Karin Marie van der Heijden

Translocação bacteriana na isquemia-reperfusão hepática com e sem estase venosa intestinal : estudo experimental em ratos

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

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa Dra Anna Sara Shafferman Levin

São Paulo

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

van der Heijden, Karin Marie
Translocação bacteriana na isquemia-reperfusão hepática com e sem estase venosa intestinal : estudo experimental em ratos / Karin Marie van der Heijden. -- São Paulo, 2007.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Anna Sara Shafferman Levin.

Descritores: 1.Translocação bacteriana 2.Isquemia 3.Reperfusão 4.Endotoxinas 5.*Enterococcus faecalis* 6.*Escherichia coli* 7.Modelos animais 8. Ratos Wistar

USP/FM/SBD-195/07

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marinus e Ana Elisabeth, pelo incentivo e pelo amor que propiciou o meu caminho.

Ao Marcel, por todo amor, apoio, compreensão e, acima de tudo, por estar sempre ao meu lado, construindo nossa vida.

Aos meus filhos Henrique e Beatriz, que me ensinaram como o amor é infinito.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Edson Abdala, pela orientação, amizade e, acima de tudo, por todo apoio, paciência e dedicação atribuídos a cada etapa deste trabalho.

À Profa. Dra. Anna Sara Shaferman Levin, pelo apoio, incentivo e orientação na realização deste trabalho.

Aos amigos, colegas e estagiários do Laboratório de Investigação Médica (LIM-54) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e colaboração.

À Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa, pelo apoio, colaboração e pelas sugestões propostas no exame de qualificação.

À Inneke Marie van der Heijden, minha irmã, que sempre fez muito mais do que me auxiliar.

Ao Dr. Dahir Ramos de Andrade Jr pelas sugestões propostas no exame de qualificação

Aos colegas e funcionários da Unidade de Fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado, pelo apoio e permissão para realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Telesforo Bacchella pelas sugestões propostas no exame de qualificação.

Ao Dr. Flávio Henrique Galvão, pelo incentivo e entusiasmo.

Ao amigos Genivaldo daSilva e Valcinéia de Souza A. Gaspar , pelo auxílio indispensável e pelo respeito com os animais

À Ana Lúcia Bernardes, pela colaboração e pela disposição

À Camila Gavão Lopes, pelo grande auxílio.

À Dra Estela Regina Ramos Figueira pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Raymundo Azedo pela colaboração na análise estatística dos resultados.

Esta dissertação está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Resumo
Summary
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 9
3. MÉTODOS 11
3.1 PARTE I - COLONIZAÇÃO DOS ANIMAIS 12
3.1.1 Animais 12
3.1.2 Fases do Processo de Colonização 12
3.1.2.1 Fases I e II - Descolonização e Inoculação de cepas bacterianas conhecidas 13
3.1.2.2 Fase III - Determinação do tempo ideal de colonização 15
3.1.3 Variáveis a serem definidas 15
3.2 PARTE II – ESTUDO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA 16
3.2.1 Animais 16
3.2.2 Grupos de estudo 16
3.2.3 Método operatório 17
3.2.4 Colheita de material 18
3.2.5 Desfechos analisados 18
3.2.6 Tratamento Estatístico 19
3.3 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA 20
3.3.1 Hemocultura 20
3.3.2 Coprocultura 20
3.3.3 Culturas de Fragmentos de tecidos 21
3.3.4 Isolamento e identificação dos microrganismos 22
3.3.4.1 Testes de triagem para detecção de *E. coli* ESBL e de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina 22
3.3.4.2 Tipagem molecular – Eletroforese de Campo Pulsátil .. 25
3.4 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS (LPS) 28
4. RESULTADOS 30
4.1 PARTE I - COLONIZAÇÃO DOS ANIMAIS 31
4.2 PARTE II – ESTUDO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA 35
4.2.1 Culturas 35
4.2.2 Dosagem de endotoxinas 41
5. DISCUSSÃO 45
6. CONCLUSÕES 56
7. ANEXOS 59
8. REFERÊNCIAS 69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases do processo de colonização dos ratos com cepas de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ERV) e *Escherichia coli* produtora de β-lactamase de espectro estendido (ESBL) 13

Figura 2 - Teste de aproximação positivo para ESBL 24

Figura 3 - Perfis moleculares de cepas de *E. coli* produtoras de β-lactamase de espectro estendido determinados por PFGE. 26 isolados obtidos de 4 animais após realização do processo de colonização. 33

Figura 4 - Perfis moleculares de cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes determinados por PFGE. Nove isolados obtidos de 4 animais após realização do processo de colonização 34

Figura 5 - Perfis moleculares de cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes determinados por PFGE isoladas dos ratos nos diferentes grupos experimentais..... 40

Figura 6 - Perfis moleculares de cepas de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamase de espectro ampliado determinados por PFGE isoladas de ratos nos diferentes grupos experimentais..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação das doses dos antibióticos, concentrações dos inóculos e resultado do crescimento microbiológico de cepas de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina e de *E. coli* produtora de β-lactamase de espectro estendido recuperadas nas amostras de fezes nos protocolos do processo de colonização 32

Tabela 2 - Número e proporção (positivos/avaliados) de animais com crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. coli* ESBL positiva e/ou *E. faecalis* resistente a vancomicina por órgão ou tecido 36

Tabela 3 - Número e proporção (positivos/avaliados) de animais com crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. coli* ESBL por órgão ou tecido 37

Tabela 4 - Número e proporção (positivos/avaliados) de animais com crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas de *E. faecalis* resistente a vancomicina por órgão ou tecido 38

Tabela 5 - Resultado das análises comparativas estatisticamente significantes entre os grupos, para crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. coli* ESBL por órgão ou tecido 39

Tabela 6 - Resultado das análises comparativas estatisticamente significantes entre os grupos, para crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. faecalis* resistente a vancomicina por órgão ou tecido.....39

Tabela 7 - Médias, medianas e desvios padrões das dosagens de endotoxina no sangue porta, nos diferentes grupos 42

Tabela 8 - Médias, medianas e desvios padrões das dosagens de endotoxina no sangue sistêmico, nos diferentes grupos 42

Tabela 9 - Comparação das concentrações de endotoxinas no sangue porta, entre os diversos grupos.....43

Tabela 10 - Comparação das concentrações de endotoxinas no sangue sistêmico, entre os diversos grupos.....44

RESUMO

van der Heiden KM. *Translocação bacteriana na isquemia- reperfusão hepática com e sem estase venosa intestinal : estudo experimental em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2007. 81p.

Atualmente, define–se como translocação bacteriana o deslocamento de bactérias e/ou seus produtos, como as endotoxinas, da luz do TGI para sítios estéreis. A ocorrência de translocação bacteriana tem sido sugerida em diversos estudos experimentais e clínicos. Apesar de todos estes estudos sustentarem a hipótese da ocorrência de translocação bacteriana, eles não demonstram que a bactéria detectada no sangue e em sítios estéreis tem efetivamente origem no TGI do animal ou paciente. Portanto, o objetivo da primeira fase deste trabalho, consistiu no desenvolvimento de um modelo experimental que comprovasse que bactérias isoladas em sítios estéreis são realmente de origem intestinal e que pudesse posteriormente viabilizar o estudo da translocação bacteriana. Para isto, realizou-se a colonização de ratos através da inoculação, via gavagem, de solução de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ERV) e *E. coli* produtora de β-lactamase de espectro estendido (ESBL). O perfil de resistência destas cepas foi utilizado como marcador. Posteriormente, este estudo avaliou a translocação bacteriana em ratos submetidos a isquemia-reperfusão hepática com e sem estase venosa intestinal, utilizando o modelo de colonização. Quarenta e seis animais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo I (n=15) ratos submetidos a isquemia hepática e estase intestinal por 30 minutos, e 1h de reperfusão; Grupo II (n=15) ratos submetidos a 30 minutos de isquemia hepática parcial sem estase intestinal, e 1h de reperfusão;Grupo III (n=8) ratos controle que apenas sofreraam manipulação cirúrgica e Grupo IV (n=8) ratos controle não cirúrgico. Os grupos foram analisados em relação: a ocorrência de translocação bacteriana; proporção de animais com crescimento da cepa pré-definida de ERV e *E. coli* ESBL, por órgão ou tecido; Concentração de LPS no sangue portal e sistêmico. Os resultados obtidos evidenciaram presença marcante de crescimento microbiológico positivo para cepas inoculadas na maioria dos órgãos ou tecidos analisados nos diferentes grupos. Desta forma, conseguimos comprovar que a bactéria detectada em sítios estéreis tem efetivamente origem no TGI daquele animal. A translocação de bactérias, para os órgãos sólidos, ocorreu com maior freqüência nos ratos submetidos a isquemia e reperfusão com estase intestinal. A translocação bacteriana para o pulmão ocorreu com maior freqüência nos grupos cirúrgicos, inclusive controle, do que no controle não cirúrgico. A translocação de endotoxinas, medida pela concentração sangüínea sistêmica, ocorreu com maior intensidade nos ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática com estase intestinal. Não houve diferenças entre os grupos quanto a proporção de animais com cultura positiva no sangue sistêmico e porta e concentração de endotoxinas no sangue porta.

Descritores: 1.Translocação bacteriana 2.Isquemia 3.Reperfusão 4.Endotoxinas 5.*Enterococcus faecalis* 6.*Escherichia coli* 7.Modelos experimentais 8. Ratos Wistar

SUMMARY

van der Heiden KM. *Bacterial translocation in liver ischemia-reperfusion injury with and without intestinal venous stasis – experimental model in rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 81p.

Bacterial translocation is defined as the passage of viable bacteria and/or their products, such as endotoxins, from inside the gastrointestinal tract (GIT) to normally sterile sites. Experimental studies demonstrate that increase of the permeability of the intestinal mucosa and other conditions such as intestinal bacterial overgrowth or host immune deficiency may be associated with this phenomenon. The occurrence of bacterial translocation has been suggested in some experimental and clinical studies. Although all these studies sustained the occurrence of the bacterial translocation but they did not demonstrate that it has effectively origin in the TGI of the animal or patient. The first objective of this study was to develop a GIT colonization experimental model in rats with resistant *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) and *E.coli,* to be used in further studies of bacterial translocation intending, The resistance profile of these strains is used as a marker. Afterwards, this study evaluated the bacterial translocation in rats submitted to hepatic ischemic-reperfusion with or without intestinal vein stasis. Forty six animals were used as follows: Group I (n=15) mice submitted to ischemic hepatica and intestinal stasis for 30 minutes, and 1h of reperfusion; Group II (n=15) mice submitted to partial ischemic hepatica for 30 minutes without intestinal stasis, and 1h of reperfusion; Group III (n=8) control of mice which only suffered surgical manipulation and Group IV (n=8) Group of mice without surgical control. The groups were analyzed concerning: the occurrence of bacterial translocation; proportion of animals with predefined ERV and *E.Coli* ESBL growth increase per organ or tissue; LPS concentration in the portal and systemic blood. The results demonstrated remarkable appearance of positive microbiological growth for inoculated stains mostly in the analyzed tissues within the different groups. By this way, we were able to prove that the bacteria present in sterile sites have effectively their origin in the TGI of that animal. The bacteria translocation in solid organs occurred frequently in group I submitted to the ischemia-reperfusion with intestinal stasis. The bacterial translocation in lung occurred more frequently in the surgical groups including chirurgical control. The endotoxin in systemic blood concentration occurred more intensively in group I submitted to the ischemia-reperfusion with intestinal stasis.

Descriptors: 1.Bacterial translocation 2.Ischemia-reperfusion 3.Endotoxin 4.*Enterococcus faecalis* 5.*Escherichia coli* 6.Experimental model 7.Wistar Rat

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o trato gastrintestinal (TGI) é reconhecido não só pelo seu papel na digestão e excreção de alimentos, mas também como um órgão metabólico e imunológico. Ele possui uma barreira fisiológica eficaz composta por vários componentes que, em condições fisiológicas, mantém bactérias e seus produtos, como as endotoxinas, no lúmen intestinal, enquanto permite a absorção de nutrientes. Em condições normais, o lúmen cecal apresenta uma concentração bacteriana por volta de 10^{12} microrganismos por mL de fezes, enquanto o sangue do sistema porta e os linfonodos mesentéricos são estéreis, sugerindo a existência de um mecanismo de defesa eficaz contra a invasão de microrganismos.[1,2] Diversos fatores, como suco gástrico, enzimas pancreáticas, bile, muco, peristaltismo, tecido linfóide associado ao intestino e uma barreira celular composta por uma camada de células epiteliais colunares simples, interpostas por células especializadas como linfócitos e células M, estão envolvidos neste mecanismo de defesa.[3]

Entretanto, qualquer alteração nesta barreira pode predispor ao aumento da permeabilidade intestinal, tornando possível a passagem de bactérias e endotoxinas através da parede intestinal.[2,4] Wolochow et al (1966) denominaram esta passagem como translocação bacteriana.[5] Berg e Garlington (1979) definiram translocação bacteriana como a passagem de

bactérias nativas viáveis do TGI para os linfonodos do mesentério (LNM) e para outros sítios extra-intestinais.[6] Atualmente, define–se como translocação bacteriana o deslocamento de bactérias e/ou seus produtos, como as endotoxinas, da luz do TGI para sítios estéreis.[7,8,9]

Estudos experimentais demonstram que, além do aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, outras condições como sobrecrescimento bacteriano intestinal ou deficiência na imunidade do hospedeiro podem estar relacionadas com a ocorrência da translocação bacteriana. [10, 11,12]

A luz do trato gastrintestinal contém uma grande variedade de bactérias aeróbicas e anaeróbias próprias. A concentração destas bactérias varia ao longo do TGI, sendo que a região intestinal proximal e do estômago possui uma escassa população bacteriana. Em contrapartida, a região distal do íleo possui uma contagem total correspondente a 10^8 microrganismos por mL, e após a válvula íleo-cecal esta concentração aumenta para 10^{12} microrganismos por mL.[12] Esta microbiota própria exerce um importante papel na prevenção da colonização por microorganismos patogênicos exógenos.[2, 12] Diversos fatores estão envolvidos no mecanismo regulatório das populações desta microbiota, formando micro ambientes onde bactérias facultativas, por exemplo, passam a utilizar oxigênio, criando assim um meio apropriado para o crescimento de anaeróbios obrigatórios, que ocupam o espaço reservado das células epiteliais, limitando a fixação de bacilos Gram-negativos potencialmente patogênicos aos enterócitos.[2,13] Deste modo,

qualquer alteração na concentração bacteriana desta microbiota proporciona falha neste mecanismo de resistência.

Terapias com antibióticos, como também algumas doenças, podem ocasionar alterações da microflora intestinal. Geralmente, nestes casos, há um sobrecrescimento significativo de bactérias no TGI proximal, fato que parece contribuir para a ocorrência de infecções nosocomiais.[14] Estudos experimentais também demonstram que o sobrecrescimento bacteriano pode estar intimamente relacionado com a translocação bacteriana.[15]

Sob condições normais, a bactéria é fagocitada antes de atingir os linfonodos mesentéricos ou os vasos linfáticos.[16] Acredita-se que em indivíduos imunodeprimidos o organismo torna-se incapaz de lidar com a quantidade de bactérias presentes, permitindo assim o ingresso e a sobrevivência destas bactérias em um sítio extra-intestinal distante.

Estudos em camundongos mostram que a ocorrência de translocação bacteriana é mais comum em atímicos quando comparados a animais controle, sugerindo um papel específico da imunidade mediada por células T na inibição da translocação.[17] Agentes imunossupressores têm sido associados ao aumento na translocação de bactérias para linfonodos mesentéricos em roedores, e doenças hematológicas têm sido associadas a aumento na translocação em humanos, sugerindo que o mecanismo seja uma manifestação de imunossupressão.[14,17]

A translocação bacteriana é conseqüência de um processo inflamatório intestinal local, em que há produção de mediadores que exacerbam a resposta inflamatória sistêmica e promovem alterações

metabólicas e circulatórias. Diversas substâncias, como TNF-α, interleucinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8) e outras citocinas, prostaglandinas, prostaciclinas, óxido nítrico e proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP) são liberadas em decorrência do processo inflamatório intestinal local e estes mediadores, como também as endotoxinas, desencadeiam no organismo reações inflamatórias em órgãos distantes, que podem culminar com a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) e com a Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos.[18,19]

Com a evolução no conhecimento dos mediadores químicos e de seus mecanismos de ação, tornou-se necessária uma reavaliação dos papéis do agente infeccioso e do hospedeiro frente à resposta a infecção e inflamação, surgindo então um paradigma que aponta uma atenção não mais só ao agente infeccioso, mas também à resposta do hospedeiro.[20]

A ocorrência de translocação bacteriana tem sido sugerida em diversos estudos experimentais e clínicos.[21,22] Há descrições em grandes cirurgias abdominais, como cirurgia de aorta abdominal,[23] ressecção hepática e transplante de fígado;[24,25,26,27] no choque;[28,29] no fenômeno de isquemia e reperfusão; [19,30] em queimadura;[31,32] no trauma;[33,34] no tratamento com drogas imunossupressoras [35,36] e na sepse.[37,38] Marshall et al., 1993, demonstraram que mais de 90% dos pacientes com quadro infeccioso apresentaram pelo menos um episódio com isolamento de microorganismo simultaneamente presente no TGI proximal.[39] Em outros estudos, bactérias presentes na flora intestinal também foram correlacionadas a agentes microbianos isolados em pacientes sépticos,

sugerindo ser o intestino um possível reservatório bacteriano que causa a infecção sistêmica por meio da translocação.[40,41] Quanto ao aspecto microbiológico associado a pacientes com sepse, um significativo percentual tem como fator etiológico as bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae,*[42,43,44,45] sendo os gêneros *Enterobacter cloacae*[46] e *Escherichia coli* (*E. coli*) referidos como os mais freqüentes.[14,40,41] Nestes casos, mais uma vez, a semelhança entre bactérias isoladas no foco séptico e bactérias presentes no TGI alto, embora não comprove, sustenta a hipótese do intestino ser o foco de disseminação de microorganismos.[3,14,41]

Apesar de todos estes estudos sustentarem a hipótese da ocorrência de translocação bacteriana, eles não demonstram que a bactéria detectada no sangue e em sítios estéreis tem efetivamente origem no TGI daquele animal ou paciente. Portanto, há necessidade de se estabelecer um modelo experimental que comprove que bactérias isoladas em sítios estéreis são realmente de origem intestinal e que viabilize o estudo depurado da translocação bacteriana.

Existem, aparentemente, duas vias de translocação: a via porta ou hematogênica e a via linfática.[16,47,48,49,50] Pela via porta, as bactérias intestinais alcançam a microcirculação hepática através da veia porta, sendo disseminadas para outros órgãos pela circulação sangüínea. Pela via linfática, as bactérias presentes no líquido intersticial do intestino seriam carregadas na linfa aferente até os LNM, os quais conduzem a linfa para o ducto torácico, atingindo finalmente a circulação sistêmica.

Na via hematogênica de translocação, o eixo fígado-intestino representa um dos sistemas de defesa da barreira intestinal. Este sistema parece atuar principalmente contra a passagem de endotoxinas, pois estas são normalmente clareadas pelo sistema reticuloendotelial hepático.[51] Em situações de lesão hepática isquêmica este processo de clareamento pode ser comprometido. [52]

A lesão de isquemia-reperfusão (IR) hepática pode ocorrer em algumas situações da prática clínica e cirúrgica, como no trauma hepático, nas cirurgias de ressecção hepática e no transplante de fígado.[24,25,26,27] A lesão de IR é caracterizada por um período variável de isquemia do órgão, com agravamento da lesão hepatocelular após a revascularização.[53] Ela promove alterações estruturais no hepatócito. Após 20 minutos de isquemia, encontram-se lesões em organelas dos hepatócitos, que se acentuam aos 30 minutos,[54] e após 60 minutos há evidências de lesão histológica permanente.[55] Após 90 minutos, o fígado sofre alterações funcionais que podem aumentar a morbidade e a mortalidade do paciente.[56]

No processo de reperfusão, inicialmente há ativação das células de Kupffer com produção e liberação de espécies de oxigênio reativo, que lesam diretamente as células. Nesta fase, observa-se alteração da microcirculação,[57,58] devido ao edema e à vasoconstrição, com estagnação de leucócitos e agregação plaquetária. Em próxima fase, mais tardia, além da maior ativação das células de Kupffer, há ativação de neutrófilos e liberação de moléculas inflamatórias que amplificam o processo de lesão hepatocelular.[59]

Estudos que avaliem a ocorrência da translocação bacteriana nos processos de isquemia-reperfusão hepática e a distingam do fenômeno decorrente de outros fatores freqüentemente associados, como estase intestinal e manipulação cirúrgica abdominal, podem auxiliar no manejo de pacientes sob risco.

2. OBJETIVOS

1. Desenvolver modelo experimental de colonização de ratos com cepas de bactérias fenotipica e genotipicamente pré-definidas, para propiciar estudos de avaliação da translocação bacteriana.

2. Identificar e comparar a translocação bacteriana em ratos submetidos a isquemia-reperfusão hepática com e sem estase venosa intestinal.

3. MÉTODOS

3.1 PARTE I - COLONIZAÇÃO DOS ANIMAIS

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 4 a 6 semanas (*Rattus norvegicus*), pesando entre 300 e 350 g. Os animais foram mantidos no Laboratório de Investigação Médica do Serviço de Transplante e Cirurgia do Fígado (LIM 37) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em biotério específico, em gaiolas individuais com fundo de malhas largas para reduzir coprofagia, que foram trocadas diariamente. Eles foram alimentados com ração para roedores e receberam água *ad libitum.*

3.1.2 Fases do Processo de Colonização

O processo de colonização ocorreu em três etapas (Figura 1):

Fase I – Descolonização da flora intestinal habitual dos animais

Fase II – Inoculação de cepas bacterianas pré-definidas

Fase III – Determinação do tempo ideal de colonização pós-inoculação

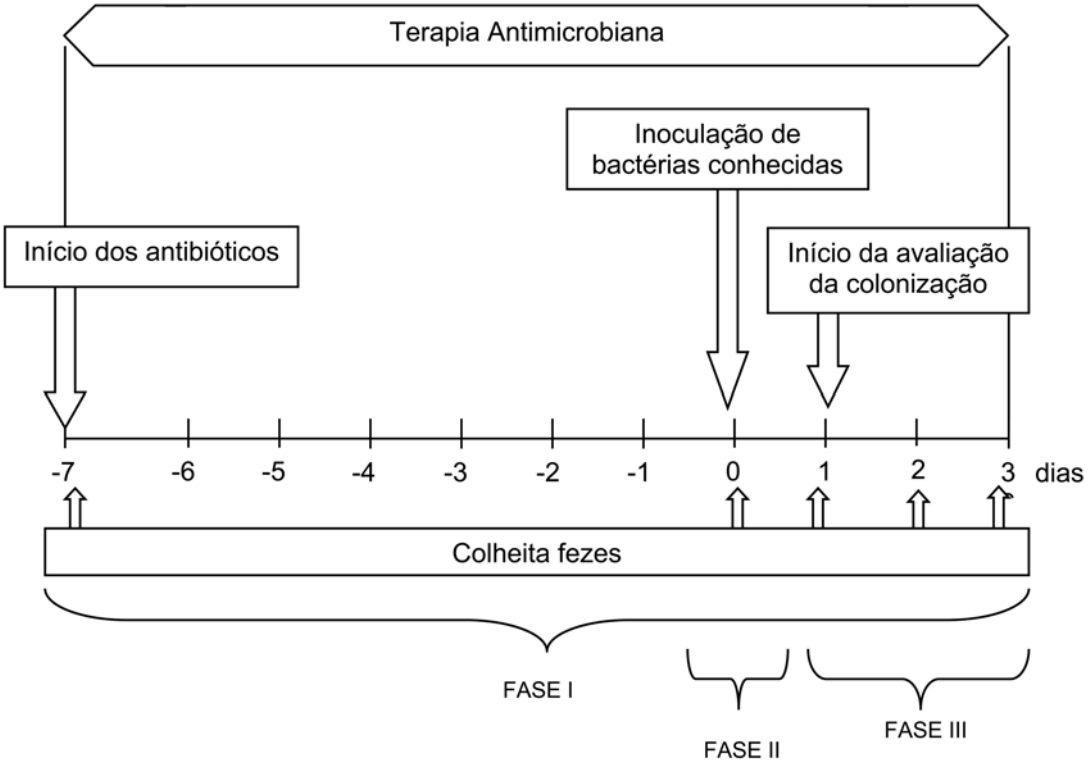


Figura 1 - Fases do processo de colonização dos ratos com cepas de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ERV) e *Escherichia coli* produtora de β-lactamase de espectro estendido (ESBL)

3.1.2.1 Fases I e II - Descolonização e Inoculação de cepas bacterianas conhecidas

Microorganismos

Foram utilizadas cepas de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ERV) e *E. coli* produtora de β-lactamase de espectro estendido (ESBL), isoladas de humanos, procedentes do Laboratório de Investigação Médica de Microbiologia (LIM 54) do HCFMUSP. As cepas foram cultivadas em placas de ágar-sangue de carneiro e, posteriormente, foram realizados subcultivos em caldo BHI *(Brain Heart Infusion*) a 35°C por 18 horas. As

concentrações inibitórias mínimas (CIM) das cepas foram determinadas por microdiluição em caldo, conforme documento aprovado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).[60]

Antibióticos

Antes da inoculação e colonização dos ratos, programou-se o uso de antibióticos sem espectro contra as cepas a serem utilizadas. Definiu-se, portanto, o uso oral de vancomicina e ceftriaxona, iniciando-se 7 dias antes da inoculação e mantendo-se durante todo o experimento.

Inicialmente, os ratos receberam água contendo 250 µg/mL de vancomicina[61] e 1,4 mg/mL de ceftriaxona diariamente, sendo esta última determinada de acordo com dados de doses terapêuticas para ratos.[62] Ao longo dos experimentos estas doses foram ajustadas, baseadas nos resultados do crescimento microbiológico, no intuito de inibir o crescimento de outros microrganismos e permitir o crescimento das bactérias inoculadas.

Quantidade inicial de bactérias inoculadas

No primeiro dia de cada experimento (dia zero) cada animal recebeu, via gástrica,[61] uma dose individual de 6 mL da suspensão bacteriana, composta por 3 mL de suspensão de ERV e de 3mL de suspensão de *E. coli* ESBL, com concentração final de aproximadamente $2x10^8$UFC/mL. A concentração do inóculo, da mesma forma que a dose dos antibióticos, foi ajustada no decorrer dos experimentos.

3.1.2.2 Fase III - Determinação do tempo ideal de colonização

Para avaliar o melhor tempo de colonização, a partir da inoculação (dia zero), foram colhidas, em 24, 48 e 72 horas, amostras frescas de fezes de cada animal e submetidas a análise microbiológica.

As cepas de ERV e de *E. coli* ESBL recuperadas dos animais foram consideradas como sendo as cepas inoculadas, baseando-se na similaridade das características fenotípicas (provas bioquímicas e testes de susceptibilidade a antibióticos) e genotipicas (tipagem molecular determinada pela técnica de eletroforese de campo pulsátil - PFGE).

O tempo ideal de colonização foi determinado pelo melhor dia de crescimento bacteriano das amostras de fezes.

3.1.3 Variáveis a serem definidas

As seguintes variáveis foram analisadas, em experimentos repetidos, para se obter colonização adequada:

- Doses dos antibióticos
- Quantidade de bactérias inoculada
- Tempo ideal de colonização pós-inoculação.

3.2 PARTE II – ESTUDO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 4 a 6 semanas (*Rattus norvegicus*), pesando entre 300 e 350 g, previamente colonizados com cepas específicas de ERV e de *E. coli* ESBL. Os animais foram mantidos no LIM 37 do HCFMUSP, em biotério específico, em gaiolas individuais, nas mesmas condições descritas no estudo da colonização. Eles foram alimentados com ração para roedores e receberam água *ad libitum.*

3.2.2 Grupos de estudo

Programou-se a inclusão de 46 animais, divididos nos seguintes grupos:

Grupo I - 15 ratos submetidos a isquemia hepática e estase intestinal por 30 minutos, e 1h de reperfusão.

Grupo II - 15 ratos submetidos a 30 minutos de isquemia hepática parcial sem estase intestinal, e 1h de reperfusão.

Grupo III - 8 ratos controle cirúrgico – apenas manipulação cirúrgica.

Grupo IV – 8 ratos controle não cirúrgico.

3.2.3 Método operatório

Todos os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Cristália, São Paulo, SP), na dose de 30 mg/kg, e éter. Durante todo o procedimento, o animal foi aquecido com lâmpada halogênica de 45W e 127V. A temperatura corpórea foi mantida entre 35 e 37°C.

Foi realizada laparotomia mediana, estendendo-se por aproximadamente 4 cm, a partir do apêndice xifóide.

Nos animais do grupo I, o pedículo hepático foi isolado e ocluído com pinça microvascular atraumática, proporcionando isquemia hepática associada a estase sangüínea intestinal. Nos animais do grupo II, fez-se o isolamento e oclusão do pedículo hepático comum dos lobos mediano e antero-lateral esquerdo, proporcionando isquemia hepática parcial. Esta técnica permite a drenagem venosa portal, proporcionando uma avaliação mais específica das lesões e conseqüências dependentes do processo de IR hepática.[63,64] Nestes grupos, a incisão abdominal foi fechada para evitar a desidratação do animal. Após 30 minutos de isquemia quente, o abdome foi reaberto e a pinça removida, permitindo a reperfusão dos lobos hepáticos isquêmicos. A incisão foi novamente fechada com sutura contínua, e reaberta após 60 minutos (tempo de reperfusão) para colheita dos materiais.

Os animais do grupo controle cirúrgico, grupo III, foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos descritos para os grupos I e II, exceto a oclusão do pedículo hepático. Os animais do grupo controle não cirúrgico,

grupo IV, foram somente anestesiados, e submetidos a colheita de material em tempo idêntico ao dos demais grupos..

3.2.4 Colheita de material

A colheita de material, nos grupos I e II, foi realizada 1 hora após o período de reperfusão hepática e intestinal, e nos grupos controle III e IV, após período idêntico ao de isquemia e reperfusão correspondente aos grupos experimentais.

Foram coletados de todos os animais: 3 mL de sangue, sistêmico e porta, para hemocultura e dosagem de endotoxinas; fezes e fragmentos de intestino grosso, intestino delgado, baço, fígado, pulmão e linfonodos cervicais e mesentéricos para cultura.

3.2.5 Desfechos analisados

Os desfechos analisados e comparados entre os grupos foram:

- Proporção de animais com crescimento da cepa pré-definida de ERV, por órgão ou tecido
- Proporção de animais com crescimento da cepa pré-definida de *E. coli* ESBL, por órgão ou tecido
- Concentração de LPS no sangue porta
- Concentração de LPS no sangue sistêmico.

3.2.6 Tratamento Estatístico

Como não havia dados disponíveis para estimar a diferença entre os grupos, o cálculo da amostra baseou-se na média do número de animais utilizados em estudos experimentais avaliando translocação bacteriana.(REF)

A análise descritiva do estudo foi preparada sob a forma de gráficos e tabelas, utilizando-se, para as variáveis quantitativas, médias e medianas para resumir as informações, e desvio padrão para indicar a variabilidade dos dados. Para as variáveis qualitativas, apresentadas em forma de tabelas, foram utilizadas freqüências absolutas e relativas.

Para as análises das proporções de animais com cultura positiva, por órgão ou tecido e por agente, foi utilizado o teste de qui-quadrado de Pearson para as comparações entre todos os grupos. As análises entre dois grupos foram feitas por qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado.

Os resultados das concentrações de LPS, entre todos os grupos, considerados variáveis paramétricas, foram analisados pelo teste ANOVA. Os casos que apresentaram diferença significante foram submetidos ao teste de Tukey para análise dois a dois.

Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5%, desta forma, diferenças significantes entre os grupos apresentaram como resultado dos testes valores abaixo de 0,05 ($p<0,05$). As análises foram realizadas através dp programa SPSS 13.

3.3 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Toda a análise microbiológica, englobando isolamento, identificação e teste de sensibilidade dos microrganismos, e também a caracterização genotípica por PFGE, foram realizadas no LIM 54 do HCFMUSP.

3.3.1 Hemocultura

O volume de 1 mL de sangue porta e 1 mL de sangue sistêmico foi colhido e imediatamente acondicionado em frascos para hemocultura (Bac–Hemocult pediátrico®, DME, Araçatuba, SP) para microrganismos aeróbios e/ou anaeróbios. Os frascos foram incubados a 35°C por 30 dias em aerobiose. As amostras foram cultivadas em ágar sangue de carneiro 5%, diariamente nas primeiras 72 horas e semanalmente por mais um mês.

3.3.2 Coprocultura

No período de colonização dos animais, foi realizada coprocultura antes e 24, 48 e 72 horas após a colonização, e, no estudo da translocação, sempre antes e 24 horas após a inoculação.

Foram coletadas amostras de fezes (aproximadamente 1 a 2 gramas) em frasco seco e estéril, as quais foram emulsificadas em caldo BHI e incubadas a 35°C por 18 a 24 horas em aerobiose. Após este período as amostras foram plaqueadas em agar sangue de carneiro a 5%, agar

MacConkey e agar SS (*Salmonella-Shigella*) e incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. As amostras de fezes provenientes do estudo de translocação bacteriana foram cultivadas, adicionalmente, em meios seletivos para ERV e *E. coli* ESBL (Anexo A). A identificação dos isolados foi realizada após a análise do crescimento bacteriano nos diferentes meios de cultura empregados, observando-se as características macroscópicas e microscópicas das colônias, e posterior realização de provas bioquímicas. [65]

Os isolados identificados como *E. faecalis* e *E. coli* foram submetidos a testes de sensibilidade específicos (triagem para ERV e ESBL) para confirmação fenotípica do isolado inoculado.

3.3.3 Culturas de Fragmentos de tecidos

Foram colhidas amostras de intestino delgado e grosso, fígado, baço, pulmão, linfonodos cervicais e mesentéricos.

As amostras foram cuidadosamente maceradas e cultivadas em caldo BHI a 35°C. Após 24 horas de incubação, em aerobiose, uma alíquota do caldo BHI foi plaqueada em agar sangue de carnerio a 5% e outras duas alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em caldo seletivo para *Enterococcus* spp. vancomicina resistente e caldo seletivo para *E. coli* resistente a ceftriaxona (CIM>100μg/mL). Após 24 horas de incubação, a 35°C em aerobiose, os caldos foram semeados em placas de agar sangue e estas incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente.[66]

3.3.4 Isolamento e identificação dos microrganismos

As colônias bacterianas isoladas foram submetidas a microscopia óptica e identificação bioquímica. A identificação das colônias foi realizada após a análise do crescimento bacteriano nos diferentes meios de cultura empregados, observando-se suas características quanto ao tamanho, borda, elevação, cor, densidade, consistência e hemólise em agar sangue (Anexo B, Quadro 1).

Cocos Gram-positivos não-hemolíticos, suspeitos de *Enterococcus* spp., foram submetidos às provas de catalase, hidrólise da esculina e tolerância ao cloreto de sódio 6,5%.[64] Bacilos Gram-negativos, suspeitos de *E. coli*, foram identificados pelo meio de IAL (Rugai modificado) e provas de oxidase e utilização de citrato.[64,65]

Várias colônias foram utilizadas na identificação e posteriormente submetidas aos testes de sensibilidade para confirmação de seu fenótipo.

3.3.4.1 Testes de triagem para detecção de *E. coli* ESBL e de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina

Os isolados de *E. coli* foram submetidos a uma triagem por diluição em Agar, onde 100 μg de ceftriaxona foram incorporadas em meio de cultura agar Mueller-Hinton conforme padronização proposta pelo NCCLS.[67] Os isolados considerados resistentes, com CIM superior a 100 μg/mL, foram submetidos ao teste de aproximação dos discos para confirmação da produção de β-lactamase de espectro estendido (ESBL).

Para determinar a concentração de ceftriaxona incorporada no agar, foi determinada a CIM do isolado usado na colonização dos animais pelo método de microdiluição em caldo.[67]

Para realização do teste de aproximação foram utilizados discos de ceftazidima (30 μg), ceftriaxona (30 μg), cefotaxima (30 μg), aztreonam (30 μg) e amoxacilina-ácido clavulânico (30 μg/10 μg).

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL) com auxílio de colorímetro (Vitek®, BioMerieux, Etoile, França). A suspensão foi inoculada de maneira homogênea, com auxílio de *swab* de algodão estéril, em placa de Petri (150mm de diâmetro) contendo ágar Mueller-Hinton (Anexo A). Os procedimentos seguidos nesta etapa foram realizados de acordo com as normas padronizadas pelo documento M2-A7 do NCCLS, 2002.[68]

Após um período de 15 minutos, os discos dos antimicrobianos foram aplicados nas placas e as mesmas foram incubadas a 35°C por 16 a 20 horas, em atmosfera ambiente.[60] A presença de um halo de inibição, ou de uma "zona fantasma", entre os discos do antimicrobiano e do inibidor de β-lactamase (que está localizado ao centro) indica que o isolado é um microorganismo produtor de ESBL. Assim, os isolados onde se observou a presença desta zona fantasma foram confirmados como sendo ESBL positivos (Figura 2).

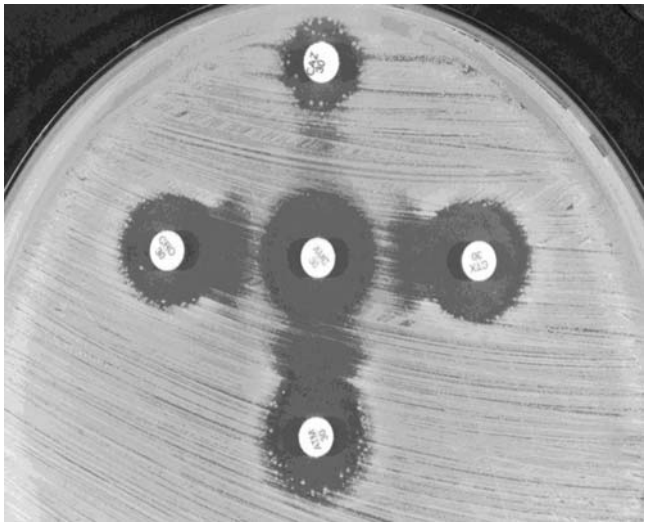


Figura 2 - Teste de aproximação positivo para ESBL

Para a detecção de VER, o teste foi realizado inoculando um isolado de *Enterococcus* spp. em agar BHI suplementado com 6 µg de vancomicina/mL.[69] Foi preparada uma solução estoque 10.000µg/mL de vancomina, a qual foi armazenada a -20°C e utilizada a cada preparo do meio de cultivo.

Os isolados identificados como *Enterococcus faecalis* foram submetidos ao teste de triagem, onde foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de MacFarland (aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL) com auxílio de colorímetro. Foram inoculados 10 µL da suspensão em placa de Petri contendo ágar BHI com 6 µg/mL de vancomicina (Anexo A). As placas foram incubadas a 35ºC, durante 24 horas, e examinadas cuidadosamente para verificar a presença de pequenas colônias (>1 colônia) ou um tênue filme de crescimento, que indica a presença de resistência a vancomicina, conforme descrito no documento do CLSI.[60]

De acordo com os critérios do CLSI (2005), foram utilizadas cepas controles de *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. coli* ATCC 25922, para todos os testes de sensibilidades realizados.

Após identificação e triagem da resistência dos isolados de ERV e *E. coli* ESBL, os mesmos foram armazenados em freezer -80°C, para eventual posterior análise molecular por PFGE.

3.3.4.2 Tipagem molecular – Eletroforese de Campo Pulsátil

Os microrganismos identificados fenotipicamente como ERV e *E. coli* ESBL foram analisados molecularmente por técnica de PFGE e os padrões moleculares obtidos foram comparados com os padrões das cepas originais utilizadas na colonização dos animais.

Protocolo para caracterização molecular por PFGE

A análise molecular foi feita pela técnica de eletroforese de campo pulsátil, de acordo com os protocolos descritos por Kaufmann, 1998[70] e Ridley, 1998.[71]

Preparo da suspensão bacteriana

As bactérias foram repicadas em meio ágar sangue de carneiro 5% e incubadas por 18 a 24h, em temperatura de 35°C ± 2°C. Três a cinco colônias foram transferidas para tubos contendo 3 mL de caldo e incubadas a 35°C ± 2°C, *overnight*. Foram transferidos aos microtubos, previamente

pesados e identificados, cerca de 2 mL do caldo com crescimento bacteriano. Os microtubos foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, o sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de solução fisiológica estéril. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o microtubo foi pesado em balança analítica. A massa bacteriana foi calculada e, em seguida, adicionou-se um volume adequado de solução de EDTA 25 mM pH8,0, obtendo-se uma suspensão bacteriana de concentração final de 100 μg/μL.

Preparo dos blocos de agarose

Os blocos de DNA foram obtidos pela mistura de 225 μL de tampão TEN (Tris 100 mM, pH7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM) acrescidos de 25 μL da suspensão bacteriana com 250 μL de agarose a 2%, em tampão 0,5X TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA 0,002 M). Esta mistura foi colocada em moldes específicos e refrigeradas a 4°C por 30 minutos.

Etapa de extração do DNA bacteriano

Os blocos de agarose foram removidos dos moldes e incubados em 2mL de tampão EC (Tris 6 mM, pH7,5; NaCl 1 M; EDTA 0,01 M; Sarcosil 0,5%, Deoxicolato 0,2%) por 5 horas a 37°C, sob agitação suave. Após este período, o tampão foi retirado e foram acrescentados 2,0 mL de tampão CHEF-TE (Tris 0,1 M, pH7,5; EDTA 0,1 M). Foi realizada uma lavagem com este último tampão e, em seguida, os blocos foram tratados

overnight, a 50°C, com solução de concentração final de 1,0 mg/mL de proteinase K (InVitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) em tampão ES (EDTA 0,4 M, pH9,3; Sarcosil 1,0%). Após este período de incubação, os blocos foram lavados cinco vezes com 2,0 mL de tampão CHEF-TE, em intervalos de uma hora sob leve agitação. Após a última lavagem, os blocos foram guardados a 4°C.

Etapa de restrição enzimática

Antes de realizar o tratamento enzimático, os blocos de agarose foram lavados cinco vezes com tampão DNS (Tris 0,1 M, pH 8,0; Cloreto de magnésio 5 mM), em intervalos de uma hora entre as lavagens. A restrição enzimática dos isolados de ERV foi realizada com 10U de enzima de restrição *Sma* (Invitrogen Life Techonologies, Carlsbad, EUA) por amostra, num período de aproximadamente 15 horas, a uma temperatura de incubação de 30°C. Para os isolados de *E.coli* ESBL, a restrição enzimática foi realizada com 10U de *Spe* (Invitrogen Life Techonologies, Carlsbad, EUA), por 15 horas a 37°C.

Preparo do gel

Os blocos tratados foram aplicados em gel de agarose a 1% (em TBE 0,5X). A eletroforese foi realizada no sistema CHEF-DRII (Bio-Rad, Richmond, EUA) e o tampão de corrida utilizado (2 litros de TBE 0,5X) foi acrescido de 200μL de tiouréa 0,5 M, somente para *E. coli*.[72]

Os padrões de variação da corrente elétrica (*switch time*) foram estabelecidos de acordo com o microrganismo estudado. Para *E. coli*, as condições de corrida foram de 5 a 30 segundos (*switch time* inicial-final), 6 V/cm (corrente elétrica) e período de corrida de 23 horas. Para ERV, as condições de corrida foram de 5 a 30 segundos (*switch time* inicial-final), 6 V/cm (corrente elétrica) e período de corrida de 24 horas.

Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (1μg/mL) por 40 minutos, descorados em água destilada por mais 40 minutos e fotografados.

3.4 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS (LPS)

A dosagem de endotoxinas no plasma foi realizada em duplicata, no LIM 37 do HCFMUSP, após a colheita de todas as amostras.

As amostras de sangue porta e sistêmico foram submetidas ao ensaio turbidimétrtico quantitativo para detecção de endotoxina "*limulus amebocyte lysate*" – LAL (Pyrogent-5000, Cambrex Bio Science, Walkersville, EUA).

O princípio do teste consiste na catalisação e ativação de uma pró-enzima no LAL pela endotoxina bacteriana. A enzima ativada hidrolisa uma proteína coagulável (coagulina), que forma um coágulo gelatinoso. O ensaio LAL turbidimétrico mede o aumento na densidade ótica, ou seja, a turvação que precede a etapa de formação do coágulo gelatinoso.

No intuito de se evitar ação de interferentes, as amostras foram diluídas, e posteriormente incubadas em microplacas para determinação da concentração de endotoxina. A análise foi realizada pelo software WinKQCL, conforme instrução do fabricante, e a concentração de endotoxina foi determinada através de comparação com a execução de uma série de padrões. De forma contínua, durante todo o ensaio, o leitor de microplacas é monitorado na absorbância de 340 nm de cada orifício da microplaca. Usando a leitura de absorbância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorbância aumente 0,03 unidades. Este tempo é denominado “tempo de reação”. O software WinKQCL executa automaticamente uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente.

A linearidade da curva padrão na faixa de concentração utilizada para determinação dos valores de endotoxina foi verificada. O valor absoluto do coeficiente de correlação da curva padrão foi maior ou igual a 0,980. Um controle positivo de produto (PPC) foi incluído nos testes. A reação ocorreu dentro dos limites de 0,01 a 100 EU/mL.

4. RESULTADOS

4.1 PARTE I - COLONIZAÇÃO DOS ANIMAIS

As amostras de fezes colhidas antes da administração dos antibióticos apresentaram crescimento positivo para *E. coli* (84,37%), *Streptococcus sp.* (56,25%), *Enterococcus sp.* (46,87%), *Proteus sp.* (46,87%), Staphylococcus *sp.* (15,62%) e *Edwardsiella sp.* (12,50%). Os resultados das coproculturas por animal, nos diferentes momentos de colheita, estão descritos no Anexo C.

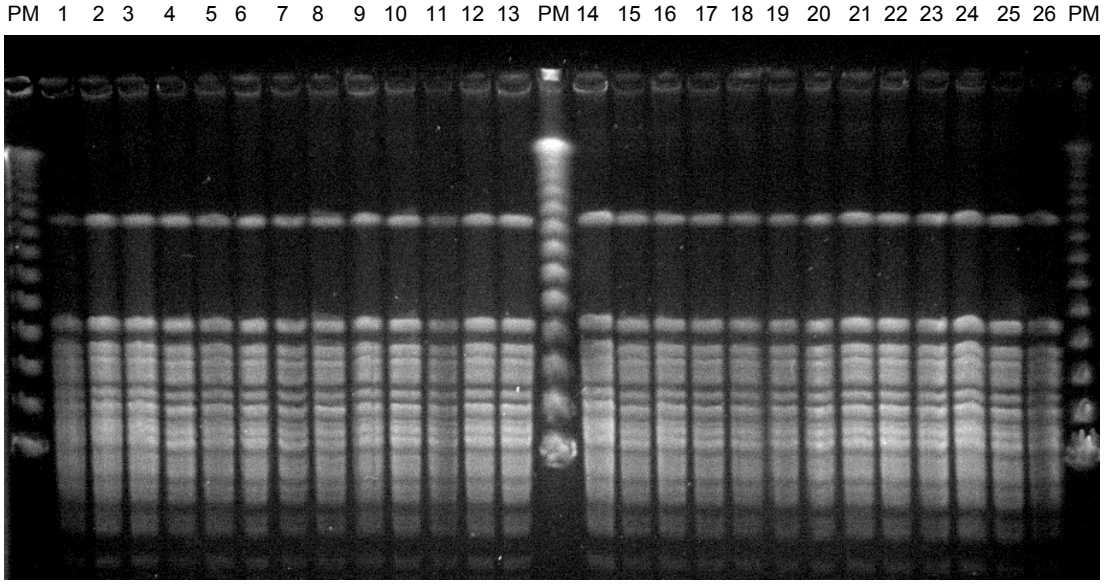
As doses dos antibióticos, as concentrações dos inóculos e o crescimento microbiológico de cepas de ERV e de *E. coli* ESBL recuperadas das fezes dos animais em 24, 48 e 72 horas, estão representadas na Tabela 1.

As caracterizações genotípicas das respectivas cepas, através da realização de tipagem molecular por PFGE, estão ilustradas nas Figuras 3 e 4.

Tabela 1 - Variação das doses dos antibióticos, concentrações dos inóculos e resultado do crescimento microbiológico de cepas de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina e de *E. coli* produtora de β-lactamase de espectro estendido recuperadas nas amostras de fezes nos protocolos do processo de colonização

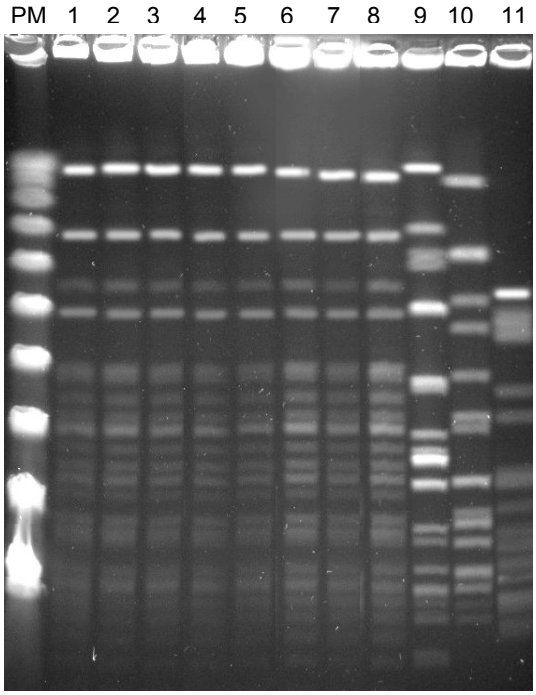
		Doses antibióticos				Número de ratos com cultura positiva					
				Concentração do inóculo (UFC/animal)		24 horas		48 horas		72 horas	
Protocolo	Numero total de ratos	Vancomicina (µg/ml)	Ceftriaxona (mg/mL)	ERV	EC	ERV	EC	ERV	EC	ERV	EC
1	4	250	1,4	$2x10^8$	$2x10^8$	0	0	1	0	1	0
2	4	500	1,4	$4,8x10^8$	$4,4x10^8$	2	0	0	0	4	0
3	5	750	3,5	$10,4x10^8$	$12x10^8$	4	0	2	0	4	0
4	5	750	3,5	$12x10^8$	$24x10^8$	5	0	1	0	1	0
5	4	750	0	$12x10^8$	$24x10^8$	0	0	0	0	0	0
6	4	0	3,5	$1,8x10^{10}$	$3,6x10^9$	0	0	0	0	0	0
7	4	750	0	$1,8x10^{10}$	$3,6x10^9$	0	0	0	0	0	0
8	4	750	3,5	$1,8x10^{10}$	$3,6x10^9$	4	0	0	0	2	0
9	4	750	2,1	$2,28x10^{10}$	$1,08x10^{10}$	3	4	2	3	1	0
10	4	750	2,1	$2,4x10^{10}$	$1,12x10^{10}$	4	4	3	2	2	1

ERV: *E. faecalis* resistente a vancomicina; EC: *E.coli* ESBL



PM: peso molecular; Colunas 4 a 10: rato 27; Colunas 11 a 17: rato 26; Colunas 18 a 25: rato 25; Coluna 26: *E. coli* ESBL inoculada

Figura 3 - Perfis moleculares de cepas de *E. coli* produtoras de β-lactamase de espectro estendido determinados por PFGE. 26 isolados obtidos de 4 animais após realização do processo de colonização.



PM: peso molecular; Coluna 1: rato 25; colunas 2 e 3: rato 26; colunas 4 a 6: rato 27; coluna 7: rato 28; coluna 8: *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina inoculado; coluna 9: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; coluna 10: *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina – cepa controle não relacionada; coluna 11: *Enterococcus faecium* – cepa controle não relacionada

Figura 4 - Perfis moleculares de cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes determinados por PFGE. Nove isolados obtidos de 4 animais após realização do processo de colonização

De acordo com o crescimento microbiológico e a caracterização genotípica de ERV e de *E. coli* ESBL recuperadas das fezes dos animais idênticas às cepas inoculadas, foram definidas as seguintes variáveis:

- As melhores doses de ceftriaxona e vancomicina foram, respectivamente, de 1,4 mg/mL (90 mg/kg/dia) e de 750 μg/ml (32mg/kg/dia). As doses por quilo/dia foram calculadas considerado o consumo médio de água por dia, que foi de 15 mL. O uso oral

destes antibióticos inicia-se 7 dias antes da inoculação e é mantido durante todo o experimento.

- A concentração ideal do inóculo foi de $2,28x10^{10}$ UFC/animal para ERV e de $1,08x10^{10}$ UFC/animal para *E. coli* ESBL.
- O tempo ideal de colonização foi de 24 horas após a inoculação.

4.2 PARTE II – ESTUDO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

4.2.1 Culturas

Os resultados do crescimento microbiológico de cepas bacterianas pré-definidas e especificamente para *E. coli* ESBL e para ERV estão relacionados, respectivamente, nas Tabelas 2, 3 e 4. As análises comparativas entre os grupos dois a dois com resultado estatisticamente significativos, para E. coli ESBL e para ERV, encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 5 e 6. Os resultados do crescimento de cada animal estão contidos no Anexo D.

Tabela 2 - Número e proporção (positivos/avaliados) de animais com crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. coli* ESBL positiva e/ou *E. faecalis* resistente a vancomicina por órgão ou tecido

Órgão ou Tecido	**Grupos**			
	I	**II**	**III**	**IV**
	n= 15	**n=15**	**n= 8**	**n=8**
Pulmão	13/15 (86,66%)	13/15 (86,66%)	6/8 (75%)	3/8 (37,5%)
Baço	11/15 (73,33%)	6/15 (40%)	3/8 37,5%)	0/8
Fígado	11/15 (73,33%)	10/15 (66,66%)	8/8 (100%)	4/8 (50%)
Sangue portal	2/12 (16,66%)	1/15 (6%)	0/7	1/8 (12,5%)
Sangue sistêmico	4/12 (33,33%)	1/15 (6%)	1/8 (12,5%)	0/8
Linfonodo mesentérico	12/15 (80 %)	5/15 (33,33%)	4/8 (50%)	1/8 (12,5%)
Linfonodo cervical	7/15 (46,66%)	6/15 (40%)	2/8 (25%)	1/8 (12,5%)

I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico.

Tabela 3 - Número e proporção (positivos/avaliados) de animais com crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. coli* ESBL por órgão ou tecido

Órgão ou Tecido	Grupos				
	I n= 15	II n=15	III n= 8	IV n=8	P*
Pulmão	10/15 (66,66%)	9/15 (60%)	6/8 (75%)	1/8 (12,5%)	0,044
Baço	3/15 (20%)	3/15 (20%)	2/8 (25%)	0/8	0,542
Fígado	8/15 (53,33%)	8/15 (53,33%)	6/8 (75%)	3/8 (37,5%)	0,512
Sangue portal	2/12 (16,66%)	1/15 (6%)	0/7	1/8 (12,5%)	0,643
Sangue sistêmico	3/12 (25%)	1/15 (6%)	1/7 (14,28%)	0/8	0,320
Linfonodo mesentérico	7/15 (46,66%)	3/15 (20%)	4/8 (50%)	1/8 (12,5%)	0,171
Linfonodo cervical	3/15 (20%)	4/15 (26,66%)	1/8 (12,5%)	1/8 (12,5%)	0,804

*Pearson qui-quadrado
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Tabela 4 - Número e proporção (positivos/avaliados) de animais com crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas de *E. faecalis* resistente a vancomicina por órgão ou tecido

Órgão ou Tecido	Grupos				
	I n= 15	II n=15	III n= 8	IV n=8	P*
Pulmão	11/15 (73,33%)	11/15 (73,33%)	5/8 (62,5%)	3/8 (37,5%)	0,307
Baço	6/15 (40%)	5/15 (33,33%)	2/8 (25%)	0/8	0,221
Fígado	11/15 (73,33%)	8/15 (53,33%)	8/8 (100%)	3/8 (37,5%)	0,039
Sangue portal	2/12 (16,66%)	1/15 (6%)	0/7	1/8 (12,5%)	0,643
Sangue sistêmico	2/12 (16,66%)	0/15	0/8	0/8	0,144
Linfonodo mesentérico	10/15 (66,66%)	2/15 (13,33%)	3/8 (37,5%)	0/8	0,002
Linfonodo cervical	5/12 (33,33%)	4/15 (26,66%)	1/8 (12,5%)	1/8 (12,5%)	0,585

*Pearson qui-quadrado
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico.

Tabela 5 - Resultado das análises comparativas estatisticamente significantes entre os grupos, para crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. coli* ESBL por órgão ou tecido

Órgão ou Tecido	Grupos Comparados	P*
Pulmão	I e IV	0,019
Pulmão	II eIV	0,038
Pulmão	III e IV	0,020

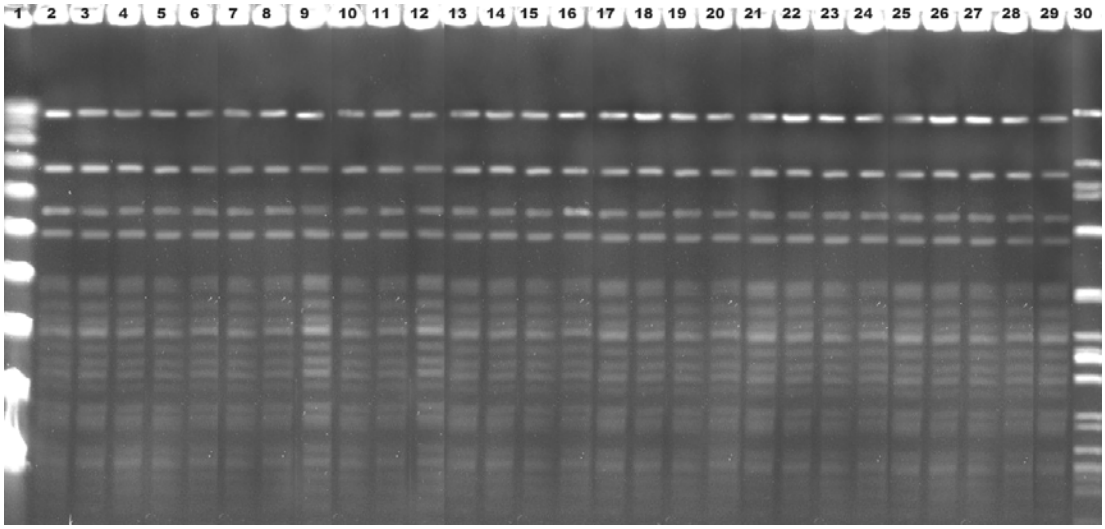
*Teste exato de Fisher
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Tabela 6 - Resultado das análises comparativas estatisticamente significantes entre os grupos, para crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. faecalis* resistente a vancomicina por órgão ou tecido

Órgão ou Tecido	Grupos Comparados	P*
Linfonodo mesentérico	I e IV	0,003
Linfonodo mesentérico	I e II	0,004
Fígado	II e III	0,026
Fígado	III e IV	0,013

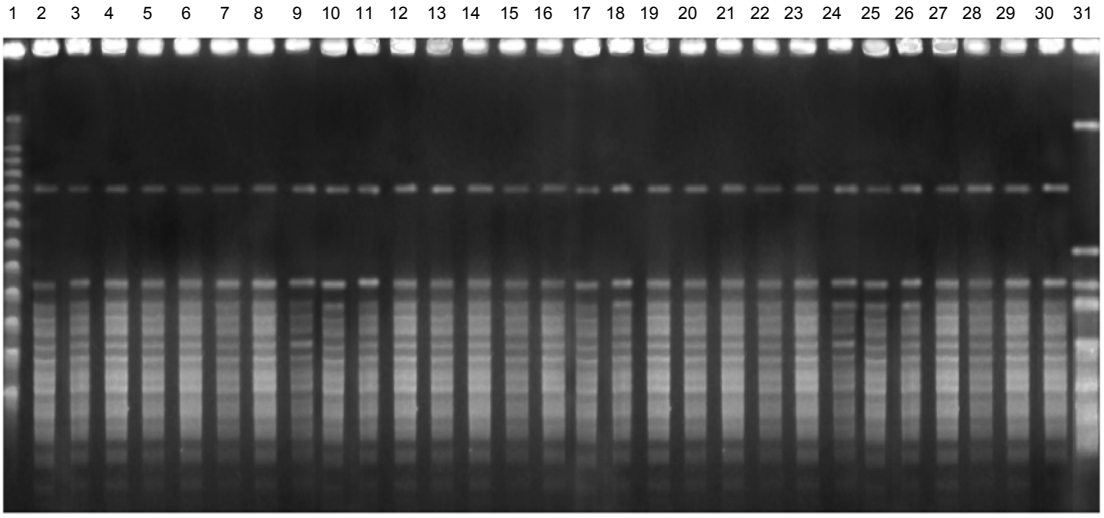
*Teste exato de Fisher
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

As caracterizações genotípicas de algumas cepas selecionadas, por PFGE, encontram-se nas Figuras 5 e 6.



Coluna1: peso molecular; Colunas 2 a 6: rato 8, grupo I - isolados respectivos do baço, fígado, linfonodo mesentérico, sangue sistêmico, linfonodo cervical; Colunas 7 a 9: rato 17, grupo I - isolados respectivos do pulmão, fígado, sangue portal; Colunas 10 a 13: rato 40, grupo II - isolados respectivos do baço, fígado, pulmão, linfonodo cervical; Colunas 14 a 18: rato 52, grupo II- isolados respectivos do baço, fígado, linfonodo mesentérico, pulmão, linfonodo cervical; Colunas 19 a 22: rato 16, grupo III - isolados respectivos do baço, fígado, linfonodo mesentérico, pulmão; Colunas 23 a 25: rato 20, grupo III - isolados respectivos do fígado, linfonodo mesentérico, pulmão: Colunas 26 e 27: rato 21, grupo III- isolados respectivos dopulmão e linfonodo mesentérico; Coluna 28: rato 24, sangue porta; Coluna 29: ERV inoculado; Coluna 30: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 -controle negativo.

Figura 5 - Perfis moleculares de cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes determinados por PFGE isoladas dos ratos nos diferentes grupos experimentais



Coluna 1: peso molecular; Colunas 2 a 6: rato 15, grupo I - isolados respectivos do baço, fígado, linfonodo mesentérico, sangue sistêmico, pulmão; Colunas 7 a 13, grupo I - isolados respectivos do baço, fígado, pulmão, linfonodo mesentérico, sangue sistêmico, linfonodo cervical, sangue porta; Colunas 14 a 17: rato 40, grupo II - isolados respectivos do pulmão, baço, fígado, sangue sistêmico; Colunas 18 a 20: rato 43, grupo II - isolados respectivos do fígado, linfonodo cervical, fígado. Coluna 21: rato 45, grupo II – sangue porta; Coluna 22: rato 27, grupo I – sangue porta; Coluna 23: rato 13, grupo I – sangue sistêmico; Colunas 23 a 25, grupo III - isoladas respectivos do pulmão, baço, fígado; Colunas 26 e 27: rato 24, grupo IV - isolados respectivos do fígado e sangue porta; Colunas 29 e 30: rato 30, grupo IV - isolados respectivos do fígado e linfonodo mesentérico; Coluna 30: *E.coli* ESBL inoculada; coluna 31: *E.coli* ATCC 25922 (controle negativo).

Figura 6 - Perfis moleculares de cepas de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamase de espectro ampliado determinados por PFGE isoladas de ratos nos diferentes grupos experimentais

4.2.2 Dosagem de endotoxinas

As médias, medianas e desvios padrões das dosagens de endotoxinas do sangue porta e sistêmico, nos diferentes grupos, estão representados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Os resultados da análise do teste de Tukey para concentração de endotoxina porta e sistêmico estão representados nas Tabelas 9 e 10 e nos Gráficos 1 e 2 . A dosagem de endotoxina por cada animal encontra-se no Anexo E.

Tabela 7 - Médias, medianas e desvios padrões das dosagens de endotoxina no sangue porta, nos diferentes grupos

	Grupos			
	I	**II**	**III**	**IV**
	n= 15	**N=15**	**n= 8**	**n=8**
Média	1,868	0,776	0,121	0,280
Mediana	0,650	0	0	0
Desvio padrão	3,230	1,322	0,321	0,737

P=0,247 (ANOVA)
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Tabela 8 - Médias, medianas e desvios padrões das dosagens de endotoxina no sangue sistêmico, nos diferentes grupos

	Grupos			
	I	**II**	**III**	**IV**
	n= 15	**n=15**	**n= 8**	**n=8**
Média	9,761	1,425	0,146	0,018
Mediana	1,605	0,420	0	0
Desvio padrão	13,804	2,179	0,385	0,051

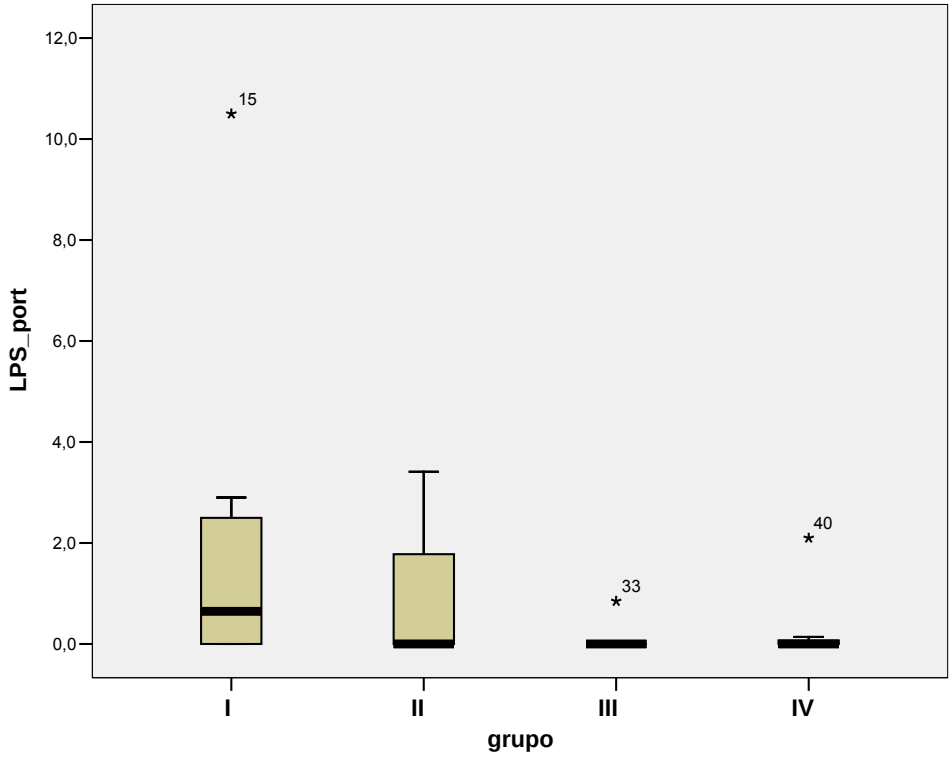
P =0,011 (ANOVA)
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Tabela 9 - Comparação das concentrações de endotoxinas no sangue porta, entre os diversos grupos

Grupos comparados	Diferença Média	Erro padrão	P*	Intervalo de confiança (95%)
I e II	0,8976	0,7210	0,603	-1,042 a 2,837
I e III	1,5519	0,8717	0,299	-0,793 a 3,896
I e IV	1,3933	0,8365	0,356	-0,857 a 3,643
II e III	0,6543	0,8484	0,867	-1,628 a 2,936
II e IV	0,4957	0,8123	0,928	-1,689 a 2,681
III e IV	-0,1586	0,9485	0,998	-2,710 a 2,393

* Teste de Tukey
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Gráfico 1 - Representação das dosagens de endotoxina em sangue porta nos diversos grupos



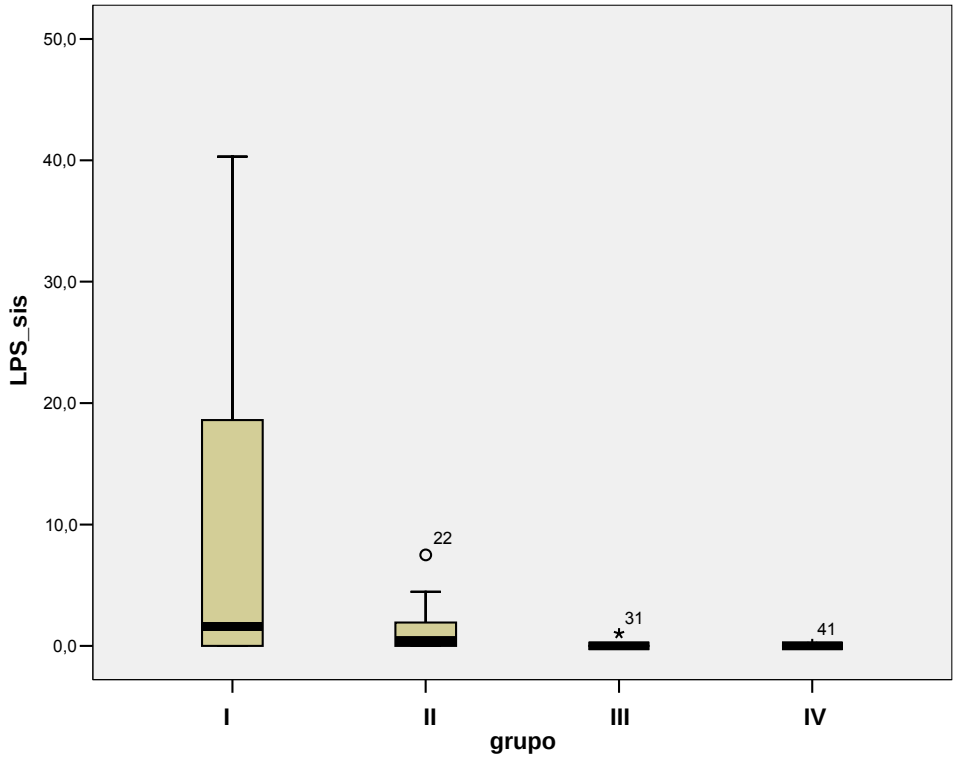
LPS port: concentração de endotoxina em sangue porta (EU/mL)
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Tabela 10 - Comparação das concentrações de endotoxinas no sangue sistêmico, entre os diversos grupos

Grupos comparados	Diferença Média	Erro padrão	P*	Intervalo de confiança (95%)
I e II	8,3360	2,9094	0,033	0,500 a 16,172
I e III	9,6335	3,3332	0,031	0,657 a 18, 610
I e IV	9,7431	3,3332	0,029	0,766 a 18,720
II e III	1,2975	3,1144	0,975	-7,090 a 9,685
II e IV	1,4071	3,1144	0,969	-6,981 a 9,795
III e IV	0,1096	3,5135	1,000	-9,353 a 9,572

* Teste de Tukey
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Gráfico 2 - Representação das dosagens de endotoxina em sangue sistêmico nos diferentes grupos



LPS sis: concentração de endotoxina em sangue sistêmico (EU/mL)
I: grupo cirúrgico isquemia hepática com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia hepática sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

5. DISCUSSÃO

A ocorrência de translocação bacteriana tem sido sugerida em diversos estudos experimentais e clínicos,[21,22] porém eles não demonstram que a bactéria detectada no sangue e em sítios estéreis têm efetivamente origem no TGI daquele animal ou paciente.

Na tentativa de comprovar que a bactéria detectada no sangue e em sítios estéreis tem efetivamente origem no TGI, alguns estudos experimentais utilizam modelos com inoculação de bactérias marcadas radioativamente (tm99 E.coli), [73,74] ou técnicas de biologia molecular.[75,76]

A primeira parte do atual estudo foi desenvolvida como uma alternativa para a avaliação futura de translocação bacteriana utilizando o perfil de resistência bacteriana como um marcador. Este modelo consiste em modelo experimental simples e dispensa o uso de material radioativo e técnicas elaboradas e dispendiosas que envolvem biologia molecular. Entretanto, alguns cuidados são necessários, pois utiliza microrganismos resistentes.

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus* constituem um grande porcentual da flora bacteriana habitual de ratos[77,78] e muitos estudos apontam as Gram-negativas dos gêneros *Enterobacter cloacae*[46] e *E. coli*[14,40,41] como os mais freqüentes agentes etiológicos de infecção sistêmica causada por meio da translocação. Portanto, a seleção dos microorganismos inoculados foi baseada nos agentes usuais da flora

intestinal e incluiu tanto uma bactéria Gram-negativa, *E. coli* ESBL, que possui papel bem descrito na ocorrência da translocação, quanto uma Gram-postiva, o ERV, que apesar de menos descrita constitui um microrganismo habitual da flora intestinal.

A primeira fase do processo de colonização consistiu na descolonização da flora intestinal habitual dos animais, com uso de vancomicina e ceftriaxona. O uso destes antibióticos não absorvidos pelo TGI acarretou na eliminação desta flora e, assim, permitiu um melhor crescimento bacteriano das cepas inoculadas, resistentes a estes antibióticos, proporcionando a colonização do TGI por estes microorganismos.

O estudo da colonização foi realizado em etapas (protocolos) e a análise dos resultados se baseou no crescimento microbiológico das amostras de fezes realizado para cada experimento.

Nos primeiros experimentos, houve fraco crescimento microbiológico das cepas de ERV e nulo para as cepas de *E.coli* ESBL. Por outro lado, houve crescimento de outras bactérias fenotipicamente diferentes. Este padrão foi mantido mesmo quando se usou apenas um dos dois antibióticos. Esta ausência de crescimento bacteriano sustenta a hipótese de que a presença de antibióticos predispõe à colonização do TGI.[79, 80]

O inicial insucesso no resgate das cepas inoculadas, associado à alta frequência de crescimento de outras cepas, fez com que a dose dos antibióticos e as concentrações dos inóculos fossem ajustadas, até que o resgate dos microorganismos inoculados fosse representativamente considerável, o que ocorreu com o protocolo 9 e, posteriormente, foi

confirmado com o protocolo 10. Com isto, pôde-se determinar as melhores doses dos antibióticos, as concentrações ideais dos inóculos bacterianos e o tempo ideal de colonização. A semelhança genotípica dos microorganismos inoculados foi comprovada através da análise do gel de PFGE.

Desta maneira, conseguimos desenvolver um modelo alternativo simples, de baixo custo e provavelmente facilmente reprodutível, onde ratos colonizados com bactérias resistentes puderam ser usados no estudo da translocação bacteriana.

Vários estudos demonstram que alterações na barreira intestinal podem predispor ao aumento de sua permeabilidade, com conseqüente ocorrência de translocação bacteriana.[2,4,19,25,26,27,30]

A lesão de isquemia intestinal constitui uma alteração de principal importância, onde a lesão por hipóxia provoca ruptura da barreira normal. Além disso, vários estudos têm demonstrado que, quando associada ao fenômeno de reperfusão, ocorre o acúmulo de oxidantes tóxicos, induzindo a lesão celular e, conseqüentemente, ruptura da integridade da membrana celular.[2] Os oxidantes, além de causarem lesão tecidual direta, podem promover uma resposta inflamatória intestinal, com produção de mediadores químicos que aumentam ainda mais a permeabilidade intestinal.

A isquemia e reperfusão hepática causam alterações funcionais e estruturais na célula hepática, reduzindo sua capacidade e clareamento.

Alguns fatores como a estase sangüínea intestinal decorrente da estase portal, a lesão de IR intestinal e a diminuição do clareamento hepático propiciam a ocorrência de translocação. Portanto, para a avaliação

da translocação bacteriana, no presente estudo, utilizou-se modelo experimental onde alguns animais foram submetidos a lesão de IR hepática total com estase sangüínea intestinal, e outros a IR hepática parcial sem estase intestinal. Desta forma, este modelo interferiu na fase final do mecanismo de defesa contra a translocação, o eixo fígado-intestino.

Os modelos descritos na literatura submetem todo o fígado ou apenas segmentos a tempos diferentes de isquemia e reperfusão. O tempo em que o animal é submetido à lesão de IR está relacionado com a gravidade das alterações encontradas, podendo ocorrer lesões irreversíveis no fígado e repercussões à distância, causando até mesmo o óbito do animal.

Os tempos de IR utilizados neste estudo foram determinados por meio de estudo piloto e de análise de dados da literatura. Em animais com pinçamento do pedículo hepático comum dos lobos mediano e ântero-lateral esquerdo, como no grupo II do atual estudo, permite-se a drenagem venosa portal através dos demais segmentos hepáticos, possibilitando tempos de isquemia mais prolongados e minimizando a interferência dos mediadores químicos inflamatórios secundários a estase intestinal. Nestes casos, tempos de isquemia inferiores a 60 minutos não demonstram causar lesões teciduais, mas tempos superiores a 120 minutos acarretam em aumento significativo da mortalidade.[81] Estes tempos encontram-se reduzidos quando a isquemia hepática é total, sendo que após 60 minutos já existem evidências de lesão histológica permanente.[82] Após 90 minutos, o fígado sofre alterações funcionais que podem aumentar a morbidade e a mortalidade do animal.[83]

Deste modo, através de estudo piloto o tempo de isquemia ficou estabelecido como 30 minutos, pois tempos superiores constituíam em alto risco de morte dos animais.

O tempo de reperfusão foi também determinado por estudo piloto, baseando-se nos dados encontrados na literatura. Até 60% das lesões secundárias causadas pelos radicais livres são observadas em 60 minutos de reperfusão.[81] Deste modo, o tempo de 60 minutos de reperfusão foi considerado como sendo suficiente para evidenciar translocação bacteriana.

A translocação foi avaliada em dois grupos, submetidos a lesão de isquemia e reperfusão hepática total ou parcial. Os 30 minutos de isquemia associados aos 60 minutos de reperfusão foram suficientes para comprometer o clareamento hepático e promover a passagem de bactérias e de seus produtos para sítios estéreis.

O fato da ocorrência da translocação bacteriana é inegável. Os resultados obtidos evidenciaram presença marcante de crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E. coli* ESBL e/ou ERV na maioria dos órgãos ou tecidos analisados nos diferentes grupos. As mesmas bactérias inoculadas, marcadas através do perfil de resistência, foram encontradas em diversos sítios estéreis tanto nos grupos cirúrgicos como nos grupos controle. Desta forma, conseguimos comprovar que a bactéria detectada em sítios estéreis tinha efetivamente origem no TGI daquele animal.

O aumento da permeabilidade intestinal, causado pela estase sangüínea decorrente da estase portal, ocorrida no grupo onde a isquemia hepática foi total, provavelmente intensificou o processo de translocação.

Além do aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, outras condições como sobrecrescimento bacteriano intestinal ou deficiência na imunidade do hospedeiro podem estar relacionadas com a ocorrência da translocação bacteriana. [10,11,15]

Uma solução bacteriana concentrada ($2,3x10^{10}$) de ERV e de *E.coli* ESBL foi inoculada, via gavagem, em todos os animais do experimento, incluindo o grupo controle. Adicionalmente, submetemos animais ao estresse cirúrgico (grupo III) e ao fenômeno de isquemia e reperfusão hepática parcial (grupo II) e total (grupo I).

Aparentemente, a translocação ocorreu de forma mais intensa nos grupos cirúrgicos, inclusive no controle cirúrgico, e de forma mais branda, embora presente, no grupo controle não cirúrgico.

Todos os animais do presente estudo estavam sob a condição de sobrecrescimento bacteriano intestinal. Estudos demonstram que este sobrecrescimento pode ser o único fator responsável pela translocação, ou seja, o aumento da concentração bacteriana intestinal pode provocar translocação mesmo quando há integridade da barreira intestinal e aparente normalidade da condição imunológica do hospedeiro.[15]

O grupo controle não cirúrgico (grupo IV), no qual os animais somente receberam a solução bacteriana, representa claramente este contexto. Neste grupo, as condições de sobrecrescimento favoreceram a ocorrência da translocação, mesmo na ausência de outros fatores indutores.

Por outro lado, a detecção de translocação no controle cirúrgico foi marcante, algumas vezes não existindo diferença significante quando

comparado com os grupos com IR hepática. Este fato demonstra que o procedimento cirúrgico, por si só, constituiu um fator de trauma suficiente para provocar a translocação das bactérias da luz intestinal para os sítios extra-intestinais analisados.

O grupo que sofreu isquemia e reperfusão com estase intestinal apresentou, em alguns sítios, proporção de positividade de culturas maior do que os demais grupos, sugerindo que a permeabilidade intestinal aumentada deste grupo pode ter sido um fator indutor da translocação.

Em relação ao crescimento de *E. coli* ESBL e de ERV, as diferenças entre os grupos foram detectadas em órgãos sólidos – pulmão, linfonodos mesentéricos e fígado. A presença preferencial das bactérias por estes tecidos pode ser explicada se considerarmos que estes órgãos sólidos são reconhecidos, eminentemente, como filtradores ou, no caso do pulmão, alvo inicial da agressão inflamatória.

A translocação bacteriana ocorre por duas vias: hematogênica e linfática.[16,47,48,49,50] Pela via hematogênica, as bactérias do TGI atingem a circulação porta e sofrem um processo de clareamento no fígado. Esta via justifica o significativo nível de bactérias recuperadas no fígado. Pela via linfática, as bactérias atingem sítios estéreis passando, inicialmente, pelos LNM, justificando o grande número de bactérias detectadas neste órgão.

O isolamento de bactérias no sangue não foi tão comum quanto em outros sítios. Algumas possibilidades podem ser consideradas. Um fator que pode estar associado é baixa sensibilidade dos métodos de hemocultura utilizados. Por outro lado, se considerarmos, como demonstram vários

estudos,[47,48,49] que a migração de bactérias ocorre preferencialmente pela via linfática, um menor crescimento nas hemoculturas seria esperado. Desta forma poderíamos considerar que a translocação destas bactérias não tenha sido predominantemente pela via porta e que os resultados encontrados foram de fato negativos.

Outro fator a ser considerado é o tempo em que foi realizada a colheita do sangue, após 60 minutos de reperfusão. A translocação, conforme descrita, parece acontecer em poucos minutos ou até em segundos. Portanto, deve-se considerar que o tempo definido para a colheita do sangue para a análise microbiológica pode não ter sido o mais adequado. Desta forma, a passagem das bactérias pela via porta e a sua retenção nos diferentes órgãos pode ter sido causa da menor recuperação de bactérias no sangue.

Em relação às endotoxinas, sua presença no sangue porta e sistêmico foi detectada tanto nos grupos cirúrgicos como nos grupos controles. Estudos sugerem que a translocação das endotoxinas ocorra preferencialmente através do sangue porta. Estes produtos bacterianos atingem o fígado, onde as células do sistema reticuloendotelial exercem importante papel no bloqueio da passagem para a circulação sistêmica e outros órgãos.[57,58,59]

Quando o fígado é submetido a um período de isquemia ocorrem diversas alterações funcionais no órgão. Os grupos cirúrgicos deste estudo foram submetidos a lesão de isquemia hepática tanto parcialmente (grupo II) quanto totalmente (grupo I). Conseqüentemente, a atividade do clareamento hepático nestes animais ficou reduzida e assim se manteve ao longo do

período de revascularização. Segundo dados de literatura, estas alterações acabam provocando a liberação de maiores quantidades de endotoxina, que atingem a circulação sistêmica, podendo provocar alterações em outros órgãos, como, por exemplo, o processo inflamatório pulmonar com conseqüentes distúrbios funcionais.[84,85]

Outro fator que pode estar relacionado com a alteração na função de clareamento hepático é a presença maciça de endotoxina, ou seja, em quantidade acima da capacidade de metabolização pelo fígado. Estudos têm demonstrado que o fígado possui capacidade de eliminar endotoxinas somente até uma determinada quantidade.[86]

O resultado das análises comparativas para a concentração de endotoxinas entre os grupos revelou alteração significante em relação à concentração no sangue sistêmico dos animais que foram submetidos a isquemia hepática total com estase intestinal. Este fato provavelmente está associado às alterações do clareamento hepático descritas acima. Nestes animais, a isquemia total do órgão poderia estar comprometendo totalmente a capacidade de clareamento hepático, permitindo a liberação de maior quantidade de endotoxina para o sangue sistêmico. Adicionalmente, o aumento da permeabilidade intestinal, causado pela estase sangüínea intestinal decorrente da estase portal, ocorrida somente neste grupo, pode estar associado à maior concentração detectada neste grupo.

Por outro lado, os animais que sofreram isquemia hepática parcial sem estase venosa intestinal, ainda possuíam uma porcentagem de parênquima hepático funcionante que talvez tenha sido capaz de clarear em

parte as endotoxinas translocadas, não causando alteração significante na concentração quando comparado com os grupos controle.

Quanto à dosagem de endotoxina no sangue porta, nenhuma alteração significante foi encontrada entre os grupos analisados. Conforme já descrito, a estase sangüínea intestinal decorrente da estase portal e a lesão de IR intestinal são fatores que propiciam a ocorrência de translocação. Baseado nestes fatos, alterações significantes também em relação à concentração de endotoxinas no sangue porta nos diferentes grupos seriam esperadas. Mais uma vez, o tempo de colheita do sangue pode ter sido o responsável por estes resultados. Se considerarmos que a translocação consiste em um fenômeno precoce, quando a colheita foi realizada, após 60 minutos de reperfusão, grande parte das endotoxinas poderia já ter transmigrado.

O estudo da translocação bacteriana determinou, portanto, translocação tanto de bactérias quanto de endotoxinas do TGI para sítios estéreis, em todos os grupos analisados. O fenômeno foi mais intenso nos animais submetidos a IR hepática total com estase sanguínea intestinal.

6. CONCLUSÕES

1. O estudo desenvolveu modelo de colonização do TGI de ratos com cepas de *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido e de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, que proporciona a viabilidade de estudos experimentais de translocação bacteriana.

2. A translocação de bactérias do TGI para sítios estéreis foi demonstrada.

3. Translocação bacteriana ocorreu tanto em animais submetidos a isquemia e reperfusão hepática com e sem estase intestinal, quanto nos controles cirúrgicos e não cirúrgicos.

4. A translocação de *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido para o pulmão ocorreu com maior freqüência nos grupos cirúrgicos, inclusive controle, do que no controle não cirúrgico.

5. A translocação de *Enterococcus faecalis* para linfonodos mesentéricos ocorreu com maior freqüência nos ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática com estase intestinal.

6. A translocação de endotoxinas, medida pela concentração sanguínea sistêmica, ocorreu com maior intensidade nos ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática com estase intestinal.

7. Não houve diferenças entre os grupos quanto à proporção de animais com cultura positiva no sangue sistêmico e porta e à concentração de endotoxinas no sangue porta.

7. ANEXOS

ANEXO A

1. MEIO SELETIVO PARA DETECÇÃO DE *E. COLI* RESISTENTE A CEFTRIAXONA (CIM>100μG/ML)

- *Composição:* Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) acrescido de 100μg/mL de ceftriaxona e 0,015% de azul de bromotimol

- *Preparo do indicador (solução a 1,5%)*
  Pesar 1,5g do indicador de azul de bromotimol;
  Dissolver em 100mL de etanol 95%;
  Estocar em frasco escuro à temperatura ambiente.

- *Preparo do meio*
  Pesar e hidratar o meio de acordo com as especificações do fabricante;
  Adicionar 1mL do indicador para cada litro de caldo BHI;
  Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
  Esfriar a temperatura ambiente e adicionar 0,1mL de ceftriaxona 1mg/mL (concentração final de 100μg/mL);
  Distribuir alíquotas de 1mL em tubos de vidro com tampa de rosca;
  Armazenar a 4°C.

- *Interpretação*
  Cor original do meio – verde
  Positivo – desenvolvimento de cor amarela
  Negativo – inalterado

2. MEIO SELETIVO PARA DETECÇÃO DE VER (*ENTEROCCUS*-VANCOMICINA-RESISTENTE)

- *Composição:* Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) acrescido de 6μg/mL de vancomicina e 0,016% de púrpura de bromocresol

- *Preparo do indicador (solução a 1,6%)*
  Pesar 1,6g do indicador de púrpura de bromocresol;
  Dissolver em 100mL de etanol 95%;
  Estocar em frasco escuro sob refrigeração.

- *Preparo do meio*
  Pesar e hidratar o meio de acordo com as especificações do fabricante;
  Adicionar 1mL do indicador para cada litro de caldo BHI;
  Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
  Esfriar a temperatura ambiente e adicionar 0,6mL de vancomicina 10mg/mL (concentração final de 6μg/mL) para cada litro de meio;
  Distribuir alíquotas de 1mL em tubos de vidro com tampa de rosca;
  Armazenar a 4°C.

- *Interpretação*
  Cor original do meio – roxa
  Positivo – desenvolvimento de cor amarela
  Negativo – inalterado (roxa)

ANEXO B

Quadro1: Características do crescimento bacteriano nos diversos meios de cultura para *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*

	Enterococcus faecalis	*Escherichia coli*
Tamanho	Médio	Médio
Borda	Circular	Circular
Elevação	Elevada	Achatada
Densidade	Opaca	Opaca
Cor	Cinza	Rosa (no MC)**
Consistência	Brilhante	Seca
Hemólise em AS*	Ausente	Beta- Hemólise
Crescimento em MC**	Ausente	Presente

FONTE: Adaptado de OPLUSTIL, 2004 [65]
* AS: Agar sangue de carneiro 5%; ** MC: meio Mac Conkey

Anexo C - Resultado do crescimento microbiológico das amostras de fezes, de cada rato, durante as diferentes fases do processo de colonização

Protocolo	N° do animal	Pré ATB	Pré inoculação	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
1	Rato 1	1,5	8	2, 3	2, 3	2, 3
	Rato 2	1, 5	3	2, 3	2, 3	2, 3
	Rato 3	9	8	2, 3	2, 3	2, 3
	Rato 4	1, 5	2, 3	2, 3	2, 3	2, 3
2	Rato 5	1, 4, 5	2, 3	2, 3	2, 3	2, 3
	Rato 6	1, 4, 5, 6	2, 3	2, 3	2, 3	1, 2, 3
	Rato 7	1, 3, 4, 5, 6	2, 3	2, 3	1, 2, 3	2, 3
	Rato 8	1, 4, 5	2, 3, 7	2, 3	2, 3	1, 2, 3
3	Rato 9	1, 2	4	2	8	8
	Rato 10	1, 4, 5	7	2	2	2
	Rato 11	4, 5, 6	2, 3	2	2	2
	Rato 12	1, 2, 4	1, 2	2	2	2
	Rato 13	1, 4	2	2	2, 7	2
4	Rato 14	1, 2, 4, 5	2, 4	2	2	2
	Rato 15	1, 2, 4	8	2	8	8
	Rato 16	1, 2, 4	2	2	2	2
	Rato 17	1, 4, 5	8	2	3	3
	Rato 18	1, 2, 3, 4	8	2	8	3
5	Rato 19	1, 2, 3, 4	1, 2	1, 2, 3	3	3
	Rato 20	1, 4	1	1	7	7
	Rato 21	2, 3, 8	8	3	3	3
	Rato 22	2, 3	8	1	7	8
6	Rato 23	1, 5	2	2	2	2
	Rato 24	2, 3, 4	2	8	2	2
	Rato 25	1, 2, 3, 4	8	8	2	2
	Rato 26	2, 3, 4	2	8	8	2
7	Rato 27	5	8	5	8	3
	Rato 28	1, 4	8	7	7	7
	Rato 29	1, 5	8	7	8	8
	Rato 30	1, 2, 4	8	1	8	8
8	Rato 31	1, 4	2	2	2	2
	Rato 32	1, 5	8	2	2	2
	Rato 33	1, 2, 5	8	2	1, 2	2, 3
	Rato 34	1, 2, 6	8	2	3	3
9	Rato 35	1, 2, 4	2, 3	1	1, 2	2, 3, 4
	Rato 36	1, 2, 5	3	1, 2, 3	1, 2, 3	2, 3
	Rato 37	1, 2, 3	2, 3	1, 2	1, 2, 4	9
	Rato 38	2, 4	8	1, 2	8	3
10	Rato 39	1, 2, 5	8	1, 2	1, 2	1
	Rato 40	1, 2, 6	8	1, 2, 3	2, 3	2
	Rato 41	1, 2, 3	3	1, 2	1	2, 3
	Rato 42	1, 2	3	1, 2	2	3

1:*E.coli*; 2: *Entercocus sp*; 3: *Sthaphylococus sp*; 4*: Streptococus sp*; 5: *Proteus sp*;
6: *Edwardsiella sp*; 7: BGN; 8: ausência de crescimento bacteriano; 9: sem amostra

Anexo D - Resultados do crescimento microbiológico para cepas bacterianas inoculadas resgatadas nas amostras de fezes de cada rato durante o estudo da Translocação Bacteriana

Tabela 1- Resultado do crescimento microbiológico para cepas bacterianas ERV por órgão ou tecido nos diferente grupos

	grupo	pulmão	baço	fígado	sangue porta	sangue sistêmico	linfonodo mesentérico	linfonodo cervical
rato 1	I	1	1	1	0	0	0	1
rato 2	I	1	1	1	0	0	1	1
rato 3	I	1	0	0			1	0
rato 4	I	1	0	0			1	1
rato 6	I	1	0	1	0	0	1	1
rato 7	I	0	0	0	0	0	1	0
rato 8	I	0	1	1	0	1	1	1
rato 10	I	1	1	1			1	0
rato 11	I	1	0	1	0	0	1	0
rato 12	I	1	0	1	0	0	1	0
rato 13	I	0	1	0	0	1	0	0
rato 15	I	1	1	1	0	0	1	0
rato 17	I	1	0	1	1	0	0	0
rato 26	I	0	0	1	0	0	0	0
rato 27	I	1	0	1	1	0	0	0
rato 5	II	1	1	1	0	0	0	1
rato 40	II	1	1	1	0	0	0	1
rato 41	II	1	0	1	0	0	0	0
rato 42	II	1	1	1	0	0	0	0
rato 43	II	1	0	1	0	0	0	1
rato 44	II	1	0	0	0	0	0	0
rato 45	II	0	0	0	1	0	1	0
rato 46	II	0	0	0	0	0	0	0
rato 47	II	0	0	0	0	0	0	0
rato 49	II	0	1	0	0	0	0	0
rato 50	II	1	0	0	0	0	0	0
rato 51	II	1	0	0	0	0	0	0
rato 52	II	1	1	1	0	0	1	1
rato 53	II	1	0	1	0	0	0	0
rato 54	II	1	0	1	0	0	0	0
rato 9	III	0	0	1	0	0	0	0
rato 14	III	0	0	1		0	0	0
rato 16	III	1	1	1	0	0	1	0
rato 18	III	1	0	1	0	0	1	0
rato 19	III	1	1	1	0	0	0	1
rato 20	III	1	0	1	0	0	1	0
rato 33	III	0	0	1	0	0	0	0
rato 35	III	1	0	1	0	0	0	0
rato 21	IV	1	0	0	0	0	0	1
rato 22	IV	0	0	1	0	0	0	0
rato 23	IV	0	0	0	0	0	0	0
rato 24	IV	0	0	0	1	0	0	0
rato 30	IV	1	0	0	0	0	0	0
rato 32	IV	0	0	1	0	0	0	0
rato 36	IV	0	0	1	0	0	0	0
rato 38	IV	1	0	0	0	0	0	0

I: grupo cirúrgico isquemia com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico 0: ausência crescimento microbiológico (negativo); 1: presença de crescimento microbiológico (positivo); Casa em branco (vazios) - sem amostra.

Tabela 2- Resultado do crescimento microbiológico para cepas bacterianas *E. coli* ESBL positiva por órgão ou tecido nos diferente grupos

	grupo	pulmão	baço	fígado	sangue porta	sangue sistêmico	linfonodo mesentérico	linfonodo cervical
rato 1	I	0	0	0	0	0	1	0
rato 2	I	0	0	1	0	0	1	0
rato 3	I	1	0	0			0	0
rato 4	I	0	0	0			1	0
rato 6	I	1	0	1	0	0	0	0
rato 7	I	1	0	0	0	0	0	0
rato 8	I	1	1	1	0	0	1	1
rato 10	I	0	0	0			1	0
rato 11	I	1	0	0	0	0	0	1
rato 12	I	1	0	1	0	0	0	0
rato 13	I	0	0	0	0	1	0	0
rato 15	I	1	1	1	0	1	1	0
rato 17	I	1	1	1	1	1	1	1
rato 26	I	1	0	1	0	0	0	0
rato 27	I	1	0	1	1	0	0	0
rato 5	II	0	0	0	0	0	1	1
rato 40	II	1	1	1	0	1	0	0
rato 41	II	1	0	1	0	0	0	0
rato 42	II	1	0	0	0	0	0	1
rato 43	II	1	0	1	0	0	0	1
rato 44	II	1	0	1	0	0	1	0
rato 45	II	0	0	0	1	0	0	0
rato 46	II	1	0	1	0	0	0	0
rato 47	II	0	0	0	0	0	0	0
rato 49	II	1	1	0	0	0	0	0
rato 50	II	0	0	0	0	0	0	0
rato 51	II	0	0	0	0	0	0	0
rato 52	II	1	0	1	0	0	0	0
rato 53	II	0	1	1	0	0	0	0
rato 54	II	1	0	1	0	0	1	1
rato 9	III	1	1	1	0	1	1	0
rato 14	III	0	0	0		0	0	0
rato 16	III	1	0	1	0	0	1	1
rato 18	III	1	0	1	0	0	1	0
rato 19	III	1	1	1	0	0	0	0
rato 20	III	1	0	1	0	0	1	0
rato 33	III	0	0	0	0	0	0	0
rato 35	III	1	0	1	0	0	0	0
rato 21	IV	1	0	0	0	0	0	1
rato 22	IV	0	0	1	0	0	0	0
rato 23	IV	0	0	0	0	0	0	0
rato 24	IV	0	0	1	1	0	0	0
rato 30	IV	0	0	1	0	0	1	0
rato 32	IV	0	0	0	0	0	0	0
rato 36	IV	0	0	0	0	0	0	0
rato 38	IV	0	0	0	0	0	0	0

I: grupo cirúrgico isquemia com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia sem estase intestinal; III:grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico 0: ausência crescimento microbiológico (negativo); 1: presença de crescimento microbiológico (positivo); Casa em branco (vazios) - sem amostra

Anexo D - Resultado das análises estatísticas comparativas entre os grupos

Tabela 1- Resultado das análises estatísticas comparativas entre os grupos para crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas ERV por órgão ou tecido

Órgão ou Tecido	Grupos Comparados	P*
Pulmão	I e II	0,659
	I e III	0,467
	I e IV	0,11
	II e III	0,467
	II e IV	0,11
	III e IV	0,31
Baço	I e II	0,5
	I e III	0,404
	I e IV	0,058
	II e III	0,533
	II e IV	0,089
	III e IV	0,233
Fígado	I e II	0,225
	I e III	0,154
	I e IV	0,11
	II e III	0,026
	II e IV	0,389
	III e IV	0,013
Sangue Porta	I e II	0,414
	I e III	0,385
	I e IV	0,656
	II e III	0,682
	II e IV	0,582
	III e IV	0,533
Sangue Sistêmico	I e II	0,188
	I e III	0,347
	I e IV	0,347
Linfonodo Mesentérico	I e II	0,004
	I e III	0,184
	I e IV	0,03
	II e III	0,208
	II e IV	0,415
	III e IV	0,1
Linfonodo Cervical	I e II	0,5
	I e III	0,288
	I e IV	0,288
	II e III	0,414
	II e IV	0,414
	III e IV	0,767

*qui-quadrado ou teste exato de Fisher; I: grupo cirúrgico isquemia com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia sem estase intestinal; III:grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Tabela 2 - Resultado das análises estatísticas comparativas entre os grupos para crescimento microbiológico positivo para cepas bacterianas *E.coli ESBL* por órgão ou tecido

Órgão ou Tecido	Grupos Comparados	P*
Pulmão	I e II	0,5
	I e III	0,533
	I e IV	0,19
	II e III	0,404
	II e IV	0,038
	III e IV	0,02
Baço	I e II	0,674
	I e III	0,586
	I e IV	0,257
	II e III	0,586
	II e IV	0,257
	III e IV	0,233
Fígado	I e II	0,642
	I e III	0,29
	I e IV	0,389
	II e III	0,29
	II e IV	0,389
	III e IV	0,157
Sangue Porta	I e II	0,414
	I e III	0,389
	I e IV	0,656
	II e III	0,682
	II e IV	0,585
	III e IV	0,533
Sangue Sistêmico	I e II	0,216
	I e III	0,465
	I e IV	0,193
	II e III	0,585
	II e IV	0,654
	III e IV	0,5
Linfonodo Mesentérico	I e II	0,123
	I e III	0,611
	I e IV	0,118
	II e III	0,152
	II e IV	0,565
	III e IV	0,141
Linfonodo Cervical	I e II	0,5
	I e III	0,565
	I e IV	0,0565
	II e III	0,414
	II e IV	0,414
	III e IV	0,767

*qui-quadrado ou teste exato de Fisher; I: grupo cirúrgico isquemia com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia sem estase intestinal; III:grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

Anexo E - Resultado das dosagens de endotoxina nas amostras sanguíneas porta e sistêmica nos diferentes grupos avaliados durante o estudo da Translocação Bacteriana

	grupo	Dosagem de Endotoxina Sangüínea (EU/mL)	
		sangue porta	sangue sistêmico
rato 1	I	<0,01	<0,01
rato 2	I	1,48	12,4
rato 3	I		
rato 4	I		
rato 6	I	2,5	18,6
rato 7	I	1,3	23,1
rato 8	I	2,9	3,21
rato 10	I	<0,01	40,3
rato 11	I	<0,01	
rato 12	I	<0,01	<0,01
rato 13	I	<0,01	<0,01
rato 15	I	<0,01	<0,01
rato 17	I		
rato 26	I	1,4	
rato 27	I	10,5	<0,01
rato 5	II	<0,01	<0,01
rato 40	II	<0,01	4,45
rato 41	II	<0,01	<0,01
rato 42	II	<0,01	<0,01
rato 43	II	<0,01	<0,01
rato 44	II	<0,01	0,84
rato 45	II	<0,01	7,49
rato 46	II	1,78	1,92
rato 47	II	3,2	<0,01
rato 49	II	2,47	<0,01
rato 50	II	<0,01	<0,01
rato 51	II	3,41	2,42
rato 52	II	<0,01	1,4
rato 53	II		
rato 54	II	<0,01	1,43
rato 9	III	<0,01	1,02
rato 14	III		<0,01
rato 16	III	0,85	<0,01
rato 18	III	<0,01	<0,01
rato 19	III	<0,01	<0,01
rato 20	III	<0,01	<0,01
rato 33	III	<0,01	<0,01
rato 35	III	<0,01	<0,01
rato 21	IV	<0,01	<0,01
rato 22	IV	2,1	<0,01
rato 23	IV	0,14	0,143
rato 24	IV	<0,01	<0,01
rato 30	IV	<0,01	<0,01
rato 32	IV	<0,01	<0,01
rato 36	IV	<0,01	<0,01
rato 38	IV	<0,01	<0,01

I: grupo cirúrgico isquemia com estase intestinal; II: grupo cirúrgico isquemia sem estase intestinal; III: grupo controle cirúrgico; IV: grupo controle não cirúrgico

8. REFERÊNCIAS

1. Simon GL, Gorbach SL. The human intestinal microflora. *Dig Dis Sci*. 1994;31:147-162.

2. Swank GM, Deitch EA. Role of gut in multiple organ falurie: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg.* 1996;20:411-7.

3. Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal Barrier Function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5:685-694.

4. Yassin MM, Barros AA, Parks TG, Soong CV, Halliday MI, Mccaigue MD, Erwin PJ, Rowlands BJ. Lower limb ischaemia-reperfusion injury causes endotoxaemia and endogenous antiendotoxin antibody consumption but not bacterial translocation. *Br J Surg*. 1998;85:785-9.

5. Wolochow H, Hildelbrand GJ, Lamanna C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J Infect Dis.* 1966;116:523-529.

6. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymphnodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*. 1979;26:403-411.

7. Ferri M, Gabriel S, Gavelli A, Franconeri P, Huguet C. Bacterial translocation during portal clamping for liver resection. *Arch Surg.* 1997;132:162-5.

8. Fontes B. *Avaliação da translocação bacteriana no trauma* [tese].São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 1990.

9. Wells CL. Colonization and translocation of intestinal bacterial flora. *Transplant Proc.* 1996;28:2653-6.

10. Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma.* 1990;30:184-189.

11. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med.* 1992;23:217-244.

12. Macfie J. Current status of bacterial translocations as a cause of surgical sepsis. *Br Med Bul.* 2004;71:1-11.

13. Katayama M, Xu D, Specian RD, Deictch EA. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation – Effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann Surg*. 1997;225:317-26.

14. O'BOYLE CJ, Macfie J, Mitchell CJ. Microbiology of bacterial translocation in humanas. *Gut*. 1998;42:29-35.

15. Koh IHJ, Silva RM. Novel in vitro small intestinal graft model for study of bacterial translocation in the rat. *Transplant Proc*. 1996;28:2667-2668.

16. Brathwaithe CEM, Ross CE, Nagele R. Bacterial translocation occurs in humans after traumatic injury: evidence using immunoflorescence. *J Trauma*. 1993;34:586-590.

17. Owens WE, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinaltract of thymectomized mice. *Curr Microbial*. 1982;7:169-174.

18. Gullo A, Berlot G. Ingredients of organ dysfunction or failure. *World J Surg*. 1996;20:430-6.

19. Lemaire LC, van Wagensveld BA, van Gulik TM, Dankert J, van Lanschot JJ, Gouma DJ. Bacterial translocation to the thoracic duct in a setting of ischemia, partial resection and reperfusion of the porcine liver. *Dig Surg*. 1999;16:222-8.

20. Marshall J, Sweeney D. Microbial infection and the septic response in critical surgical illness. *Arch Surg.* 1990;125:17-23.

21. Cicalese L, Aitouche A, Ploskina BS, Ford HR, Rao AS. The role of laparotomy, gut manipulation and immunosuppression on bacterial translocation from the intestinal tract. *Transplant Proc.* 1999;31:1922.

22. Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology*. 1994;107:643.

23. Brinkmann A, Wolf CF, Berger D, Kneitinger E, Neumeister B, Büchler M, Radermacher P, Seeling W, Georgieff M. Perioperative endotoxemia and bacterial translocation during major abdominal surgery: Evidence for the protective effect of endogenous prostacyclin? *Crit Care Med*. 1996;24:1293-301.

24. Miki C, Iriyama K, Gunson BK, Mayer AD, Buckels JAC, Mc Master P. Influence of intraoperative blood loss plasma levels of cytokines and endotoxin and subsequent graft liver function. *Arch Surg*. 1997;132:136-41.

25. Miki C, Mc Master P, Mayer AD, Iriyama K, Suzuki H, Buckels JA. Factors predicting perioperative cytokine response in patients undergoing liver transplantation. *Crit Care Med*. 2000;28:351-4.

26. Pillay SP, Wynter C, Lynch S, Wall D, Balderson G, Strong R. Endotoxin levels in donors and recipients during orthotopic liver transplantation. *Aust N Z J Surg*. 1997;67:187-91.

27. Abdala E, Baia CE, Mies S, Massarollo PC, De Paula NC, Baia VR, Inacio CA, Sef HC, Barone AA. Bacterial translocation during liver transplantation: A randomized trial comparing conventional with venovenous bypass vs. piggyback methods. *Liver Transpl*. 2007;13:488-96.

28. Magnotti LJ, Upperman JS, Xu AZ. Gut-derived mesenteric lymph not portal blood increases endotheliam cell permeability and promotes lung injury after hemorragic shock. *Ann Surg*. 1998;228:518-527.

29. Ljungdahl M, Lundholm M, Kaglund U. Bacterial translocation in experimental shock is dependent on the strains the intestinal flora. *Scand J Gastroenterology*. 2000;4:389-397.

30. Deitch EA. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: What is important in human beings? *Surgery*. 2002;131:241-244.

31. Alexander JW, Gianotti L, Pyles T. Distribution and survival of *Escherichia coli* translocating from the intestine after thermal injury. *Ann Surg*. 1991;213: 558-567.

32. Fukushima R, Alexander JW, Wu JZ, Szczur K, Stephens AM, Ogle JD, Ogle CK. Time course of production of cytokines and prostaglandin E2 by macrophages isolated after thermal injury and bacterial translocation. *Circ Shock*. 1994;42:154-62.

33. Moore FA, Moore EE, Poggetti R. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J Trauma*. 1991;31:629-638.

34. Brathwaite CE, Ross SE, Nagele R. Bacterial translocation occurs in humans after traumatic injury: evidence using immunofluorescence. *J Trauma*. 1993;34:586-590.

35. Berg ARD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. *Curr Microbiol.* 1983;8:285-292.

36. Berg ARD, Berg RD, Wommack E, Deitch EA. Immunosuppression and intestinal bacteral overgrowth synergistically promote bacterial translocation. *Arch Surg*. 1988;123:1359-1364.

37. Johnson GB, Brunn GJ, Samstein B, Platt JL. New insight into the pathogenesis of sepsis and the sepsis syndrome. *Surgery.* 2005;137:393-5.

38. Díaz JLM. *Translocação Bacteriana na Vigência da Sepse e sua influência na evolução clínica da Sepse Estudo experimental* [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2003.

39. Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. The gatroinestinal tract: the undrained abscess of multiple organs failure. *Ann Surg*. 1993;218:111-119.

40. Marshall JC, Chistou NV, Horn K. The microbiology of multiple organ failure. The Proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens. *Arch Surg*. 1988;123:309-315.

41. Macfie J, O'BOYLE CJ, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origem of sepsis: a prospective study investiganting associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*. 1999;99:223-228.

42. Jonh JF, Sharbaugh RJ, Bannister ER. *Enterobacter cloacae*: bacteremia, epidemiology and antibiotic resistance. *Rev Infect Dis*. 1982;4:13-28.

43. Flynn DM, Weistein RA, Nathan C, Gaston MA, Kabins SA. Patients endogenous flora as a source of "nosocomial" *Enterobacter* in cardiac surgery. *J Infect Dis,* 1987; 156:363-368.

44. Watanakunakorn C, Weber J. *Enterobacter* bacteremia: a review of 58 episodes. Scand. *J Infect Dis.* 1989;21:1-8.

45. Gallagher GP. *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. *Rer Infect Dis,* 1990;12:808-812.

46. Gonçalves CR, Vaz TMI, Pisani B, Simões M., Leite D., Prandi M.M. Molecular epidemiology of a nosocomial outbresk due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter* agglomerans in Campinas, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2000;42:1-7.

47. Moore FA, Moore EE, Poggetti, R. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J Trauma.* 1991;31:629-638.

48. Mainous M, Tso P, Berg RD. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg*. 1991;126:33-37.

49. van Goor H, Rosman C, Grond, J. Translocation of bacteria and endotoxin in organ donors. *Arch Surg*. 1994;129:1063-1066.

50. Koh IHJ, Menchaca-Díaz JL, Farsky SHP, Siqueira AFR, Ruiz-Silva M, Puppi J, Fagundes-Neto U, Morais MB, Silva RM. Injuries to the Mesenteric Microcirculation Due to Bacterial Translocation. *Transplant Proc*. 2002;34:1003-1004.

51. Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, Lohse AW, Gerken G. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immumol*. 1999;1401-7.

52. Nolan JP, Camara DS. Intestinal endotoxin in liver injury. *Immun Invest*. 1989;18:325-31.

53. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg*. 1975;129,513-17.

54. Sebe AA, Gomes PO, Nigro AJT, Simões MJ, Novo NF, Juliano Y. Efeitos de deiferentes tempos de isquemia no fígado de ratos. *Acta Cir Brás*. 2002;17:48-91.

55. Pegg DE. Organ preservation. *Surg Clin North Am*. 1986;66:617-632.

56. Platz, K.P., Mueller, A.R., Schäfer, C., Jahns, S., Guckelberger, O., NEUHAUS, P. Influence of warm ischemia time on initial graft function in human liver transplantation. *Transplant Proc.* 1997;29:3458-3459.

57. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ,ischemia-reperfusion. *Am J Pathol*. 1994;145:1421-1431.

58. Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ, Strasberg SM. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology*. 1993;18:635-647.

59. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2000;32:169-173.

60. Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S15.* Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2005.

61. Whitman M S, Pitsakis PG, De Jesus E, Osborne AJ, Levison ME, Johnson CC. Gastrointestinal tract colonization with Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:1526-1530.

62. Waynforth HB, Flicknell PA. Experimental And Surgical Thechnique In The Rat. *Academic Press, INC.*, San Diego, 1992.

63. Canedo LF. *Efeito de antagonista das glicoproteinas IIb/IIIa nas alterações hepáticas e pulmonares secundárias à isquemia e reperfusão de fígado em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2005.

64. Patel S, Pachter L, Yee H. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg*. 2000;191:650-656.

65. Murray PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, PFALLER MA, YOLKEN RH. Manual of clinical microbiology. *ASM*, Washington DC, 8 ed.,2003

66. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. Sarvier, São Paulo, Brasil, 2004.

67. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard M7–A5. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa., 2002.

68 . National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – seventh edition. NCCLS Document M2-A7, Wayne, Pa, USA. 2002

69. Swenson JM, Clark NC, Ferraro MJ, Sahm DF, Doern G, Pfaller MA. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1700-1704.

70. Kaufmann ME. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*. In: Woodford N, Johnson AP, editors. *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. 1st ed. New Jersey: Ed. Humana Press. 1998;15:33-50.

71. Ridley AM. Genomic Fingerprinting by Application of REP-PCR. In: Woodford N, Johnson AP, editors. *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications.* New Jersey: Ed. Humana Press. 1998;15:103-15.

72. Silbert S, Boyken L, Hollis RJ, Pfaller MA. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47(4):619-21.

73. Alencar SSS, Medeiros AC, Brandt CT, Aguiar JLA, Rocha KBF, Silva MP. Translocação de bacterias marcadas com Tc99 na icterícia obstrutiva. *Acta Cir Brás.* 2001;17(1):35-38.

74. Joaõ SA, Alencar SSS, Medeiros AC, Diniz SOF, Cardoso VN, Brandt CT. Translocation of 99m Tc labelled bacteria after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras,* [serial online] 19(4), 2004. URL: http://www.scielo.br/acb

75. van Minnen LP, Timmerman HM, Lutgendorff F, Verheem WW, Harmsen SR, Konstantinov H, Smidt MR, Visser GT, Rijkers HG, Akkermans LM. Modification of intestinal flora with multispecies probiotics reduces bacterial translocation and improves clinical course in a rat model of acute pancreatitis. *Surgery.* 2007;141:470-80.

76. Guarner CJM, Gonzalez-Navajas E, Sanchez G, Soriando R, Frances M, Chiva P, Zapater S, Benlloch C, Munoz S, Pascual J, Balanzo M, Perez-Mateo M, Such J. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl4-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology.* 2006;44:633-9

77. Li LJ, Wu ZW, Xiao DS, Sheng JF. Changes of gut flora and endotoxin in rats with D-galactosamine-induced acute liver failure. *World J Gastroenterol.* 200414:2087-90.

78. Nakayama M, Hatano S, Yamazaki K, Aoyama Y, Yajima T, Kuwata T. Bacterial translocation in neonatal rats: The relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;33:592-601.

79. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, Pfaller MA, Sanford MD, Wenzel RP. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteremia: risk factors for infection. *Clin Infec Dis.* 1995;20:1126-33.

80. Thouverez M, Talon D. Microbiological and epidemiological studies of *Enterococcus faecium* resistant to amoxycillin in a university hospital in eastern France. *Clincal Microbiology and Infection*. 2004;10:441-447.

81. Zumbado M, Dominguez-Diez A, Hernandez JR, Diazj M, Palomar R, Garcia-Plaza G, Navarro D, Boada LD. Evaluation of the potential protctive effect of 21-aminosteroid U-74389 on liver injury induced by reduced and prolongedpartial hepatic ischaemia reperfusion in rats *Pharmacol, Toxicol.* 2003;93:238-43.

82. Pegg DE. Organ preservation. *Surg Clin North Am*. 1986;66:617-632.

83. Platz KP, Mueller AR, Schäfer C, Jahns S, Guckelberger O, Neuhaus P. Influence of warm ischemia time on initial graft function in human liver transplantation. *Transplant Proc.* 1997;29:3458-3459.

84. Gust R, Kozlowski J, Stephenson AH, Schuster DP. Synergistic hemodynamic effects of low-doseendotoxin and acute lung inury. *Am. Respir. Crit. Care Med.* 1998;157:1919-26.

85. Writght R, Zlogar DF, Taylor JC, Restrepo CI. Effectes of endotoxin on surfactant protein A and D stimulation of NO production by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 1999;276:L650-8.

86. Steininger R, Roth E, Fugger R, Winkler S, Langle F, Grunberger T, Gotzinger P, Sautner T, Muhlbacher F. Transhepatic metabolism of TNF-α, IL-6, and endotoxin in the early hepatic reperfusion period after human liver transplantation. *Transplantation*. 1994;58: 179-82.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo