

ANTÔNIO FREDERICO DE FREITAS GOMIDES

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E POR IMUNOFLOURESCÊNCIA DE ÓRGÃOS
DE CAMUNDONGOS PARA DETECÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural,
para obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G633a
2006

Gomides, Antônio Frederico de Freitas, 1972-
Análise histológica e por imunofluorescência de órgãos
de camundongos para detecção de *Klebsiella pneumoniae*
/ Antônio Frederico de Freitas Gomides. – Viçosa : UFV,
2006.
xi, 47f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Márcio de Silveira Mezencio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 37-43.

1. Imunofluorescência. 2. Histologia.
3. *Klebsiella pneumoniae*. 4. Imunologia. 5. Nutrição
enteral - Efeito de prebióticos. 6. Infecção hospitalar.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.633

ANTÔNIO FREDERICO DE FREITAS GOMIDES

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E POR IMUNOFLOURESCÊNCIA DE ÓRGÃOS DE
CAMUNDONGOS PARA DETECÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural,
para obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

APROVADA: 04 de agosto de 2006.

Prof^o. Clóvis Andrade Neves
(Co-orientador)

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Co-orientadora)

Prof^o. José Rogério de Oliveira

Prof^a. Simone Cardoso Lisboa Pereira

Prof^o. José Mário da Silveira Mezencio
(Orientador)

A Deus pelas obras realizadas em minha vida.

A minha esposa Erotides pelo carinho e compreensão.

Aos meus pais, pelo apoio irrestrito aos meus estudos.

Aos meus irmãos por compartilharem todos os meus momentos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Geral e ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de ter realizado o curso.

Ao professor José Mário da Silveira Mezencio pela generosidade, amizade, presença de espírito, bondade e a sua infindável disponibilidade como orientador.

Ao professor Clovis Andrade Neves pelo apoio, conselhos e conhecimentos a mim passados.

Ao professor Sérgio Luís Pinto da Matta pela paciência, amizade e presteza de seus conhecimentos.

À professora Cristina Dantas Vanetti, pela generosidade e apoio.

Ao professor Sérgio Oliveira de Paula pela amizade e incentivo.

À professora Izabel pela gentileza, amizade, apoio, bondade e ensinamentos.

Aos professores do Curso de Biologia Celular e Estrutural que contribuíram para minha formação educacional e pessoal.

À Daniele Ferreira da Silva pela amizade e apoio irrestrito na realização deste trabalho.

Aos funcionários Jorge e Chiquinho do Laboratório de Imunologia e Virologia pelo apoio e amizade.

Ao Alex do Laboratório de Histologia que sempre esteve presente com sua presteza e amizade.

As colegas Jaqueline, Mariauréa, Reggiane, Andréia e ao colega Marcos

pela amizade e ajuda na realização dos experimentos. Em especial à Andréa do Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

A todos os colegas pelo apoio nos estudos em especial à Ana Paula da Fitotecnia.

Aos meus sobrinhos pelo carinho.

“ E como, até hoje, me deparo na mesma encruzilhada,
escolho a vida _
escolho a vitória”...

“ Vivo o meu tempo e me renovo com ele”

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

ANTÔNIO FREDERICO DE FREITAS GOMIDES, filho de Edgard de Godoy Gomides e Helena de Freitas Gomides, nasceu em Ponte Nova, Estado de Minas Gerais no dia 06 de agosto de 1972.

Em agosto de 1993 ingressou na Universidade Federal de Ouro Preto onde trabalhou sob orientação do professor Marcelo Eustáquio da Silva como Bolsista PIBIC/CNPQ e em julho de 1998 graduou-se em Nutrição.

Em março de 1999 ingressou na Universidade do Grande Rio onde em janeiro de 2000 concluiu o Programa Especial de Formação Pedagógica para Docentes, habilitação em Química, equivalente a Licenciatura Plena.

Nos anos de 2002 e 2006 assumiu os cargos efetivos de professor de Química do Ensino Médio da Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais na cidade de Ponte Nova, Minas Gerais, onde também leciona em Pré-vestibular.

Em agosto de 2004, iniciou o Curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. O microrganismo.....	17
3.2. Preparo da massa celular imunogênica.....	17
3.3. Produção e purificação do anti-soro policlonal para <i>K. pneumoniae</i>	18
3.4. Titulação do anti-soro de coelho imunizado com <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	18
3.5. Preparo do material para análise histológica e de imunofluorescência.....	19
3.5.1. Preparo do material para obtenção de séries histológicas em parafina.....	20
3.5.2. Obtenção de secções histológicas em resina.....	20
3.5.3. Preparo do esfregaço bacteriano.....	21
3.5.4. Técnica de imunofluorescência indireta.....	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Verificação do título do anti-soro e teste sorológico para isolados de <i>Klebsiella</i> sp.....	23

1.1. Microscopia óptica e de fluorescência em esfregaços da suspensão bacteriana de <i>K. pneumoniae</i>	23
1.2. Análise de secções histológicas do fígado e do baço por imunofluorescência indireta.....	25
1.3. Análise de secções histológicas de fígado e de baço submetidas a diferentes colorações para a detecção de <i>K. pneumoniae</i>	25
5. DISCUSSÃO.....	28
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXO I.....	44
ANEXO II.....	45
ANEXO III.....	46
ANEXO IV.....	47

RESUMO

GOMIDES, Antônio Frederico de Freitas, M.S. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006. **Análise histológica e por imunofluorescência de órgãos de camundongos para detecção de *Klebsiella pneumoniae*.** Orientador: José Mário da Silveira Mezencio. Co-Orientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti, Sérgio Luís Pinto da Matta, Clóvis Andrade Neves e Sérgio Oliveira de Paula.

O presente trabalho teve como objetivo demonstrar a presença de antígenos de *K. pneumoniae*, em tecidos ou órgãos de camundongos imunodeprimidos e não imunodeprimidos, tratados com dieta enteral contaminada com *K. pneumoniae* na presença e ausência de prebióticos FOS e inulina. Fígado e baço dos animais oriundos do sexto e sétimo dia de experimento foram coletados e processados através de técnicas histológicas para a análise por microscopia óptica e de fluorescência. Para a técnica de imunofluorescência indireta foi produzido anti-soro policlonal contendo anticorpos para *K. pneumoniae* utilizando coelhos albinos da raça Nova Zelândia. O anti-soro obtido também apresentou reação positiva nos testes sorológicos para 14 isolados de *Klebsiella* sp. Os testes de imunofluorescência indireta e de colorações com hematoxilina e eosina (HE), azul-de-toluidina, ácido periódico de Shiff (PAS) e Gram, utilizados para a detecção de *K. pneumoniae*, não revelaram indícios da presença da bactéria no fígado e no baço, bem como as análises histológicas não demonstraram alterações nos órgãos analisados.

ABSTRACT

GOMIDES, Antônio Frederico de Freitas, M.S. Universidade Federal de Viçosa, August, 2006. **Histological and immunofluorescent analysis of mouse organs for detection of *Klebsiella pneumoniae***. Adviser: José Mário da Silveira Mezencio. Co-Advisers: Clovis Andrade Neves, Cristina Dantas Vanetti, Sérgio Luís Pinto da Matta and Sérgio Oliveira de Paula.

The objective of the study is to determine the presence of antigens of *Klebsiella pneumoniae* in tissues or organs of immunodepressed and non-immunodepressed mice fed an enteric diet contaminated with *K. pneumoniae* and in the presence or absence of the prebiotics FOS and inuline. The liver and spleen of the animals were extracted on the sixth and seventh day of the experiment and analyzed with histological techniques of optic and fluorescent microscopy. For the indirect technique of immunofluorescence analysis using albino New Zealand rabbits, polyclonal antiserum containing antibodies for *K. pneumoniae* were produced. The antiserum yielded positive results in the serological tests for 14 isolates of *Klebsiella* sp. To detect *K. pneumoniae*, the indirect tests for immunofluorescence and staining with hematoxylin and eosin (H&E), toluidine blue, periodic acid Schiff (PAS), and Gram, showed no bacteria present in either the liver or spleen, nor did the histological analyses show evidence of alterations in the selected organs.

1. INTRODUÇÃO

Os mamíferos, inclusive o homem, possuem milhões de bactérias vivendo em estado de equilíbrio no trato gastrointestinal. Essas bactérias são importantes para a manutenção da saúde e funcionamento adequado do trato gastrointestinal, competindo com patógenos e conseqüentemente protegendo o hospedeiro. Algumas espécies bacterianas produzem e fornecem ao hospedeiro vitaminas e outros nutrientes importantes.

Estudos recentes têm demonstrado que *Klebsiella* sp. pode ser em determinadas circunstâncias, como na imunodepressão, um microrganismo patogênico que pode causar infecções em órgãos para onde ela é translocada, como coração, rins, pulmão, baço e fígado.

Indivíduos imunodeprimidos por uso de medicação, politraumatizados, acometidos de queimaduras graves, câncer, diabetes, doença pulmonar crônica, desnutrição, cirrose e outras patologias podem desenvolver doenças infecciosas por microrganismos oportunistas, entre eles *Klebsiella* sp.

O uso de dietas enterais tem sido uma prática freqüente em pacientes hospitalizados acometidos de doenças graves. Alguns pesquisadores relatam que a contaminação bacteriana de dietas enterais, especialmente as semi-artesanais, ocorre durante o procedimento de preparo da dieta, estocagem e durante a administração ao paciente. Entre estas bactérias a *Klebsiella* sp. tem sido encontrada contaminando dietas enterais utilizadas em hospitais.

Uma das alternativas nas terapias nutricionais é o uso dos prebióticos, que são suplementos alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro por estimulação seletiva da microbiota intestinal, promovendo o crescimento e

a atividade de um número limitado de bactérias no cólon, proporcionando melhora na saúde do hospedeiro. Os prebióticos que têm sido utilizados com o objetivo de se evitar a translocação bacteriana em pacientes hospitalizados são os frutooligossacarídeos (FOS) e inulina.

Este trabalho tem o objetivo de pesquisar a presença de antígenos de *K. pneumoniae*, através da análise histológica e por imunofluorescência de fígado e de baço de camundongos imunodeprimidos e não imunodeprimidos, tratados com dieta enteral contaminada com *K. pneumoniae*, na presença e ausência de prebióticos FOS e inulina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A principal função do trato gastrointestinal é a digestão e absorção seletiva dos nutrientes necessários para o crescimento e a manutenção da estrutura do organismo. A seletividade de suas propriedades digestivas e da absorção pressupõe tanto a passagem dos nutrientes do lúmen intestinal para a circulação sanguínea e linfática como a função de barreira contra agentes nocivos (POWELL, 1994).

O trato gastrointestinal está exposto, desde o nascimento e diariamente, a microrganismos potencialmente prejudiciais provenientes do meio (CLARKSON, 1995). Em indivíduos saudáveis existem mecanismos complexos, inter-relacionados, que permitem que se estabeleça e mantenha uma microbiota gastrointestinal normal e que se encontra em harmonia com o meio externo. De certa forma esta microbiota reflete o meio externo, especialmente durante as etapas precoces da infância (GRACEY, 1999).

Esta homeostasia é alterada no ambiente contaminado por vetores humanos ou animais, por microrganismos veiculados pela água ou alimentos contaminados, pela falta da higiene pessoal, doméstica ou comunitária não adequada. Estas circunstâncias são de grande importância nos países tropicais em desenvolvimento. Lactentes e crianças que vivem nesses países podem sofrer contaminação por microrganismos do intestino superior ocorrendo a chamada “síndrome do intestino delgado contaminado”, particularmente quando desnutridos. Esta síndrome pode causar má absorção de nutrientes, como carboidratos, lipídios, proteínas e vitaminas. Em regiões endêmicas a doença diarreica pode acometer os visitantes vindos de países industrializados

durante as visitas ou mesmo depois de tê-las feito. A diarreia do viajante é considerada um problema que afeta principalmente adultos, podendo ocorrer em lactentes e crianças pequenas que desenvolvem graves episódios de diarreia, que às vezes se prolonga e chega a ser fatal (GRACEY, 1999).

A diarreia persistente foi reconhecida como uma das principais causas de mortalidade associada à desnutrição e à doença diarreica em crianças nos países em via de desenvolvimento (BLACK, 1993). Os fatores predisponentes compreendem a contaminação do meio por microrganismos, as práticas inadequadas de desmame e alimentação, o estado nutricional dos lactentes e crianças de saúde comprometida e sua exposição prévia a antidiarreicos e antimicrobianos (GRACEY, 1999).

As infecções gastrointestinais podem ser causadas por bactérias, vírus ou parasitas. As bactérias podem causar diarreia devido aos efeitos da própria infecção ou por intoxicação, ou liberação de exotoxinas as quais podem ser ingeridas com os alimentos previamente contaminados. As infecções têm origem pela contaminação do hospedeiro por via oral, de pessoa a pessoa, ou de animais doentes para pessoas, de superfícies contaminadas, como roupas ou utensílios de cozinha ou por alimentos e água. Os alimentos podem apresentar contaminação fecal através por exemplo da água utilizada em seu cultivo, no preparo ou manipulação ou através da adição de gelo contaminado a bebidas ou alimentos (GRACEY, 1999).

A contaminação dos alimentos por bactérias é de longe o risco mais importante a que está submetido o trato intestinal, sendo mais freqüente e grave no momento do desmame (DESJEUX e BOISSET, 1999).

Os tratos gastrointestinal e respiratório são dois dos portais mais comuns de entrada de microrganismos. A defesa contra microrganismos que entram por essas rotas é proporcionada pelos anticorpos em grande parte pela imunoglobulina A (IgA), que são produzidos nos tecidos linfóides mucosos e secretados através do epitélio para os lúmens dos órgãos. Nas secreções mucosas a IgA se liga aos microrganismos e às toxinas presentes no lúmen e as neutralizam, bloqueando sua entrada no hospedeiro (ABBAS & LICHTMAN, 2005). As IgAs atuam como opsoninas facilitando a fagocitose por macrófagos, de imunógenos que escapam da lâmina própria do intestino (BERG, 1995, DIEBEL et al., 1997).

O sistema imunológico associado às mucosas contém tecidos linfóides organizados, sendo as placas de Peyer do intestino delgado o mais importante deles. A região central desses folículos é rico em células B. As placas de Peyer contém um número pequeno de células T CD4⁺, especialmente na região interfolicular. Em camundongos adultos, as células B representam 50 a 70% dos linfócitos das placas de Peyer, enquanto as células T representam 10 a 30%. Algumas das células que revestem as placas de Peyer são células M, especializadas, as quais não possuem microvilosidades, fazem pinocitose ativamente e transportam macromoléculas da luz intestinal para os tecidos infra-epiteliais. Elas parecem desempenhar um papel importante no transporte dos antígenos para as placas de Peyer (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Outros componentes importantes na defesa da barreira intestinal, são as defensinas e as lisozimas secretadas pelas células de Paneth. As células de Paneth presentes na base das criptas do intestino delgado derivam de células-tronco epiteliais, sendo relacionadas com a produção e a liberação de defensinas e lisozimas que exercem função efetora protegendo a mucosa (OUELLETTE, 1997).

As defensinas são peptídios ricos em cisteína, constituídos por 29 a 34 aminoácidos, que estão presentes também na pele de muitas espécies de mamíferos e são também abundantes nos grânulos dos neutrófilos, constituindo cerca de 5% de todas as proteínas celulares dos neutrófilos humanos. As defensinas agem como antibiótico contra uma variedade de bactérias e fungos. A síntese das defensinas é elevada em resposta ao estímulo de citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), os quais são produzidos por macrófagos (ABBAS & LICHTMAN, 2005). As defensinas têm papel importante na defesa contra patógenos ingeridos, bem como na proteção das células-tronco das criptas e também, limitam o número e o tipo de comensais (BEVINS, 2004). Os grânulos das células de Paneth também contêm lisozima, enzima que digere a parede de certas bactérias a qual tem atividade antibacteriana e pode colaborar para a regulação da microbiota intestinal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Outros peptídeos antimicrobianos potentes secretados pelo epitélio intestinal chamados criptocidinas são capazes de eliminar microrganismos no lúmen, por exemplo, dentro das criptas intestinais (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

BERG (1995) demonstrou que ao se utilizar anticorpos monoclonais que bloqueiam a ação de células CD4 e CD8, ocorre o aumento da passagem de microrganismos pela barreira intestinal. O tecido linfóide associado ao intestino possui a capacidade de responder a antígenos ingeridos, pois, sabe-se que ele impede ou limita o acesso de bactérias que de alguma maneira venceram as barreiras enzimáticas e epitelial (MADDAUS et al., 1988).

Os epitélios das barreiras mucosas e as cavidades serosas contêm, respectivamente, linfócitos T intra-epiteliais e a subpopulação B-1 de células B, essas células podem reconhecer e responder a microrganismos comumente encontrados no intestino. Os linfócitos T intra-epiteliais podem atuar na defesa do hospedeiro mediante a secreção de citocinas, ativação de fagócitos e morte de células infectadas. As células B-1 produzem anticorpos IgM específicos para antígenos polissacarídicos e lipídicos, tais como a fosforilcolina e o lipopolissacarídeo que são compartilhados por muitos tipos de bactérias. Indivíduos sadios apresentam anticorpos circulantes contra tais bactérias, cuja maioria está presente no intestino, sem qualquer evidência de infecção. Esses anticorpos são chamados de naturais e são em grande parte, produzidos pelas células B-1. Os anticorpos naturais servem como um mecanismo de defesa pré-formado contra microrganismos que foram bem-sucedidos pela invasão através de barreiras epiteliais. Outro tipo de célula presente sob muitos epitélios e nas cavidades serosas é o mastócito. Os mastócitos respondem aos microrganismos e a vários mediadores secretando substâncias tais como a histamina, enzimas, prostaglandina D₂, leucotrienos, fator ativador de plaquetas e citocinas. A lâmina própria intestinal contém também grande quantidade de plasmócitos ativados, células dendríticas e eosinófilos (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Uma nutrição adequada favorece a preservação da mucosa intestinal, da microbiota simbiótica, dos macrófagos e outras células imunológicas da lâmina própria e dos linfonodos mesentéricos como também a produção de mucinas e anticorpos específicos tais como a IgA secretória (TEIXEIRA NETO, 2003).

Na desnutrição os tecidos linfáticos atrofiam, ocorre redução do número de linfócitos T auxiliares, alterações nos mecanismos de defesa não específicos por redução do complemento (C3), redução da capacidade opsonica, redução do interferon gama (INF- γ), redução da interleucina-1 (IL-1)

e da interleucina-2 (IL-2), redução da afinidade de anticorpos e as respostas reagentes da fase aguda à agressão e a infecção. As conseqüências de todas essas alterações são morbidade e mortalidade elevadas: pacientes estarão sujeitos a infecções por organismos oportunistas tais como bactérias Gram-negativas, *Cândida* ou herpes (WAITZBERG et al., 2001).

A nutrição enteral é usada comumente em ambientes hospitalares como terapia nutricional (MITNE et al., 2001). Foi utilizada inicialmente na década de 1960, sendo aperfeiçoada nos meados da década de 1970 (COPPINI & VASCONCELOS, 2001).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com a Resolução RDC nº 63, de 6 de julho de 2000, define a nutrição enteral como: “Alimento para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada, de composição química definida ou estimada, especialmente elaborada para uso por sondas ou via oral, industrializados ou não, utilizado exclusiva ou parcialmente para substituir ou complementar a alimentação oral em pacientes desnutridos ou não, conforme suas necessidades nutricionais, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando a síntese ou manutenção de tecidos, órgãos ou sistemas”.

A Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral (SBNPE), promoveu e realizou o Inquérito brasileiro de avaliação nutricional (Ibranutri), fazendo um estudo epidemiológico multicêntrico no ano de 1996, assistindo 4000 pacientes hospitalizados atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em 25 hospitais de doze estados brasileiros. Este inquérito demonstrou que, dos 4000 pacientes, 48,1% apresentavam desnutrição e o tempo de internação igual ou superior a 15 dias se correlacionou com uma chance três vezes maior de desnutrição. Da população internada, 36% apresentavam mais de 60 anos e a população idosa estava associada com a maior prevalência de desnutrição (52,8%). Pacientes com infecções tinham taxas de desnutrição também maiores (61,4%). A nutrição enteral foi indicada em 6,1% dos casos, e dos 48,1% dos pacientes desnutridos, 10,1% recebiam nutrição enteral. O estudo verificou também que pacientes se tornam mais desnutridos em função do tempo de internação, ainda que outros fatores de risco possam contribuir para isso. A desnutrição hospitalar progride à medida que aumenta o período de internação: 31,8% dos pacientes já estão desnutridos nas primeiras 48 horas de internação (WAITZBERG et al., 2001).

A nutrição enteral é uma importante modalidade terapêutica utilizada no combate à desnutrição em pacientes hospitalizados. Assim sendo há que se avaliar a relação entre custo com o tratamento nutricional de pacientes hospitalizados e os benefícios desta forma de terapia. O tempo de permanência hospitalar de pacientes desnutridos é significativamente maior e pode estar aumentado em até 90% pela desnutrição. A incidência de complicações infecciosas e não infecciosas é de duas a seis vezes maior em pacientes desnutridos, principalmente nos imunodeprimidos (WAITZBERG et al., 2001).

A solução de alimentação enteral representa um meio favorável para crescimento de microrganismos e vários deles têm sido isolados. Estes incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella enteridis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e leveduras (CAMPBELL, 1995). FREEDLAND et al. (1989) reportaram uma taxa de 30% a 90% de contaminação em sistemas de alimentação enteral. WAITZBERG (2001) relatou que as fórmulas enterais se constituem em excelente meio de cultura para numerosas espécies de microrganismos, patogênicas ou não, devido à alta presença de nutrientes, Aw (atividade de água) de 0,8 a 1,0, pH em torno de 7,0 e fórmulas isomolares.

Segundo WAGNER et al. (1994), a possibilidade de contaminação da dieta enteral ocorre principalmente, pela falta de técnicas de higiene adequadas durante o trabalho dos manipuladores, desinfecção inadequada de equipamentos de preparação e pelos aditivos não-estéreis ou contaminados, adicionados ou utilizados no preparo da dieta. Além desses, outros fatores como temperatura, transporte, tempo e sistema de administração da dieta devem ser considerados.

Segundo ANDERTON (1986), o principal problema com a dieta enteral é ser mantida em temperatura ambiente por períodos prolongados, e isso se dá normalmente no tempo que decorre de suas preparações, armazenagem e transporte da cozinha para a enfermaria. De acordo com a Resolução RDC nº 63, de 6 de julho de 2000 da ANVISA, a nutrição enteral deve ser conservada sob refrigeração, em geladeira exclusiva, com temperatura de 2 °C a 8 °C. O transporte deve ser feito, em recipientes térmicos exclusivos de modo a garantir que a temperatura da nutrição enteral se mantenha de 2 °C a 8 °C durante o tempo de transporte, que não deve ultrapassar duas horas.

Segundo OLIVEIRA et al. (2000) o limite microbiológico de contagem em placas de aeróbios mesofílicos em nutrição enteral antes da administração deveria ser menor que dez unidades formadoras de colônias por mililitros (10 UFC mL⁻¹) sendo que contagens maiores do que 10² UFC mL⁻¹ devem ser consideradas impróprias para consumo. No entanto, as diretrizes publicadas pelo “United States Food and Drug Administration” (USA) para alimentos médicos estabelecem que esta ação deve ser tomada quando a contagem em placa de aeróbios exceda 10³ UFC mL⁻¹. A Resolução RDC nº 63, de 6 de julho de 2000 da ANVISA estabelece que a contagem de microrganismos aeróbios mesofílicos na dieta enteral deva atender limites microbiológicos menor que 10³ UFC g⁻¹.

PEREIRA (2001) em um estudo com isolados de *Klebsiella* spp. de dietas enterais, alerta para a constatação da resistência múltipla a antibióticos destes isolados, relatando que dietas enterais têm grande significado clínico, pois são alimentos destinados a pacientes, por vezes, imunodeprimidos, e que possuem baixa resistência à colonização do trato intestinal, por geralmente estarem recebendo drogas como antibióticos de amplo espectro e corticóides. A resistência a antibióticos confere a estes patógenos oportunistas, a maior possibilidade de colonizarem o hospedeiro e de provocar doenças.

Aproximadamente, 50% das infecções que acometem pacientes hospitalizados são causados por microrganismos hospitalares que colonizam o trato gastrointestinal. Apesar disso, pouca importância é dada aos alimentos como fonte de microrganismos capazes de causar infecções hospitalares. Dietas enterais e fórmulas infantis devem receber atenção especial, considerando que os pacientes a quem são destinados, geralmente estão mais susceptíveis a infecções, a desidratações e suas conseqüências (PINTO et al., 2004).

A contaminação de dieta enteral tem sido uma grande preocupação para os médicos pelo fato destas serem oferecidas a pacientes de risco para infecção, incluindo neonatos, pacientes transplantados, com injúrias na cabeça, câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (OLIVEIRA et al., 2000).

PINTO et al. (2004) analisaram amostras coletadas de dietas enterais e encontraram espécies do gênero *Klebsiella* os quais foram identificados como pertencentes às espécies de *K. pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*. Além disso foram detectadas bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella*.

A contaminação bacteriana de dietas enterais oferecidas a pacientes pode levar a complicações tais como sepse, diarreia, pneumonia e colonização do trato gastrointestinal. Desordens intestinais especialmente diarreia, ocorrem freqüentemente em pacientes que recebem antibióticos. Elas resultam do decréscimo em duas propriedades fisiológicas fundamentais da microbiota endógena: resistência de colonização e capacidade de fermentação. A adesão e invasão celular, bem como a translocação do patógeno são fatores importantes para o desenvolvimento da sintomatologia (MARTEAU, 2002).

K. pneumoniae é uma das causas mais comuns de sepse por Gram-negativos, seguida por *Escherichia coli* (MONTGOMERIE, 1984; KORVICK et al., 1992), e infecções por *Klebsiella* estão associadas com alta morbidade e mortalidade (KORVICK et al., 1992). Isolados de *K. pneumoniae* podem apresentar múltiplos fatores de virulência. Os mais importantes parecem ser a natureza da cápsula de polissacarídeo que protege o organismo contra ingestão e morte por fagócitos, o lipopolissacarídeo que oferece proteção contra o efeito bactericida do soro, as fímbrias de aderência mediada por pili que inibem o processo de adesina, o sistema de aerobactina e, finalmente o fenótipo mucóide. Alguns desses elementos são geneticamente determinados por um plasmídeo grande de 180 Kb. A presença deste plasmídeo aumenta a virulência de *K. pneumoniae* em ratos (VERNET et al., 1995).

OELSCHLAEGER & TALL (1997) obtiveram isolados de *K. pneumoniae* de amostras da urina de pacientes de uma unidade de terapia intensiva (UTI) e avaliaram a capacidade de invasão e replicação deste microrganismo, em culturas de células da bexiga e de intestino de humanos. Estes autores observaram através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, que *K. pneumoniae* possui a capacidade de invadir essas células após uma hora de infecção, onde foram vistas no interior de endossomos. Esses autores verificaram também que, após transcorrido o período de três horas, *K. pneumoniae* foi capaz de se replicar dentro dos endossomos.

Uma das características das bactérias intracelulares facultativas é a sua capacidade de sobreviver e mesmo de se replicar dentro dos fagócitos. Como esses microorganismos são capazes de encontrar um nicho onde sejam inacessíveis aos anticorpos circulantes, sua eliminação requer os mecanismos da imunidade mediada por células. Indivíduos com imunidade mediada por células deficiente, tais como pacientes com síndrome da imunodeficiência

adquirida (SIDA) são extremamente suscetíveis a infecções com bactérias intracelulares e vírus (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Em Bangui, na República Centro-Africana, PHUONG et al. (2003) relataram que *Klebsiella* sp. pode causar diarreia em pacientes imunodeprimidos ou não imunodeprimidos. Foram examinados 31 pacientes HIV-positivo e 31 pacientes HIV-negativos. Dos pacientes positivos, 22,6% apresentaram diarreia crônica com sangue, 29% tiveram diarreia crônica aquosa e 48,4% diarreia crônica branda. Destes 31 pacientes positivos, todos apresentaram estirpes de *K. pneumoniae* como causadora de diarreia. Nos 31 pacientes HIV-negativos, uma taxa de 10 a 20% dos isolados dos pacientes que apresentaram diarreia era de *K. pneumoniae*.

Várias doenças são atribuídas às espécies de *Klebsiella* sp. sendo *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* responsáveis por quase todas as infecções em humanos. Dentre as pneumonias as mais comuns são as causadas por *K. pneumoniae*, dentro e fora das unidades de saúde. A maioria dos casos ocorre em homens de meia idade que já estão debilitados por doenças como alcoolismo, diabetes e doenças pulmonares crônicas. A mortalidade tem sido alta, chegando a 50% e, nos casos de alcoolismo, pode atingir quase 100% (VINCENT, 2004).

Numerosas doenças têm sido associadas com translocação bacteriana em humanos. Estas incluem pneumatoses intestinais, gangrena intestinal não oclusiva, enterocolite necrotizante, resposta a drogas citotóxicas, síndrome de liberação de citosina, doença de Crohn, colite ulcerativa, choque hemorrágico, trauma severo, injúria cerebral, neutropenia e câncer do cólon (ALEXANDER, 1998).

Em um estudo realizado com humanos, LEVY et al. (1989) demonstraram a presença de *Enterobacter cloacae* e *K. pneumoniae* no sangue de pacientes que receberam dieta enteral. Estes autores relataram que a dieta enteral representa causa significativa de sepse nosocomial.

PEREIRA (2001) em modelo experimental com camundongos, utilizou dieta enteral com o imunodepressor prednisona e o antibiótico carbenicilina, combinado com estirpes de *K. pneumoniae*. Após plaqueamento em ágar, detectou a presença de *K. pneumoniae* translocada para o fígado e pulmão desses animais. A autora relatou também que a instalação de *K. pneumoniae*

proveniente de dietas enterais no intestino é facilitada quando medicamentos imunodepressores e antimicrobianos são utilizados.

A translocação a partir do intestino é detectada pela presença de bactérias presentes nos tecidos. Isto pode refletir não somente a integridade da função intrínseca da barreira da mucosa, mas também os tipos de microrganismos no lúmen e a capacidade do hospedeiro em matar a bactéria que transloca (ALEXANDER & GENNARI, 1996).

A translocação bacteriana e de suas endotoxinas pode ocorrer a partir do intestino, através das células M, por via paracelular, entre os enterócitos quando ocorrem injúrias que causam ruptura nas junções de oclusão ou por via transcelular, através dos enterócitos (SPAETH et al., 1995, DIEBEL et al., 1997).

VAN & FURTADO (1986) estudaram a relação entre a ingestão da dieta enteral contaminada e a colonização intestinal e sepse. Concluíram que organismos ingeridos oralmente sobrevivem à passagem através do trato gastrointestinal de ratos, oferecendo um risco de infecção invasiva fatal associado com a ingestão de bactérias patogênicas.

Muitas estratégias de tratamento têm sido utilizadas no intuito de diminuir ou impedir a translocação bacteriana. Tais estratégias incluem o uso de substâncias que atuam melhorando a microcirculação e agindo como fatores de crescimento de macrófagos ou do epitélio. Outras substâncias podem agir diminuindo os danos causados pela inflamação (ALEXANDER, 1998). A suplementação com IgA, em um estudo com coelhos, diminuiu a translocação bacteriana a partir do intestino, através da melhora na defesa da barreira intestinal (DIEBEL et al., 1997; WIEST & RATH, 2003).

Estudos experimentais têm sugerido que a translocação pode ser reduzida por um suprimento enteral de nutrientes destinados ao cólon, como por exemplo, fibras fermentáveis. Fibras tais como a pectina e inulina não são absorvidas pelas células da mucosa e alcançam o intestino grosso praticamente intactas (RAYES et al., 2002).

Prebiótico é definido como um ingrediente alimentar não digerível que beneficia o hospedeiro por estimulação seletiva, crescimento e atividade de um número limitado de bactérias no cólon e assim melhora a saúde do hospedeiro. As bactérias alvo são as bifidobactérias e lactobacilos. Os prebióticos aumentam a microbiota intestinal direcionando-a para uma composição de

microrganismos benéficos. Têm sido demonstrado que o aumento de bifidobactérias na microbiota intestinal tem melhorado a saúde de pacientes com doenças gastrointestinais crônicas e de idosos que possuem pequenas quantidades de bifidobactérias no intestino (TUOHY et al., 2003). Segundo ROBERFROID (1993), SCHIFFRIN et al. (1995) e GARLEB et al. (1996), as bifidobactérias protegem contra espécies bacterianas invasivas e patogênicas, cuja proliferação é favorecida pelo tratamento com antibiótico ao secretar substâncias antibacterianas e competindo por locais de substrato ou aderência ou estimulando o sistema imunológico aumentando a capacidade fagocítica.

Os prebióticos de eficácia comprovada e comercialmente disponíveis, são os frutooligossacarídeos (FOS) e inulina (TUOHY et al., 2003). A inulina e os frutooligossacarídeos são considerados como alimentos normais, ingredientes alimentares ou fibras em diferentes países. Os prebióticos têm recebido muita atenção recentemente por causa do seu efeito sobre a microbiota intestinal. A inulina contém cadeias de duas a 60 unidades de frutose, enquanto o FOS contém de duas a nove unidades de frutose que são, às vezes, ligadas a uma unidade de glicose terminal (ROBERFROID, 1998). A fermentação de FOS e inulina necessita de enzimas específicas. Bifidobactérias fermentam FOS através da enzima β -fructosidase e sintetizam as inulinases para a degradação da inulina (ROBERFROID et al., 1998).

Embora não haja uma recomendação de dose diária dos prebióticos FOS e inulina, achados recentes sugerem que cerca de 10 g dia^{-1} constitui uma dose ideal e tem sido bem tolerada (BOUHNİK et al., 1999). ROBERFROID et al. (1998), sugeriram que um mínimo de 4 g dia^{-1} de inulina ou FOS pode ser necessário para observar o aumento de bifidobactérias.

SPAETH et al. (1995) avaliaram o efeito de seis dietas enterais na barreira intestinal de camundongos e observaram que quando a nutrição enteral era acrescida de fibra, a translocação bacteriana era menor em relação aos grupos que não receberam dieta com fibras. Em todos os grupos onde houve translocação havia um número significativamente maior de bactérias aeróbicas no ceco, principalmente de microrganismos Gram-negativos. Esses autores concluíram que dietas enterais livres de fibras não protegeram a barreira intestinal contra a invasão microbiana.

SILVA (2004) em estudo com camundongos alimentados com dieta enteral com diferentes combinações de prebióticos FOS e inulina,

imunodepressor e antibiótico, relatou que a adição de FOS e inulina a dietas enterais na dose de 15,3 mg 100 g⁻¹ de peso corporal por dia resultou na diminuição da translocação de *Klebsiella* para o baço, coração, fígado, pulmão e rins de camundongos que receberam dieta contaminada com *K. pneumoniae*, associada ou não com droga imunodepressora e antibiótico. Este autor relatou ainda que essas bactérias ocasionaram pouca ou nenhuma alteração no tecido hepático dos camundongos.

No cólon as bactérias probióticas degradam as fibras e produzem uma série de nutrientes incluindo ácidos graxos de cadeia curta tais como acetato, butirato e propionato, que estimulam o crescimento da mucosa, reduzem a translocação e estimulam a defesa intestinal (RAYES et al., 2002). A fermentação de FOS e inulina resulta em concentrações elevadas de ácido láctico, o que diminui, consideravelmente, o pH do cólon, evitando a colonização do intestino por bactérias patogênicas (ROBERFROID, 1993).

WOODS & WALKER (1996), PARIKH et al. (2003) relataram que as bactérias que translocam podem ser visualizadas em secções histológicas de baço, fígado e pulmão através de colorações de Gram, hematoxilina e eosina (HE) e pela técnica de imunofluorescência indireta.

KONEMAN et al. (2001) relataram que várias técnicas podem ser utilizadas para o exame microscópico direto de amostras clínicas, a fim de demonstrar a presença de microrganismos ou para observar determinadas características bioquímicas, fisiológicas ou sorológicas e que o índice de refração de bactérias e outros microrganismos é similar ao do meio. Assim os mesmos não são visíveis sem a utilização de corantes.

Segundo WOODS & WALKER (1996) a utilização da técnica de coloração histológica em tecidos tem sido um método tradicional para o diagnóstico de infecções causadas por agentes tais como: *Mycobacterium leprae*, *Pneumocystis carinii*, *Treponema pallidum*, *Tropheryma whipplei* e *Loboia lobi*.

BROUILLETTE et al. (2003) utilizando glândulas mamárias, demonstraram no interior das células glandulares a presença de *Staphylococcus aureus*, através de colorações de secções histológicas com hematoxilina e eosina (HE), azul-de-toluidina e coloração de Gram.

Segundo KONEMAN et al. (2001) o azul-de-toluidina está sendo usado com mais freqüência na coloração de impressões de biopsias de pulmão e

secreções respiratórias para detecção rápida de *Pneumocystis carinii* e a coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) está sendo utilizada com mais freqüência na coloração de cortes histológicos para demonstrar elementos fúngicos e a coloração de Gram é utilizada com muita freqüência para exame microscópico direto de amostras e subcultivos. Segundo este autor a visualização de certos bacilos Gram-negativos, quando observadas em conjunto com o tipo (cocos e bacilos) e a disposição das células bacterianas, podem ser utilizadas para efetuar identificações presuntivas.

WOODS & WALKER (1996) relataram que as colorações com HE e de Gram são comumente usadas para detecções de bactérias em secções histológicas de tecidos e que *S. aureus* e *Helicobacter pylori* são visualizados através da coloração com hematoxilina e eosina (HE) e que bactérias individuais não são detectadas por coloração com HE. Além disso relataram também que *Bortanella* spp., *H. pylori* e *Legionella* spp. podem ser freqüentemente detectadas em secções histológicas de tecidos através da coloração de Gram.

Segundo IAN (1998) a técnica de imunofluorescência indireta é usada para testar a presença do anticorpo no soro-teste ou para detectar antígenos em esfregaços, tecidos ou em culturas celulares. Neste teste o anti-soro é utilizado em um esfregaço ou um corte tecidual ou uma cultura celular em uma lâmina. Essa amostra é incubada em um anti-soro suspeito de conter anticorpos para esse antígeno. Após algumas horas o anti-soro é então lavado e pesquisada a presença de anticorpos específicos conjugados com o antígeno. A presença de anticorpos conjugados com o antígeno pode ser analisada após as amostras serem incubadas em antiglobulina marcada, por exemplo com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Quando a antiglobulina é removida com a lavagem e a lâmina examinada a fluorescência indica que o anticorpo ou o antígeno encontrava-se presente na amostra-teste.

PARIKH et al. (2003) mostraram através da técnica de imunofluorescência indireta que *Listeria monocytogenes* translocou para o fígado e para o baço de camundongos cinco dias após a inoculação intravenosa dessa bactéria.

OELSCHLAEGER & TALL (1997) demonstraram a presença de *K. pneumoniae* em cultura de células da bexiga de humanos após incubação destas células com anticorpos anti-clatrina, onde vesículas de clatrina

associadas com *K. pneumoniae* foram vistas através da técnica de imunofluorescência indireta. Além disso também demonstraram através de coloração com acridina orange e contra-coloração com cristal violeta que *K. pneumoniae* pode ser visualizada por microscopia de fluorescência, onde estas bactérias apareceram com fluorescência verde em células da bexiga.

Segundo IAN (1998) a técnica de microaglutinação para determinação do título do anticorpo consiste na conjugação de anticorpos com antígenos em solução onde os complexos resultantes podem se precipitar. Se os antígenos forem bactérias, os anticorpos farão com que eles se aglutinem. Caso se misture uma solução de antígenos com um anti-soro, a mistura fica turva dentro de alguns minutos depois floculenta e dentro de uma hora ou mais um precipitado se sedimenta formando complexos de antígeno-anticorpo permitindo a determinação do título do anti-soro.

Os estudos de técnicas que permitam o diagnóstico de doenças infecciosas, trazem benefícios no cuidado de pacientes e são de fundamental importância na identificação presuntiva do agente infeccioso. A identificação de microrganismos como por exemplo, *K. pneumoniae* em amostras clínicas de pacientes pode diminuir o risco de sepse, diminuir o tempo de internação hospitalar, evitando assim ônus excessivo para o governo e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de ativação do microrganismo, preparo da dieta enteral, delineamento experimental, dissecação dos animais, fixação, armazenamento e inclusão dos órgãos em resina, foram realizadas por SILVA (2004). Anexos I, II, III e IV.

3.1. O microrganismo

O experimento foi conduzido com a estirpe P15 de *K. pneumoniae*, isolada por PEREIRA (2001), de dieta enteral proveniente de uma unidade hospitalar da Zona da Mata Norte (MG), Brasil. As células foram mantidas estocadas a -86 °C negativos em caldo tripticaseína e soja (TSB) acrescido de 20% de glicerol.

3.2. Preparo da massa celular imunogênica

Um volume de 20 mL de cultura de segunda ativação dos isolados de *K. pneumoniae* foi adicionado em 200 mL do mesmo meio de cultura (TSB), e incubado durante 24 horas a 26 °C.

As culturas foram centrifugadas três vezes durante 20 minutos a 4000 g a 10 °C e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas três vezes em solução salina (NaCl 0,85 %), repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições por três vezes. A massa celular resultante de cada cultura foi

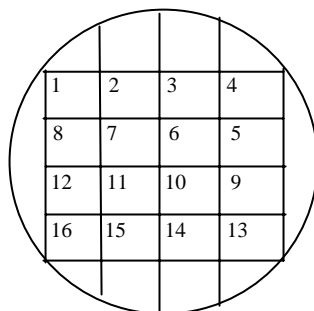
congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultra-freezer a 86 °C negativos.

3.3. Produção e purificação do anti-soro policlonal para *K. pneumoniae*

Foram utilizados dois coelhos albinos, da raça Nova Zelândia, com três a quatro meses de idade e peso entre 1800 a 2000 gramas, para aplicação do imunógeno segundo MEZENCIO (1981). O imunógeno foi preparado ressuspendendo-se a massa celular após descongelamento, em solução salina, até a obtenção de concentração celular de 10^{10} UFC mL⁻¹. Foi coletado o sangue dos coelhos para obtenção de soro normal antes da imunização para ser utilizado como controle. Em seguida, foi realizada a aplicação de 1 mL de emulsão contendo suspensão de *K. pneumoniae* e adjuvante completo de Freund (SIGMA®), na proporção de 1:1, na coxa e região subcutânea do dorso do pescoço dos coelhos. Em intervalos de 15 dias, foram aplicadas mais duas doses de 1 mL de emulsão de suspensão bacteriana e adjuvante incompleto de Freund. Após o décimo dia de aplicação da 3ª dose de imunógeno, foram coletados 10 mL de sangue na veia marginal da orelha dos animais, para obtenção do anti-soro.

3.4. Titulação do anti-soro de coelho imunizado com *K. pneumoniae* e teste se sorológico para isolados de *Klebsiella* sp

Foram feitas diluições em série do anti-soro de coelho utilizando-se microplaca diluidora, adicionando-se 100 µL de solução salina e 100 µL de anti-soro de coelho para obter as diluições de 1/2 a 1/4096. Para a determinação do título do anti-soro foram utilizadas placas de Petri divididas em 16 quadrados de 1 cm² cada, e utilizados conforme o esquema e descrição a seguir.



Nos quadrados 1 ao 12 foram adicionados 10 µL de anti-soro de coelho nas respectivas diluições. A adição das gotas do anti-soro de coelho começou no quadrado 12, contendo a diluição de $1/_{4096}$ até o quadrado 1 contendo a diluição $1/2$. Em seguida nos quadrados 1 ao 12 foram adicionados sobre o anti-soro de coelho 10 µL da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae* contendo 2×10^6 UFC mL⁻¹.

No quadrado 13 foi adicionado 10 µL de anti-soro sem diluir e 10 µL da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae* contendo 2×10^6 UFC mL⁻¹.

No quadrado 14 foi adicionado 10 µL do anti-soro de coelho sem diluir e 10 µL de solução salina.

No quadrado 15 foi adicionado 10 µL da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae* contendo 2×10^6 UFC mL⁻¹ e 10 µL de solução salina.

Os procedimentos dos quadrados 14 e 15 foram realizados com o objetivo de observar possível auto-precipitação do anti-soro ou da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae*.

As placas de Petri foram incubadas em temperatura ambiente durante 6 horas para então fazer a leitura do título do anti-soro.

Após a constatação de produção de anticorpos para *K. pneumoniae* pela técnica de microaglutinação em gotas, os animais foram eutanasiados e foi coletado sangue total para obtenção do anti-soro conforme MEZENCIO (1981). O anti-soro obtido foi utilizado na técnica de imunofluorescência indireta.

Foram testados também contra o anti-soro obtido através da técnica de microaglutinação em gotas, 14 isolados por SILVA (2004), de *Klebsiella* sp., sendo 12 de fígado e dois de baço respectivamente.

3.5. Preparo do material para análise histológica e de imunofluorescência

As análises ocorreram após um ano de armazenamento de fragmentos de baço e fígado, fixados em paraformaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4 e armazenados a 4 °C. Foram analisadas secções histológicas do fígado e do baço de camundongos de cada tratamento totalizando 36 animais oriundos do sexto e sétimo dia de experimento. Esfregaços a serem examinados foram obtidos diretamente da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae*. As análises de secções histológicas obtidas em

resina glicolmetacrilato (Historesin[®], Leica) foram realizadas do material previamente incluído por SILVA (2004), anexo IV. As preparações foram analisadas por microscopia óptica e de fluorescência e fotografadas.

3.5.1 Preparo do material para obtenção de séries histológicas em parafina

Fragmentos de fígado e de baço foram desidratados em banhos de concentração crescente de etanol a 80%, 90%, 95%, 100% (3 x) durante 30 minutos, e em seguida foram diafanizados em álcool/xilol e xilol (3 x), durante 30 minutos. Para a infiltração, os fragmentos foram embebidos em três banhos de parafina em estufa a 60 °C durante 30 minutos e em seguida incluídos em parafina. Secções histológicas de 4 µm foram obtidas em micrótomo rotativo utilizando-se navalhas de aço. As secções histológicas foram aderidas com albumina sobre lâminas de vidro, secas em placa aquecedora e, em seguida, desparafinizadas em xilol (3 x) e álcool/xilol, hidratadas em banhos de concentração decrescente de etanol 100% (3 x), 95%, 90% e 80% durante dez minutos cada e colocadas em água destilada. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), Gram e ácido periódico de Schiff (PAS). Em seguida foram desidratadas conforme metodologia já citada. As preparações foram seladas com lamínula e resina Entellan[®] e examinadas por microscopia óptica. Foram preparadas e analisadas 36 lâminas contendo de três a quatro secções histológicas.

3.5.2. Obtenção de secções histológicas em resina

Foram feitas secções histológicas de fígado e de baço, com espessura de 1µm e 2 µm, em micrótomo rotativo, utilizando-se navalha vidro. As secções histológicas foram aderidas a lâminas de vidro e secas em placa aquecedora, coradas com azul-de-toluidina, hematoxilina e eosina (HE) e Gram, seladas com lamínula e resina Entellan[®] e examinadas ao microscópio óptico. Foram preparadas e analisadas 36 lâminas contendo de seis a oito secções histológicas.

3.5.3. Preparo do esfregaço bacteriano

Esfregaços de amostras de *K. pneumoniae* foram preparados e analisados por microscopia de luz e de fluorescência.

A suspensão bacteriana foi espalhada sobre lâminas de vidro para se obter os esfregaços os quais foram secados ao ar e fixados ao calor.

Algumas lâminas contendo os esfregaços foram submetidas à coloração de Gram e outras por coloração com ácido periódico de Schiff (PAS), para posterior análise por microscopia óptica e de fluorescência.

3.5.4. Técnica de imunofluorescência indireta

Fragmentos de fígado e de baço de camundongos foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina. Foram obtidas secções histológicas de 4 μm e aderidas a lâmina de vidro sendo em seguida desparafinizadas, hidratadas e colocadas em água destilada conforme metodologia já citada no item 3.5.1. Outras lâminas de esfregaços de *K. pneumoniae* foram também preparadas conforme metodologia citada no item 3.4.2. As secções histológicas e os esfregaços foram submetidos à técnica de imunofluorescência indireta.

As lâminas contendo as secções histológicas e os esfregaços, foram lavadas três vezes em tampão salina fosfato (PBS), por 15 minutos e incubadas com soro normal sem diluir, por 30 minutos. Em seguida foram lavadas três vezes em PBS por 15 minutos e incubadas em câmara úmida durante duas horas, na presença de anti-soro sem diluir, contendo anticorpo policlonal para a estirpe P15 de *K. pneumoniae*. Após a incubação com anticorpo primário, as lâminas de esfregaço foram lavadas três vezes em tampão PBS por 15 minutos e incubadas em câmara úmida e escura por uma hora e meia com IgG de camundongo marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) interagindo com IgG de coelho. As lâminas foram lavadas três vezes em PBS durante 15 minutos, seladas com lamínula e solução de sacarose a 50% e analisadas ao microscópio de fluorescência através da exposição aos filtros “wide-blue” (WB), “wide-green” (WG) e “wide-ultraviolet” (WU).

Foram preparadas e analisadas 36 lâminas contendo de três a quatro secções histológicas e quatro lâminas de esfregaço da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae*.

4. RESULTADOS

4.1. Verificação do título do anti-soro e teste sorológico para isolados de *Klebsiella* sp.

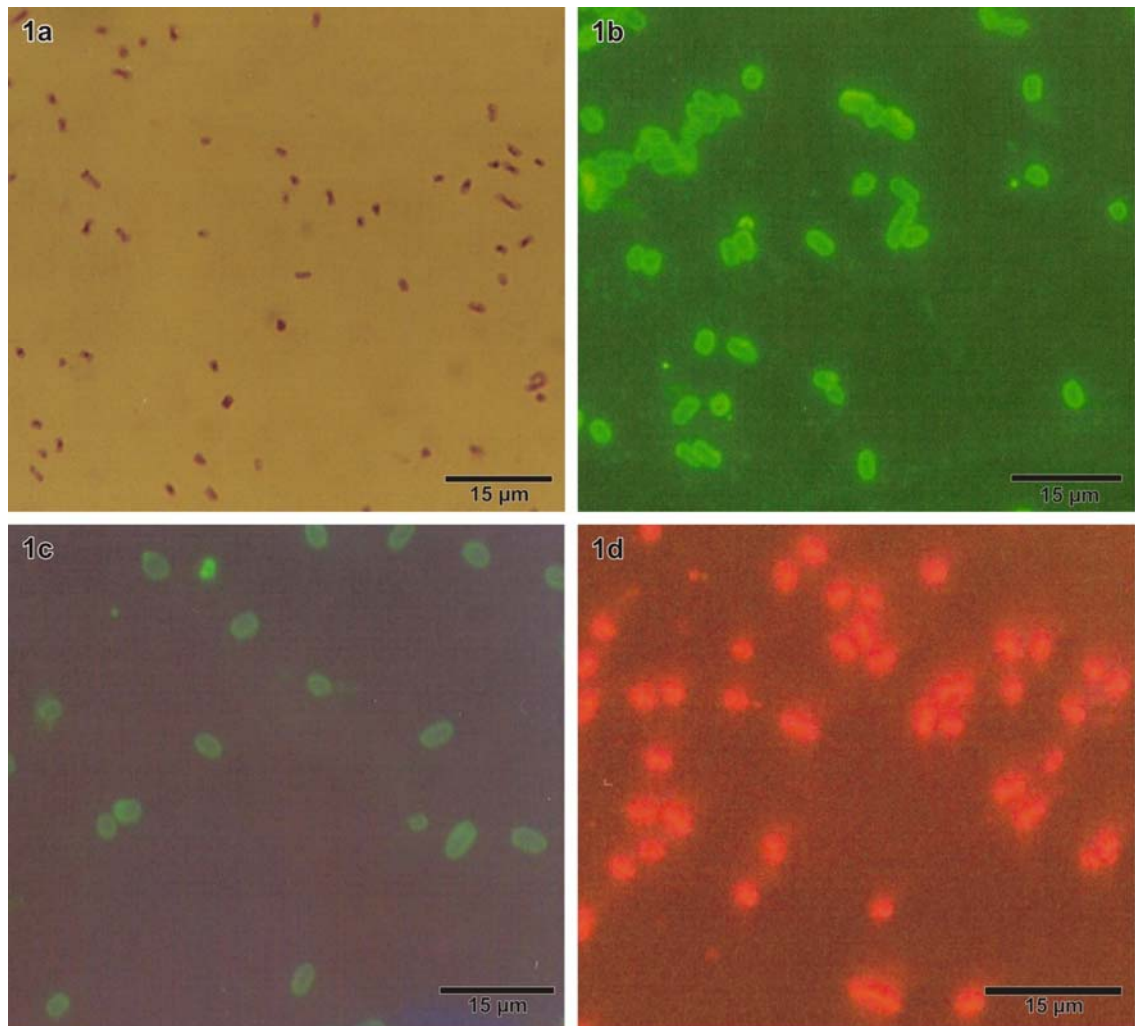
No teste de microaglutinação em gotas o título do anti-soro para *K. pneumoniae* foi igual a 1024, utilizando-se o antígeno na concentração de 2×10^6 UFC ml⁻¹.

Nos testes sorológicos foram obtidas reações positivas para os 14 isolados de *Klebsiella* sp. analisados quando o antígeno foi utilizado na concentração de 10^7 UFC ml⁻¹.

4.2. Microscopia óptica e de fluorescência em esfregaços da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae*

Não se visualizaram bactérias nas lâminas controle contendo somente os esfregaços de *K. pneumoniae*, indicando que a bactéria não possui autofluorescência.

Lâminas de esfregaços de *K. pneumoniae* submetidas à coloração de Gram foram analisadas por microscopia óptica e foram observadas as bactérias coradas pela safranina em vermelho (Figura 1a). Nesta Figura pode-se observar as bactérias com tamanho aproximado de 1 µm de largura e 2 µm de comprimento. Na Figura 1b pode-se observar as bactérias reveladas pela



Figuras: 1a) Esfregaço de *Klebsiella pneumoniae* corado pela técnica de Gram, onde observa-se as bactérias coradas em vermelho. 1b) Esfregaço de *K. pneumoniae*, submetido à técnica de imunofluorescência indireta exposto ao filtro “wide-blue” (WB). 1c) Esfregaço de *K. pneumoniae* submetido à técnica de imunofluorescência indireta com múltipla exposição aos filtros “wide-blue” (WB), “wide-green” (WG) e “wide-ultraviolet” (WU). Nas figuras 1b e c, observa-se às bactérias fluorescentes em verde. 1d) Esfregaço de *K. pneumoniae* corado pela técnica de PAS exposto ao filtro “wide-blue” (WB). Nesta figura, observa-se às bactérias fluorescentes em vermelho.

técnica de imunofluorescência indireta, em verde, indicando a interação da bactéria com IgG de camundongo, marcada com FITC interagindo com IgG de coelho, pela exposição do esfregaço de *K. pneumoniae* ao filtro “wide-blue” (WB).

Na Figura 1c pode-se observar as bactérias em verde, submetida à técnica de imunofluorescência indireta, pela múltipla exposição aos filtros “wide-blue” (WB), “wide-green” (WG) e “wide-ultraviolet” (WU), para obtenção de um melhor contraste entre a bactéria e o plano de fundo da fotomicrografia.

Nas Figuras 1b e c, observa-se bactérias com tamanho aproximado de 2,5 µm de largura e 4 µm de comprimento.

Na Figura 1d observa-se a fluorescência das bactérias em vermelho pela coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) exposta ao filtro “wide-green” (WG).

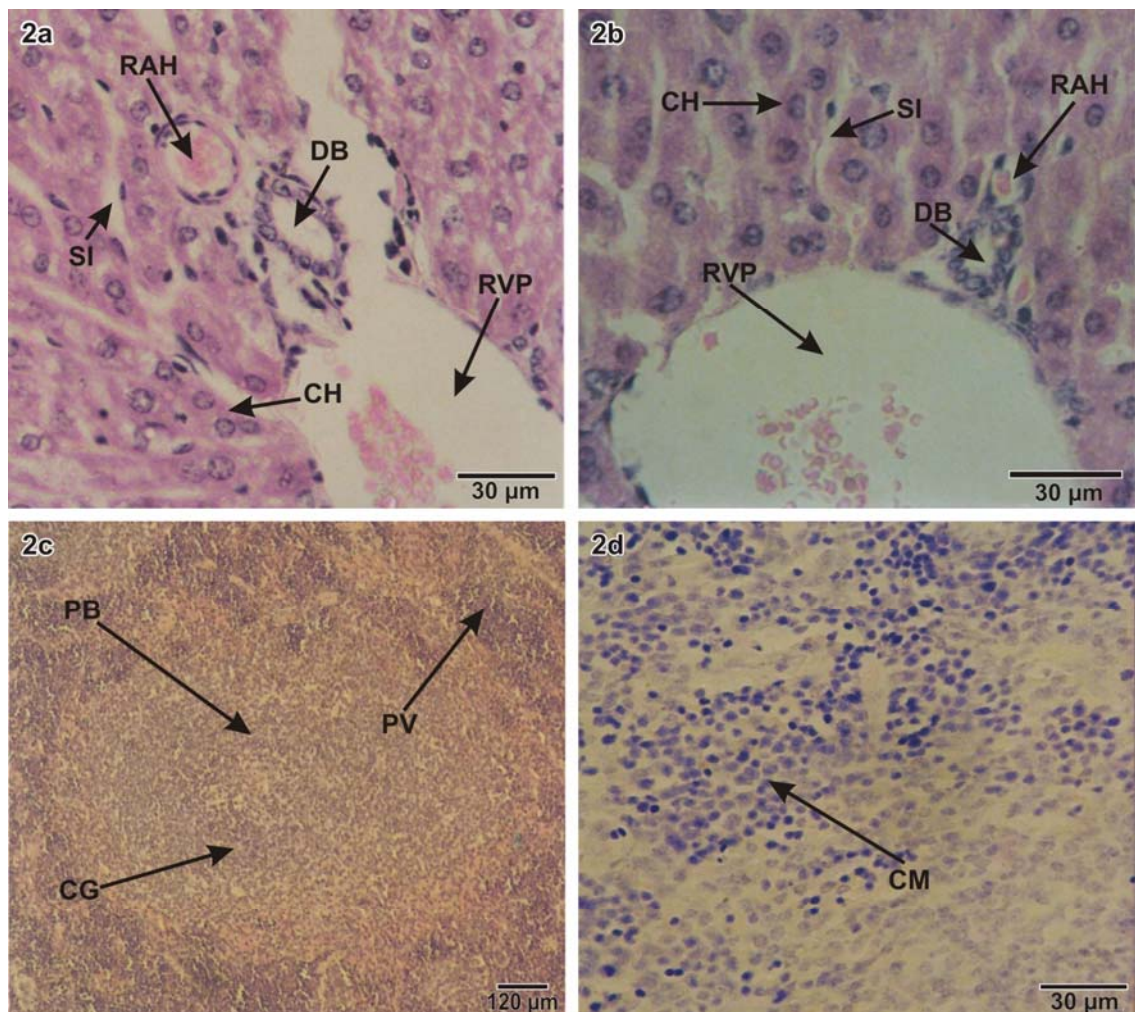
4.3. Análise de secções histológicas do fígado e do baço por imunofluorescência indireta

Nas análises por imunofluorescência indireta do fígado e do baço realizada no sexto e no sétimo dia do experimento, não foi encontrada fluorescência que sugerisse a presença de *K. pneumoniae*.

4.4. Análises de secções histológicas de fígado e de baço submetidas a diferentes colorações para a detecção de *K. pneumoniae*

As análises de secções histológicas do fígado e do baço que foram submetidas às colorações de hematoxilina e eosina (HE) e azul-de-toluidina, não demonstraram alterações na morfologia normal destes órgãos e nem qualquer sinal indicativo de patologia.

Na Figura 2a observa-se um corte histológico do fígado de camundongo que foi submetido ao tratamento I (dieta AIN 93G e animais não imunodeprimidos) obtido no sétimo dia de experimento demonstrando que o órgão está bem preservado, como era de se esperar, devido a este ser o grupo controle do experimento. Para a comparação entre os diferentes tratamentos, na Figura 2b, observa-se um corte histológico do fígado de camundongo que foi submetido ao tratamento IX (dieta enteral sem prebióticos, contaminada e



Figuras: 2a) Secção histológica de fígado de camundongo submetido ao tratamento I (dieta AIN 93G e animais não imunodeprimidos). 2b) Secção histológica de fígado de camundongo submetido ao tratamento IX (dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos). As secções histológicas das figuras 2a e b foram obtidas de fígado incluído em parafina e submetido a coloração com hematoxilina e eosina (HE). Em ambas as figuras pode-se observar, o ramo da veia porta (RVP), ramo da artéria hepática (RAH), ducto biliar (DB), sinusóide (Si) e cordões de hepatócitos (CH). 2c) Secção histológica de baço de camundongo submetido a tratamento V (dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos), corte incluído em parafina e submetido a coloração com hematoxilina e eosina (HE), observa-se a polpa branca (PB), polpa vermelha (PV) e o centro germinativo (CG). 2d) Secção histológica de baço de camundongo submetido ao tratamento V, corte incluído em parafina, submetido a coloração de Gram, observa-se aglomerados de células mielóides (CM).

animais imunodeprimidos) obtido no sétimo dia de experimento. Ambos os cortes histológicos foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (HE). Verificou-se que nos dois tratamentos o ramo da artéria hepática, o ramo da veia porta, o ducto biliar e os sinusóides estão bem preservados, bem como o fígado do animal do tratamento IX não apresentou indícios de patologia (Figura 2b).

Na Figura 2c observa-se um corte histológico do baço de camundongo que foi submetido ao tratamento V (dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos) obtido no sétimo dia de experimento, que foi incluído em parafina e corado com hematoxilina e eosina (HE). Observa-se que as áreas de transição entre polpa vermelha e polpa branca são facilmente distinguíveis e bem preservadas, bem como o centro germinativo.

Na Figura 2d observa-se um corte histológico do baço de camundongo que foi submetido ao tratamento V, obtido no sétimo dia de experimento incluído em parafina e corado pela técnica de Gram. Neste corte histológico observa-se aglomerados de células mieloídes precursoras de granulócitos, eritrócitos, monócitos e plaquetas. Pode-se observar também que não existe indicativo de patologia.

As análises através das diversas colorações realizadas nas secções histológicas do fígado e do baço de todos os tratamentos não mostraram indícios da presença de *K. pneumoniae*.

5. DISCUSSÃO

MACÍAS et al. (1992) relataram que fatores como dietas contaminadas e mudanças ambientais podem resultar em desequilíbrio da microbiota intestinal e reduzir a resistência à colonização por bactérias exógenas. Isto freqüentemente capacita bactérias exógenas a se multiplicarem, dentre elas as oportunistas que provocam infecções. Neste trabalho, de acordo com os resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência indireta, verificou-se que a dieta contaminada não foi um fator que contribuísse para a translocação bacteriana da estirpe P15 de *K. pneumoniae*, pois em todos os tratamentos em que os animais receberam o inóculo bacteriano não foi detectada fluorescência da estirpe P15 de *K. pneumoniae* nos cortes histológicos do fígado e do baço dos animais examinados.

SILVA (2004) analisou o fígado dos mesmos camundongos utilizados neste trabalho, alimentados com dieta enteral inoculada com a estirpe P15 de *K. pneumoniae*, encontrando isolados de *Klebsiella* sp.. No entanto a análise por RAPD comparando o perfil genético das bactérias isoladas do fígado com as oferecidas na dieta, não mostrou similaridade com os padrões de banda de DNA da estirpe P15 de *K. pneumoniae* administrada oralmente aos animais, com as bactérias que foram encontradas no fígado. Conforme o autor, estirpes da microbiota autóctone intestinal foram capazes de translocar quando houve depressão do sistema imunológico. Assim, os resultados relatados acima são um indício de que a estirpe P15 de *K. pneumoniae*, ministrada na dieta contaminada não tenha translocado do intestino para o fígado e para o baço.

Dessa forma esses dados de SILVA (2004) estão de conformidade com os encontrados neste trabalho, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta. No entanto quando foram analisados os 14 isolados de *Klebsiella* sp. através da técnica de microaglutinação em gotas, o teste sorológico foi positivo para todos os isolados, mostrando a eficiência do anti-soro obtido neste trabalho em reagir com determinantes antigênicos de *Klebsiella* sp.. Apesar disso, não foi possível através da técnica de imunofluorescência, observar a presença de *Klebsiella* sp. nas secções histológicas dos órgãos analisados, portanto, apesar de termos obtido resultado positivo dos testes sorológicos dos 14 isolados de *Klebsiella* sp. e também da estirpe P15 de *K. pneumoniae*, não foi possível a detecção de *Klebsiella*. Estes resultados sugerem uma maior sensibilidade da técnica de plaqueamento em agar seletivo utilizada por SILVA (2004) quando comparada com a técnica de imunofluorescência indireta utilizada neste trabalho.

BERG (1995) relatou que a translocação de microrganismos da parede intestinal pode ocorrer por pinocitose, que consiste em um processo de ingestão de quantidades diminutas de líquido extracelular e de substâncias nele dissolvidos sob forma de pequenas vesículas em células epiteliais. De acordo com GUYTON (1988), microrganismos podem passar da mucosa intestinal para o sistema porta, transitando pelos seios hepáticos antes de alcançarem a circulação sistêmica. Esses mecanismos têm sido propostos para a ocorrência de translocação na presença de uma barreira mucosa intacta. SILVA (2004) sugeriu que em hospedeiro com o sistema imunológico apto, que não recebe o inóculo bacteriano e quando não submetido a tratamento com medicação imunodepressora, *Klebsiella* sp. endógena do trato digestório de camundongos não é capaz de translocar para o fígado e baço. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que os animais nos diferentes tratamentos poderiam estar imunologicamente aptos a conter a translocação da estirpe P15 de *K. pneumoniae* administrada pela dieta, pois, as análises de imunofluorescência não revelaram a presença dessa estirpe no fígado e no baço dos camundongos. Além disso as análises histológicas não indicaram nenhuma característica associada à infecção, bem como não foi detectada a presença de *K. pneumoniae* nestes órgãos através das diferentes colorações.

CARLOS (2006, dados não publicados) em um estudo morfológico do íleo dos mesmos camundongos utilizados neste trabalho, não encontrou

evidências de que a translocação de *K. pneumoniae* ocorreu pelo epitélio deste órgão. Os resultados dos dados encontrados não permitiram concluir se o uso de prebióticos na dieta tenha alguma relação com a diminuição da translocação de *K. pneumoniae* a partir do intestino. No presente trabalho os resultados encontrados estão de acordo como os dados relatados por CARLOS (2006, dados não publicados) pois não encontramos indícios de *K. pneumoniae* no fígado e no baço dos camundongos, indicando que a translocação da estirpe P15 de *K. pneumoniae* não tenha ocorrido.

BERG et al. (1988) relataram que em camundongos tratados com uma combinação de antibióticos e drogas imunodepressoras, por via oral apresentaram bactérias autóctones que foram capazes de translocar para a cavidade peritoneal e atingir o fígado. Segundo RAYES et al. (2002), NESTLÉ (2003), KAPKAC et al. (2003), SILVA (2004), estudos experimentais têm sugerido que a translocação bacteriana pode ser diminuída por um suprimento enteral de fibras fermentáveis destinadas ao cólon, tais como os prebióticos FOS e inulina. Os resultados obtidos neste trabalho, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, não mostraram que os prebióticos foram eficientes em evitar ou diminuir a translocação da estirpe *K. pneumoniae* do intestino para o fígado e baço, pois não foi encontrada nenhuma fluorescência sugestiva da presença da bactéria nestes órgãos em nenhum dos tratamentos analisados.

PARIKH et al. (2003) mostraram através da técnica de imunofluorescência indireta que *Listeria monocytogenes* translocou para o fígado e para o baço de camundongos, cinco dias após a inoculação intravenosa dessa bactéria, sugerindo que esse seja um tempo hábil entre a inoculação do microrganismo e a translocação sistêmica da bactéria para o fígado e para o baço de camundongos. Parece que os mecanismos de translocação bacteriana a partir do sistema gastrointestinal são bem mais complexos e a técnica de imunofluorescência indireta aplicada sobre as secções histológicas do fígado e do baço, não foi suficientemente sensível para detectar bactérias translocadas nestes órgãos, apesar do anti-soro ter sido eficiente para detectar a bactéria e permitir sua visualização pela mesma técnica, nos esfregaços da suspensão bacteriana.

Analisou-se também outros esfregaços da estirpe P15 de *K. pneumoniae* que não foram submetidos à técnica de imunofluorescência e não foi observada autofluorescência da bactéria. Esta é mais uma prova de que o anti-

soro produzido continha anticorpo para a estirpe P15 de *K. pneumoniae*. Além disso, o teste de microaglutinação em gota foi positivo para a obtenção do anti-soro contra esta estirpe de *K. pneumoniae* e de outros 14 isolados por SILVA (2004) de *Klebsiella* sp.

Segundo KONEMAN et al. (2001) em amostras diferentes de fezes, uma preparação corada com Gram pode revelar células bacilares e cocobacilares Gram-negativas com 0,5 a 2 μm de largura e 2 a 4 μm de comprimento. Neste trabalho a medida do tamanho de *K. pneumoniae* através da técnica de coloração de Gram revelou bactérias com tamanho aproximado de 1 μm de largura e 2 μm de comprimento. No entanto através da técnica de imunofluorescência indireta as bactérias apresentaram tamanho aproximado de 2,5 μm de largura e 4 μm de comprimento. Portanto, os reagentes utilizados na técnica de coloração de Gram parecem não possuir afinidade com todos os componentes da superfície da parede celular de bactérias Gram-negativas, sendo assim, devemos considerar no momento de realizar técnicas, medidas do tamanho de bactérias Gram-negativas como por exemplo, a da estirpe P15 de *K. pneumoniae* que permitam obter-se dados reais da medida destes microrganismos. A técnica de imunofluorescência indireta mostrou-se eficaz para a realização desta medida, pois o anti-soro utilizado neste trabalho possui afinidade com antígenos O, que são regiões presentes na superfície da parede celular de bactérias Gram-negativas. Assim, quando os esfregaços foram submetidos à técnica de imunofluorescência indireta e analisados por microscopia de fluorescência e fotografados, foi possível obter-se a medida aproximada da estirpe P15 de *K. pneumoniae* levando em consideração a dimensão da cápsula bacteriana.

PEREIRA (2001) avaliou a capacidade de translocação de seis isolados de dietas enterais de *Klebsiella* spp. de um hospital da Zona da Mata Norte (MG), pela técnica de polimorfismo de fragmentos de DNA amplificado ao acaso (RAPD). As bactérias que foram adicionadas e administradas via dieta enteral a camundongos com o objetivo de verificar se *Klebsiella* spp. é capaz de translocar do intestino para o fígado, baço, coração e pulmão desses animais; durante o experimento foi combinado com as drogas prednisona e carbenicilina _ para comparar se havia relação entre o perfil genético desses isolados e o perfil genético da bactéria administrada na dieta. Nos camundongos que receberam as drogas prednisona e carbenicilina e que não

receberam dieta contaminada, foi detectada a presença de *Klebsiella* no fígado destes animais nas amostras coletadas cinco e seis dias após o início da administração das drogas. No entanto a análise do perfil genético desses contaminantes não apresentou similaridade com o perfil genético dos isolados bacterianos do hospital. Nos animais que receberam dieta contaminada com os seis isolados de *Klebsiella* spp., bem como nos animais que receberam dieta contaminada combinada com a droga prednisona, foram encontradas nos pulmões destes animais no 2º dia e 4º dia da respectiva inoculação, bactérias com similaridades dos padrões de bandas de DNA das estirpes isoladas da dieta enteral do hospital, com as bactérias ministradas na dieta. Neste trabalho, através da técnica de imunofluorescência indireta não foi possível detectar *K. pneumoniae* utilizando anti-soro policlonal produzido para a estirpe P15 de *K. pneumoniae*, sendo que, este anti-soro contém anticorpos específicos para a estirpe P15 de *K. pneumoniae* isolada por PEREIRA (2001) e para outros 14 isolados por SILVA (2004) de *Klebsiella* sp. A estirpe P15 de *K. pneumoniae* utilizada neste trabalho foi relatada por PEREIRA (2001) como a mais freqüentemente encontrada nos pulmões dos camundongos. Portanto, apesar de ter sido obtido anti-soro policlonal eficiente para a estirpe P15 de *K. pneumoniae*, não se pode confirmar que essa estirpe transloque com grande freqüência para o fígado e para o baço de camundongos.

KONEMAN et al. (2001) relataram que as moléculas de lipopolissacarídeo (LPS) são os principais determinantes antigênicos de superfície, denominados antígenos somáticos ou antígenos O das bactérias Gram-negativas. As cadeias laterais O-específicas encontradas no LPS são regiões de estrutura bioquímica variável que conferem identidade sorológica única às espécies de bactérias Gram-negativas e são responsáveis pela especificidade antigênica dos isolados individuais, contendo um número variável, que pode chegar a 40 subunidades repetidas de oligossacarídeos, abrangendo de três a cinco monossacarídeos cada uma. Os resultados desse trabalho sugerem que devido à presença de cadeias laterais antígenicamente específicas das bactérias Gram-negativas, o anti-soro policlonal produzido para *K. pneumoniae* possa ter uma especificidade para a estirpe P15 de *K. pneumoniae* bem como para os 14 isolados testados, mas não para estirpes que possam ter especificidade antigênica diferente, pois mais de 200 isolados foram obtidos por SILVA (2004) e apenas uma amostra de 14 destes isolados

foi testada neste trabalho e não foram encontradas através de técnica de imunofluorescência indireta.

PEREIRA (2001) avaliando a patogenicidade de isolados de *Klebsiella* sp. em séries histológicas de pulmões, rins e fígado de camundongos não encontrou elementos que pudessem caracterizar uma reação de natureza inflamatória nos órgãos examinados. Segundo o autor, esses dados sugerem que os isolados não são patogênicos, poderiam estar em baixas concentrações nos órgãos, o sistema imune do animal evitou a infecção por *Klebsiella* ou que o tempo entre a inoculação da bactéria via dieta e a análise foi insuficiente para causar alterações detectáveis. As análises histológicas do fígado e do baço durante o sexto e sétimo dia de tratamento realizadas neste trabalho não mostraram a presença de *K. pneumoniae* nesses órgãos, talvez porque as análises tenham ocorrido antes da bactéria colonizar e levar a alterações de natureza patológica. Outra possibilidade é que as bactérias autóctones que translocaram estavam presentes em baixas concentrações e não foram detectadas pela coloração de rotina. Uma terceira possibilidade seria que ainda os animais estivessem aptos imunologicamente em evitar a infecção por *Klebsiella*.

Segundo TEIXEIRA NETO (2003), os mecanismos de ação dos corticosteróides são complexos e envolvem inibição da proliferação de linfócitos T, diminuição da produção de interleucina-1 (IL-1), de interleucina-2 (IL-2), de leucotrienos e inibição da atividade moduladora da fosfolipase A2, do fator de necrose tumoral (TNF) e da lise de linfócitos e eosinófilos. Nesse trabalho sugere-se que o não aparecimento de sítios de inflamação bacteriana no fígado e no baço analisados possam ter sido evitados pela ação de células "Natural Killer" (NK), pois bactérias intracelulares ativam células NK quer diretamente, quer pela estimulação de macrófagos. ABBAS & LICHTMAN (2005) relataram que camundongos com imunodeficiência grave, que têm deficiência de células T e B são capazes de controlar a infecção com *L. monocytogenes* pela produção de interferon-gama (INF- γ) derivado de células NK. Cita também, que a imunidade inata pode limitar o crescimento bacteriano por algum tempo mas geralmente não consegue erradicar essas infecções e a erradicação requer a ativação da imunidade adaptativa. Neste trabalho, como não foram encontradas características de infecção causada por bactéria, sugere-se que a infecção possa ter sido contida pela imunidade inata durante

os dias que transcorreram da inoculação e posterior análise do fígado e do baço.

WOODS & WALKER (1996), PARIKH et al. (2003) relataram que bactérias que translocam podem ser visualizadas em secções histológicas de baço, fígado e pulmão através de colorações de Gram, hematoxilina e eosina (HE) e pela técnica de imunofluorescência indireta.

Segundo KONEMAN et al. (2001) a coloração com ácido periódico de Schiff é baseada na oxidação de hexoses e hexosaminas pelo ácido periódico, o qual rompe os anéis de piranose, produzindo dialdeídos que reagem com o reagente de Schiff. Este corante foi utilizado neste trabalho porque de acordo com KONEMAN et al. (2001), bactérias Gram-negativas possuem no seu componente de lipopolissacarídeo presente na parede celular, um cerne de polissacarídeo variando sua composição de espécie para espécie. Este cerne pode conter N-acetilglicosamina, glicose e galactose. Portanto, quando se aplicou este corante nos esfregaços da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae* conseguiu-se obter fluorescência, sugerindo a presença de hexose ou hexosaminas em sua parede celular. Estes resultados permitem concluir que *K. pneumoniae* mesmo não possuindo autofluorescência quando é empregado um corante que possui afinidade com os seus componentes da parede celular, esta bactéria pode ser visualizada pela microscopia de fluorescência nos esfregaços da suspensão bacteriana. Assim, de acordo com os dados encontrados na literatura, WOODS (1996), KONEMAN et al. (2001), BROUILLETTE et al. (2003), e neste trabalho, foram utilizadas colorações com azul-de-toluidina, hematoxilina e eosina (HE), Gram e ácido periódico de Schiff (PAS) nas secções histológicas de fígado e de baço na tentativa de detectar a presença de *K. pneumoniae* nestes órgãos.

BROUILLETTE et al. (2003), utilizando glândulas mamárias, demonstraram no interior das células glandulares a presença de *Staphylococcus aureus*, através de colorações de secções histológicas com hematoxilina e eosina (HE), azul-de-toluidina e coloração de Gram. WOODS & WALKER (1996) relataram que as colorações com HE e de Gram são comumente usadas para detecções de bactérias em secções histológicas de tecidos e que *S. aureus* e *Helicobacter pylori* são visualizados através da coloração com hematoxilina e eosina (HE). Além disso relataram também que *Bortanella* spp., *H. pylori* e *Legionella* spp., podem ser freqüentemente

detectadas em secções histológicas de tecidos através da coloração de Gram. Entretanto afirmaram que bactérias individuais não são detectadas por coloração com HE.

As diferentes colorações de rotina para a detecção de *K. pneumoniae* nas secções histológicas do fígado e do baço utilizadas neste trabalho não demonstram qualquer indício da presença desta bactéria. Estes resultados sugerem que provavelmente, as bactérias autóctones que translocaram conforme as análises realizadas por SILVA (2004) no fígado e no baço dos mesmos camundongos utilizados neste trabalho poderiam estar em baixas concentrações nestes órgãos e por isso não foram detectadas pelas colorações de rotina.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho foi conduzido com a estirpe P15 de *K. pneumoniae* isolada de dieta enteral por PEREIRA (2001), em uma unidade hospitalar da Zona da Mata Norte (MG), tendo como objetivo verificar a possível presença de *K. pneumoniae* que possa ter translocado do intestino para o fígado e para o baço de camundongos.

Secções histológicas do fígado e do baço oriundas dos animais do sexto e sétimo dia de experimento foram preparadas e submetidas às técnicas de coloração de rotina com hematoxilina e eosina (HE), azul-de-toluidina, Gram e imunofluorescência indireta. As colorações convencionais realizadas nas secções histológicas de fígado e de baço de camundongos e analisadas com microscopia óptica não revelaram indícios da presença de *K. pneumoniae* nesses órgãos.

Os resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência indireta também não revelaram a presença da estirpe P15 de *K. pneumoniae* nesses órgãos indicando que esta estirpe não tenha translocado a partir do intestino.

As análises histológicas do fígado e do baço não revelaram qualquer indício de patologia associada à infecção bacteriana.

Assim, de acordo com os resultados deste trabalho, conclue-se que a translocação de bactérias autóctones pode ter ocorrido e, no entanto as técnicas de imunofluorescência indireta e de microscopia utilizadas não apresentaram sensibilidade suficiente para detectar a presença de *Klebsiella* nos órgãos analisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5^o ed., Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005. 580 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 63, de 6 de julho de 2000**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 15 de maio de 2006.

ALEXANDER, J. W. Bacterial translocation during enteral and parenteral nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, 57: 389-93. 1998.

ALEXANDER, J. M.; GENNARI, R. Translocation as it applies to metabolism. In **Nutrition and Metabolism in the Surgical Patient**, 2 ed., p. 459-76 [JE Fischer, editor]. Boston, M. A. Little, Brown and Company. 1996.

ANDERTON, A. Microbiological quality of products used in enteral feeds. **Journal of Hospital Infection**, 7: 68-73. 1986.

BERG, R. D.; WOMMACK, E.; DEITCH, E. A. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. **Archives of Surgery**, 132:1359-69. 1988.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in Microbiology**, 3:149-54. 1995.

- BEVINS, C. L. The Paneth cell and the innate immune response. **Current Opinion Gastroenterology**, 20:572-80. 2004.
- BLACK, R.E. Persistent diarrhea in children in developing countries. **Pediatric Infect Disease Journal**, 12:751-61. 1993.
- BOUHNİK, T.; VAHEDI, K.; ACHOUR, L. et al. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. **Journal of Nutrition**, 129:113-16. 1999.
- BROUILLETTE, E.; GRONDIN, G.; SHKRETA, L. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. **Microbial Pathogenesis**, 35: 159-68. 2003.
- CAMPBELL, S. M. Preventing microbial contamination of enteral formulas and delivery systems. **Ross Medical Nutrition Systems**, 1:1-18. 1995.
- CARLOS, J. **Estudo morfológico e morfométrico do intestino delgado de camundongos imunodeprimidos submetidos à dieta enteral contendo prebióticos e contaminada por *Klebsiella pneumoniae***. Viçosa, MG, 2006. 63 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa (“in press”).
- CLARKSON T. W. Environmental contaminants in the food chain. **American Journal of Clinical Nutrition**, 61: 6825-65. 1995.
- COPPINI. L. Z.; VASCONCELOS, M. I. L. Preparo da nutrição enteral industrializada In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 1809 p.
- DESJEUX, J.; BOISSET, M. O trato gastrointestinal e o enfrentamento dos riscos oriundos da cadeia alimentar de crianças. In: **44º Seminário de Nestlé Nutrition - Riscos para as crianças na cadeia alimentar**. p. 15-8. 1999.

- DIEBEL, L. N.; LIBERATI, D. M.; DULCHAVYSK, S. A. et al. As *in vitro* model to assess mucosal immune function and bacterial translocation. **Journal of Surgical Research**. 68:178-82. 1997.
- FREEDLAND, C. P.; ROLLER, R. D.; WOLFE, B. M.; FLYNN, N. M. Microbial contamination of enteral nutrition systems during prolonged intermittent use. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 13:23-5. 1989.
- GARLEB, K. A.; SNOOK, J. T.; CARCON, M. J. et al. Effect of fructooligosaccharide containing enteral formula on subjective tolerance factors, serum chemistry profile, and faecal bifidobacteria in healthy adult male subjects. **Microbial Ecology Health and Disease**, 9:279-85. 1996.
- GRACEY M. Contaminação ambiental, diarreia e doenças transmitidas pelo alimento. In: **44º Seminário de Nestlé Nutrition - Riscos para as crianças na cadeia alimentar**. p. 35-7. 1999.
- GUYTON, A. C. **Fisiologia Humana**, 6ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1988. 348 p.
- IAN, R. TIZARD. **Imunologia Veterinária – Uma introdução**. 5ª ed. , São Paulo: Editora Rocca. 1998. 486 p.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2004. 488 p.
- KAPKAC, M.; ERIKOGLU, M.; TUNCYUREK, P. et al. Fiber enriched diets and radiation induced injury of the gut. **Nutrition Research**, 24:77-83. 2003.
- KONEMAN, E. W.; STEPHEN D. ALLEN.; JANDA, W. M. et al. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5º ed., São Paulo: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001. 1465 p.
- KORVICK, J. A.; BRYAN, C. S.; FARBER, B. et al. Prospective observational study of *Klebsiella* bacteremia in 230 patients: outcome for antibiotic

combination versus monotherapy. **Antimicrobial Agents Chemother**, 36:2639-44. 1992.

LEVY, J.; VAN, L. Y.; VERHAEGEN, G. et al. Contaminated enteral nutrition solutions as a cause of nosocomial bloodstream infection: A study using plasmid fingerprinting. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 13:228-3. 1989.

MACÍAS, M. E. N.; APELLA, M. C.; ROMERO, N. C. et al. Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal Applied Bacteriology**, 73:407-11. 1992.

MADDAUS, M. A.; WELLS, C. L.; PLATT, J. L. et al. Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. **Annual Surgical**, 207(4):387-98. 1988.

MARTEAU, P. Probiotics in clinical conditions. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 22:255-73. 2002.

MEZENCIO, J. M. S. **Cinética de produção de anticorpos em coelhos e relacionamento antigênico entre estirpes de *Rhizobium japonicum***. Viçosa, MG, 1981. 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1981.

MITNE, C.; SIMÕES, A. M. G.; WOKAMOTO, D. et al. Análise das dietas enterais artesanais. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, 16:100-9. 2001.

MONTGOMERIE, J. Z. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital associated infections. **Review of Infectious Disease**, 1:736-53. 1984.

NESTLÉ. **Fibras em nutrição enteral, 2003**. Disponível em: <<http://nutricaoclinica.nestlé.com.br/publicacoes/fibrasnutricaoenteral/index.htm>>. Acesso em 18 de abril de 2006.

OELSCHLAEGER, T. A.; TALL, B. D. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. **Infection and Immunity**, 65: 2950-58. 1997.

OLIVEIRA, M. H.; BONELLI, R.; AIDOO, K. E. et al. Microbiological quality of reconstituted enteral formulations used in hospitals. **Nutrition**, 16:729-33. 2000.

OUELLETTE, A. J. Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment. **Gastroenterology**, 113:1779-84. 1997.

PARIKH, S. S.; LITHERLAND, S. A.; CLARE-SALZLER, M. J. CapG^{-/-} mice have specific host defense defects that render them more susceptible than CapG^{+/+} mice to *Listeria monocytogenes* infection but not to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Infection and Immunity**, 71:6582-90. 2003.

PEREIRA, S. C. L. **Patogenicidade de *Klebsiella* sp. isolada de dietas enterais**. Viçosa, MG, 2001. 106 p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

PHUONG, L. N. T.; SIMON, Y.; AWA, A.; et al. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa. **Emergent Infect Disease**, 9(1):2-138. 2003.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. **Revista de Nutrição**, 17(3):319-26. 2004.

POWELL D. W. Barrier function of epithelia. **American Journal of Physiology**, 241:275-88. 1994

RAYES, N.; HANSEN, S.; SEEHOFER, D. et al. Early enteral supply of fiber and lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. **Nutrition**, 18:609-15. 2002.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Review in Food Science Nutrition**, 33:103-48. 1993.

ROBERFROID, M. B.; DELZENEN. M. Dietary fructans. **Annual Review of Nutrition**, 18:117-43. 1998. .

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J. A. E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, 128:11-198. 1998.

SCHIFFRIN, E. J.; ROCHAT, F. LINK-AMSTER, H. et al. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, 78:491-7. 1995.

SILVA, D. F. **Efeito de prebióticos adicionados em dietas enterais na translocação de *Klebsiella sp.* em camundongos**. Viçosa, MG, 2004, 46 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa.

SPAETH, G.; GOTTWALD, T.; HIRNER, A. Fibre is an essential ingredient of enteral diets to limit bacterial translocation in rats. **The European Journal of Surgery**, 16(7): 513-18. 1995.

TEIXEIRA NETO, F. **Nutrição Clínica**. 1ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003. 519 p.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, 8(15):692-700. 2003.

VAN, E. R. A.; FURTADO, D. Bacterial contamination of enteral nutrient solutions: intestinal colonization and sepsis in mice after ingestion. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 10:503-7. 1986.

VERNET, V.; PHILIPPON, A.; MADOULET, C. et al. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. **FEMS Microbiology Letters**, 130:51-7. 1995.

VINCENT, W. F. Infections caused by members of the genus *Klebsiella*. **Medical News**, 11(5): 28-33. 2004.

WAGNER, D. R.; EMORE, M. F.; KROLI, D. M. Evaluation of “closed” vs “open” systems for the delivery of peptide-based enteral diets. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 18:453-7. 1994.

WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W.; CORREIA, M. I. T. D. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (Ibranutri): a study of 4000 patients. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 1809 p.

WAITZBERG, D. L.; FADUL, R. A.; VAN AANHOLT, D. P. J. et al. Indicações e técnicas de ministração em nutrição enteral. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 1809 p.

WAITZBERG, D. L.; RODRÍGUEZ, J.G.; CORREIA, M. I. T. Desnutrição hospitalar no Brasil. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 1809p.

WIEST, R.; e RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, 17:397-425. 2003.

WOODS, G. L.; WALKER, D. H. Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. **Clinical Microbiology Reviews**, 9:382-404. 1996.

ANEXO I

Ativação do microrganismo

O isolado foi ativado em TSB a 37 °C por 24 horas e as células foram coletadas por centrifugação. As células de *K. pneumoniae* foram ressuspensas em 10 mL de dieta enteral, preparada com água destilada estéril obtendo-se uma suspensão contendo cerca de 10^{10} UFC ml⁻¹.

ANEXO II

Preparo das dietas

• Dieta AIN 93G

Foram utilizados no preparo da dieta controle como fonte de sacarose (açúcar refinado), óleo de soja e o amido (maisena), adquiridos no comércio; os demais ingredientes tais como celulose microfina, bitartarato de colina, L-cistina, pré-Mix mineral e pré-Mix vitamínico e caseína foram obtidos no Departamento de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Viçosa. Os ingredientes foram misturados em um único recipiente e processados em uma batedeira semi-industrial por 15 minutos. Em seguida adicionou-se água destilada estéril aos poucos até a massa ficar no ponto de obter “pellets” os quais foram acondicionados em geladeira por 24 horas. No dia seguinte foram retirados e acondicionados em sacos plásticos na geladeira com temperatura variando de 4°C a 8°C.

• Dieta “Soya Diet” sem sacarose (Support®)

A dieta enteral utilizada para alimentar os camundongos foi a “Soya Diet” sem Sacarose (Support®). A dieta em pó foi dissolvida em água destilada estéril. Para os tratamentos que receberam prebióticos foram adicionados 15,3 mg 100 g⁻¹ de peso corporal por dia de FOS e 15,3 mg 100 g⁻¹ de peso corporal por dia, de inulina, considerando-se o peso médio do animal como 24 g e um consumo médio diário de, aproximadamente, 20 mL da dieta por animal.

ANEXO III

Delineamento experimental

Foram utilizados camundongos albinos suíços com quatro a seis semanas de idade, obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos de dez animais e mantidos em gaiolas desinfetadas em temperatura de 25 °C. A imunodepressão foi feita do início ao fim do experimento com prednisona (10 mg Kg⁻¹ de peso corporal), por via oral, nos animais dos tratamentos III, V, VII e IX. Foi também administrado carbenicilina (200 mg kg⁻¹ de peso corporal) nos quatro primeiros dias de experimento por via oral, nos animais dos tratamentos III, V, VII e IX. No quinto dia do experimento foi fornecida com micropipeta, 100 µL de dieta, contendo 10¹⁰ UFC mL⁻¹ de *K. pneumoniae*, aos animais dos tratamentos IV, V, VIII e IX (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferentes tipos de tratamentos aos quais os animais foram submetidos.

Tratamento	Características
I	Dieta AIN 93G e *animais saudáveis.
II	Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e animais saudáveis.
III	Dieta enteral com prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos.
IV	Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais saudáveis.
V	Dieta enteral com prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos
VI	Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais saudáveis.
VII	Dieta enteral sem prebióticos, não contaminada e animais imunodeprimidos
VIII	Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais saudáveis.
IX	Dieta enteral sem prebióticos, contaminada e animais imunodeprimidos

* animais saudáveis = animais não imunodeprimidos

ANEXO IV

Preparo do material para obtenção de séries histológicas em resina

Fragmentos de fígado e de baço de camundongos foram desidratados em banhos de série crescente de etanol a 80%, 90% 95% e 100% (3 x) durante 30 minutos, infiltrados em resina glicolmetacrilato (Historesin[®], Leica) durante 24 horas e incluídos na mesma resina.