

ELIANA MARIA FERREIRA GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS  
FOSFORILADOS EM INFECÇÕES EXPERIMENTAIS CAUSADAS PELAS  
*Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICAS DE CÃES (DEPEC)**

Campo Grande – MS

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELIANA MARIA FERREIRA GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS  
FOSFORILADOS EM INFECÇÕES EXPERIMENTAIS CAUSADAS PELAS  
*Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICAS DE CÃES (DEPEC)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Iandara Schetttert Silva

Campo Grande – MS  
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIANA MARIA FERREIRA GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS MANANOLIGOSSACARÍDEOS  
FOSFORILADOS EM INFECÇÕES EXPERIMENTAIS CAUSADAS PELAS  
*Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICAS DE CÃES (DEPEC)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

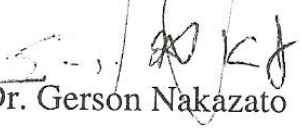
Resultado: Aprovada

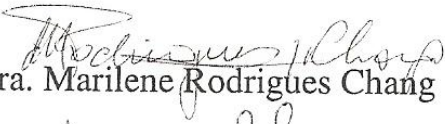
Campo Grande (MS), 17 de setembro de 2010.

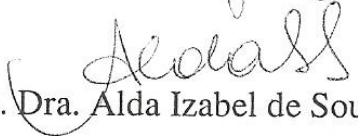
BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dra. Iandara Schettert Silva

  
Prof. Dr. Cláudio Roberto Madruga

  
Prof. Dr. Gerson Nakazato

  
Prof. Dra. Marilene Rodrigues Chang

  
Prof. Dra. Alda Izabel de Souza

Prof. Dra. Alexandra Maria Almeida Carvalho Pinto

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo constante incentivo e crédito que iria conseguir realizar mais esse objetivo em minha vida.

À família, que se torna a base de todas as realizações.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois é tudo em minha vida, sem a Sua presença, não conseguiria.

À Prof<sup>a</sup> Dra Landara Schettert Silva, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos e equipe por ter idealizado o curso de pós-graduação, tornando possível a formação de vários Mestres e Doutores e abrindo portas para o conhecimento ainda maior na UFMS.

À Prof<sup>a</sup> Dra Marilene Rodrigues Chang, pelo apoio e por participar do exame de qualificação e banca definitiva e por toda ajuda prestada durante a tese.

Ao Dr. Valter Onselen e ao Dr. Rui Caetano pela orientação nas análises estatísticas e ajuda na metodologia do experimento.

A Prof<sup>a</sup>. Dra Alda Izabel de Souza por participar do exame de qualificação e da banca definitiva.

Ao Dr. Claudio Madruga e ao Dr. Flávio Araújo pelo apoio durante a tese.

Ao Dr. Gerson Nakazato pelo apoio, pela ajuda nos artigos e toda a sua ajuda prestada durante a tese.

À Débora Orlatechea Alencar e Fernanda Sposito do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia e Bioquímica pela ajuda no laboratório.

Ao Daniel Guedes, Carlos Ramos, Thais Farias, Renato Marçal, Ingrid Souza e Lívia Russi pela ajuda no laboratório e, sobretudo pela amizade.

À Elizabeth Souza Sanches, Floriano Campoçano e Maína Oliveira Nunes pela ajuda e atenção.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos os amigos, funcionários, colegas veterinários que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

## RESUMO

Gouveia E.M.F. **Avaliação da ação dos mananoligossacarídeos fosforilados em infecções experimentais causadas pelas *Escherichia coli* enteropatogênicas de cães (DEPEC).** Campo Grande; 2010. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Denomina-se como “diarreia infantil” a doença causada pela *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), que causa uma diarreia com febre, náuseas e vômitos. As cepas de EPEC, desse estudo, possuem fatores de virulência similares aos de EPEC, isoladas de humanos, e são potencialmente infectantes para crianças e lactentes. Utilizou-se, neste estudo, um mananoligossacarídeo fosforilado (Bio-Mos<sup>®</sup>), um prebiótico não digestível, que não é hidrolisado nem absorvido na porção superior do trato gastrointestinal e ocupa o sítio de ligação do patógeno no intestino, evitando que as bactérias se liguem à manose do epitélio intestinal. Entre sete linhagens de EPEC de cães, foram escolhidas as linhagens SPA14 e 4083 por causarem diarreia em testes preliminares. Foram escolhidos, como unidades experimentais, 25 cães distribuídos em cinco grupos, um controle e quatro inoculados, sendo dois grupos tratados com o prebiótico. Quando os animais completaram 60 dias de idade, as variáveis hematológicas (linfócitos, neutrófilos e monócitos) e textura das fezes, foram observadas após os dias 0, 5, 10, 15 e 20 da inoculação das duas linhagens. As variáveis imunológicas IgG e IgA foram analisadas nos dias 0, 10 e 20 e as bacteriológicas (presença do gene *eae* de EPEC reisolada de coprocultura) após 24h, 48h e 72h da infecção experimental, finalizando o experimento aos 80 dias de idade. As duas linhagens utilizadas provocaram diarreia após 24 a 48 horas de inoculação e, algumas, em até 72 horas. Na Reação em Cadeia da

Polimerase (PCR), constatou-se que houve uma recuperação do fator de virulência com a amplificação do gene *eae* após a inoculação das linhagens 4083 e SPA14. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de células sanguíneas e produção de IgA e IgG. O MOS foi efetivo na recuperação da textura das fezes, pois os animais que receberam o prebiótico recuperaram-se mais rapidamente da infecção, comparando-se aos que não receberam o tratamento, demonstrando-se, dessa forma, a sua importância, visto que a diarreia causa desidratação com a perda de nutrientes e eletrólitos. Estudos que caracterizam as EPEC permitem-nos conhecer mais sobre a patogenicidade dessas bactérias e tornam-se relevantes na área de Saúde Pública.

**Palavras-chave:** *E. coli* enteropatogênica, experimento *in vivo*, cães, mananoligossacarídeos fosforilados, PCR.



## ABSTRACT

Gouveia E.M.F. **Evaluation of the action of phosphorylated mannanoligosaccharides on experimental infections caused by dog enteropathogenic *Escherichia coli* (DEPEC).** Campo Grande; 2010. [Thesis – Federal University of Mato Grosso do Sul].

“Infant diarrhea” is the name of the disease caused by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which cause diarrhea with fever, nausea and vomits. The EPEC strains in this study have virulence factors similar to those of EPECs isolated from humans and are potentially infective for children and nursing mothers. In the present study, a phosphorylated mannanoligosaccharide (Bio-Mos<sup>®</sup>) was employed; it is a non-digestible prebiotic, neither hydrolyzed nor absorbed at the upper part of the gastrointestinal tract and occupies the binding site for the pathogen in the intestine, preventing thus that bacteria bind to mannose at the intestinal epithelium. Of seven EPEC strains from dogs, SPA14 and 4083 were chosen for having caused diarrhea in preliminary tests. Experimental units consisted of 25 dogs distributed into five groups, one control and four inoculated, two groups treated with the prebiotic. When the animals were 60 days old, the hematological variables (lymphocytes, neutrophils and monocytes) and stool texture were observed after days 0, 5, 10, 15 and 20 after inoculation of both strains. The immunological variables IgG and IgA were analyzed at days 0, 10 and 20 and the bacteriological parameters (presence of the gene *eae* from EPEC reisolated from fecal culture) were assessed after 24h, 48h and 72h of the experimental infection; the experiment ended when the animals were 80 days old. Both strains caused diarrhea after 24 to 48 hours of inoculation and, in some cases, up to 72 hours. Polymerase Chain Reaction

(PCR) indicated that there was a recuperation of the virulence factor by amplification of *eae* gene after inoculation of 4083 and SPA14 strains. There was no significant difference between groups as to number of blood cells and production of IgA and IgG. MOS was effective in the recovery of stool texture since the animals that received the prebiotic recovered more rapidly from the infection, compared to those that did not receive the treatment, showing thus its importance once diarrhea cause dehydration with nutrient and electrolytes losses. Studies characterizing EPECs improve the knowledge of the pathogenicity of these bacteria and become relevant in the field of Public Health.

**Keywords:** Enteropathogenic *E. coli*, *in vivo* experiment, dogs, phosphorylated mannanoligosaccharides, PCR.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO GERAL DA LITERATURA</b>	<b>14</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>4 Trabalhos Publicados</b>	<b>19</b>
<b><i>Use of mannanoligosacharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and this effects on E.coli inactivated in dogs</i></b>	<b>20</b>
<b>Abstract</b>	<b>21</b>
<b>Resumo</b>	<b>21</b>
<b>Introduction</b>	<b>21</b>
<b>Methods</b>	<b>22</b>
<b>Results</b>	<b>23</b>
<b>Discussion</b>	<b>23</b>
<b>Conclusion</b>	<b>24</b>
<b>References</b>	<b>24</b>
<b><i>Experimental Infection with Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) identified by PCR in Boxer Pups</i></b>	<b>25</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>27</b>
<b>Introduction</b>	<b>29</b>
<b>Materials and Methods</b>	<b>31</b>
Bacterial strains	31
DNA extraction	32
PCR	33
In vivo tests	33
<b>Results</b>	<b>35</b>
<b>Discussion</b>	<b>39</b>
<b>Acknowledgements</b>	<b>41</b>
<b>References</b>	<b>42</b>
<b><i>Avaliação da ação dos mananoligossacarídeos fosforilados na resposta imune, hematológica e textura das fezes em infecção experimental com Escherichia coli enteropatogênica (EPEC)</i></b>	<b>46</b>
<b>Resumo</b>	<b>48</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>50</b>

<b>2</b>	<b><i> Materiais e Métodos</i></b>	<b>52</b>
2.1	Amostras bacterianas	52
2.2	Animais	53
2.3	Instalações	54
2.4	Infecção experimental e PCR	55
2.5	Grupos experimentais	55
2.6	Delineamento experimental	56
2.7	Variáveis resposta	56
2.10	Análise estatística	58
<b>3</b>	<b><i> Resultados</i></b>	<b>58</b>
3.1	Hemograma	58
3.2	Imunoglobulinas IgG e IgA	59
3.3	Avaliação clínica	61
<b>4</b>	<b><i> Discussão</i></b>	<b>63</b>
	<b><i> Referências</i></b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b><i> DISCUSSÃO</i></b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b><i> CONCLUSÕES</i></b>	<b>75</b>
	<b><i> REFERÊNCIAS</i></b>	<b>77</b>
	<b><i> Anexo 1 - Certificação de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais</i></b>	<b>83</b>
	<b><i> Anexo 2</i></b>	<b>85</b>
	<b><i> Figura 1</i></b>	<b>86</b>
	<b><i> Figura 2</i></b>	<b>86</b>
	<b><i> Figura 3</i></b>	<b>87</b>
	<b><i> Apêndice - Tabela de Avaliação dos Animais</i></b>	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Além de ser responsável pela digestão e absorção de nutrientes e água, o sistema digestório é a principal via de acesso pela qual microrganismos patogênicos e toxinas invadem o organismo (CORREA JR, 2007).

A biota gastrointestinal da maioria dos animais contém um complexo especial de população denominada de microbiota que é importante para o desenvolvimento do sistema imunológico, resistência às populações patogênicas, nas produções de ácidos graxos e essenciais (AGE) e na expressão de genes no trato gastrointestinal.

A microbiota desejável ao organismo de cães é aquela que trabalha para melhorar a saúde intestinal, como, por exemplo, composta por *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* sp., *Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Propionibacterium* sp., entre outros (CORREA JR, 2007). Esses microrganismos ou suplementos alimentares administrados para o benefício da saúde dos animais e humanos podem ser divididos em probióticos e prebióticos.

O conceito de probiótico segundo SCHREZENMEIR e DE VRESSE (2001) é de uma mono ou policultura viável de microrganismos os quais aplicados ao animal ou homem afetam benéficamente o hospedeiro por melhorar as propriedades da microbiota nativa.

Os prebióticos são ingredientes não digestíveis que não são hidrolisados e nem absorvidos na porção superior do trato gastrointestinal e que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias desejáveis, melhorando o perfil da microbiota (ROY e GIBSON, 1998).

Entre os oligossacarídeos que têm sido mais estudados nessa área estão os frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS) (MENTEN, 2001).

As pesquisas relatam três respostas distintas quanto ao uso de prebióticos na alimentação animal. A primeira refere-se à modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro. A segunda é a possível ação melhoradora sobre o sistema imune e sobre certos aspectos anatômicos do

sistema digestório. A terceira é a conseqüência direta dessas duas primeiras e demonstra a influência do uso destes compostos sobre o desempenho animal (SILVA & NÖRNBERG, 2003).

O Mananoligossacarídeo fosforilado Bio-Mos<sup>®</sup> é extraído da levedura *Sacharomyces cerevisiae*. Esse carboidrato complexo oferece receptores ricos em manose para atrair as bactérias patogênicas. Ocupando o sítio de ligação do patógeno, evita que as bactérias se liguem a manose do epitélio intestinal e provoquem doenças nos animais (COLLET, 2000)

As bactérias podem causar enfermidade tanto pela invasão de tecidos ou órgãos do hospedeiro, replicando-se extra ou intracelularmente, como pela secreção de toxinas que são responsáveis pelas alterações clínicas (KREUTZ et al., 2001).

*Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa que habita o intestino de humanos e animais (DRASAR & HILL, 1974). Esse bacilo foi descrito em 1885, pela primeira vez, por Theodor Escherich, que o denominou inicialmente de *Bacterium coli*.

A maioria das amostras de *E. coli* não é patogênica, mas algumas estão associadas a uma variedade de doenças intestinais e extra intestinais em humanos (LEVINE, 1984) e animais (PESTANA DE CASTRO et al., 1984; BLANCO et al., 1993; ROBINS et al., 1991)

Para a classificação dos microrganismos em patogênicos e não-patogênicos, deve-se observar que, dentro dos grupos ou gêneros de bactérias, pode haver espécies com propriedades antagônicas. GIBSON e ROBERFROID (1995) apresentaram um esquema generalizado de bactérias colônicas de humanos as quais têm efeitos benéficos ou prejudiciais. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp e *E. coli* foram incluídas no grupo das bactérias patogênicas.

As infecções por EPEC são caracterizadas por produzirem lesões no epitélio intestinal denominadas *attaching and effacing* (A/E). O fenômeno distingue-se pela aderência bacteriana íntima ao epitélio intestinal. A presença de A/E é associada ao desarranjo do sistema enzimático de absorção digestiva levando à má absorção de nutrientes (NATARO & KAPER, 1998), acúmulo de actina e outras proteínas do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas semelhantes a pedestais (CRAY & MOON, 1995).

No segundo Simpósio Internacional de EPEC , em 1995, pesquisadores classificaram amostras de EPEC em duas categorias (KAPER, 1996): EPEC típicas, caracterizadas por causarem lesão A/E, presença do gene *eae*, ausência de *stx* e presença do plasmídeo EAF, e EPEC atípicas que apresentam lesão A/E, presença do gene *eae*, ausência de *stx*, mas não apresentam plasmídeo EAF (NATARO & KAPER, 1998).

As EPEC, assim como outras *E. coli* que causam diarreia, são definidas na base de propriedade de virulência. Existem dois métodos de identificação e detecção de EPEC em laboratório: fenotípico e genotípico. O método fenotípico inclui o uso de cultura de célula e microscopia de fluorescência (detectar lesão A/E), e o método genotípico requer o uso de hibridização de DNA ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (detecção do gene *eae* e ausência de gene *stx*) (NATARO & KAPER, 1998).

GOUFFAUX et al. (2000), estudando EPEC em humanos, cães e gatos, identificaram um grupo heterogêneo de genes por meio de PCR, e encontraram pelo menos cinco genes destas estavam intimamente relacionados às EPEC humanas.

As EPEC têm sido relatadas como a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento (NATARO & KAPER, 1998). Assim, os estudos sobre os fatores de virulência, patogênese e quais são os sintomas clínicos observados tem sido de fundamental importância para a área de saúde pública. Neste estudo, provocando uma infecção experimental em filhotes de cães com duas linhagens de EPEC com fatores de virulência já estudados e intimamente relacionados às EPEC humanas objetivou-se verificar a ação terapêutica do prebiótico MOS após a inoculação experimental.

## 2 REVISÃO GERAL DA LITERATURA

Alguns oligossacarídeos como a estaquiase, a galactona e os mananos podem atuar diretamente sobre bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. impedindo sua proliferação no sistema digestório. Para que as bactérias consigam colonizar o trato gastrointestinal e criar uma condição patológica, precisam inicialmente aderir-se à superfície epitelial. Esta adesão ocorre através de glicoproteínas (lectinas ou fímbrias) que reconhecem determinados açúcares da superfície do epitélio intestinal. Portanto, se elas se ligarem a um açúcar ou oligossacarídeo dietético e não à mucosa intestinal, irão passar com a digesta, sem causar problemas aos animais (COLLET, 2000, MULRENNAN 2003).

O MOS atua beneficemente modulando a resposta imune dos animais através da apresentação de patógenos às placas de Payer. Os patógenos e as toxinas ligados ao MOS formam um grande novelo que é facilmente identificado pelo sistema imune. Estudos mostram uma maior produção de imunoglobulina A (IgA) sérica em cães e maior atividade neutrofílica (LAUE & TUCKER, 2006).

Os prebióticos têm sido usados com a finalidade de estimular o desenvolvimento de bactérias como *Bifidobacterium* e dos *Lactobacillus*, os quais têm uma grande capacidade de produzir ácidos láctico e acético. Esses ácidos promovem a diminuição do pH do sistema digestivo e provoca a inibição no desenvolvimento das populações de bactérias nocivas, como *E. coli*, *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp, as quais apresentam alta sensibilidade a ambientes ácidos (MATHEW et al., 1993).

Os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm capacidade de produzir substâncias com propriedades imunoestimulatórias e interagir com o sistema imune em vários níveis, incluindo a produção de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose macrofágica, eliminação e a indução da síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas, em especial IgA (SILVA & NÖRHBORG, 2003). Os macrófagos ativados são muito mais eficientes para fagocitar bactérias e eliminar organismo invasores (STHAL, 1992). SAVAGE et al., (1996) ao fornecerem 0,11% de MOS constataram significativos aumentos nos níveis de IgG do plasma e IgA da bile em perus.



*Escherichia coli* é a bactéria anaeróbia facultativa encontrada em maior quantidade no intestino. São conhecidas variantes de *E. coli* que adquiriram virulência: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtoras de shiga-toxina (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (NATARO & KAPER, 1998).

Ao contrario das cepas comensais da microbiota intestinal normal, EPEC adquiriu genes que codificam os fatores de virulência que a habilitam a infectar células hospedeiras, tais como a proteína ou adesina intimina (codificada pelo gene *eae*) e *bundle forming pilli* (codificada pelo gene *bfpA*) (SILVA & SILVA, 2005).

SCALETSKY et al. (1999) avaliaram fezes de crianças recém nascidas e menores de um ano e associaram a presença de *E. coli* enteropatogênica com o tempo de duração da diarreia, sendo que a presença de EPEC atípicas foi considerada significativamente associada à diarreia.

A maioria das cepas atípicas de EPEC já foi isolada de diferentes espécies de animais ao contrário das cepas típicas que, segundo a literatura, têm apenas os seres humanos como reservatório (NATARO & KAPER, 1998; ROTTNER et al., 2005).

Como as EPEC causam diarreia não está claro. Acredita-se que as EPEC aderem à superfície da mucosa do intestino delgado e grosso e não atingem a lâmina própria em número suficiente (FRANKEL et al., 1998). Entretanto, as EPEC demonstram uma habilidade de internalização em epitélios intestinais *in vitro*, apesar de limitada (FRANCIS et al., 1991).

O mecanismo central da patogênese da EPEC é a lesão A/E. Caracteriza-se pela aderência íntima da bactéria à superfície das células epiteliais, seguida de destruição das microvilosidades, formação de pedestal e agregação polarizada de moléculas de  $\alpha$ -actina, talina, exrina, com como de outros componentes do citoesqueleto situados abaixo do sítio de adesão. A habilidade de produzir A/E não se restringe a EPEC, pois tem sido observada também em *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), e em outras espécies de bactérias (KNUTTON et al., 1989; PEDROSO et al., 1993; NATARO & KAPER, 1998).

As principais proteínas efetoras responsáveis pelo desencadeamento da adesão intimina e A/E são a intimina e seu receptor Tir. A interação intimina-Tir permite a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira, inicia processos de sinalização celular e reorganiza os componentes do citoesqueleto para formar o pedestal (GOOSNEY et al., 2000).

Intimina é uma proteína de 94kDa, codificada pelo gene *eae*, que se expressa na membrana externa da bactéria. Análises das seqüências de 280 resíduos de aminoácidos de sua porção C-terminal, correspondente ao domínio que interage com Tir, permitem distinguir moléculas de intimina encontradas em EPEC e em STEC (ADU-BOBIE et al., 1998). Já foram inicialmente descritos quatro subtipos de intimina:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Cada um deles pode estar relacionado com o tropismo tecidual da bactéria para diferentes regiões do intestino (PHILLIPS & FRANKEL, 2000).

Modelos experimentais usando culturas de células como alvo e cepas de *E. coli* originais ou geneticamente modificadas como agente infectante, têm permitido o estudo detalhado das interações de EPEC com a célula hospedeira, como a produção de mediadores da inflamação, a identificação de vias celulares de sinalização e de mecanismos de lesão ou morte celular (PARKOS et al, 1991; SAVKOVIC et al., 1996).

Os dados disponíveis sobre a resposta da célula hospedeira aos fatores de virulência desenvolvidos por EPEC são compatíveis com as informações já obtidas para outros patógenos, como, por exemplo, produção de fatores quimiotáticos, estimulação de sinal das vias de transdução nas células hospedeiras e recrutamento de células inflamatórias. Vários estudos usando diferentes modelos animais ou sistemas *in vitro* têm identificado a interleucina IL-8 como um dos principais fatores quimiotáticos que atraem PMN para o sítio de infecções ou de lesão tecidual (HOCH et al., 1996).

O uso de modelo animal tem sido útil no momento em que desvendar mecanismos etiopatológicos de diversos estudos, ainda que se deparem com limitações para se investigar a doença humana, quando se encontram aspectos éticos ou inerentes à própria doença e no modo de investigação (FAGUNDES & TAHA, 2004).

Dados epidemiológicos indicam que, nas áreas endêmicas, a diarreia causada por EPEC é mais comum e mais grave na primeira infância,

progressivamente menos freqüente e mais branda na segunda e terceira infâncias e rara em adultos (LEVINE & EDELMAN, 1984). Já o aparecimento de anticorpos circulantes segue curso inverso: não são detectáveis na primeira infância, aumentam com a idade e atingem níveis mais elevados nos adultos (NETER et al., 1955). Admite-se, portanto, que a exposição a EPEC durante a infância produz imunidade contra este patógeno. Esses dados sugerem que o desenvolvimento de vacinas contra EPEC seria de utilidade em países como o Brasil, onde, de maneira perversa, estão associados fatores de subnutrição, condições precárias de habitação e falta de água potável e de rede de esgotos (SILVA & SILVA, 2005).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Verificar a ação terapêutica do MOS em infecção experimental com EPEC em cães.

#### **3.2 Específicos**

Avaliar a variação no número de leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e linfócitos em animais infectados com EPEC, recebendo MOS.

Avaliar as concentrações séricas de IgA e IgG em animais infectados com EPEC, recebendo MOS.

Avaliar as mudanças na textura das fezes de animais infectados com EPEC, recebendo MOS.

## **4 Trabalhos Publicados**

**Use of mannanoligosacharides as an adjuvant treatment for  
gastrointestinal diseases and this effects on *E.coli* inactivated in dogs**

Publicado na revista **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n.4, p. 23-26, 2006.

## Use of mannanoligosaccharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and this effects on *E.coli* inactivated in dogs<sup>1</sup>

Uso de mananoligosacarídeos fosforilados como adjuvante no tratamento de doenças gastrointestinais e seu efeito na inativação da *E. coli* em cães

Eliana Maria Ferreira Gouveia<sup>2</sup>, Iandara Schettert Silva<sup>3</sup>, Valter Joost Van Onselem<sup>4</sup>, Rui Alberto Caetano Corrêa<sup>4</sup>, Camila Junqueira e Silva<sup>5</sup>.

1. Postgraduate Program on Agroindustrial Production and Management Work of University for Development of the State and the Pantanal Region (UNIDERP), Campo Grande, Brazil.
2. Master, Fellow PhD degree in Postgraduate Program on Health and Development in West Central Region, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Brazil.
3. PhD, Associate Professor of Department of Veterinary, UNIDERP, Brazil.
4. PhD, Department of Production, UFMS, Brazil.
5. Fellow Master degree in Postgraduate Program on Agroindustrial Production and Management, UNIDERP, Brazil.

### ABSTRACT

**Purpose:** To evaluate the effects of mannanoligosaccharides on dogs showing gastroenteritis. **Methods:** Sixteen dogs, 2-6 month-old, distributed into two groups: T1 - animals with gastroenteritis receiving treatment for the disease + mannanoligosaccharides (2 g/animal).; and T2 - animals with gastroenteritis receiving just treatment for the disease. The animals were randomly included in the sample and all of them were submitted to blood and feces collection for coproculture. In the treatment for gastroenteritis antibiotic, antiemetic, vermifuge, vitamins and sorotherapy were used. The parameters evaluated were the numbers of leucocytes, neutrophils, lymphocytes and the presence of enteropathogenic bacteria in feces. **Results:** The mannanoligosaccharides was effective in eliminating pathogenic *E. coli* in 85.71% of the animals, while in the no-treated group only 25% of the animals were negative to *E. coli*. **Conclusion:** The mannanoligosaccharides is effective in the control of pathogenic *E. coli* and it can be indicated as an adjuvant treatment for gastroenteritis in dogs. **Key words:** Gastroenteritis. *Escherichia coli*. Probiotics. Dog Diseases.

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da adição de mananoligosacarídeos fosforilados (MOS) que apresentavam gastroenterite, pacientes de uma Clínica Veterinária. **Métodos:** foram estudados 16 cães de 2 a 6 meses de idade, de várias raças. Os animais foram distribuídos em 2 grupos, sendo o grupo T<sub>1</sub> composto por animais com gastroenterite, que receberam o tratamento para a doença e Mos (2,0 g/animal) e o grupo T<sub>2</sub>, animais com gastroenterite, que somente receberam o tratamento para a doença sem o MOS. Os animais foram incluídos aleatoriamente na amostra e todos eles foram submetidos à coleta de sangue e de fezes para coprocultura. O tratamento para a gastroenterite constituiu-se de antibiótico, antiemético, vermífugo, vitaminas e soroterapia. No experimento, foram avaliados os leucócitos, neutrófilos, linfócitos e a presença de bactérias enteropatogênicas nas fezes. **Resultados:** Constatou-se a efetividade do Mos no grupo tratado, quando houve a eliminação da *Escherichia coli* patogênica em 85,71% dos animais, enquanto que, no grupo sem o Mos, só 25%, não apresentaram o microorganismo. **Conclusão:** O Mos é efetivo no controle da *E. coli* patogênica, sendo indicado como tratamento adjuvante nas gastroenterites. **Descritores:** Gastroenterite. *Escherichia coli*. Probióticos. Doenças do Cão.

### Introduction

There are several factors that can cause gastroenteritis including viral and bacterial infection, endoparasites and other agents, however the definitive diagnostic is not relevant once the treatment is only symptomatic. It is observed an increase in mortality of young animals when gastroenteritis occurs and when pathogenic bacteria are still present. Phosphorylated mannanoligosaccharides (MOS) are complex carbohydrates with mannose receptors that can bind pathogenic bacteria, eliminating available

receptor sites, thus avoiding other bacteria from attaching to the epithelium. The microbial food additives, defined as sources of live microorganisms, include bacteria, fungi and yeasts. The most important and usually added to ruminant diets are the yeasts, yeast cultures and fungi extracts. The carbohydrates play several roles in the nutrition of dogs, cats and other companion animals. Three important functions of carbohydrates in biological systems used to be recognized – the first was to act as energy source or component for energy storage; the second was to act as a structural component like cellulose and chitin; and the third

was confusing to scientists due to the diversity and complexity of these compounds. Nowadays, the carbohydrates and oligosaccharides have been used as nutritional modulators of the immune system. The carbohydrates are involved in all aspects of biological sciences. The wide range of possibilities available related to the structure and function of polysaccharides makes glycomics a science that study sugars and the structure of these sugars that are components of the cells. The phosphorylated mannanoligosaccharides are derived from a specific yeast strain (*Sacharomyces cerevisiae* strain 1026). These complex carbon hydrates are found mostly in the yeast cell wall, which is composed of more than 30% of mannanoligosaccharides. The cell wall is a complex matrix of protein and complex carbon hydrate that serves as a protective barrier around the cell and an interface between the cell and the extracellular surroundings. Thus, this complex matrix was developed with special characteristics to allow the communication with the extracellular surroundings. After analyzing the function of sugars in intracellular communication, it was demonstrated that the complex oligosaccharides such as the mannanoligosaccharides play fundamental roles in these interactions<sup>1</sup>. In many cases, bacterial infections occur due to the ability of the bacteria to recognize sugars present in the host cell surface and use specific receptors that allow them to attach, colonize, and, in the case of pathogens, cause disease in the animals. Mannose-specific lectins (protein fimbriae on the bacterial surface) are utilized by many gastrointestinal pathogens as a means of attachment to the gut epithelium<sup>2</sup>. The isolated definition of leavening mentions the product to it that was separate of the way of culture of leavenings: it is the composed product for leavend leavenings, that is, viable cells, with its half one of growth. Amongst the cultures of leavenings it is distinguished, particularly, of *Sacharomyces cerevisiae*. The neutrophils are destroyed in the inflammatory focus, when eat the bacterium (or other agents). Still in this initial acute phase of the inflammation, the lymphocytes frequently are diminished, had to a hormone release<sup>3</sup>. The action way, according to the authors, is based on the capacity of linking of MOS the a specific Gran-negative microbes through its interaction with sensible lactinas to manose present in the surface of these bacteria. The commercial application of this phenomenon was demonstrated by the capacity of ME to reduce the counting of *Salmonella* in chickens inoculated with a culture of these microrganismos<sup>4</sup>. The prebióticos (ME) modulate the gastrointestinal motilidade, reduce the diarréia (increased water absorption), promote the development of the mucosa of the íleo and of cólon, they provide energy to the intestinal mucosa, diminish pH of cólon favoring the one growth microbiota beneficial, increase the protection against infections (function of the barrier, immunity), among others effect<sup>5</sup>. Research with ME has been lead has five years more than and, in this short period of time, advances with regard to the briefing in its way of action had been gotten front to promotional antibiotics of growth (APCs). This factor is, in part, responsible for the degree of existing indetermination and confusion how much to the impossibility to reintroduce the use of APCs in the ration. More than 100 published assays

of research had demonstrated to the benefits of ME for the health and the performance of swines, birds and vitelos. ME also it was tested successfully in other species, such as rabbits, ostriches, emas and fish. The improvement index, as much with ME as with the APCs, depended on diverse factors that incluíam the sanitary state of the birds, the degree of contamination of the way for the illness, the level of estresse and the age of the animal<sup>6</sup>. The briefing of the effect of continues ME, especially, in relation to its effect on the imunitário system. Diverse researchers had described interesting comments in swines, vitelos and birds, being that other works lead in this area will be able to provide excellent information on ME in the next years, especially with regard to the enterite<sup>6</sup>. They had carried through experiments, supplementing dogs with 2,0g ME, 2,0g of FOS or 2,0g ME + 2,0g of FOS per day, during 14 days, dogs supplemented with 2,0g of FOS + 2,0g ME per day had presented expressivo increase in the concentrations of IgA in the íleo in relation the dog-control, also indicating stimulatón of the local immunity. The dogs supplemented with ME had presented a lesser concentration of aeróbicas bacteria and a trend of rise of the concentrations of lactobacilos in excrementos<sup>7,8</sup>. This trial aimed to evaluate the effect of MOS in animals with viral, parasitic or bacterial gastroenteritis with or without blood, and also to determine bacterial presence and alterations in feces, and changes in the number of leucocytes and neutrophils.

### Methods

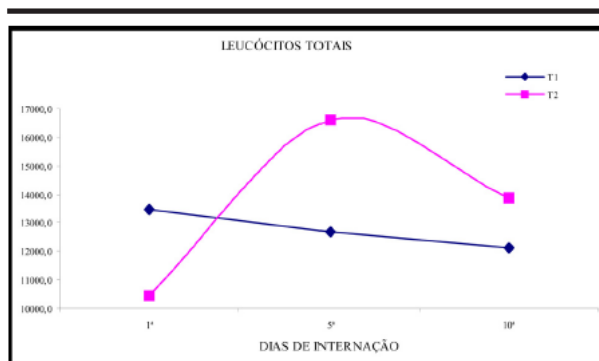
A total of 16 dogs (Rottweiler, Pit Bull, Poodle and no-pedigree) from 2 to 6 months old suffering from gastroenteritis were used in the study. The animals were kept in individual cages for 10 days. The sick animals received sorotherapy and were treated for the disease. These animals, selected according to the age, had gastroenteritis and diarrhea with or without blood. Because MOS was provided orally, animals showing vomit were not used in the study. The animals were submitted to blood collection (2,0 ml of blood) punched from cephalic vein, stored in sterilized flasks with anticoagulant (EDTA) and conserved at temperatures between 2 and 8°C. Feces were collected with sterile swabs (1.0g) with mucus, pus or blood and stored in environmental temperature for coproculture analyses on the 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days, considering the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> collection, respectively. The samples were sent to Pardini Laboratory in Minas Gerais, Brazil. Animals with gastroenteritis were examined to evaluate the level of dehydration. Through the determination of the dehydration rate, the fluid therapy treatment was started until hydration, followed by the maintenance treatment with Ringer lactate and physiological solution at 0,9%. The animals were distributed into two groups: T1 - animals with gastroenteritis receiving treatment for the disease + Bio-Mos; and T2 - animals with gastroenteritis receiving treatment for the disease, without Bio-Mos. In the treatment for gastroenteritis antibiotic, antiemetic, vermífuge, vitamins and sorotherapy were used. The antibiotic treatment consisted of intravenous enrofloxacin (5mg/Kg) during 3 or 4 days, diluted in equal parts during two minutes. The antiemetic used was metoclopramide chloridrate (1-2mg/



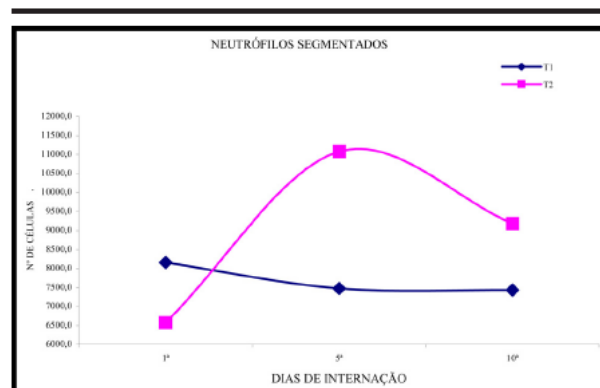
kg) total volume, administrated during 24 hours. The vermifuges used were Praziquantel, Pyrantel Pamoate (10mg/kg) administered orally when animals were not vomiting. Vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>12</sub> were also used. In the beginning of the study, animals were fed easily digestible diets once intestine takes one or two weeks to regenerate. In the group fed diets containing MOS, 2g of medication diluted in 2,0ml of water were provided orally to animals that were not eating. The effects of treatments were evaluated upon three variables obtained through hemogram (total leukocytes, segmented neutrophils and lymphocytes) and a variable obtained from coproculture (presence or absence of *E. coli*). The data were collected in the 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days of internment and the alterations occurred in the number of total leukocytes,

segmented neutrophils and lymphocytes between the 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> and 1<sup>st</sup> and 10<sup>th</sup> days were observed. A completely randomized experimental design was used. The first dog showing gastroenteritis received treatment with MOS (T1), the second one received treatment without MOS (T2) and then successively. As samples of the two groups were independent and total leukocytes, segmented neutrophils and lymphocytes can be evaluated in the ordinal measurement scale, Mann-Whitney U test was used to compare the groups with and without MOS. Exact Fisher test was used in the 10<sup>th</sup> day of the experimental period to determine the effect of MOS on the frequency of dogs that stopped being positive to *E. coli*. P-values higher than 0.05 were not considered statistically significant.

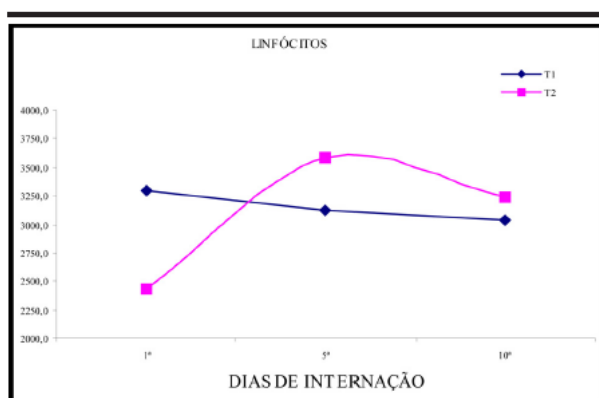
## Results



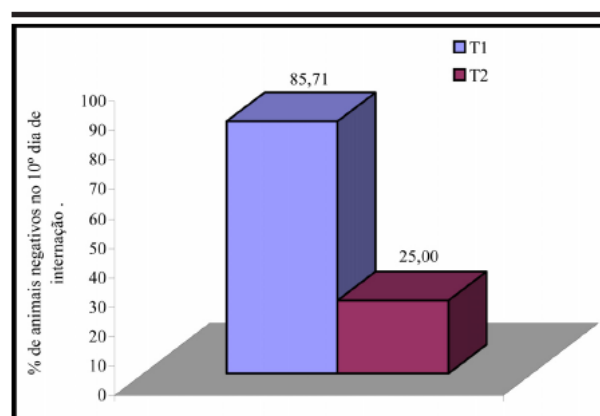
**FIGURE 1** - Number of total leukocytes obtained in the hemogram of dogs from T1 (with MOS) and T2 (without MOS) in the 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days.



**FIGURE 2** - Number of segmented neutrophils obtained in the hemogram of dogs from T1 (with MOS) and T2 (without MOS) in the 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days.



**FIGURE 3** - Number of lymphocytes obtained in the hemogram of dogs from T1 (with MOS) and T2 (without MOS) in the 1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days.



**FIGURE 4** - Percentage of animals positive to *E. coli* in the 1<sup>st</sup> or 10<sup>th</sup> day and without the microorganism in the 10<sup>th</sup> day in the groups T1 (with MOS) and T2 (without MOS).

## Discussion

There were no statistically differences between the two groups with respect to leukocytes analysis. These data remained on physiological parameters, what can be considered as a clinical improvement (Figure 1). In a bacterial infection, due to the inflammatory process, the number of

leukocytes tends to increase, while in a viral infection, drugs, toxic chemicals, toxoplasmosis and *Erlichia* this number is reduced. Therefore, the results of the present study demonstrate the acute pathogenesis of viral gastroenteritis. No mortality was observed, despite this pathology normally represents the main cause of mortality in small animals. In the Neutrophils analysis, there were no significant

differences ( $P>0.05$ ) in the number of segmented neutrophils between T1 and T2. According to Kantek *et al.* (1994), neutrophils are the first cells to reach the inflammation foci, identify and neutralize foreign agents, and can be mobilized in large number first from the marginal pool, subsequently from the reserve compartment of the marrow and finally by an increase in the mitotic compartment of the same marrow. The neutrophils are destroyed inside the inflammatory focus, during the phagocytosis of bacteria or other agents (Figure 2). There were no significant differences ( $P>0.05$ ) between the two groups with respect to lymphocytes analysis. These data remained on physiological parameters, what can be considered as a clinical improvement. Hematological results showed better homogenization of leukocytes, neutrophils and lymphocytes in animals fed MOS. There was higher instability and a greater variation in the number of evaluated cells in the animals fed diets without MOS, as demonstrated in the graphs (Figure 3). The coproculture results, after the three collections (1<sup>st</sup>, 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days) in all animals, only enteropathogenic microorganisms were observed and these were positive for:

1. *Pseudomonas aeruginosa*
2. *Proteus mirabilis*
3. *Providencia alcalifaciens*
4. *Enterobacter cloacae*
5. *Morganella motganii*
6. *Citrobacter freundii*
7. *Escherichia coli*

There was a significant difference ( $P<0.05$ ) between the groups. Animals fed diets with MOS became negative to pathogenic *Escherichia coli* while in the animals fed diets without MOS these pathogenic bacteria remained present thus intensifying symptoms of gastroenteritis (figure 4). Bio-Mos was effective in eliminating pathogenic *E. coli* in 85.71% of the animals, while in the non-treated group only 25% were negative to *E. coli*. It can be concluded that Bio-Mos was effective in the control of pathogenic *E. coli* and can be indicated as an adjuvant treatment for gastroenteritis in dogs. There was a significant difference ( $P<0.05$ ) between groups T1 and T2 regarding the frequency of animals that became negative to *E. coli*.

## Conclusion

The results of the present study demonstrated that pathogenic bacteria were inactivated in the animals fed diets supplemented with Bio-Mos. Significant differences were observed between the number of dogs fed diets containing MOS that became negative to *E. coli* and those that were not supplemented with MOS. It can be concluded that Bio-Mos was effective in the control of pathogenic *E. coli*. Considering the changes in the number of leukocytes, neutrophils and lymphocytes in the animals, further studies evaluating the same parameters must be conducted. The non-supplemented group showed higher variation in the number of leukocytes, neutrophils and lymphocytes, indicating higher instability. Animals fed diets with Bio-Mos remained within normal physiological parameters, what can be considered as a clinical improvement.

## References

1. Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am.* 1993;268:82-9.
2. Mulrennan F. A escolha de uma nova geração. *Glicômica Feeding Times.* 2003;8(2):5-30
3. Kantek CE, Pachaly JR. Os Leucócitos. In: Manual de Hematologia Veterinária. São Paulo:, Livraria Varela, 1978.
4. Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poult Sci.* 2000;79:205-11.
5. Borges FMO, Nunes IJ. Dietas Específicas para Pacientes Especiais. In: Simpósio de Nutrição de Pets Alltech. Belo Horizonte: Escola de Veterinária-UFMG; 2003, p1-23.
6. Connolly A. Reagindo ao desafio da retirada dos antibióticos promotores de crescimento das rações e a forma como os oligossacarídeos específicos assumiram a dianteira. *Feed Compounder.* 2001;4:25-6.
7. Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Chow J, Wolf BW, Garleb KA, Fahey Jr GC. Fructooligosaccharides and Lactobacillus acidophilus modify gut microbial population, total tract nutrient digestibility and fecal protein catabolite concentration in healthy adult dogs. *J Nutr* 2002;132:3721-31.
8. Grieshop MC. Diet may affect nutrition, immune system of pets. *Feedstuffs.* 2003;75:26-52.

---

### How to cite this article:

Gouveia EMF, Silva IS, Van Onselem VJ, Corrêa RAC, Silva CJ. Use of mannanoligosaccharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and this effects on *E.coli* inactivated in dogs. *Acta Cir Bras.* [serial on the Internet] 2006;21 Suppl 4. Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

---

\* Color figures available from [www.scielo.br/acb](http://www.scielo.br/acb)

**Experimental Infection with Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)  
identified by PCR in Boxer Pups**

Enviado para publicação na revista: **Acta Cirúrgica Brasileira**

**Experimental infection with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)  
identified by PCR using enteric-coated capsules in boxer pups<sup>1</sup>**

Infecção experimental com *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC),  
identificadas por PCR, utilizando cápsulas com revestimento entérico em  
filhotes da raça boxer

**Eliana Maria Ferreira Gouveia<sup>I</sup>, Iandara Schettert Silva<sup>II</sup>, Gerson Nakazato<sup>III</sup>,  
Flávio Ribeiro de Araujo<sup>IV</sup>, Marilene Rodrigues Chang<sup>V</sup>**

Corresponding Author: Eliana Maria Moreira Ferreira Gouveia. saudeanimalms@terra.com.br.  
Avenida das Bandeiras, Nº 1296, Bairro Marcos Roberto, CEP: 79080-001, Campo Grande,  
MS, Brazil. phone: +55 (67) 3342-0702, +55 (67) 9983-4470

Tradutora: Karina Chamma e-mail: klc\_btu@yahoo.com.br

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior – CAPES.

This article does not present statistical analysis because it is descriptive characteristic.

---

<sup>I</sup> Master, Fellow PhD degree in Postgraduate Program on Health and Development for the Central-West Region, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil  
Responsible author for conception, design and writing of the study and scientific article.

Research performed at the Microbiological Research Laboratory, Department of Pharmacy and Biochemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul State, Brazil and Sanitary Animal Laboratory, Research Department, EMBRAPA Beef Cattle in Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil

<sup>II</sup> Associate Professor, PhD, Department of Postgraduate Program on Health and Development for the Central-West Region, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Advisor, guiding the design and the study design and scientific and intellectual content of the article

<sup>III</sup> Associate Professor, PhD, Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, Paraná State, Brazil. Providing strains of bacteria and critical review of the article.

<sup>IV</sup> Researcher, PhD, EMBRAPA (Brazilian Enterprise for Agricultural Research) Beef Cattle, Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Acquisition and interpretation of immunological data.

<sup>V</sup> Associate professor; PhD, Departamento de Farmácia e Bioquímica, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, State, Brazil. Acquisition and interpretation of microbiological data and critical review of the article

## ABSTRACT

**Purpose:** To verify the possibility of an experimental infection with EPEC and to confirm by PCR that the symptoms manifested after infection were due to the virulence factors of the studied bacteria. **Methods:** Experimental units were 14 healthy pups of Boxer breed, aged 60 days, from Campo Grande City, Mato Grosso do Sul State, Brazil. The animals were divided into three groups. One animal from each litter was included in a control group and the remaining animals were divided into two groups: one inoculated with *E. coli* 4083 strain, and another one inoculated with strain SPA14. Gelatinous capsules coated with enteric-coating solution were used for the inoculation of microorganisms. *E. coli* isolation from feces was performed for all tested animals, and the extracted DNA was subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR). **Results:** All infected animals presented diarrhea and had the gene *eae* amplified by PCR. **Conclusion:** The efficiency of PCR for the studied strains indicates that this technique could be recommended for the diagnosis of EPEC as a differential from other pathogens causing diarrhea; it may also be used in the future to verify whether other virulence factors (*bfpA* gene and EAF plasmid) persist after infection and to assess the pathogenicity of these bacteria.

**Keywords:** enteropathogenic *Escherichia coli*, dogs, virulence factors, *in vivo* experimental

## RESUMO

**Objetivo:** Verificar a possibilidade de uma infecção experimental com EPEC e confirmar por PCR que os sintomas manifestados após a infecção foram decorrentes dos fatores de virulência da bactéria estudada. **Métodos:** As unidades experimentais foram 14 filhotes saudáveis com idade de 60 dias da raça Boxer, da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Os animais foram divididos em três grupos, sendo um controle de cada ninhada e o restante dividido em dois grupos, um de animais inoculados com a cepa de *E. coli* 4083 e o outro de animais inoculados com a cepa SPA14. Para inoculação das cepas, utilizaram-se cápsulas gelatinosas revestidas com solução de revestimento entérico. O isolamento de *E. coli* das fezes foi realizado em todos os animais testados, e o DNA extraído foi submetido à técnica de PCR. **Resultados:** Todos os animais infectados apresentaram diarreia e tiveram a gene *eae* amplificado por meio de PCR. **Conclusão:** Através da eficiência da PCR das amostras, a técnica poderia ser recomendada para diagnóstico da EPEC como diferencial de outros patógenos que causam diarreia, e, no futuro, verificar se outros fatores de virulência (gene *bfpA* e plasmídeo EAF) permaneceriam após a infecção, podendo avaliar a patogenicidade das EPEC. **Palavras-chave:** *Escherichia coli* enteropatogênica, cães, fatores de virulência, Infecção experimental *in vivo*.

<sup>1</sup>Research performed at the Microbiological Research Laboratory, Department of Pharmacy and Biochemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul State, Brazil and Sanitary Animal Laboratory, Research Department, EMBRAPA Beef Cattle in Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil

## Introduction

*Escherichia coli* is an facultative anaerobic pathogenic bacterium inhabiting the intestine. Based on virulence markers associated with diarrhea in humans and other animals, six groups of diarrheagenic *E. coli* were established<sup>1</sup>: enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), Shiga Toxin-producing (STEC) and enteroaggregative (EAEC). The EPEC group expresses colonization factors such as the intimin protein (codified by the *eae* gene) and bundle forming pilus (codified by the *bfpA* gene).

EPEC infections are characterized by lesions in the intestinal epithelium which are named attaching and effacing (A/E) lesions. This phenomenon is distinguished by the close bacterial adherence to the intestinal epithelium. The presence of A/E lesions is associated with the disorganization of the digestive absorption enzyme system, leading to poor nutrient absorption<sup>2</sup>, accumulation of actin and other cytoskeleton proteins, resulting in the formation of structures similar to pedestals<sup>3</sup>.

EPEC are classified into two categories: typical EPEC, characterized by presence of A/E lesion, presence of the *eae* gene, absence of Shiga-toxin gene (*stx*) and presence of the large plasmid named EPEC adherence factor (EAF); and atypical EPEC, which are strains characterized by presence of A/E lesion, presence of the *eae* gene, absence of *stx* gene, and absence of the EAF plasmid<sup>2</sup>.

Scaletsky *et al.*<sup>4</sup> evaluated the feces of newborns and children younger than one year old and related the presence of EPEC to the duration of diarrhea,

and the presence of atypical EPEC was considered significantly associated with diarrhea.

EPEC have been reported as the main cause of infant diarrhea in developing countries<sup>2</sup>. Thus, studies on virulence factors, occurrence forms and clinical symptoms of gastrointestinal disease have been essential to understand its pathogeny.

The mechanism by which EPEC strains cause diarrhea is not clear yet. It is believed that they adhere to the mucosal surface of the small and large intestines, not reaching the lamina propria in adequate number. On the other hand, although limited, EPEC have shown the ability to invade intestinal epithelia *in vitro*<sup>5</sup>.

EPEC, similarly to other *E. coli* groups causing diarrhea, are defined based on the virulence property. There are two different methods to detect and identify EPEC in the laboratory: the phenotypic and the genotypic methods. The former requires cell culture and fluorescent microscopy (to detect A/E lesions), whereas the latter requires DNA hybridization or PCR (to detect the presence of the *eae* gene and the absence of the *stx* gene)<sup>2</sup>.

Gouffaux *et al.*<sup>6</sup> studied EPEC in humans, dogs and cats and isolated a heterogeneous group of genes by means of PCR, concluding that at least five genes from these dog enteropathogenic *Escherichia coli* (DEPEC) were closely associated with those from human EPEC.

The main aims of this study were to verify the possibility of an experimental infection with DEPEC and to confirm by PCR that the symptoms manifested after infection were due to the virulence factors of the studied bacteria.



## Materials and Methods

### Bacterial strains

We used seven EPEC strains, four atypical (*eae+*) and three typical (*eae+*, *bfpA+*)<sup>7, 8</sup>. All samples were negative to the shiga-toxin gene (*stx*)<sup>9</sup>. The strains had been previously tested for the presence of localized adherence-like pattern in HEp-2 cell cultures (Table 1).

**TABLE 1.** Characteristics of the *Escherichia coli* enteropathogenic strains from dogs used in the present experiment<sup>7, 8</sup>.

Strains	Presence of			Adhesion in HEp-2 cells
	<i>eae</i> <sup>*</sup>	<i>bfpA</i> <sup>†</sup>	EAF <sup>‡</sup>	
008	+	-	-	LAL <sup>*</sup>
HE8	+	-	-	-
SPA14	+	-	-	LAL
SPA16	+	-	-	NC <sup>‡</sup>
4225	+	+	+	-
4083	+	+	+	-
3549	+	+	+	-

\**eae*: gene codifying intimin.

<sup>†</sup>*bfpA*: one of the genes responsible for codifying the bundle forming pilus.

<sup>‡</sup>EAF: detection of EAF plasmid

\*LAL: Localized adherence-like pattern

<sup>‡</sup>NC: Non-characteristic adherence

+ : positive

- : negative

EPEC strains 3549, 4083 and 4025 had their phenotypes and genotypes studied<sup>7</sup> and were supplied by the University of Montreal, Canada. Strains 008,

HE8, SPA14 and SP16 were characterized<sup>12</sup> and supplied by the University of São Paulo, Brazil.

As negative control for PCR, we used the saprophytic *E. coli* strain TOP10 and the same protocols for DNA extraction and PCR employed for the other two strains.

### **DNA extraction**

The DEPEC strains, frozen at -80°C in Brain Heart Infusion broth (BHI; Oxoid) containing 20% glycerol, were thawed, seeded on plates containing McConkey agar medium (Sigma) and incubated at 37°C for 24 h. From this growth step, one colony was selected, seeded on BHI broth (5 mL) and incubated at 37°C for 12 h. The culture was centrifuged and the sediment resuspended in 200 µL phosphate buffered saline 0.05M, pH 7.2 (PBS), added of 10mg/ml lysozyme and incubated for 1 h at 30°C, followed by addition of 200 µg/mL proteinase K and incubation at 55°C for 1 h. Then, 300 µL 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) were added and incubation was performed at 65°C for 10 minutes; 600 µL chloroform and 400 µL protein precipitation solution (potassium acetate 5M and acetic acid 11%) were also added. The tube was then centrifuged at 10,000 × g for 10 min and the supernatant was carefully transferred to a clean tube added of 1 mL absolute ethanol for later centrifugation for 5 min. The sediment was added of 1 mL ethanol 70% and centrifuged for 2 min. After the sediment was dried, DNA was eluted in 50 µL Tris-EDTA and incubated at 65°C for 5 min. The extracted DNA was quantified in a Nanodrop spectrophotometer (Thermo).

## PCR

For PCR, 10  $\mu$ L DNA template were mixed with 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 50 pmol of each primer, 200  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate (Invitrogen), 1.5 mM  $MgCl_2$  (Invitrogen) and PCR buffer 1X (Invitrogen) in a final volume of 25  $\mu$ L<sup>10</sup>.

Following an initial denaturation at 94°C for three minutes, the material was subjected to 35 thermal cycles of 94°C (denaturation) for one minute, 56°C (annealing) for one min, and 72°C for 40 seconds. The reactions were carried out in a thermocycler BioRad Laboratories, USA.

A 5 $\mu$ L volume from each reaction was subjected to electrophoresis on 0.8% agarose gel, stained with ethidium bromide/SybrGold (Invitrogen) and later visualized in a transilluminator (Ultra Violet Products). The amplification of an 815 bp fragment, corresponding to *eae* gene, was expected<sup>10</sup>.

For the amplification of *eae* gene, the following primers were used:  
 EAE1: 5'ACGTTGCAGCATGGGTA ACTC3' and EAE2:  
 5'GATCGGCAACAGTTTTCACCTG3'<sup>11</sup>.

## ***In vivo tests***

Experimental units – 14 healthy pups of Boxer breed, aged 60 days, males and females – were selected from two litters, the mothers of which were sisters, received vaccine and anthelmintics, and crossbred with the same Boxer reproducer from the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil. The pups received the anthelmintics Praziquantel and Pyrantel pamoate<sup>VI</sup> at 20 days. Then, at 45 days, they were vaccinated (distemper, Infectious canine

---

<sup>VI</sup> Dose: 10mg/Kg Endal Plus (Shering-Plough)

hepatitis, adenovirus type 2, parainfluenza, and parvovirus and coronavirus infection)<sup>VII</sup> and received the second dose of anthelmintics. All animals were subjected to clinical examination at birth, at 20 days, at 45 days on vaccination, and before the beginning of the experiment. After these evaluations, all animals were within the normal health patterns.

Masonry kennels were built, including a covered area and a solarium to prevent contamination other than experimental.

Strains SPA14 and 4083 were chosen for the present work because in preliminary studies they have caused pasty-to-liquid diarrhea from 24 to 48 h post-infection (PI).

From each litter, one animal was included in the control group (group A) and the remaining animals were divided into two groups: group B, inoculation of strain 4083, and group C, inoculation of strain SPA14. The dogs were randomly distributed into those groups.

EPEC strains SPA14 and 4083 were thawed, seeded in McConkey agar (Sigma) and incubated for 24 h at 37°C. A glass test tube containing 2 mL saline solution was slowly added of isolated colonies at a quantity sufficient to make the medium turbid, up to McFarland's scale 8 (Probac do Brasil). That tube was incubated at 37°C for 12 h and subjected to centrifugation for 10 min at 400 × g twice, discarding the supernatant between centrifugations. Since EPEC has as its primary infection site the small intestine and causes liquid diarrhea, especially in children<sup>12</sup>, we used colorless gel capsules no. 3, suitable for medicine manipulation, to include the sediment. These capsules are incompatible with liquid medium; thus, SkinMilk medium was included in the

---

<sup>VII</sup> Duramune® Max (Fort Dodge)

capsule together with the culture sediment. After capsules were closed, enteric coating solution was sprayed three times at 5-min intervals for intestinal absorption; once dried, the capsules were orally administered to experimental animals.

In this experiment,  $24 \cdot 10^8$  bacteria (McFarland's scale 8 – Probac do Brasil) were inoculated.

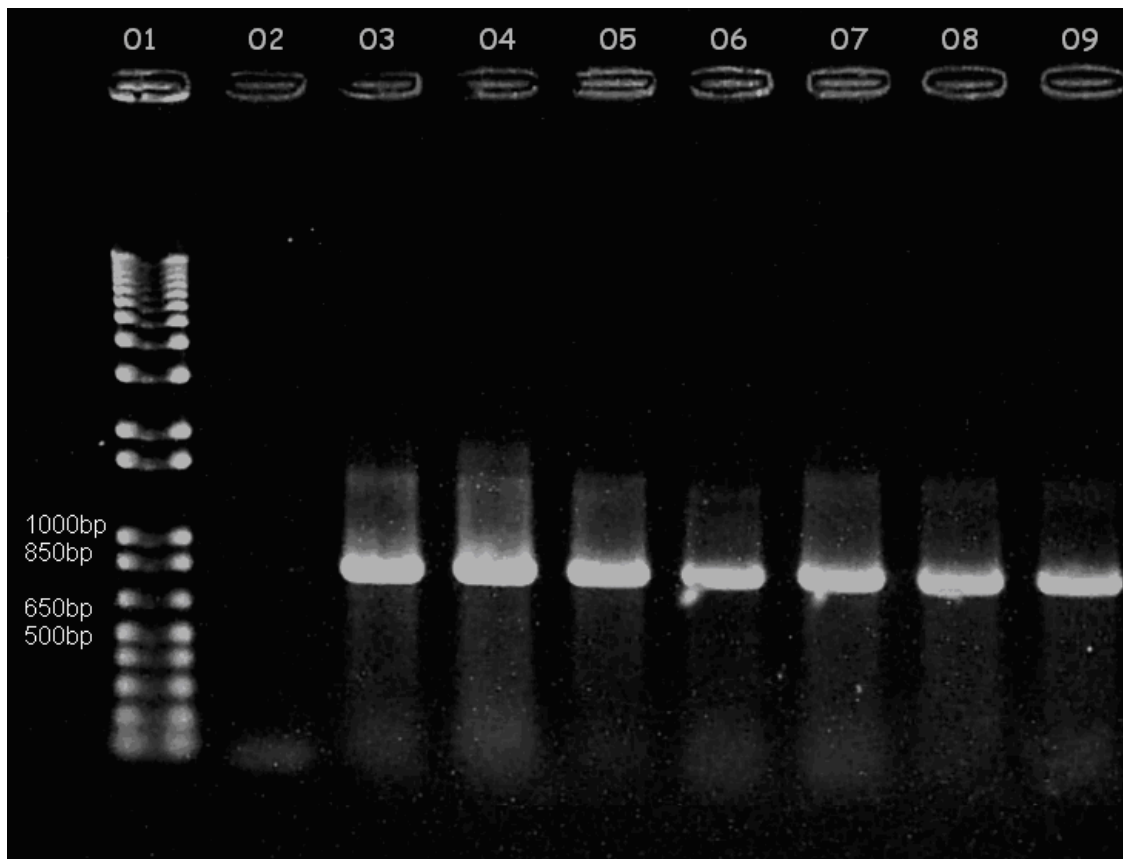
The feces samples from animals of both groups were collected from their anal regions by means of sterile swab, inoculated into a liquid selective medium used for culturing Gram-negative bacilli (GN broth, Lab. Vetec. Quimicafina Ltda.), and incubated at 37°C for 24 h. Then, these cultures were inoculated into McConkey agar (Sigma) and incubated for 12 to 24 h at 37°C. One plate was cultured for each animal; one-to-three colonies were selected, isolated from each plate, inoculated into BHI broth (Oxoid), and incubated at 37°C for 12 h.

Genomic DNA was extracted by following the above-mentioned protocol. PCR was performed according to Nakazato *et al.*<sup>10</sup>.

Although the animals received inoculum to cause diarrhea, there was no risk of death, and when necessary they received suitable treatment for the provoked infection. This study was approved by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE/CEUA/UFMS, protocol No: 116/2006.

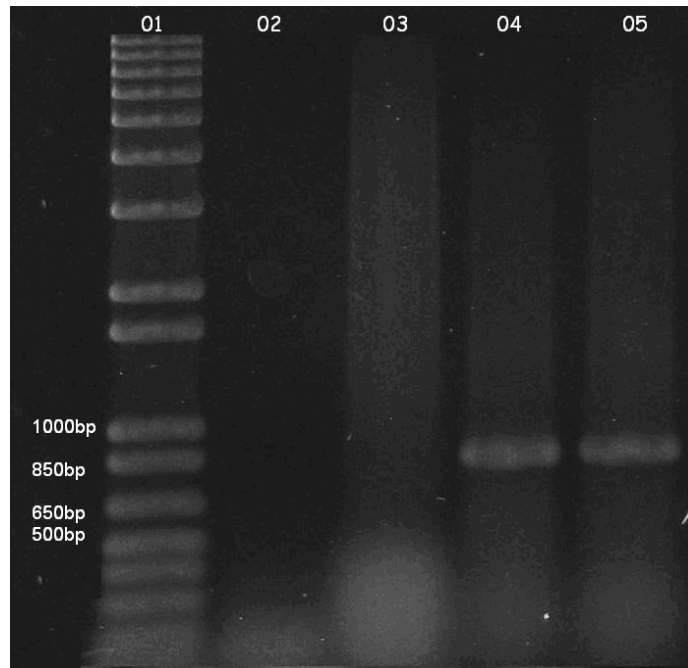
## Results

The 3549, 4083, 4025, 008, HE8, SPA14 and SPA16 EPEC strains had their DNA extracted and subjected to PCR for the amplification of *eae* gene. All analyzed colonies had the expected amplified fragment with 815 bp (Figure 1).



**FIGURE 1** Amplification of the 815bp *eae* gene from different enteropathogenic *Escherichia coli* strains on 0.8% agarose gel. 01: Base pair marker 1 kb Plus (Invitrogen). 02: Negative control (without DNA). 03: Strain 008. 04: Strain SPA14. 05: Strain SPA16. 06: Strain HE8. 07: Strain 4225. 08: Strain 3549. 09: Strain 4083.

Although the concentration of the DNA extracted from strain TOP was 1100.97  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , there was no amplification of *eae* gene by PCR (Figure 2).



**FIGURE 2.** Amplification of the *eae* gene from enteropathogenic *Escherichia coli* strains used in the experiment and from strain *E. coli* TOP10 used as negative control in PCR on 0.8% agarose gel. 01: Base pair marker 1 kb Plus (Invitrogen). 02: Negative control (without DNA). 03: *E. coli* strain TOP10 (saprophytic). 04: Strain SPA14. 05: Strain 4083.

McFarland's nephelometric scale (Probac do Brasil) was employed to determine the bacterial multiplication intensity; for this study,  $24 \cdot 10^8$  bacteria were sufficient to cause the expected diarrhea.

Periodic observations were done at every six hours after inoculation (PI), and at 24–48 h after the experimental infection all inoculated animals had pasty-to-liquid diarrhea, without vomiting. The feces of the animals were collected at the moment of diarrhea, at around 24–48 h PI. Two animals from the first litter kept presenting pasty feces up to 72 h PI. For these animals, feces were collected in two steps: at 24–48 h PI and at 72 h PI. However, the same pattern did not occur for the second litter, which had normal feces at 72 h PI

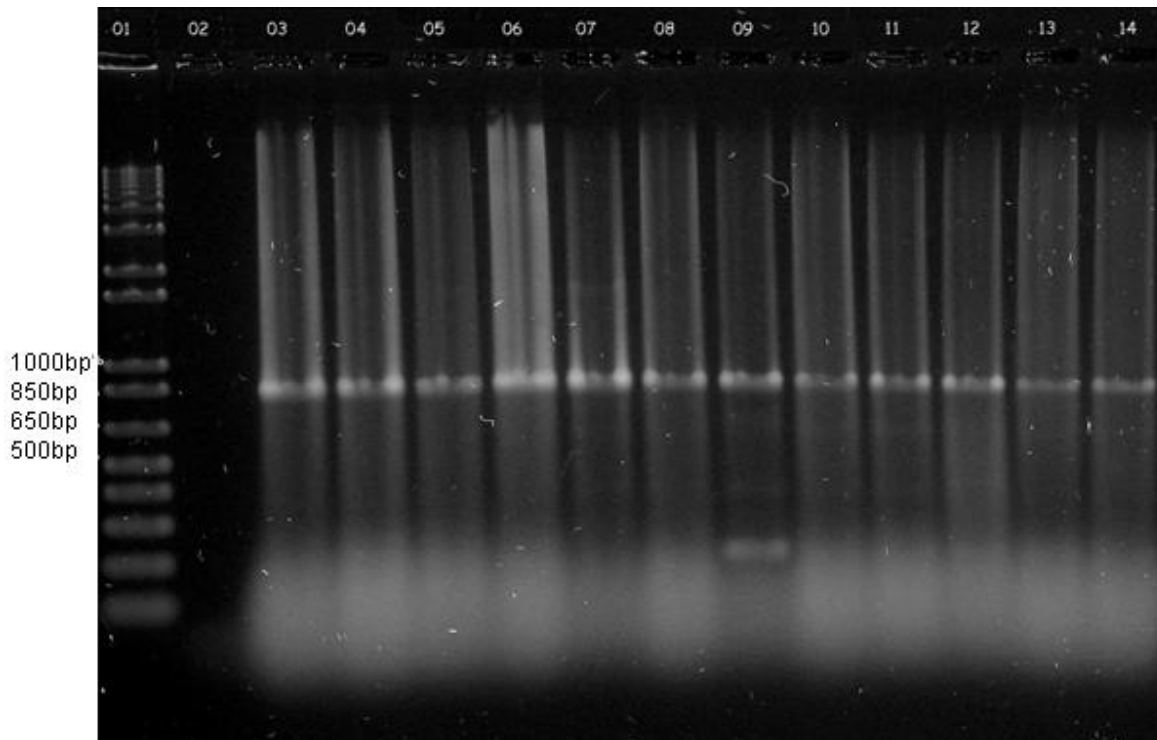
(Table 2). The feces samples were cultured and the EPEC strains from infected animals had the expected bacterial growth, differently from those from control animals, which did not form colonies in McConkey agar (Sigma). The bacterial DNA was extracted and subjected to PCR in order to amplify the *eae* gene. Isolated strains from all inoculated animals showed amplification of the gene of interest, of 815 bp, by PCR (Figure. 3).

**TABLE 2.** Identification of dogs and *E. coli* strains inoculated into each experimental group, showing persistence or not of diarrhea at 72 h post-infection (PI).

Animal/Group	<i>E. coli</i> Strain	Feces 24 to 48 h PI	Feces 72 h PI
01a*/A	Control	Normal	Normal
02a/B	4083	Diarrhea	Diarrhea
04a/B	4083	Diarrhea	Normal
03a/C	SPA14	Diarrhea	Diarrhea
05a/C	SPA14	Diarrhea	Normal
04b/A	Control	Normal	Normal
02b*/B	4083	Diarrhea	Normal
05b/B	4083	Diarrhea	Normal
01b/B	4083	Diarrhea	Normal
03b/C	SP14	Diarrhea	Normal
06b/C	SP14	Diarrhea	Normal
07b/C	SP14	Diarrhea	Normal

a: 1<sup>st</sup> litter; b: 2<sup>nd</sup> litter





**FIGURE 3.** Amplification of the gene *eae* from DNA of enteropathogenic *Escherichia coli* strains extracted from the feces samples of experimentally infected animals. 01: Base pair marker 1 Kb plus (Invitrogen). 02: Negative control (without DNA). 03: 01b/group B. 04: 02b/group B. 05: 03b/group C. 06: 05b/group B. 07: 06b/group C. 08: 07b/group C. 09: 03a/group C 48 h PI. 10: 02a/group B 48 h PI. 11: 02a/group B 72 h PI. 12: 05a/group C. 13: 03a/group C 72 h PI. 14: 04a/group B.

## Discussion

The amplification of gene *eae* by using the PCR method indicated that, after experimental infection, the clinical symptoms such as the diarrhea manifested by the pups were due to the ingestion of EPEC. These two strains are believed to cause diarrhea due to A/E lesions, by means of close adherence to the intestinal epithelium, since strain SPA14 specifically had accumulation of

actin in the bacterial adhesion sites, being positive by the fluorescent-actin staining test (FAS)<sup>8</sup>.

Drolet *et al.*<sup>13</sup> studied *E. coli* from 45–90-day-old dogs with enteric colibacillosis diagnosed at necropsy and detected the presence of gene *eae*, plasmid EAF and *bfpA*. The researchers concluded that EAEC samples (diffuse adherence) could be considered a relevant cause of diarrhea in dogs, especially in pups. Our work corroborates these data since *eae+* samples were isolated from diarrheic feces from pups aged 60 days.

The available reports on the presence of virulence factors in samples of the typical EPEC group (*eae*, *bfpA* genes and EAF plasmid) from canine colibacillus isolates stimulate epidemiological studies since the dog is a domestic animal which is thus capable of transmitting this pathogen to humans<sup>8</sup>.

Krause *et al.*<sup>14</sup> studied EPEC serogroups isolated from healthy dogs and noticed that a great variety of them, which cause diseases in humans, were isolated from dogs. In addition, children constitute the group at highest risk, either by their constant contact with animals or by the higher development in the young and neonates.

Rodrigues *et al.*<sup>15</sup> reported that DEPEC isolated from a pup with diarrhea were closely related to human EPEC. They also studied samples isolated from a child and noticed a phenotypic and genetic similarity to the same serotype, as well as identical EPEC markers. Those authors also suggested that young dogs not only carry the agent, but also may be susceptible to diseases caused by human EPEC strains.

Another study on the clonal relationships between animal and human atypical *E. coli* indicated that EPEC strains isolated from animals have the potential to cause diarrhea in humans<sup>16</sup>.

In the present study, strains 4083 and SPA14, the former being typical EPEC and the second being atypical EPEC, caused diarrhea at 48 h PI and at 72 h PI. For the first litter, with two animals in each group, diarrhea was detected for one animal from each group at 72 h PI. Therefore, these data indicate that whether EPEC is typical or atypical does not influence EPEC pathogenicity.

Considering the virulence factors of these strains, which are isolated from animals but have the potential to infect humans, a previous study<sup>17</sup> has demonstrated that the serotypes used in this work are similar to those found in infections of human origin.

The experimental infection caused symptoms of natural infection, and the PCR technique was specific, requiring the isolation of only one colony to extract DNA and amplify the gene of interest. This technique can be recommended for EPEC diagnosis as a differential from other pathogens causing diarrhea.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior – CAPES and Embrapa Beef Cattle.

### References

1. Beutin, L. 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.* 30, 285–98.
2. Nataro, J. P., Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
3. Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60, 3953–61
4. Scaletsky, I.C., Pedroso, M.Z., Oliva, C.A., Carvalho, R.L., Morais, M.B., Fagundes-Neto, U. 1999. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 67, 3410–5.
5. Francis, C.L., Jerse, A.E., Kaper, J.B., Falkow, S. 1991. Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 with mammalian cells *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 164, 693–703.
6. Gouffaux, F., China, B., Janssen, L., Mainil, J. 2000. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Res. Microbiol.* 151, 865–71.

7. Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, J. M., Harel, J. 1996. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. J. Clin. Microbiol. 34, 144–8.
8. Nakazato, G., Gyles, C., Ziebell, K., Keller, R., Trabulsi, L.R., Gomes, T.A. T., Irino, K., da Silveira, W.D., Pestana de Castro, A. F. 2004. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). Vet. Microbiol. 101, 269–77.
9. Blanco, M., Blanco, J.E., Gonzalez, E.A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T.A., Zerbine, L.F., Yano, T., de Castro, A.F.P., Blanco, J. 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. J. Clin. Microbiol. 35, 2958–63.
10. Nakazato, G., Osuguf, L., de Ávila, F.A., de Castro, A.F.P. 2001. Identification by the polymerase chain reaction (PCR) technique of strains of enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy dogs in the state of São Paulo, Brazil. ARS Veterinária, 17, 218–23.
11. Gannon, V.P., Rashed, M., King, R.K., Thomas, E.J. 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31, 1268–74.

12. Silva, C.H.P.M. 2008. Protocolos de Microbiologia Clínica – Coprocultura, parte 1 – Salmonella e Shigella [Protocols on Clinical Microbiology – Coproculture, part 1 - Salmonella and Shigella]. Newslab. 86, 58-66.
13. Drolet, R., Fairbrother, J.M., Harel, J., Hélie, P. 1994. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in dog. Can. J. Vet. Res. 58, 87–92.
14. Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L. 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin – (eae) gene positive *Escherichia coli* types O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. FEMS Microbiology Letters. 249, 335-42.
15. Rodrigues, J., Thomazini, C.M., Lopes, C.A.M., Dantas, L.O. 2004. Concurrent infection in a dog and colonization in a child with a human enteropathogenic *Escherichia coli* clone. J. Clin. Microbiol. 42, 1388–9.
16. Kobayashi, H., Shimada, J., Nakazawa, M. 2001. Prevalence and characteristics of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. Appl Environ Microbiol. 67, 484-9.

17. Leomil, L., Pestana de Castro, A.F., Krause, G., Schmidt, H., Beutin, L. 2005. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. FEMS Microbiol. Lett. 249, 335–42.

**Avaliação da ação dos mananoligossacarídeos fosforilados na resposta imune, hematológica e textura das fezes em infecção experimental com *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**

A ser enviado para a revista *Journal of Clinical Microbiology*



**Avaliação da ação dos mananoligossacarídeos fosforilados na resposta imune, hematológica e textura das fezes em infecção experimental com *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**

**Gouveia, E. M. M. F.<sup>1\*</sup>, Silva, I. S.<sup>1</sup>, Nakazato, G.<sup>2</sup>, V.J.V. Onselem<sup>3</sup>,  
R.A.C.Corrêa<sup>3</sup>, Araujo, F.R.<sup>4</sup>, Chang, M. R.<sup>5</sup>,**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento para a Região Centro-Oeste, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Londrina, Paraná, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Cirurgia, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>4</sup> Embrapa gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>5</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Farmácia e Bioquímica, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

---

\*Autor para correspondência: Eliana

Maria Moreira Ferreira Gouveia.

saudeanimalms@terra.com.br. Avenida  
das Bandeiras, Nº 1296, Bairro Marcos  
Roberto, CEP: 79080-001, Campo  
Grande, MS, Brasil. Telefone: (67) 3342-  
0702, ("67) 9983-4470.

## Resumo

Utilizou-se, neste estudo, um mananoligossacarídeo fosforilado, prebiótico não digestível que não é hidrolisado nem absorvidos na porção superior do trato gastrointestinal e ocupa o sítio de ligação do patógeno no intestino, evitando que as bactérias se liguem a manose do epitélio intestinal. Inicialmente, foram testadas sete linhagens de EPEC de cães (DEPEC), nas quais foi verificada a presença do gene *eae* e foram selecionadas as linhagens 4083 e SPA14, por ser uma linhagem típica e outra atípica, respetivamente e sendo que as duas foram isoladas previamente de cães com diarreia. As unidades experimentais foram 25 cães divididos em cinco grupos, sendo um controle e quatro tratamentos. O experimento se iniciou quando os animais completaram 60 dias de idade, as coletas foram nos dias 0, 5, 10, 15 e 20, finalizando aos 80 dias de vida dos animais. As variáveis analisadas foram: imunológicas (IgA e IgG), hematológicas (linfócitos, neutrófilos e monócitos), bacteriológicas (detecção por PCR do gene *eae* de EPEC recuperada de coprocultura) e textura das fezes. Todos os animais foram examinados a cada seis horas após a infecção nos primeiros cinco dias. Após esse período, os exames foram realizados a cada 24 horas. As duas linhagens utilizadas provocaram diarreia após 24, 48 e até 72 horas de infecção. Por meio da técnica de PCR, constatou-se que todas as *E. coli* isoladas de coprocultura de todos os animais infectados apresentaram gene *eae*. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de células sanguíneas no hemograma e produção de IgA e IgG. O MOS foi efetivo na recuperação dos animais infectados pela DEPEC, pois os animais que receberam o prebiótico recuperaram-se mais rapidamente da infecção, em comparação com os que

não receberam o tratamento ( $p < 0,05$ ), demonstrando-se importante, visto que a diarreia causa desidratação com a perda de nutrientes. Estudos que caracterizam as EPEC e nos permitem conhecer mais sobre a patogenicidade dessas bactérias tornam-se relevantes na área de Saúde Pública. Nos casos de diarreia em humanos e outros animais a utilização da biotecnologia pode ser uma opção coadjuvante no tratamento de infecções causadas por DEPEC.

**Palavras-chave:** *E. coli* enteropatogênica, experimento *in vivo*, cães, mananoligossacarídeos fosforilados, PCR.

## 1 Introdução

Os mananoligossacarídeos fosforilados (MOS), atuam benéficamente modulando a resposta imune dos animais através da apresentação de patógenos às placas de Payer. Os patógenos e as toxinas ligados ao MOS formam um grande novelo que é facilmente identificado pelo sistema imune. Estudos mostram uma maior produção de imunoglobulina A (IgA) sérica em cães e maior atividade neutrofílica (LAUE & TUCKER, 2006).

O Mananoligossacarídeo fosforilado Bio Mos<sup>®</sup> (AllTech) é extraído das paredes celulares da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, é um carboidrato complexo que oferece receptores ricos em manose para atrair as bactérias patogênicas, ocupando o sítio de ligação do patógeno e evita que as bactérias se liguem a manose do epitélio intestinal e provoquem doenças nos animais (COLLET, 2000).

As bactérias podem causar enfermidade tanto pela invasão de tecidos ou órgãos do hospedeiro, replicando-se extra ou intracelularmente, como pela secreção de toxinas que são responsáveis pelas alterações clínicas (KREUTZ et al., 2001).

*Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa que habita o intestino de humanos e animais (DRASAR & HILL, 1979). Esse bacilo foi descrito em 1885, pela primeira vez, por Theodor Escherich, que o denominou inicialmente de *Bacterium coli*. São conhecidas atualmente variantes de *E. coli* que adquiriram virulência: *E. coli* produtoras de Shiga-toxina (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli*

enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (EXPEC). (NATARO & KAPER, 1998).

As infecções por EPEC são caracterizadas por produzirem lesões no epitélio intestinal denominadas *attaching and effacing* (A/E). O fenômeno distingue-se pela aderência bacteriana íntima ao epitélio intestinal. A presença de A/E é associada ao desarranjo do sistema enzimático de absorção digestiva levando à má absorção de nutrientes (NATARO & KAPER, 1998), acúmulo de actina e outras proteínas do citoesqueleto, resultando na formação de estruturas semelhantes a pedestais (CRAY & MOON, 1995).

No segundo Simpósio Internacional de EPEC , em 1995, pesquisadores classificaram amostras de EPEC em duas categorias (KAPER, 1996): EPEC típicas, caracterizadas por causarem lesão A/E, presença do gene *eae*, ausência de *stx* e presença do plasmídeo EAF, e EPEC atípicas, que são as cadeias que apresentam lesão A/E, presença do gene *eae*, ausência de *stx*, mas não apresentam plasmídeo EAF (NATARO & KAPER, 1998).

SCALETISKY et al. (1999) avaliaram fezes de crianças recém nascidas e menores de um ano e associaram a presença de *E. coli* enteropatogênica com o tempo de duração da diarreia, sendo que a presença de EPEC atípicas foi considerada significativamente associada à diarreia.

As amostras de EPEC têm sido relatadas como a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento (NATARO & KAPER, 1998). Assim, os estudos sobre os fatores de virulência, como ocorre a infecção e quais são os sintomas clínicos observados têm sido de fundamental importância para o entendimento da sua patogenia.

GOUFFAUX et al. (2000), estudando EPEC em humanos, em cães e em gatos, isolaram um grupo heterogêneo de genes por meio de PCR, concluindo que pelo menos cinco genes destas *E. coli* enteropatogênicas isoladas de animais (DEPEC) estavam intimamente relacionados às EPEC humanas, demonstrando o potencial zoonótico das DEPEC.

O objetivo nesse trabalho foi verificar a ação terapêutica do MOS em infecção experimental com bactérias enteropatogênicas em cães. Ainda avaliar o comportamento das imunoglobulinas (IgA e IgG), das células sanguíneas inflamatórias e as alterações na textura das fezes e propor um modelo de infecção por *in vivo* de EPEC em cães jovens.

## **2 Materiais e Métodos**

O experimento foi conduzido no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

### **2.1 Amostras bacterianas**

Foram utilizadas sete linhagens de EPEC, quatro atípicas (*eaе+*) e três típicas (*eaе+*, *bfpA+*) (BEAUDRY et al., 1996; NAKAZATO et al., 2004) de acordo com a Tabela 1. Todas as amostras eram negativas para o gene da shiga-toxina (*stx*) (BLANCO et al., 1997). As linhagens foram previamente testadas para a presença de aderência do tipo localizada em culturas de células HEp-2 (Tabela 1).

Tabela 1. Características das linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas de cães utilizadas no presente experimento (BEAUDRY et al., 1996; NAKAZATO et al., 2004).

Linhagens	Presença de			Adesão em células HEp-2
	<i>eae</i> <sup>*</sup>	<i>bfpA</i> <sup>†</sup>	EAF <sup>‡</sup>	
008	+	-	-	LAL <sup>*</sup>
HE8	+	-	-	-
SPA14	+	-	-	LAL
SPA16	+	-	-	NC <sup>‡</sup>
4225	+	+	+	-
4083	+	+	+	-
3549	+	+	+	-

\**eae*: gene que codifica a intimina.

<sup>†</sup>*bfpA*: um dos genes responsáveis pela codificação de *bundle forming pilus*.

<sup>‡</sup>EAF: detecção de plasmídeo EAF

\*LAL: padrão Localized adherence-like

<sup>‡</sup>NC: Aderência não-característica

+ : positivo

- : negativo

## 2.2 Animais

Foram utilizados 25 cães da raça boxer machos e fêmeas com 60 dia de idade, sendo cinco animais em cada grupo experimental. Os animais foram selecionados de cinco ninhadas, de quatro mães irmãs com idade de um ano e meio. Todos os animais são originários do mesmo reprodutor.

Os genitores foram vacinados<sup>9</sup> quando filhotes e vermifugados<sup>10</sup> regularmente a cada quatro meses. Os filhotes foram vermifugados aos 20 dias de idade com Praziquantel e Pamoato de Pirantel e vacinados aos 45 dias de idade para cinomose, hepatite infecciosa canina, Adenovírus Tipo 2, Parainfluenza, parvovirose e coronavirose.

Os pais dos animais experimentais foram avaliados quanto ao estado de saúde na época do acasalamento por meio de exame clínico e hemograma. Todos os filhotes foram submetidos à avaliação clínica ao nascer, com 20 dias de idade, com 45 dias de idade e antes do início do período experimental. Antes do início da fase experimental colheu-se o sangue dos filhotes para hemograma e pesquisa de hemoparasitas, com resultados negativos para o último.

### **2.3 Instalações**

Após o acasalamento as fêmeas foram mantidas em canis individuais de alvenaria com área coberta e solário.

Do nascimento à desmama com 30 dias de idade os filhotes permaneceram junto à mãe no mesmo canil. Durante todo o período de gestação e amamentação as mães receberam ração<sup>11</sup>, água limpa e fresca à vontade.

Na desmama os filhotes de cada ninhada passaram a ser alojados em canis, em número de 3 filhotes da mesma ninhada por canil, também de alvenaria com área coberta e solário, recebendo a mesma alimentação fornecida às mães.

---

<sup>9</sup> Vacina Duramune® Max (Fort Dodge)

<sup>10</sup> Vermífugo Endal Plus® (10mg/kg)

<sup>11</sup> Ração AGR® Royal Canin



## 2.4 Infecção experimental e PCR

A infecção experimental foi realizada de acordo com GOUVEIA et al., 2010.

Para a PCR, 10 µL de DNA molde foram adicionados a 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 50 pmol de cada primer, 200 µM deoxinucleosideo trifosfato (Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) and tampão de PCR 1X (Invitrogen) em um volume final de 25 µL (Nakazato et al, 2001).

Após uma desnaturação inicial a 94°C por três minutos, as amostras foram submetidas a 35 ciclos térmicos de 94°C (desnaturaçã) por um minuto, 56°C (anelamento) por um minuto e 72°C por 40 segundos. As reações foram realizadas em termociclador BioRad Laboratories, USA.

Um volume de 5µL de cada reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo ou SybrGold (Invitrogen) e visualizados em transiluminador (Ultra Violet Products). Era esperada a amplificação de um fragmento de 815 pb, correspondente ao gene *eae* (Nakazato et al, 2001).

Para a amplificação do gene *eae*, os seguintes primers foram utilizados:

EAE1: 5'ACGTTGCAGCATGGGTA ACTC3' and EAE2:  
5'GATCGGCAACAGTTT CACCTG3' (Ganon et al, 1993).

## 2.5 Grupos experimentais

Foram constituídos cinco grupos experimentais:

Grupo A: Sem inoculação experimental e sem fornecimento de MOS<sup>12</sup>  
Grupo B: Com inoculação pela linhagem 4083 e sem fornecimento de MOS  
Grupo C: Com inoculação pela linhagem SPA14 e sem fornecimento de MOS  
Grupo D: Com inoculação pela linhagem 4083 e com fornecimento de MOS  
Grupo E: Com inoculação pela linhagem SPA14 e com fornecimento de MOS

O fornecimento de MOS na quantidade de 2g/kg de peso vivo foi feito por via oral diluído em 2mL de água a partir de 24 horas após a infecção experimental, uma vez ao dia durante 20 dias.

O dia em que se realizou a infecção experimental foi considerado o dia zero do período experimental. Os animais foram avaliados 5, 10, 15 e 20 dias após a infecção, assim como no momento do inoculo do agente infectante.

## **2.6 Delineamento experimental**

O delineamento experimental empregado foi o completamente casualizado com cinco repetições, analisando-se o efeito dos tratamentos em cada momento. Quando se analisou o efeito dos momentos em cada grupo experimental empregou-se o delineamento em blocos casualizados, considerando-se o animal como fator bloqueado.

## **2.7 Variáveis resposta**

Todos os animais foram avaliados clinicamente de acordo com JONES (2003) a cada seis horas após a infecção experimental, nos primeiros 5 dias e após esse período, os exames eram realizados a cada 24 horas.

---

<sup>12</sup> Bio-Mos® - AllTech

### **2.7.1 Avaliação clínica**

Nos cinco momentos do período experimental (DIA 0, 5, 10, 15 e 20) os animais também foram avaliados clinicamente com a medida da Temperatura corporal, avaliação do grau de desidratação (Escore + - não, ++ - pouco e +++ - muito desidratado), da coloração das mucosas (Escore 1 - mucosas pálidas, 2 - róseas e 3 - congestas), da vitalidade (Escore 1 - apático, 2 - brinca quando estimulado e 3 - agitado), da presença de sangue nas fezes (Escore 1 - ausente, 2- pouco e 3 - muito sangue) e da consistência das fezes (normal, pastosa e líquida).

### **2.7.2 Avaliação laboratorial**

Logo após a avaliação clínica, colheu-se uma amostra de 5mL de sangue de cada animal pela punção jugular. Estas amostras foram separadas em duas alíquotas, sendo a primeira conservada em frasco estéril com anticoagulantes (EDTA) à temperatura de -2 a 8°C para posterior realização de hemograma pela técnica automatizada ABCVET. A segunda alíquota foi centrifugada e após separação do soro, este foi conservado à temperatura de -2 a 8°C para posterior determinação da concentração das imunoglobulinas IgA e IgG pelo método de ELISA (utilizando-se os kits comerciais: IgA Elisa quantitation kit e Dog IgG Elisa quantitation set, laboratório Bethyl). Das amostras obtidas com a segunda alíquota, utilizou-se apenas as de três momentos (Dia 0, Dia 10 e Dia 20)

Após a colheita de cada amostra de sangue os animais foram pesados individualmente.

## 2.10 Análise estatística

Os resultados de hemograma, dosagens de imunoglobulinas e textura das fezes nos grupos foram comparados em cada momento pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto que estas respostas nos diferentes momentos foram comparados em cada grupo pelo teste de Friedman, segundo TRIOLA (2005). Em todas as comparações empregou-se o nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

Este trabalho foi devidamente aprovado pela Comissão de ética no uso de animais/UFMS, protocolo de N<sup>o</sup>: 116/2006. Ao término do experimento todos os animais apresentavam boas condições de saúde

## 3 Resultados

No início do experimento, foram incluídas sete linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica: 3549, 4083, 4025, 008, HE8, SPA14 e SPA16. Todas as linhagens foram testadas pela técnica de PCR e apresentaram amplificação de um fragmento de 815 pb, correspondente ao gene *eae* (Figura 1).

### 3.1 Hemograma

A Figura 2 apresenta as medianas das concentrações de células sanguíneas da série branca em diferentes momentos pós infecção nos animais dos cinco grupos experimentais. As concentrações de células sanguíneas não apresentaram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os grupos nos vários momentos e entre os momentos nos vários grupos.

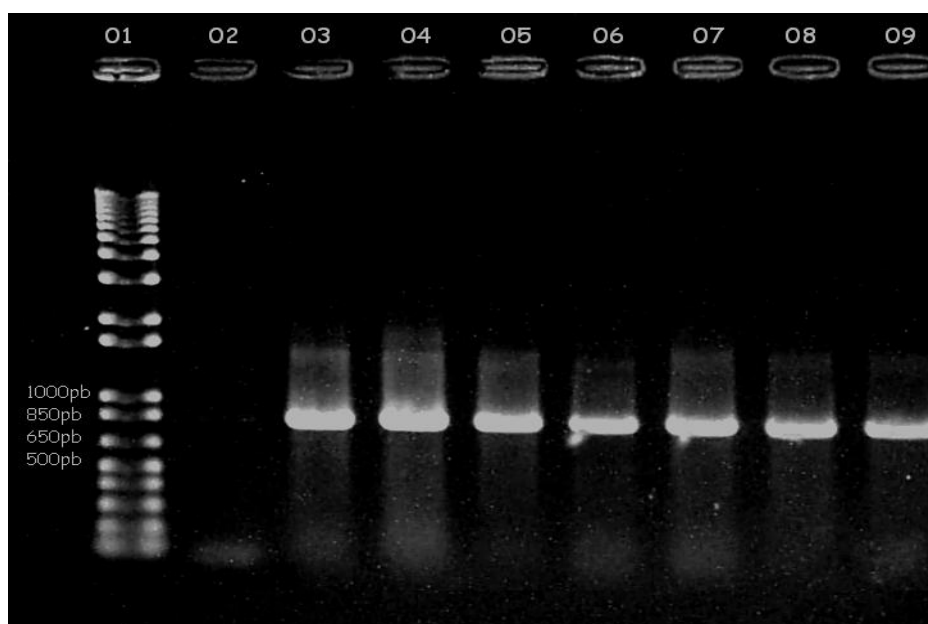


Figura 1. Amplificação do gene *eae* com 815pb de diferentes linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica em gel de agarose 0,8%. 01: Marcador de pares de bases 1 kb Plus (Invitrogen). 02: Controle negativo. 03: Linhagem 008. 04: Linhagem SPA14. 05: Linhagem SPA16. 06: Linhagem HE8. 07: Linhagem 4225. 08: Linhagem 3549. 09: Linhagem 4083.

### 3.2 Imunoglobulinas IgG e IgA

A Figura 3 apresenta as medianas das concentrações de imunoglobulinas em diferentes momentos pós infecção nos animais dos cinco grupos experimentais. As concentrações de imunoglobulinas IgA e IgG não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos nos vários momentos e entre os momentos nos vários grupos.

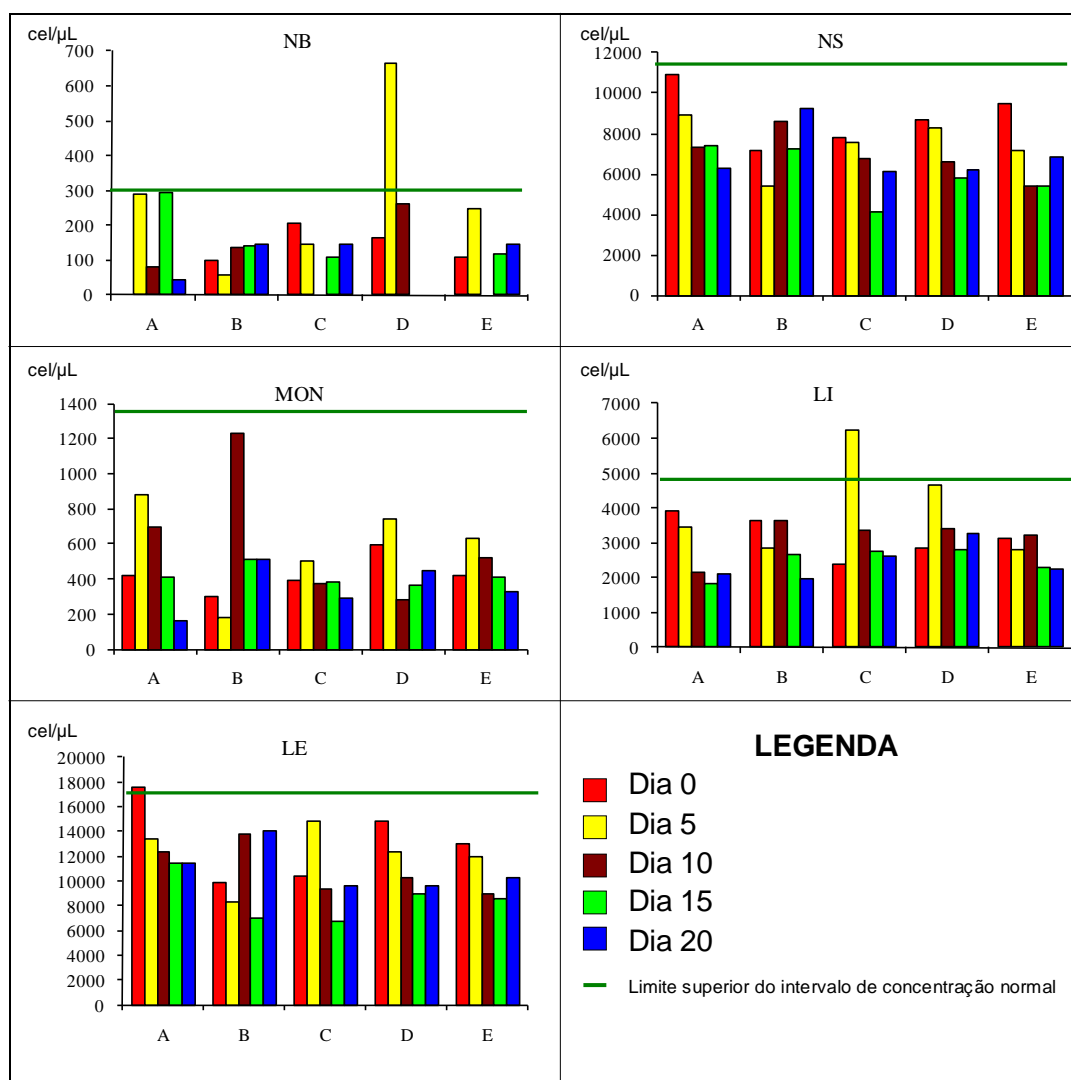


Figura 2 - Medianas das concentrações de células sanguíneas<sup>(\*)</sup> (células/μL) em cinco momentos (dias) do período experimental de cães submetidos a diferentes tratamentos. NB - basófilos; NS - Neutrófilos segmentados; MON - Monócitos; LI - Linfócitos; LE- Leucócitos totais. A - Sem indução de diarreia e sem fornecimento de MOS; B - Com indução de diarreia pela linhagem 4083 e sem fornecimento de MOS; C - Com indução de diarreia pela linhagem SPA14 e sem fornecimento de MOS; D - Com indução de diarreia pela linhagem 4083 e com fornecimento de MOS; E - Com indução de diarreia pela linhagem SPA14 e com fornecimento de MOS.

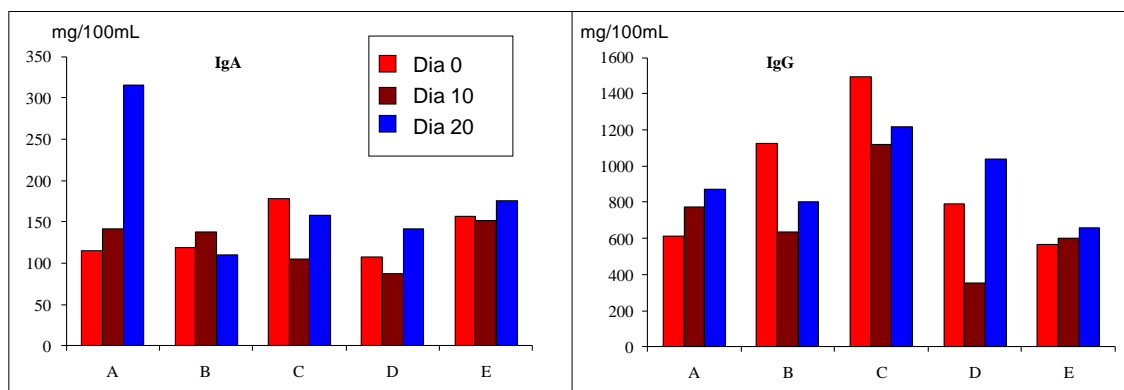


Figura 3 - Medianas das concentrações de imunoglobulinas IgA e IgG (mg/100mL) em três momentos (dias) do período experimental de cães submetidos a diferentes tratamentos. A - Sem indução de diarreia e sem fornecimento de MOS; B - Com indução de diarreia pela linhagem 4083 e sem fornecimento de MOS; C - Com indução de diarreia pela linhagem SPA14 e sem fornecimento de MOS; D - Com indução de diarreia pela linhagem 4083 e com fornecimento de MOS; E - Com indução de diarreia pela linhagem SPA14 e com fornecimento de MOS.

### 3.3 Avaliação clínica

A temperatura corporal de todos os animais manteve-se dentro dos limites normais, variando de 38,5°C a 39°C. Nenhum animal apresentou vômito e não se observaram sintomas de desidratação, portanto, não ocorreu hidratação parenteral durante a fase experimental. A coloração das mucosas permaneceu normal e os animais ativos (não apáticos). Em nenhum momento se observou presença de sangue nas fezes. Por meio da amplificação do gene *eae* por PCR, foi possível identificar a presença de EPEC nas fezes de todos os animais experimentalmente infectados (Figura 4).

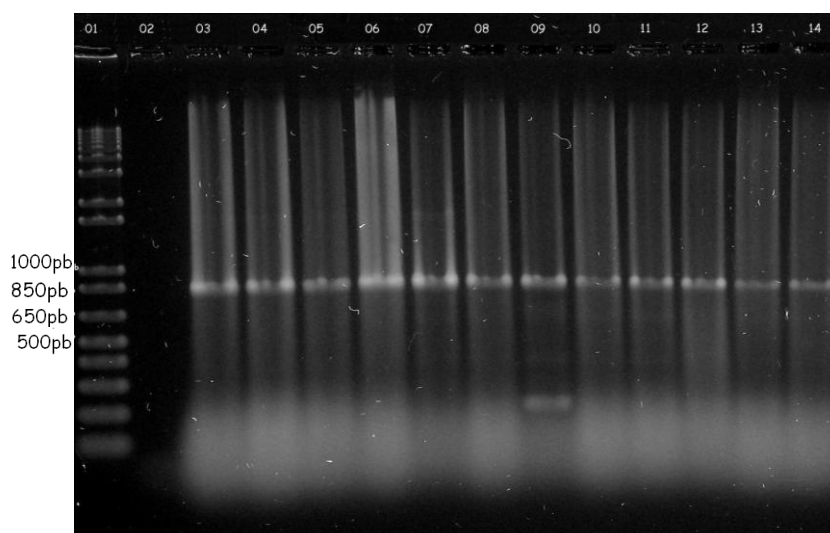


Figura 4 - Amplificação do gene *eae* de *Escherichia coli* enteropatogênicas extraídas das fezes. 01. Marcador de pares de bases 1kb Plus (Invitrogen); 02. Controle sem DNA; 03-14: amostras de EPEC reisoladas de coprocultura de animais inoculados com as linhagens SPA14 e 4083.

Os valores medianos dos escores da textura das fezes nos diferentes grupos experimentais e momentos pós inoculação, estão apresentados na Tabela 2 abaixo.

TABELA 2 - Medianas dos escores<sup>(\*)</sup> da textura das fezes em cinco momentos do período experimental de cães submetidos a diferentes tratamentos<sup>(\*\*)</sup>

GRUPOS	MOMENTOS (dias)				
	0	5	10	15	20
<b>A</b>	1	1	1	1	1
<b>B</b>	1	2	2	1	1
<b>C</b>	1	2	2	1	1
<b>D</b>	1	2	1	1	1
<b>E</b>	1	2	1	1	1

(\*) 1 - Normal; 2 - Pastosa; 3 - Líquida (\*\*). A - Sem indução de diarreia e sem fornecimento de MOS; B - Com indução de diarreia pela linhagem 4083 e sem fornecimento de MOS; C - Com indução de diarreia pela linhagem SPA14 e sem fornecimento de MOS; D - Com indução de diarreia pela linhagem 4083 e com fornecimento de MOS; E - Com indução de diarreia pela linhagem SPA14 e com fornecimento de MOS.



Todos os animais inoculados com *Escherichia coli* enteropatogênicas apresentaram diarreia pastosa 12 a 24 horas, incluindo os grupos tratados D e E. Enquanto no grupo controle nenhum animal apresentou sintomatologia de infecção intestinal, nos demais grupos ocorreram animais com intensa diarreia, apresentando em um ou outro momento do período experimental fezes de textura líquida. Os animais que receberam Bio-Mos<sup>®</sup> (grupos D e E) demonstraram uma recuperação significativamente ( $p < 0,05$ ) mais rápida quando comparados aos animais que não receberam o prebiótico (grupos B e C). Quinze dias após a aplicação dos tratamentos, todos os animais já haviam se recuperado.

#### **4 Discussão**

Em casos de infecção, os neutrófilos podem ser mobilizados em grande número, inicialmente do pool marginal, em seguida do compartimento de reserva da medula e também por um aumento do compartilhamento mitótico da mesma medula. Os neutrófilos são destruídos no foco inflamatório, ao fagocitar as bactérias (ou outros agentes). Posteriormente, os linfócitos são atraídos para o foco da infecção, mobilizados de acordo com o antígeno e junto com os linfócitos aparecem os monócitos (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994).

LAUE e TUCKER (2006) afirmam que os patógenos e as toxinas ligados ao MOS formam um grande novelo que é facilmente identificado pelo sistema imune. No nosso estudo, não houve alteração nas concentrações de imunoglobulinas IgA e IgG no soro, portanto, sugere-se que em estudos posteriores a quantificação de IgA deva ser realizada a partir de amostras da

mucosa intestinal, que pode ser mais facilmente estimulada pelo novelo formado pela ligação entre o MOS e os patógenos/toxinas.

A ação do MOS é ligar-se ao sítio da manose tipo I da bactéria, impedindo a mesma de ligar-se às glicoproteínas das células do intestino, devido ao mecanismo de ação do produto não há o processo de ativação pelos antígenos das células sanguíneas, neutrófilos, linfócitos e monócitos, já que a bactéria seria inativada pelo MOS e sairia do intestino sem causar danos ao hospedeiro. Talvez seja por esse motivo que, no presente estudo, não houve alteração no número das células sanguíneas inflamatórias nos grupos após a infecção experimental.

Os linfócitos T atuam na chamada imunidade celular. Essas células migram até o local da inflamação e secretam substâncias citotóxicas chamadas citocinas que destroem as células patogênicas como bactérias, fungos e células neoplásicas, por exemplo. O’CARRA (1996), pesquisando os efeitos do MOS na resposta imunológica em cães filhotes, constatou que houve uma tendência de ser maior o número de neutrófilos circulantes e a concentração de lisozima no sangue dos animais com MOS em comparação ao grupo controle. No trabalho, os autores sugerem em que estudos posteriores sejam feitas a mensuração da concentração de lisozima e comparação com o número de neutrófilos para verificar se há alguma relação no estímulo do sistema imunológico não específico.

Os linfócitos B quando estimulados, transformam-se em plasmócitos e passam a secretar imunoglobulinas que desempenham a função de imunidade humoral. Neste trabalho não foi detectado o aumento da produção destas imunoglobulinas nos animais infectados em comparação com o grupo controle

provavelmente devido ao fato de ter não ocorrido estimulação suficiente para a produção de linfócitos B. Isto pode ter ocorrido devido ao próprio mecanismo de ação do Bio-Mos<sup>®</sup> na luz intestinal, impedindo a ligação da EPEC às células intestinais.

No presente estudo, as duas linhagens, uma de *Escherichia coli* enteropatogênica típica (linhagem 4083) e outra atípica (linhagem SPA14), provocaram diarreia em animais 24, 48 e até 72 horas após a indução, sugerindo que linhagens típicas e atípicas foram patogênicas para os cães testados. A presença da fímbria BFP não interferiu na patogenicidade da DEPEC, por isso não foi realizado um aprofundamento do estudo desta fímbria neste trabalho.

As EPECs possuem fatores de virulência associados a uma variedade de doenças intestinais em humanos (LEVINE, 1984) e outros animais (PESTANA DE CASTRO, 1984, FRANCIS et al., 1991, BLANCO et al. 1993). Como o cão é um animal doméstico e convive com os humanos, o fato de as linhagens estudadas terem causado sintomas de infecção natural, indica que pode haver uma contaminação de humanos a partir dos animais e vice-versa.

Nakazato et al., 2004 demonstram que sorotipos de EPEC encontrados em humanos, também foram identificados em outros animais, como o cão. Por meio da PCR para o gene *eae*, nosso trabalho mostrou que esse fator de virulência está presente intensamente (100%) em amostras isoladas de fezes dos animais infectados, demonstrando o risco zoonótico da DEPEC.

O MOS teve efeito na textura das fezes e os animais que receberam o produto tiveram uma recuperação mais rápida da diarreia do que os animais infectados que não receberam o MOS. Através da inibição competitiva por

receptores de manose, o MOS diminui o efeito da aderência bacteriana por fímbria do tipo I, no epitélio intestinal dos animais, importante processo envolvido na patogenicidade das EPEC. Como a fímbria do tipo I é encontrada na maioria das amostras de *Escherichia coli* (LAW, 1994), a presença do MOS foi determinante para impedir a colonização. Além disso, a avaliação da textura das fezes (presença de diarreia) mostrou que o processo de aderência bacteriana é de extrema importância no aparecimento da diarreia em cães infectados por EPEC.

A técnica de PCR foi eficiente na detecção do gene *eae* que codifica a adesina intimina de linhagens de EPEC, não apresentando resultados falso-negativos e nem falso-positivos. A utilização desta técnica é uma das alternativas para o diagnóstico diferencial entre as EPEC e outros patógenos que causam diarreia.

O modelo de infecção em cães pela EPEC deste estudo foi muito útil para a determinação dos sintomas de patogenicidade destas amostras. Diversos parâmetros (diarreia, estado do animal, sorologia) puderam ser avaliados para a realização de uma análise comparativa entre os diferentes grupos experimentais.

### **Agradecimentos**

Este trabalho teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior – CAPES e da Embrapa Gado de Corte.

## Referências

Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, M., Harel, J. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **J. Clin. Microbiol.** 34:144-148, 1996.

Blanco, M., Blanco, J. E., Gonzalez, E. A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T. A., Zerbine, L. F., Yano, T., Pestana de Castro, A. F., Blanco, J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. **J. Clin. Microbiol.** 35:2958-2963, 1997.

Cray, W. C., Moon, H. W. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:h7. **Appl. Environ. Microbiol.** 61:1586-1590, 1995.

Collet, S. Nutrição, Imunidade e Produtividade. In: **10ª Ronda Latino-Americana Alltech – O futuro da alimentação**. Nicholasville: Alltech, p. 20-30, 2000.

Drasar, B. S., Hill, M. J. **Human intestinal flora**. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom, 1974.

Garcia-Navarro, C.E.K., Pachaly, J.R. **Manual de hematologia veterinária**. Livraria Varela, São Paulo, 1994.

Gannon, V.P., Rashed, M., King, R.K., Thomas, E.J. Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1268–74, 1993.

Gouffaux, F., China, B., Janssen, L., Mainil, J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Res. Microbiol.* 151, 865–71, 2000.

Gouveia, E.M.F.; Silva, I.S.; Nakazato, G.; Araújo, F.R.; Chang, M. R.. Experimental infection with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) identified by PCR using enteric-coated capsules in boxer pups. **Acta Cir Bras** (*In press*), 2010.

Jones, D. Anamnese e exame físico.. *In*: Birchard, S.J, Sherding, R. G. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**. Rocca. 2ªedição. São Paulo, 2003.

Kaper, J. B. Defining EPEC. **Vet. Microbiol.** 27:1-6, 1996.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn Jr., W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 6 ed., Belo Horizonte: MEDSI, 2008.

Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L. Investigation of domestic animals and pets as reservoir for intimin – (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Vet. Microbiol.** 67:484-489, 2005.

Kreutz, L. C., Madruga, C. R., Araujo, F.R. Imunidade contra bactérias. In: Madruga CR, Araújo FR, Soares CO. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p. 145-178, 2001.

Laue, D., Tucker, L.A. **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham University Press: United Kingdom, 2006.

Law, D. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Clin.Microbiol. Rev.** 7:152-173, 1994.

Leomil, L., Pestana de Castro, A. F., Krause, G., Schmidt, H., Beutin, L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. **FEMS Microbiol. Lett.** 249:335-342, 2005.

Nakazato, G., Gyles, C., Ziebell, K., Keller, R., Trabulsi, L. R., Gomes, T. A. T., Irino, K., Silveira, W. D., Pestana de Castro, A. F. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Vet. Microbiol.** 101:169-277, 2004.

Nakazato, G., Osuguf, L., de Ávila, F. A., Pestana de Castro, A. F. Identificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC) isoladas de cães com diarreia e normais no estado de São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, 17:218-223, 2001.

Nataro, J.P.; Kaper, J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, p. 142-201, 1998.

O'Carra, R. **Effects of Dietary Inclusion of Bio-Mos on Growth and Immunisation Response of Border Collie Pups**. Gatway, Ireland: European Biosciences Center, 1996.

Scaletsky, I. C. A, Pedroso, M. Z., Oliva, C. A. G., Carvalho, R. L. B., Morais, M. B., Fagundes-neto, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.** 67:3410-3415, 1999.

Silva, C.H.P.M. Coprocultura. **Protocolos de Microbiologia Clínica**. Newslab. 87, 2008.

Triola, M.F. **Introdução à estatística**. 8ªed. Rio de Janeiro: (LTC), 2005. 410p.



## **Discussão**

## 5 DISCUSSÃO

As EPECs possuem fatores de virulência associados a uma variedade de doenças intestinais em humanos (LEVINE, 1984) e animais (PESTANA DE CASTRO, 1984, FRANCIS et al., 1991, BLANCO et al. 1993). Como o cão é um animal doméstico e convive com os humanos, o fato de as linhagens estudadas terem causados sintomas de infecção natural, sugere que pode haver uma contaminação de humanos a partir dos animais e vice-versa.

As duas linhagens experimentais são isoladas de animais, mas carregam potencial para infectarem humanos. Estudos (DOYLE et al., 1997, KRAUSE et al., 2005, LEOMIL et al., 2005, KOBAYASHI et al., 2001, CRAY & MOON, 1995) demonstraram que os sorotipos utilizados neste trabalho são semelhantes aos encontrados em infecções de origem humana, sugerindo que pode haver infecção cruzada entre essas duas espécies.

Com a amplificação do gene *eae*, pelo método de PCR foi possível constatar que a diarreia apresentada pelos filhotes foi decorrente da indução experimental com as duas linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica. Estas linhagens causam diarreia devido a lesões A/E, por meio da aderência íntima ao epitélio intestinal, pois a linhagem SPA14, especificamente, apresenta acúmulo de actina nos pontos de adesão das bactérias, sendo positiva no teste *Fluorescent-actin staining* (FAS) (NAKAZATO et al., 2004, VIDAL et al., 2007).

LAUE e TUCKER (2006) afirmam que os patógenos e as toxinas ligados ao MOS formam um grande novelo que é facilmente identificado pelo sistema imune. No nosso estudo, não houve alteração nas concentrações de imunoglobulinas IgA e IgG no soro, portanto, sugere-se que em estudos posteriores a quantificação de IgA deva ser realizada a partir de amostras da mucosa intestinal, que pode ser mais facilmente estimulada pelo novelo formado pela ligação entre o MOS e os patógenos/toxinas.

Em um estudo de IgA na mucosa intestinal de ratos, no qual se administrou 2 g de MOS por Kg de peso e dosou-se IgG no plasma, os níveis de IgA foram significativamente maiores do que nos animais do grupo controle, em contraste com os níveis de IgG no plasma que não houve diferença significativa. O método utilizado para determinar a concentração de IgG foi imunodifusão radial de acordo com SWANSON et al, 2002.

Neste estudo, optou-se pelo método de ELISA para dosagem de IgA e IgG séricas dos animais para detectar e quantificar anticorpos no soro dos animais devido a alta sensibilidade e especificidade do teste.

No presente estudo, as duas linhagens, uma de *Escherichia coli* enteropatogênica típica (linhagem 4083) e outra atípica (linhagem SPA14), provocaram diarreia em animais 24, 48 e até 72 horas após a indução, indicando que, ser *E. coli* típica ou atípica não influencia na patogenicidade.

O MOS teve efeito na textura das fezes e os animais que receberam o produto tiveram uma recuperação mais rápida da diarreia do que os animais infectados que não receberam o MOS. Esse resultado pode reforçar que a ação do MOS ocorre mais na luz intestinal, agindo diretamente nas bactérias, ligando-se e não permitindo a ligação da mucosa intestinal.

## **Conclusões**

## **6 CONCLUSÕES**

Com a infecção experimental, foram provocados sintomas de infecção natural, sendo que a técnica de PCR foi bastante sensível e específica, tendo sido necessário utilizar apenas uma a três colônias para extração de DNA e amplificação do gene de interesse. A referida técnica seria recomendada para o diagnóstico de EPEC como diferencial de outros patógenos que causam diarreia.

O MOS foi efetivo na recuperação da textura das fezes, pois os animais que receberam o prebiótico recuperaram-se mais rapidamente da infecção, em comparação com os que não receberam o tratamento, demonstrando-se importante, visto que a diarreia causa desidratação com a perda de nutrientes.

A utilização do cão como modelo experimental, apesar de laboriosa e demandar um longo período de tempo, foi eficaz para atingir os objetivos propostos.

A especificidade do teste ELISA permitiu verificar que não houve diferença significativa entre os diversos grupos quanto a produção de IgA e IgG.

## Referências

## REFERÊNCIAS

Adu-Bobie, J; Frankel, G.; Bain, C.; Gonçalves, A.G.; Trabulsi, L.R.; Douce, G. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J Clin Microbiol**, v. 36, p. 662-668, 1998.

Blanco, M., Blanco, J. E., Ramos, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Amer. J. Vet. Res.** 54:1446 – 1451, 1993.

Collet, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: **10ª Ronda Latino-Americana Alltech – O futuro da alimentação**. Nicholasville: Alltech, p. 20-30, 2000.

Correa Jr, S., Lima, L.M.S., Saad, F.M.O.B., Silva Jr., J.W. Prebióticos e sua relação com a microbiota e a saúde intestinal. **A Hora Veterinária**, v. 27, n.160, p. 27-29, 2007.

Cray, W. C., Moon, H. W. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:h7. **Appl. Environ. Microbiol.** 61:1586-1590, 1995.

Donnenberg, M. S., Kapper, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 60:3953-3961, 1992.

Doyle, M. P., Zhao, T., Meng, J., Zhao, S. *Escherichia coli* O157:H7. In: Doyle, M. P., Benchat, L. R., Montville, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. ASM Press, Washington, DC, 1997.

Drasar, B. S., Hill, M. J. **Human intestinal flora**. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom, 1974.

Fagundes, D. J; Taha, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente, **Acta Cir. Bras.** [serial online] 19:1, 2004.

Francis, C. L., Jerse, A. E., Kaper, J. B., Falkow, S. Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 with mammalian cells *in vitro*. **J. Infect. Dis.** 164:693-703, 1991.

Frankel, G., Philips, A. D., Novakova, M., Batchelor, M., Hicks, S., Dougan, G. Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-direct mutagenesis of the intimin C-terminus domain. **Mol. Microbiol.** 29:559-570, 1998.

Gibson G.R., Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.** 125, 1402–1412, 1995.

Goosney, D.; DeVinney, R.; Pfuetzner, R.; Frey, E.; Strynadka, N.C.; Finlay, B.B. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actin. **Curr Biol**, v. 10, p. 735-738, 2000.

Gouffaux, F., China, B., Janssen, L., Mainil, J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Res. Microbiol.** 151:865-871, 2000.

Hoch, R.C.; Schraufstatter, I.U.; Cochrane, C.G. *In vivo*, *in vitro*, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. **J Lab Clin Med**, v. 128, p. 134-145, 1996.

Kaper, J. B. Defining EPEC. **Vet. Microbiol.** 27:1-6, 1996.



Knutton, S.; Baldwin, T.; Williams, P.H.; McNeish, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 57, p. 1290-1298, 1989.

Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L. Investigation of domestic animals and pets as reservoir for intimin – (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Vet. Microbiol.** 67:484-489, 2005.

Laue, D., Tucker, L.A. **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham University Press: United Kingdom, 2006.

Levine, M. M. *Escherichia coli* infections. In: **Bacterial vaccines**, cap. 7. London, Academic Press, p. 187-235, 1984.

Levine, M.M.; Edelman, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiol Rev**, v. 6, p. 31-35, 1984.

Mathew, A.G., Sutton, A.L., Scheidt, A.B. Effect of galactan on select microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of weaning pig. **J. Anim. Sci.**, v. 71, p. 1503-1509, 1993.

Menten, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: **Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 38, 2001, Piracicaba. Anais. Piracicaba, SBZ, 2001, p. 141-157.

Mulrennan, F. Glicômica: a escolha de uma nova geração. **Feeding Times**, v. 8, n. 2, 2003.

Nataro, J. P., Kaper, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11:142-201, 1998.

Neter, E.; Westphal, O.; Luderitz, O.; Needell, M.H. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Paediatrics**, v. 16, p. 801-805, 1955.

Olsvik, O., Strockbine, N. A. PCR detection of heat-stable, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In. Persing, D.H.; Smith, T.F.; Tenover, F.C.; White, T.J. **Diagnostic molecular microbiology**. Washington: ASM, pp. 271-276, 1993.

Parkos, C.A.; Delp, C.; Amaout, M.A.; Madara, J.L. Neutrophil migration across a cultures intestinal epithelium: dependence on a CD11b/CD18-mediated event and enhanced efficiency in the physiologic direction. **J Clin Invest**, v. 88, p. 1605-1612, 1991.

PESTANA de Castro, A.F., Serafim, M.B., Brito, J.R.F., Barcellos, D.S.E.N., Colli, I.A.G. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concordia, SC, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 4, 109–114, 1984.

Pedroso, M.Z.; Freymuller, E.; Trabulsi, L.R.; Gomes, T.A. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. **Infec Immun**, v. 61, p. 1152-1156, 1993.

Phillips, A.D; Frankel, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. **J Infect Dis**, v. 181, p. 1496-1500, 2000.

Robins, R. M, Browne, A. M., Adams, L. M., Wood, B. V., Molsiols, A. V., Francis, C. L., Jerse, A. E., Kaper, J. B., Falkow, S. Characterization of interactions of enter pathogenic *Escherichia Coli* 2127:H6 with mammalian cells *in vitro*. **J. Infect. Dis** .164:693-703, 1991.

Rottner, K.; Stradal, T.E.B.; Wehland J. Bacteria-host cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. **Develop Cell**, v. 9, p.3-17, 2005.

Roy, M., Gibson, G.R. Probiotics and prebiotics – microbial in menu. **C-H-C Carbohydrates**, v. 9, n. 3, 6 p., 1998. Disponível em: <http://www.babelfish.altavista.com/cqi-bm>.

Savage, T.F., Cotter, P.F., Zakrzewska, E.I. The effects of feeding mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of wrolstad MW male turkeys. **Poultry Sci.**, v. 75, n. 1, p. 143, 1996.

Savkovic, S.D.; Koutsouris, A.; Hecht, G. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultures human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. **Infect Immun**, v. 64, p. 4480-4487, 1996.

Scaletsky, I. C. A, Pedroso, M. Z., Oliva, C. A. G., Carvalho, R. L. B., Morais, M. B., Fagundes-neto, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.** 67:3410-3415, 1999.

Schrezenmeir, J., De Vrese, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 361-364, 2001.

Silva, J.A.; Silva, W.D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Rev. Patol. Trop.** v. 34, n. 3, p. 175-196, 2005.

Silva, L.P., Nörnberg, J.L. Prebióticos na nutrição de não-ruminantes. **Rev. Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 55-65, 2003.

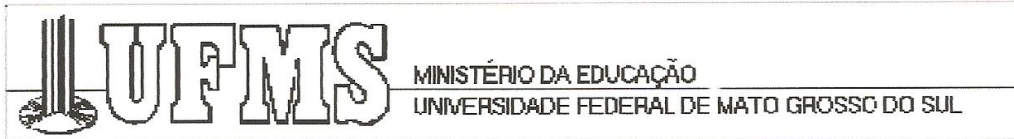
Sthal, P.D. The mannose receptor and other macrophage lectins. **Curr. Opin. Immunol.**, v.4, p. 49-52, 1992.

Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Chow, J., Wolf, B.W., Garleb, K.A., Fahey JR, G.C. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and tract nutrient digestibilities microbial populations and concentrations of protein catabolites in the larger bowel of dogs. **J. Nutr.** 132: p.980-989. 2002.

Vidal, J. E., Canizalez-Roman, A., Gutierrez-Jimenez, J., Navarro-Garcia, F. Patogenesis molecular, epidemiologia y diagnostico de *Escherichia coli* enteropatógena. **Salud Publica Mex.** 49:376-386, 2007.

## **Anexo 1**

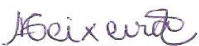
**Certificação de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº. 116/2006 da Doutoranda **Eliana Maria Moreira Ferreira Gouveia**, sob a Orientação do Prof. Ricardo Dutra Aydos, referente ao projeto de pesquisa “**Efeito dos mananoligossacarídeos fosforilados (BIO-MOS) na função imune e na microbiologia fecal em cães**”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 27 de julho de 2006.

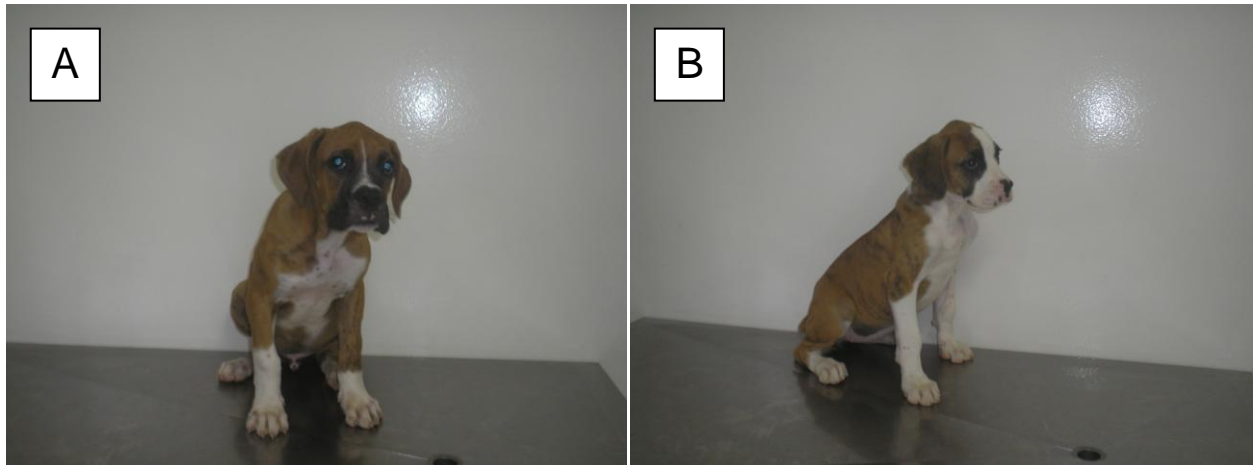
Campo Grande (MS), 27 de julho de 2006.

  
Dr<sup>a</sup> Maria Araújo Teixeira  
Presidente da CEUA

## **Anexo 2**



**Figura 1.** Canis nos quais os animais permaneceram durante todo o período experimental.



**Figura 2.** Filhotes infectados com *Escherichia coli* enteropatogênica. A: animal do grupo C, linhagem SPA14 que não recebeu tratamento com MOS. B: animal do grupo E, linhagem SPA14, tratado com MOS.





**Figura 3.** Placa com meio de cultura MacConkey com crescimento de *Escherichia coli* a partir das fezes de um animal experimentalmente infectado.

## **Apêndice**

### **Tabela de avaliação dos animais**

### Tabela de Avaliação dos Animais

Animal n°: \_\_\_\_\_ Nome da mãe: \_\_\_\_\_ Ninhada nascida em: \_\_/\_\_/\_\_

Grupo: \_\_\_\_\_

Dia da coleta		0	5	10	15	20	Observações
Exame clínico	Estado Geral	Um ( )	Um ( )	Um ( )	Um ( )	Um ( )	
		Dois ( )	Dois ( )	Dois ( )	Dois ( )	Dois ( )	
		Três ( )	Três ( )	Três ( )	Três ( )	Três ( )	
	Temperatura						
	Desidratação	Não ( )	Não ( )	Não ( )	Não ( )	Não ( )	
		Pouco ( )	Pouco ( )	Pouco ( )	Pouco ( )	Pouco ( )	
		Muito ( )	Muito ( )	Muito ( )	Muito ( )	Muito ( )	
	Vitalidade	Apático ( )	Apático ( )	Apático ( )	Apático ( )	Apático ( )	
		Brinca ( )	Brinca ( )	Brinca ( )	Brinca ( )	Brinca ( )	
		Agitado ( )	Agitado ( )	Agitado ( )	Agitado ( )	Agitado ( )	
	Mucosas	Pálidas ( )	Pálidas ( )	Pálidas ( )	Pálidas ( )	Pálidas ( )	
		Róseas ( )	Róseas ( )	Róseas ( )	Róseas ( )	Róseas ( )	
		Congestas ( )	Congestas ( )	Congestas ( )	Congestas ( )	Congestas ( )	
	Textura das fezes	Normais ( )	Normais ( )	Normal ( )	Normais ( )	Normais ( )	
		Pastosas ( )	Pastosas ( )	Pastosas ( )	Pastosas ( )	Pastosas ( )	
		Líquidas ( )	Líquidas ( )	Líquidas ( )	Líquidas ( )	Líquidas ( )	
	Sangue nas fezes	Ausente ( )	Ausente ( )	Ausente ( )	Ausente ( )	Ausente ( )	
		Traços ( )	Traços ( )	Traços ( )	Traços ( )	Traços ( )	
		Presente ( )	Presente ( )	Presente ( )	Presente ( )	Presente ( )	
	Desenvolvimento	Peso					
	Imunológicas	IgA					
IgG							
Hematológicas	Leucócitos						
	Neutrófilos						
	Linfócitos						

# 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](#)