PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

**Monitoramento sanitário de colônia de camundongos BALB/c
mantidos em biotério convencional**

Tânia Cristina Pereira¹, Sílvia Cristina Barboza Pedrini², Heloísa Helena
Escudero³, Reinaldo Valério Germino³, Patrícia Sammarco Rosa

¹ Bióloga

² Médica Veterinária

³ Biologista

Instituto Lauro de Souza Lima

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 225/226 - Bauru, SP - Cx postal 3021

CEP 17034-971 - F.: (14) 3103-5886 – endereço eletrônico:

silviapedrini@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o estado sanitário da colônia de camundongos BALB/c e as condições ambientais do Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima, através de exames parasitológicos e microbiológicos. Utilizando-se meios de cultura enriquecidos e seletivos, procurou-se identificar agentes potencialmente patogênicos para os animais e zoonóticos, a partir de pele, pelos, trato respiratório e entérico dos animais, além da microbiota fúngica ambiental. Pesquisou-se a presença de *Mycoplasma* sp. e *Bordetella* sp. em traqueia e fungos em pele e pelos, além de exames parasitológicos e pesquisa de *Salmonella* spp. e enterobactérias em amostras de conteúdo do

ceco dos animais. Para monitoramento do ambiente, coletaram-se amostras de diferentes locais do interior do biotério. Após macro e microcultivo fúngicos, foram identificados *Cladosporium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp. e *Trichophyton mentagrophytes*. O exame micológico de pele e pelos resultou negativo para 100% das amostras. Não foi observado crescimento de patógenos respiratórios, nem de *Salmonella* spp. As bactérias isoladas são constituintes da microbiota entérica normal de animais em condições convencionais: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., *Providencia stuart*, *Pseudomonas putida*. O exame parasitológico demonstrou a presença de *Strongyloides stercoralis*, *Syphacia obvelata*, *Aspiculuris tetraptera* e *Ancylostoma* sp.. O trabalho realizado demonstrou grande valor diagnóstico, tanto para avaliação da saúde dos animais de laboratório, como para uma análise qualitativa da microbiota fúngica ambiental, devendo ser implantado como rotina no biotério.

Palavras-chave: camundongo, monitoramento sanitário, animais de laboratório.

Health monitoring of the of BALB/c mice colony kept in a conventional animal facility

Abstract

The aim of this work was to evaluate the health status and environmental conditions of the colony of BALB/c mice maintained in an Animal Facility of the Lauro de Souza Lima Institute. Parasitological and microbiological tests with enriched and selective culture media were used to identify zoonotic and potentially pathogenic agents from skin, hair, respiratory and enteric tracts of the animals and fungal flora of the environment. This study proposed to verify colonization of *Mycoplasma* sp. and *Bordetella* sp. in trachea, fungi in skin and hair, as well as perform parasitological examination, *Salmonella* spp. and enterobacteria isolation from cecum of sampled animals. In addition serum of

animals were tested against different viral and bacterial antigens and against *Toxoplasma gondii* antigen. For environmental monitoring samples were collected from different locations. After macro and microculture, the fungi identified were *Cladosporium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp. and *Trichophyton mentagrophytes*. Mycological examination of the skin was negative for 100% of the samples. There was no growth of respiratory pathogens or *Salmonella* spp. The bacteria isolated in the present study consist of the normal enteric microbiota of animals in conventional conditions: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., *Providencia stuart* and *Pseudomonas putida*. The parasitological examination showed the presence of *Strongyloides stercoralis*, *Syphacia obvelata*, *Aspiculuris tetraptera* and *Ancylostoma* sp. Serology resulted negative for all tested antigens. The techniques used in this work showed to be valuable for diagnostic purpose, to assess the health of laboratory animals, as well as for qualitative analysis of environmental fungal microbiota, thus it should be implemented as a routine in the animal house.

Keywords: mouse, healthy monitoring, laboratory animals.

Introdução

Grande parte dos avanços no conhecimento sobre enfermidades infecciosas, microbiologia, imunologia, farmacologia e patologia tem sido possível graças à existência de modelos experimentais (Molinaro, 2009).

As instalações onde são produzidos e mantidos estes animais de experimentação são denominadas biotérios. Neles devem ser produzidas e alojadas espécies animais destinados a atender às atividades de ensino e pesquisa, conforme a missão da instituição. Os biotérios podem se distinguir quanto às atividades neles realizadas. Nos biotérios de produção são criados animais a partir de matrizes selecionadas para linhagens específicas. Sua edificação deve ocorrer preferencialmente em áreas isoladas distantes dos centros urbanos. Nos biotérios de experimentação são alojados os animais que

serão utilizados para ensino e pesquisa. Nesse caso os animais permanecem no biotério por um determinado período experimental, durante o qual devem ser observados rigorosamente o início, duração e término, bem como a quantidade e espécie animal a ser utilizada no experimento. A prática aconselha que esse tipo de construção deva ser próximo ao laboratório de pesquisa (Cardoso, 2001).

Para manutenção do padrão sanitário num biotério é necessária a implantação de barreiras sanitárias para proteção da população humana e animal, envolvidas nos processos de produção e experimentação (Cardoso, 2001). Barreira sanitária é, portanto, um sistema que combina aspectos construtivos, equipamentos e métodos operacionais que buscam estabilizar as condições ambientais das áreas restritas, minimizando a probabilidade de patógenos ou outros organismos indesejáveis contactarem a população animal de áreas limpas.

As barreiras sanitárias adotadas dependem do padrão sanitário que se pretende obter. Todas as barreiras devem ser implantadas para proporcionar bem estar ao animal garantindo que nada influencie no resultado do experimento. São fatores importantes o controle do macroambiente (temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e ruídos), controle do microambiente (qualidade da cama, dieta e hidratação), instalações adequadas com portas e janelas vedadas, filtros de ar, sistema de exaustão, higienização do ambiente e esterilização de materiais, observação de boas práticas de laboratório para manejo dos animais, quarentena para animais recém-adquiridos, higiene pessoal dos bioteristas, utilização de equipamentos de segurança individual (máscaras, gorros, uniformes, propés e luvas), avaliação laboratorial periódica, treinamento e qualificação dos recursos humanos (Raimundo e Goldim, 2002).

As barreiras sanitárias devem ser validadas de forma a assegurar a qualidade dos animais produzidos e/ou utilizados na pesquisa. As infecções subclínicas são muito mais comuns do que as doenças em animais de experimentação, ainda assim podem causar alterações nos resultados de

experimentos, acarretando perdas econômicas e diminuição da produtividade científica (Molinaro, 2009). Portanto, um fator essencial para reprodutibilidade e confiabilidade dos protocolos experimentais só é possível através de um monitoramento rigoroso da qualidade sanitária dos animais utilizados na pesquisa biomédica.

O monitoramento sanitário é um conjunto de metodologias e procedimentos estabelecidos realizados em colônias de animais em intervalos regulares, que variam de acordo com o padrão sanitário da colônia, e visam detectar a presença ou não de agentes infecciosos (Luca *et al.*, 1996).

Material e Métodos

Animais

Trinta e um camundongos BALB/c de ambos os sexos, com idade variando de 4 semanas (30% dos animais) a 12 meses de idade (70% dos animais) foram divididos em três grupos (G₁ e G₂ e G₃), onde G₁ (n=10) ; G₂ (n=11) ; G₃ (n= 10), mantendo a proporção da idade.

Sorologia

Os animais do grupo G₁ foram anestesiados, via intraperitoneal, com 100mg de quetamina e 10mg de xilazina e submetidos à punção cardíaca para retirada de sangue total, que foi colocado em tubos cônicos estéreis de 1,5ml para obtenção dos soros, devidamente identificados e armazenados a -20°C para envio ao Laboratório de Controle de Qualidade Animal, Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, CEMIB, Unicamp.

Os antígenos testados foram: vírus da hepatite murina (MHV), vírus da encefalomielite de Theiler (TMEV-GD), vírus Sendai, vírus diminuto do camundongo (MVM), vírus da ectromelia, vírus da coriomeningite linfocitária (LCM), adenovírus tipo 1 (MAD), rotavírus do grupo A, reovírus tipo 3, além dos antígenos para *Bordetella bronchiseptica*, *Corynebacterium kutscheri*, *Mycoplasma pulmonis*, *Clostridium piliforme* e *Toxoplasma gondii*.

Coleta de amostras

Os camundongos do grupo G1 foram eutanasiados por sangria branca, após retirada total do sangue. Já os animais dos grupos G₂ e G₃ foram eutanasiados em câmara de CO₂. . Posteriormente foram colocados no interior de uma câmara asséptica e fixados em decúbito dorsal em um suporte para dissecação. A face ventral do animal foi submetida a antissepsia com álcool 70%. A pele foi então rebatida com ajuda de pinça e tesoura estéreis. Foi feita coleta de material com fita anal para pesquisa direta de parasitas.

Avaliação micológica

- Animais

Foram coletados pelos para exame micológico com pinça estéril. O material foi semeado nos meios Agar Sabouraud e Mycosel, os quais foram incubados a 25°C durante 30 dias, para verificar a ocorrência de fungos dermatófitos e leveduras na pele dos animais.

- Ambiente

Foram utilizados *swabs* em solução salina estéril, em diferentes regiões das instalações, equipamentos e fômites das salas de camundongos. O material foi semeado em tubos contendo Ágar Mycosel e Ágar Sabouraud acrescido de 30mg de cloranfenicol. Os tubos foram incubados a 25°C durante 30 dias. Em seguida foi realizado o microcultivo para a identificação das colônias. Foram avaliadas paredes da frente, laterais e fundo antes e após limpeza e desinfecção com hipoclorito de sódio a 0,5%; janela e portas internas e externas sem limpeza e desinfecção; maravalha imediatamente após autoclavagem, estocada há uma semana, com 24 e 72 horas de uso; gaiolas imediatamente após a lavagem, estocadas há uma semana, com 24 e 72 horas de uso; grades imediatamente após a lavagem e em uso há uma semana; bebedouros lavados e secos; tambor de ração, uniformes, botas e luvas dos funcionários.

- **Swab de traqueia**

As traqueias dos animais foram dissecadas e abertas longitudinalmente com uma lâmina de bisturi. Seus conteúdos foram coletados com um *swabs* estéreis umedecidos com água destilada estéril e imediatamente semeados nos meios: Ágar Sangue (para mesófilos), Bordet-Gengou (para *Bordetella bronchiseptica*), Löffler (para *Corynebacterium* sp.), Caldo PPLO – “Pleuropneumonia-like organisms” (para *Mycoplasma* spp.)

As amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período foi feita a primeira leitura e verificado o crescimento positivo ou negativo. Os tubos contendo o caldo PPLO foram incubados a 37°C por 72 horas. Após esse período foi realizada uma leitura. As colônias foram isoladas e coradas pelo método de Gram e em seguida foram realizadas provas bioquímicas catalase, coagulase, manitol, Dnase, EPM-Mili, citrato e uréia para identificação de espécies.

- **Conteúdo do ceco**

Os cecos dos animais foram abertos com auxílio de tesoura estéril e seu conteúdo foi coletado com uma alça descartável estéril e semeado em meios de cultura MacConkey (para Gram negativos), Salmonella-Shigella (SS), Cetrimide (*Pseudomonas* sp.), Manitol Salt Agar (*Staphylococcus*), Ágar Sangue (*Enterococos* sp., *Micrococus* sp., *Streptococus* sp.). Os meios foram incubados por 48 horas a 37°C. Após este período, quando houve crescimento de colônias, estas foram isoladas e identificadas bioquimicamente juntamente com as amostras isoladas de traqueia.

O ceco foi retirado e colocado em um tubo plástico estéril para exame parasitológico, pesquisa de protozoários, ovos, cistos, larvas e helmintos adultos. Foi utilizado o método de Hoffman.

Resultados

Os resultados de exame micológico foram negativos para todas as amostras de pelo dos grupos G1, G2 e G3. Quanto ao ambiente, em uma das amostras (grade com uma semana de uso) foi isolado um patógeno importante, o *Trichophyton mentagrophytes*; os demais fungos isolados são considerados ambientais e oportunistas (tabela 1).

Tabela 1. Culturas de fungos positivas de amostras coletadas em diferentes regiões das instalações, equipamentos e fômites das salas de camundongos do biotério do ILSL.

Fungo isolado	Local isolado
<i>Cladosporium</i> sp.	Maravalha/ Uniformes dos funcionários/ Janela/ Parede
<i>Aspergillus</i> sp.	Grades/ Tambor de ração
<i>Acremonium</i> sp.	Parede do fundo
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Grades com uma semana de uso

Não foram observados ectoparasitas na pele dos animais. No exame parasitológico direto, todas as amostras resultaram negativas. Pelo método de sedimentação foram observados alguns animais parasitados por oxiurídeos. No G1 4/10 (40%) animais estavam infectados pelos organismos *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. No G2 4/11 (36%) estavam animais infectados pelos mesmos organismos. No grupo G3 encontramos animais infectados com *Strongyloides* sp. 5/10 (50%) e animais infectados com *Ancystoloma* sp. 2/10 (20%).

Quanto ao exame microbiológico, nos grupos G1, G2 e G3 foi verificada somente a presença de bactérias pertencentes à microbiota normal de traquéia

e ceco de roedores, (tabelas 2 e 3), com exceção do *Staphylococcus aureus*, que pode colonizar a pele dos animais.

Tabela 2. Porcentagem de animais com culturas positivas de amostras coletadas da traquéia de camundongos BALB/c mantidos em biotério convencional no ILSL. Resultados obtidos nos grupos G1 (n=10) G2 (n=11); G3 (n= 10).

Organismo pesquisado	G1 (%)	G2 (%)	G3(%)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0	0	0
<i>Corynebacterium sp.</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	27	27

Tabela 3. Porcentagem de animais com culturas positivas de amostras coletadas do ceco de camundongos BALB/c mantidos em biotério convencional no ILSL. Resultados obtidos nos grupos G1 (n=10) ; G2 (n=11) ; G3 (n= 10)

Organismo isolado	G1 (%)	G2 (%)	G3(%)
<i>Escherichia coli</i>	70	91	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	0	0
<i>Klebsiella spp.</i>	0	9	0
<i>Proteus mirabilis</i>	30	0	0
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	10
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	20
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	0

A negatividade dos soros testados (tabela 4) contra os diferentes antígenos indica ausência de infecção subclínica na colônia.

Tabela 4. Resultado das provas sorológicas dos camundongos BALB/c mantidos em biotério convencional no ILSL.

Antígeno / método	C5	C6	C7	C9	10	11	12	13	14	% de infecção
MHV- IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
TMEV-GD VII - IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Sendai – IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
MVM - IFI / IHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Ectromélia - IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
LCM – IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
MAD tipo 1 (FL) - IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
Rota grupo A (EDIM) – IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
REO-3 – IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
<i>Bordetella bronchiseptica</i> – MA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
<i>Corynebacterium kutscheri</i> – MA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
<i>Mycoplasma pulmonis</i>–IFI /Elisa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
<i>Clostridium piliforme</i> – IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
<i>Toxoplasma gondii</i> – IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0

C = camundongo (soros obtidos de cada animal do grupo G1); - = negativo

IHA = Reação de Inibição da Hemaglutinação; Soros testados nas diluições 1/10 até 1/320

IFI = Reação de Imunofluorescência Indireta; Soros testados na diluição 1/20 :

+ = imunofluorescência fraca (título 1/20 a 1/40)

++ = imunofluorescência média (título 1/40 a 1/80)

+++ = imunofluorescência forte (título > 1/80)

MA = Reação de Microaglutinação; Soros testados nas diluições 1/5 até 1/32

Discussão

Os camundongos constituem cerca de 90% dos animais de laboratório utilizados em pesquisa e ensino. A presença de microrganismos patogênicos, mesmo que em infecções subclínicas, é um fator importante pela possibilidade de ocorrerem infecções oportunistas que podem colocar em risco a saúde dos animais, e em casos de zoonoses, a saúde humana.

Os parâmetros biológicos alterados podem se refletir em mudanças de comportamento, taxa de crescimento, níveis enzimáticos, resposta imune e índices de produtividade. O monitoramento sanitário periódico é importante para assegurar o *status* microbiológico e a qualidade do animal, além de servir de base para orientar tomadas de decisões, na tentativa de correção de erros de manejo na produção dos animais e durante a análise de dados de pesquisa.

Em colônias convencionais de animais de laboratório são comuns as infecções parasitárias por oxiurídeos, mesmo na presença de barreiras sanitárias. A infestação de animais pode ocorrer por ingestão de ovos embrionados através de aerossóis enquanto os animais se limpam durante trocas de caixas. Apesar das lesões causadas por oxiurídeos serem raras, infestações severas podem causar irritabilidade e desconforto nos animais, levando a alteração de parâmetros fisiológicos e debilidade. Um estudo mostrou a porcentagem de infecção por ecto e endoparasitas em camundongos e ratos de cinco biotérios do estado de São Paulo, sendo em média 57% para *Syphacia* spp. e 50% para *Aspiculuris tetraptera* (Bressan *et al.*, 1997). Outro estudo realizado em dezoito biotérios brasileiros com diferentes padrões sanitários demonstrou prevalência de infecção de 86.6% pela *Syphacia obvelata* e 60.0% pelo *Aspiculuris tetraptera*, entre outros parasitas (Gilioli *et al.*, 2000). O presente trabalho mostrou 30% de animais infectados por oxiurídeos. Apesar da taxa de infecção ser mais baixa do que as relatadas na literatura podemos considerar que toda colônia está infectada.

A presença de *Staphylococcus aureus* em 30% das amostras de traqueia pode ser devida à contaminação da pele, durante o procedimento de coleta. Também merece atenção a presença de *Trichophyton mentagrophytes* na

grade dos animais, que representa uma potencial fonte de infecção para os animais e o homem. O restante dos organismos identificados são bactérias encontradas na microbiota normal de animais convencionais.

O fato de o presente estudo estar avaliando animais em condições sanitárias convencionais, em um biotério com apenas algumas barreiras sanitárias estabelecidas, merece ser discutido. As barreiras utilizadas são portas fechadas, impedindo a entrada de outros vertebrados na área de manutenção dos animais, controle de entrada de animais provenientes de outros biotérios, fluxo unidirecional dos materiais utilizados de área limpa para suja e autoclavagem da maravalha. Não existe controle de eficiência das barreiras, nem controle e validação dos processos de limpeza e de esterilização. Mesmo nas condições descritas, os organismos encontrados colonizando os camundongos avaliados são considerados não patogênicos.

O sucesso tanto da produção de animais, como da utilização destes em procedimentos experimentais, depende principalmente da conscientização dos técnicos e pesquisadores, em conjunto com a implantação de transformações que visem reestruturação física e refinamento de procedimentos operacionais (Oliveira, 2003). É necessário trabalhar com pessoal técnico treinado e capacitado para manipulação dos animais; possuir protocolos de avaliação das condições sanitárias dos animais e do ambiente no qual estes se encontram; e respeitar as exigências éticas e legislativas sobre o uso de animais na pesquisa. Isto só pode ser obtido através de um esforço conjunto entre profissionais que trabalham diretamente na manutenção dos animais, pesquisadores e a administração da instituição.

Conclusões

Algumas conclusões importantes podem ser tiradas com base nos resultados encontrados nesse trabalho:

- Apesar do biotério do ILSL ser instalado em condições convencionais sem controle de barreiras sanitárias, não há indicação da existência de

importantes patógenos para os animais, nem para os técnicos que manipulam os animais, o que indica que as barreiras estabelecidas (controle de entrada de animais externos e pessoas, esterilização de cama) têm sido efetivas no controle de contaminação do meio externo para o interno.

- A presença de helmintos na colônia indica que o manejo dos animais em seu micro-ambiente, a higiene pessoal e ambiental devem ser melhorados de forma a evitar re-infecção dos animais.
- A caracterização da microbiota torna mais fácil a identificação de microrganismos para diagnóstico e controle de enfermidades.
- O monitoramento sanitário é um procedimento importante para auxiliar na validação de métodos operacionais que visem a obtenção de animais de qualidade para uso na pesquisa científica.
- Considerando a importância do monitoramento realizado, a metodologia aplicada revela grande valor prático, devendo ser implantada como rotina neste biotério.

Referências Bibliográficas

BRESSAN, M.C.R.V., CALGARO, G.A., ALEXANDRE, S.R., MARQUES T. Prevalence of ecto and endoparasites in mice and rats reared in animal houses. *Bras J Vet Res Anim Sci*, v.34, p.142-46, 1997.

CARDOSO, T.A.O. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. *Bol Centr Panam Fiebre Aftosa*; v.64-67, p.3-17, 1998-2001.

GILIOLI, R., ANDRADE, L.A.G., PASSOS, L.A.C., SILVA, F.A., RODRIGUES D.M., GUARALDO, A.M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.52, 2000.

LUCA, R.R., ALEXANDRE, S.R., MARQUES, T., SOUZA, N.L., MERUSSE, J.L.B. Manual para Técnicos em Bioterismo. 2 ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.

MOLINARO, E. M.; MAJEROWICZ, J.; COUTO, S. E.R.; BORGES, C.C. A.; MOREIRA, W.C.; RAMOS, S. Animais de laboratório. In: Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Janeiro: EPSJV; IOC; v.1, cap.4, p.155-222, 2009.

OLIVEIRA, G.M. Conscientização e Implantação de Transformações Institucionais. Parte I de III. Controle de Contaminação, v.55, p.20-26, 2003.

RAYMUNDO, M.M., GOLDIM, J.R. Ética da pesquisa em modelos animais. *Bioética*, v.10, p.31-44, 2002.