao menos em parte dos parâmetros avaliados. Assim, os animais infectados pela amostra 455 de *K. pneumoniae* não responderam ao tratamento quando analisamos a infecção localizada no baço; no entanto, no experimento II houve redução progressiva nas UFC/g de tecido no fígado dos animais alcançando significância. Porém, o tratamento não aumentou a sobrevivência destes animais.

A redução da contagem bacteriana tanto no baço quanto no fígado dos animais inoculados com a amostra 974 de *K. pneumoniae* pôde ser estatisticamente constatada nos dois experimentos realizados com esta amostra. Apesar não ter havido diferença estatisticamente significativa, foi possível observar um aumento na sobrevida dos animais tratados com 2 doses de 50mg de ceftriaxona/Kg de peso.

A análise das contagens de UFC/g de tecido encontradas no baço e no fígado dos camundongos infectados pela amostra 1024 de *K. pneumoniae* indica, igualmente, resposta ao tratamento com 50mg de ceftriaxona/Kg de peso, nos dois experimentos realizados, inclusive com aumento significativo na sobrevida dos mesmos.

Quanto aos animais inoculados pela amostra 1131 de *K. pneumoniae* e tratados com 1 ou 2 doses de 50mg de ceftriaxona/Kg de peso, somente em um dos experimentos foi possível observar uma redução, mesmo que não significativa, na contagem de UFC/g de tecido no baço. No fígado, as reduções na carga bacteriana foram mais expressivas e, portanto significantes em ambos experimentos. Entretanto, o tratamento não prolongou a sobrevida dos animais.

Esta divergência de resultados motivou-nos a realizar, para esta mesma amostra, um experimento com 1, 2 ou 3 doses de 100mg de ceftriaxona/Kg de peso, e os resultados obtidos com este tratamento não foram muito diferentes daqueles encontrados com a dose de 50mg de ceftriaxona/Kg de peso. No baço, o tratamento promoveu redução da carga bacteriana ao compararmos o subgrupo não-tratado com o T3_{100mg}, porém sem significância estatística. No fígado houve redução, mesmo que não significativa, da carga bacteriana quando comparamos o subgrupo controle com o T1_{100mg} e diminuição das UFC/g de tecido, estatisticamente comprovada, em relação aos subgrupos controle e T3_{100mg}. Outra vez, a sobrevida dos animais não foi prolongada, nos subgrupos tratados em relação ao não-tratado.

No caso dos animais infectados por esta amostra de *K. pneumoniae*, caracterizada fenotipicamente como não-produtora de ESBL e plenamente sensível a ceftriaxona nos testes de susceptibilidade *in vitro* para esta droga, esta dose de 100mg/Kg de peso apresentou-se um pouco mais efetiva, em relação à diminuição da carga bacteriana, que o tratamento com 50mg/Kg de peso.

Pelos resultados obtidos com o tratamento dos animais infectados por estas amostras de *K. pneumoniae* não-produtoras de ESBL e sensíveis *in vitro* a ceftriaxona, apesar de ter havido algumas divergências, quando confrontamos resultados de experimentos diferentes com uma determinada amostra de *K. pneumoniae*, de um modo geral, foi possível constatar a eficácia do tratamento com 50mg de ceftriaxona/Kg de peso. Esta dosagem é similar à utilizada em infecções humanas, mas provavelmente foi insuficiente, assim como o reduzido número de doses aplicadas, para conter mais eficientemente a infecção disseminada produzida nos animais imunodeprimidos.

Nossos resultados assemelham-se aos encontrados em outros estudos que utilizaram *K. pneumoniae* ou *E. coli* e o mesmo antibiótico para o tratamento de infecções *in vivo*. Assim, no estudo de Caron et al., (1990), a monoterapia com ceftriaxona (30mg/Kg de peso, uma vez ao dia) foi eficaz em um modelo de endocardite experimental conduzido em coelhos, provocada por uma amostra de *K. pneumoniae* caracterizada como susceptível a esta droga no teste de susceptibilidade *in vitro*, reduzindo significativamente a carga bacteriana nos grupos tratados em relação ao controle. Da mesma forma, a monoterapia com ceftriaxona (45, 35, 25 e 15mg/Kg de peso) foi capaz de reduzir a contagem de UFC, em coelhos infectados por *K. pneumoniae* sensível a este agente antimicrobiano, em níveis abaixo do limite de detecção definido pelos pesquisadores em relação ao grupo controle (GEORGOPOULOS; BUXBAUM; GRANINGER, 1999).

Em outro modelo de endocardite experimental em coelhos provocado por uma amostra de *E. coli* sensível a ceftriaxona *in vitro*, Pangon et al., 1987 mostraram que dentre as 3 cefalosporinas avaliadas (cefotiam, cefmenoxima e ceftriaxona), ceftriaxona (30mg/Kg de peso, uma vez ao dia) exibiu o maior efeito bactericida.

Quanto à infecção provocada pelas amostras produtoras de ESBL, pelos resultados obtidos quando enfocamos a infecção localizada no baço e no fígado dos animais tratados com ceftriaxona 50mg/Kg de peso, podemos dizer que os animais infectados pela amostra 158 de *K. pneumoniae* não responderam ao tratamento e em alguns casos, a carga bacteriana até aumentou nos subgrupos que receberam o antibiótico. Não houve também, aumento na sobrevida dos animais tratados. Isto era esperado, visto que esta amostra, produtora de ESBL, era resistente *in vitro* ao antibiótico.

Esta amostra de *K. pneumoniae* também foi utilizada no experimento com 1, 2 ou 3 doses de 100mg de ceftriaxona/Kg de peso. Novamente, a carga bacteriana não diminuiu no baço e no fígado dos animais infectados, não havendo também aumento da sobrevida dos mesmos.

Fracasso terapêutico também foi evidenciado em um modelo de endocardite experimental conduzido em coelhos, no qual a amostra de *K. pneumoniae* inoculada era produtora de ESBL e resistente *in vitro* a ceftriaxona (CARON et al., 1990).

Georgopoulos; Buxbaum e Graninger, (1999) empregaram ceftriaxona em monoterapia ou associada ao tazobactam no tratamento de coelhos infectados por *K. pneumoniae* resistente a ceftriaxona *in vitro*, também observaram que somente a ceftriaxona, neste caso, não reduzia a carga bacteriana. Entretanto, quando o tazobactam era adicionado à ceftriaxona e estes aplicados imediatamente após a inoculação, a contagem de colônias diminuía em relação aos animais do grupo controle.

A literatura científica também traz exemplo de falha terapêutica em pacientes quando quadros infecciosos graves são tratados com antibiótico para os quais o isolado apresenta-se resistente no teste de susceptibilidade *in vitro*. Naumovski et al., (1992) descreveram o resultado clínico de 4 pacientes com bacteremia, Dois deles tratados com ceftazidima, morreram após desenvolverem um quadro de choque séptico devido a *K. pneumoniae* resistente a ceftazidima; os outros dois sobreviveram após a adição de tobramicina ao tratamento.

No presente trabalho, incomum e surpreendente foi o resultado obtido com os animais infectados pela amostra 312 de *K. pneumoniae*, que responderam ao tratamento (apesar da produção de ESBL e da resistência *in vitro* a ceftriaxona) com redução significativa da carga bacteriana nas vísceras e aumento estatisticamente comprovado da sobrevivência dos animais tratados com 50mg de ceftriaxona/Kg de peso em relação aos animais dos subgrupos controle. Talvez, a utilização de mais doses, ou seja, o prolongamento do tratamento por mais dias poderia efetivamente debelar o processo infeccioso e levar à cura da infecção, como recomenda o estudo de Pangon et al., (1987), no qual os resultados obtidos confirmam que o nível local de antibiótico está amplamente correlacionado ao efeito bactericida das drogas *in vivo*.

No que diz respeito à literatura consultada, o sucesso do tratamento com uma cefalosporina de amplo espectro (em monoterapia) em infecções sistêmicas (humanas ou experimentais) causadas por enterobactérias produtoras de ESBL e resistentes *in vitro* à droga utilizada *in vivo*, foi excepcional. O que se tem relatado é a cura de infecções urinárias, provavelmente devido à alta concentração que algumas destas drogas atingem na urina. Emery e Weymouth (1997), apresentaram o caso de um paciente com urocultura positiva para *K. pneumoniae* produtora de ESBL e resistente *in vitro* à ceftazidima, que recuperou-se completamente, quando tratado com esta droga.

Quanto aos animais infectados pelas amostras 120 e 291 de *K. pneumoniae* (sensível e intermediária *in vitro* a ceftriaxona, respectivamente), o tratamento com as doses de 50mg de ceftriaxona/Kg de peso não foi efetivo e os animais não tiveram a infecção controlada pela ceftriaxona nesta dosagem. Isto pôde ser confirmado tanto pelos resultados obtidos com as contagens de colônias nas vísceras dos animais, como pela sobrevida dos mesmos, que não aumentou nos animais dos subgrupos tratados.

Rice et al., (1991), conduziram um estudo para comparar a eficácia *in vivo* de alguns antibióticos β -lactâmicos no tratamento de abscessos intra-abdominais provocados por amostra de *K. pneumoniae* produtora de ESBL altamente resistente à ceftazidima, porém plenamente sensível à cefotaxima. Os animais tratados com 400mg de cefotaxima/Kg de peso/dia não tiveram redução da carga bacteriana em relação ao grupo controle, mesmo a amostra sendo sensível *in vitro* ao antibiótico.

Os resultados obtidos com as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e sensibilidade intermediária ou plena a ceftriaxona (291 e 120, respectivamente) mostraram falta de ação da droga nos experimentos em que utilizávamos 50mg de ceftriaxona/Kg de peso e isto nos levou a avaliar se o aumento na concentração de ceftriaxona e o acréscimo de uma dose para o tratamento da infecção provocada por estas amostras bacterianas poderia surtir efeitos mais concretos, diminuindo a carga bacteriana nas vísceras dos animais e aumentando a sobrevida dos mesmos. Neste sentido realizamos um experimento com 1, 2 ou 3 doses de ceftriaxona, 100mg/Kg de peso/dose.

Os animais inoculados pela amostra 291 de *K. pneumoniae* responderam a este tratamento com redução da contagem de colônias tanto no baço quanto no fígado dos animais dos subgrupos tratados em relação ao controle, mas, sem alcançar significância estatística. Quanto à sobrevida, embora a diferença não possa ter sido comprovada estatisticamente, o

aumento da concentração e o acréscimo de uma dose de ceftriaxona aumentaram a sobrevivência dos animais, especialmente, daqueles do subgrupo tratado com 3 doses de 100mg/Kg de peso.

O tratamento alcançou êxito com 100mg de ceftriaxona/Kg de peso, nos animais infectados pela amostra 120 de *K. pneumoniae*. No baço e no fígado as diferenças nas contagens de UFC/g de tecido puderam ser detectadas estatisticamente. E, assim como aconteceu com a sobrevivência dos animais inoculados pela amostra 291, os camundongos infectados pela amostra 120 e tratados com 3 doses de ceftriaxona tiveram sua sobrevivência aumentada em relação aos outros subgrupos, principalmente ao controle; porém isso não pôde ser detectado estatisticamente.

A dificuldade em demonstrar estatisticamente que a sobrevivência dos animais aumentou com a utilização da ceftriaxona (tanto nos animais infectados pelas amostras não-produtoras de ESBL e sensíveis a esta droga, como nestes, inoculados por amostras de sensibilidade plena ou intermediária e produtoras da enzima) ocorreu provavelmente porque os testes que analisam tempo de sobrevivência recomendam amostra em torno de 25 indivíduos ou animais, ou seja, muito maior do que a que foi utilizada no presente estudo (COLLETT, 1994). Talvez por isso, este parâmetro não foi muito eficiente para a demonstração da ação da ceftriaxona. Mesmo assim, é possível notar o aumento da sobrevivência dos animais tratados pela tendência das curvas apresentadas.

Alguns pesquisadores também analisaram a resposta clínica de pacientes infectados por amostras de enterobactérias produtoras de ESBL que apresentavam uma aparente susceptibilidade às cefalosporinas nos testes de susceptibilidade *in vitro*.

O caso de um paciente com meningite provocada por *K. pneumoniae* resistente *in vitro* à ceftazidima, mas susceptível a ceftriaxona foi apresentado por Quinn et al., (1989). Neste grave quadro infeccioso, a cura e a completa recuperação do paciente deu-se após o tratamento com a droga para a qual o agente infeccioso isolado apresentava sensibilidade.

Outro caso de meningite e bacteremia provocada por *K. pneumoniae* produtora de ESBL e sensível *in vitro* a cefotaxima, foi curado com a utilização de cefotaxima (SMITH et al., 1990).

Emery e Weymouth (1997), realizaram um estudo confrontando os resultados clínicos do tratamento, com a produção de ESBL e o teste de susceptibilidade *in vitro*. Vinte e dois pacientes apresentavam infecção por enterobactérias produtoras de ESBL; dentre os 9 pacientes tratados com cefalosporinas de amplo espectro, 7 foram curados. Um destes apresentava abscesso abdominal, provocado por *K. pneumoniae* de sensibilidade intermediária à ceftriaxona, que foi drenado e tratado com ceftriaxona e sulfametoxazol.

Rice et al., (1990) descreveram um surto que incluiu 14 pacientes infectados por enterobactérias produtoras de ESBL, resistentes *in vitro* a ceftazidima e sensíveis a outras drogas. Destes, 4 foram tratados com cefotaxima e obtiveram resposta clínica favorável, tendo um deles septicemia provocada por *E. coli*.

Nos experimentos em que utilizávamos 50mg de ceftriaxona/Kg de peso observamos, em algumas situações, o efeito antibiótico dependente do número de doses, tanto em animais inoculados com amostras não-produtoras de ESBL, como nos infectados por amostras produtoras da enzima.

Em um dos experimentos (II) com a amostra 312 de *K. pneumoniae* houve uma diminuição significativa da carga bacteriana no baço dos animais tratados com 2 doses de ceftriaxona em relação aos tratados com uma única dose. No experimento I esta situação também foi encontrada, mesmo que sem comprovação estatística, no fígado destes animais.

Nos animais infectados pela amostra 1024 de *K. pneumoniae*, o mesmo efeito pôde ser observado, tanto no baço (podendo ser comprovado estatisticamente) como no fígado, no experimento II. Quanto aos animais infectados pela amostra 455 e os inoculados pela amostra

974 de *K. pneumoniae*, em ambos experimentos houve uma tendência a redução da carga bacteriana dependente do número de doses de ceftriaxona, no fígado dos camundongos.

Os animais infectados pela amostra 1131 de *K. pneumoniae*, também tiveram redução dose-dependente da contagem de UFC/g de tecido, no baço e no fígado, embora ela não tenha sido comprovada estatisticamente.

No experimento de avaliação da eficácia de ceftriaxona 1 a 3 doses de 100mg/Kg de peso foi evidente e comprovado estatisticamente o efeito dependente do número de doses, no baço e no fígado dos animais infectados pela amostra 120 de *K. pneumoniae*. O efeito dependente da dosagem de antibiótico também foi notado (mesmo que sem comprovação estatística) quando comparamos os resultados obtidos nos experimentos de avaliação da eficácia de ceftriaxona, 50mg/Kg de peso, com os encontrados no experimento de avaliação da eficácia de ceftriaxona, 100mg/Kg de peso, para as amostras 291 e 120 de *K. pneumoniae*.

Na literatura científica também é descrito este efeito dependente de concentração ou número de doses para cefalosporinas de amplo espectro no tratamento de infecções experimentais provocadas por amostras de *K. pneumoniae* ou *E. coli* produtoras ou não de ESBL.

Thauvin-Eliopoulos et al.(1997), conduziram um estudo para comparar a eficácia *in vivo* de alguns antibióticos β -lactâmicos no tratamento de abscessos intra-abdominais provocados por uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de ESBL porém, plenamente sensível à cefotaxima. Os resultados obtidos por estes autores sugerem uma alta dependência do regime de doses para cefotaxima. No grupo controle a carga bacteriana chegou a 8,76 log₁₀ UFC/g de abscesso, no grupo de animais tratados por infusão contínua com 400mg de cefotaxima/Kg de peso a contagem de colônias caiu para 4,28 log₁₀UFC/g de abscesso. No grupo de animais tratados também por infusão contínua, com 1000mg de cefotaxima/Kg de peso, a carga bacteriana atingiu 2,87 log₁₀UFC/g de abscesso e no grupo de animais tratados

com 180mg de cefotaxima/Kg de peso a cada 4 horas, a carga bacteriana foi a 2,27 \log_{10} UFC/g de abscesso.

Fantin et al., (1990) em um modelo de endocardite experimental utilizaram uma amostra de *E. coli* produtora de SHV-2, que apresentava uma reduzida susceptibilidade as cefalosporinas de amplo espectro (ceftriaxona e cefotaxima), também demonstraram o efeito dependente de concentração de ceftriaxona associada ao sulbactam, este em concentração fixa de 100mg/Kg de peso, 3 vezes ao dia. A associação 15mg de ceftriaxona/Kg de peso, uma vez ao dia reduziu a carga bacteriana a 5,7 \log_{10} UFC/g de vegetação, quando comparado ao controle, onde as contagens alcançavam 8,1 \log_{10} UFC/g de vegetação. Contudo, quando outra combinação, mantendo o sulbactam e dobrando a concentração de ceftriaxona (30mg/Kg de peso, uma vez ao dia), foi utilizada, a contagem bacteriana diminuiu para 3,1 \log_{10} UFC/g de vegetação.

Em outro modelo de endocardite em coelhos provocada por *E. coli* não-produtora de ESBL e sensível à ceftriaxona, onde a contagem de colônias dos animais do grupo não-tratado alcançava 7,41 \log_{10} UFC/g de vegetação, o tratamento com 15mg de ceftriaxona/Kg de peso, uma vez ao dia não reduziu significativamente a carga bacteriana (7,17 \log_{10} UFC/g de vegetação). Entretanto, o dobro da dose de ceftriaxona (30mg /Kg de peso, uma vez ao dia) foi capaz de reduzi-la a 2,41 \log_{10} UFC/g de vegetação obtendo significância estatística (PANGON et al., 1987).

Foi constatado também no presente trabalho que, independente da produção da enzima ESBL pelas amostras de *K. pneumoniae*, a carga bacteriana no fígado foi, em geral, mais acentuada que no baço, sugerindo, assim, uma infecção hepática mais intensa do que a esplênica.

Nos diferentes experimentos que realizados também foi possível observar que geralmente o fígado, apresentava maior redução das contagens de UFC/g de tecido com o uso

de ceftriaxona, nas infecções provocadas por amostras de *K. pneumoniae* produtoras ou não de ESBL. A provável razão desta melhor atividade no fígado é que a ceftriaxona é eliminada, principalmente, pelo sistema hepato-biliar. Matsui et al., (1984), utilizando ratos que receberam, via endovenosa, 20mg de ceftriaxona/kg de peso, demonstraram que 61,8% da droga é eliminada na bile, 24 horas após a dose do antibiótico. Em humanos saudáveis, a excreção via biliar da ceftriaxona também é elevada, ficando entre 40 a 50%, 24 horas após uma dose de 500mg/Kg de peso (SEDDON et al., 1980).

O modelo de infecção sistêmica com alto inóculo utilizado para o presente estudo mostrou-se adequado aos objetivos e reprodutível. As doses de 50 e 100mg de ceftriaxona/Kg de peso são comparáveis às doses utilizadas em humanos (adultos e idosos podem receber até 2g de ceftriaxona em dose única diária ou a cada 12 horas), inclusive em recém-nascidos (cuja dose máxima diária não deve passar de 50mg/Kg), lactentes e crianças até 12 anos de idade (nos quais podem ser utilizadas até 80mg/Kg de peso).

Como era previsível, a ceftriaxona foi útil no tratamento dos animais infectados pelas amostras não-produtoras de ESBL e sensíveis a esta droga *in vitro*. De uma maneira geral, podemos dizer que esta cefalosporina atuou também nos casos de infecção por amostras produtoras de ESBL plenamente sensível ou com sensibilidade intermediária, embora a atividade tenha sido altamente dependente do número de doses e da concentração do antibiótico. Nesta condição de tratamento, a atuação *in vivo* da ceftriaxona foi mais relacionada com o resultado dos testes de susceptibilidade *in vitro* do que com a produção ou não de ESBL. Constitui exceção a esta observação, os resultados paradoxais verificados com a amostra 312 de *K. pneumoniae*, produtora de ESBL e resistente *in vitro*, mas sensível *in vivo*.

Os resultados obtidos sugerem a possibilidade de se utilizar cefalosporinas de amplo espectro, como a ceftriaxona, nos casos de infecções causadas por amostras de *K. pneumoniae*

produtoras de ESBL que apresentem susceptibilidade *in vitro* a esta droga, desde que uma alta dose de ceftriaxona possa ser usada e mantida durante o tratamento dos pacientes, já que a eficácia do tratamento com β -lactâmicos depende da manutenção da concentração adequada do antibiótico no plasma durante o tratamento (BAKKER-WOUDENBERG; ROOSENDAAL, 1990).

7 CONCLUSÕES

1. Padronizou-se um modelo experimental de infecção generalizada por *Klebsiella pneumoniae* em camundongos previamente tratados com corticosteróide e injetados endovenosamente com grande inóculo bacteriano.

2. Os animais infectados pelas amostras de *Klebsiella pneumoniae* não-produtoras de ESBL e sensíveis à ceftriaxona, responderam a tratamento com esta cefalosporina, conforme demonstrado por uma ou mais das seguintes evidências: redução da contagem bacteriana no baço, redução da contagem bacteriana no fígado e aumento da sobrevivência dos animais tratados.

3. A atuação de ceftriaxona foi variável em animais infectados por amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL:

- amostras resistentes *in vitro* ao antibiótico – ausência de eficácia ou controle parcial da infecção;
- amostras com sensibilidade plena ou intermediária ao antibiótico – controle parcial da infecção, dosagem dependente.

4. Foi detectado efeito dependente do número de doses e da concentração de ceftriaxona no tratamento dos animais infectados, tanto por amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras, como não-produtoras de ESBL.

5. A produção de beta-lactamase de espectro estendido e a resistência à ceftriaxona *in vitro* não necessariamente estão associadas com resistência *in vivo* ao antibiótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, S. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. JO.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. Cap. 29. p. 475-482.
- BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M.; ROOSEDAAL, R. Impact of dosage schedule of antibiotics on the treatment of serious infections. **Intensive Care Med.**, Berlin, v. 16, Suppl. 3, p. 229-234, 1990.
- BARBOSA, R. C.; SILVA, C. M. C.; HIZUKA, S. M.; CAVASSIN, E. D.; PERUGINI, M. R. E. Beta-lactamase de espectro estendido: prevalência e comparação de métodos de screening. **Semina: Ci. Biol. Saúde**, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 17-24, jun. 1999/2000.
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 14, n. 4, p. 933-951, out. 2001.
- BUSH, K. Characterization of β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 33, n. 3, p. 259-263, mar. 1989.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, jun. 1995.
- BUSH K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, abr. 2001.
- CARON, F.; GUTMANN, L.; BURE, A.; PANGON, B.; VALLOIS, J. M.; PECHINOT, A.; CARON, C. Ceftriaxone-sulbactam combination in rabbit endocarditis caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-broad-spectrum TEM-3 β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 34, n. 11, p. 2070-2074, nov. 1990.

CHANDRASEKAR, P. H.; SLUCHAK, J. A.; KRUSE, J. A. Therapy with cefoperazone plus sulbactam against disseminated infection due to cefoperazone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in granulocytopenic mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 37, n. 9, p. 1927-1930, set. 1993.

COLLET, D. **Modelling survival data in medical research**. New York: Chapman & Hall, 1994. 347 p.

CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics**. New York: John Wiley, 1999

CORMICAN, M. G.; MARSHALL, S. A.; JONES, R. N. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) – producing strains by the Etest ESBL screen. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 34, n. 8, p. 1880-1884, ago. 1996.

EMERY, C. L.; WEYMOUTH, L. A. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 8, p. 2061-2067, ago. 1997.

FANTIN, B.; PAGON, B.; POTEL, G.; CARON, F.; VALLÉE, E.; VALLOIS, J. M.; MOHLER, J.; BURÉ, A.; PHILIPPON, A.; CARBON, C. Activity of sulbactam in combination with ceftriaxone *in vivo* and in experimental endocarditis caused by *Escherichia coli* producing SHV-2 like β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 34, n. 4, p. 581-586, abr. 1990.

FARMER III, J. J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. JO.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. Cap. 27. p. 442-458.

FLEMING, P. C.; GOLDNER, M.; GLASS, D. G. Observations on the nature, distribution, and significance of cephalosporinase. **Lancet** i, London, n. 1, p. 1399-1401, 1963.

GEORGOPOULOS, A.; BUXBAUM, A.; GRANINGER, W. Efficacy of β -lactam and inhibitor combinations in a diffusion chamber model in rabbits. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 43, p. 497-501, 1999.

GERBER, A. U.; VASTOLA, A. P.; BRANDEL, J.; CRAIG, W. A. Selection of aminoglycoside-resistant variants of *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vivo* model. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 146, n. 5, p. 691-697, nov. 1982.

GERBER, A. U.; CRAIG, W. A.; BRUGGER, H. P.; FELLER, C.; VASTOLA, A. P.; BRANDEL, J. Impact of dosing intervals on activity of gentamicin and ticarcillin against *Pseudomonas aeruginosa* in granulocytopenic mice. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 147, n. 5, p. 910-917, maio 1983.

GOMES, A. C. L. F. **Detecção e significado clínico de Enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido em pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.** 2002. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biociências aplicadas a Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

HOYEN, C. K.; PULTZ, N. J.; PATERSON, D. L.; ARON, D. C.; DONSKEY, C. J. Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization in mice by *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 47, n. 11, p. 3610-3612, nov. 2003.

HSIUNG, A.; MENDES, C.; OPLUSTIL, C.; SINTO, S. Detecção e prevalência de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) em amostras bacterianas isoladas em hospitais brasileiros. **J. Bras. Patol.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 241-246, jul. 2000.

JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Bacterial resistance: a worldwide problem. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 31, n. 2, p. 379-388, mar. 1998.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, p. 457-481, 1958.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. *Enterobacteriaceae*. In: _____. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido.** 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2001. Cap. 4. p. 177-261.

LAUTENBACH, E.; PATEL, J. B.; BILKER, W. B.; EDELSTEIN, P. H.; FISHMAN, N. O. Extended-spectrum β -lactamase – producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 32, n. 8, p. 1162-1171, abr. 2001.

LEGGET, J. E.; FANTIN, B.; EBERT, S.; TOTSUKA, K.; VOGELMAN, B.; CALAME, W.; MATTIE, H.; CRAIG, W. A. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals

in murine pneumonitis and thigh-infection models. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 159, n. 2, p. 281-292, fev. 1989.

LIMA, A. O.; SILVA, W. D. **Imunologia, imunopatologia, alergias e métodos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1970. 642 p.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D. **SAS System for the LIFETEST Procedure**. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1996.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 8, n. 4, p. 557-584, out. 1995.

LIVERMORE, D. M. β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 41, Suppl. D, p. 25-41, jun. 1998.

MANDELL, G. L.; PETRI Jr., W. A. Antimicrobial agents: penicillins, cephalosporins and other β -lactam antibiotics. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9 ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies, 1995. Cap. 45. p. 1073-1102.

MATSUI, H.; KOMIYA, M.; IKEDA, C.; TACHIBANA, A. Comparative pharmacokinetics of YM-13115, ceftriaxone, and ceftazidime in rats, dogs, and rhesus monkeys. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 26, n. 2, p. 204-207, ago. 1984.

MENDES, C.; HSIUNG, A. KIFFER, C.; OPLUSTIL, C.; SINTO, S.; MIMICA, I.; ZOCCOLI, C.; MYSTIC STUDY GROUP. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC antimicrobial surveillance program. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 4, n. 5, p. 236-244, out. 2000.

MENTEC, H.; VALLOIS, J. M.; BURE, A.; SALEH-MGHIR, A.; JEHL, F.; CARBON, C. Piperacillin, tazobactam, and gentamicin alone or combined in an endocarditis model of infection by a TEM-3-producing strain of *Klebsiella pneumoniae* or its susceptible variant. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 36, n. 9, p. 1883-1889, set. 1992.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility testes for bacteria that grow aerobically; approved standard - 5th ed.** Wayne: National Committee For Clinical Laboratory Standards, jan. 2000. (Document M7-A5, vol. 20, n. 2).

NAUMOVSKI, L.; QUINN, J. P.; MIYASHIRO, D.; PATEL, M.; BUSH, K.; SINGER, S. B.; GRAVES, D.; PALZKILL, T.; ARVIN, A. M. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 36, n. 9, p. 1992-1996, set. 1992.

NEU, H. C. The new beta-lactamase-stable cephalosporins. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 97, n. 3, p. 408-419, set. 1982.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 38, n. 1, p. 71-78, jan. 1994.

PANGON, B.; JOLY, V.; VALLOIS, J. M.; ABEL, L.; BURÉ, A.; BRION, N.; CONTREPOIS, A.; CARBON, C. Comparative efficacy of cefotiam, cefmenoxime, and ceftriaxone in experimental endocarditis and correlation with pharmacokinetics and *in vitro* efficacy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 31, n. 4, p. 518-522, abr. 1987.

PATERSON, D. L.; KO, W. C.; GOTTBURG, A. V.; CASELLAS, J. M.; MULAZIMOGLU, L.; KLUGMAN, K. P.; BONOMO, R. A.; RICE, L. B.; MCCORMACK, J. G.; YU, V. L. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2206-2212, jun. 2001.

PATTERSON, J. E. Extended-spectrum β -lactamases: a therapeutic dilemma. **Pediatr. Infect. Dis.**, Baltimore, v. 21, n. 10, p. 957-959, out. 2002.

PEREIRA, A. S.; CARMO FILHO, J. R.; TOGNIM, M. C. B.; SADER, H. S. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido. **J. Bras. Patol.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 301-308, jun. 2003.

PITOUT, J. D. D.; SANDERS, C. C.; SANDERS Jr., W. E. Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram-negative bacilli. **Am. J. Med.**, New York, v. 103, n. 1, p. 51-59, jul. 1997.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 11, n. 4, p. 589-603, out. 1998.

QUINN, J. P.; MIYASHIRO, D.; SAHM, D.; FLAMM, R.; BUSH, K. Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 33, n. 9, p. 1451-1456, set. 1989.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Princípios básicos de quimioterapia. In: _____. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. Cap. 41. p. 544-556.

REIS, A. O.; GALES, A. C.; SADER, H. S. Detecção de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) pelo laboratório clínico: uma revisão crítica. **J. Bras. Patol.**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 43-48, jul. 2001.

RICE, L. Evolution and clinical importance of extended-spectrum β -lactamases. **Chest**, Chicago, v. 119, Suppl. 2, p. 391-396, fev. 2001.

RICE, L. B.; YAO, J. D. C.; KLIMM, K.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING Jr., R. C. Efficacy of different β -lactams against an extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the rat intra-abdominal abscess model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 35, n. 6, p. 1243-1244, jun. 1991.

RICE, L. B.; WILLEY, S. H.; PAPANICOLAOU, G. A.; MEDEIROS, A. A.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING Jr., R. C.; JACOBY, G. A. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 34, n. 11, p. 2193-2199, nov. 1990.

RODRIGUES, F. B. *Klebsiella* spp produtora de beta-lactamase de espectro estendido: fatores de risco para infecção e impacto clínico, em pacientes hospitalizados. 2004. 99 f. Dissertação

(Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

SADER, H. S.; SAMPAIO, J. L. M.; ZOCCOLI, C.; JONES, R. N. Results of the SENTRY antimicrobial surveillance program results in three Brazilian medical centers for 1997. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 3, n. 2, p. 63-79, 1999.

SADER, H. S. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 4, n. 2, p. 91-99, abr. 2000.

SANDERS, C. C.; SANDERS Jr., W. E. Microbial resistance to newer generation β -lactam antibiotics: clinical and laboratory implications. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 151, n. 3, p. 399-405, mar. 1985.

SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with random effects. **Biometrika**, Great Britain, v. 78, n. 4, p. 719-727, dez. 1991.

SEDDON, M.; WISE, R.; GILLET, A. P.; LIVINSTON, R. Pharmacokinetics of Ro 13-9904, a broad-spectrum cephalosporin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 18, n. 2, p. 240-242, ago. 1980.

SIROT, D. L.; GOLDSTEIN, F. W.; SOUSSY, C. J.; COURTIEU, A. L.; HUSSON, M. O.; LEMOZY, J.; MEYRAN, M.; MOREL, C.; PEREZ, R.; QUENTIN-NOURY, C.; REVERDY, M. E.; SCHEFTEL, J. M.; ROSEMBAUM, M.; REZVANI, Y. Resistance to cefotaxime and seven other β -lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3-year survey in France. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 36, n. 8, p. 1677-1681, ago. 1992.

SMITH, C. E.; TILLMAN, B. S.; HOWELL, A. W.; LONGFIELD, R. N.; JORGENSEN, J. H. Failure of ceftazidima-amikacin therapy for bacteremia and meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 34, n. 6, p. 1290-1293, jun. 1990.

SPANU, T.; LUZZARO, F.; PERILLI, M.; AMICOSANTE, G.; TONIOLO, A.; FADDA, G.; THE ITALIAN ESBL STUDY GROUP. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the

family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 46, n. 1, p. 196-202, jan. 2002.

THAUVIN-ELIOPOULOS, C.; TRIPODI, M. F.; MOELLERING Jr., R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Efficacies of piperacillin- tazobactam and cefepime in rats with experimental intra-abdominal abscess due to an extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 41, n. 5, p. 1053-1057, maio 1997.

WINOKUR, P. L.; CANTON, R.; CASELLAS, J. M.; LEGAKIS, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 32, Suppl. 2, p. 94-103, maio 2001.

YAO, J. D. C.; MOELLERING Jr., R. C. Antimicrobial agents. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. JO.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. Cap. 116. p. 1474-1504.