

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Especialização em Biotérios

André Teixeira Lellis

**Tipos de modelos de análise para controle sanitário de animais de
laboratório**

São Paulo
2023

André Teixeira Lellis

Tipos de modelos de análise para controle sanitário de animais de laboratório

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientadora: Gláucie Jussilane Alves

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Lellis, André Teixeira

Tipos de modelos de análise para controle sanitário de animais de laboratório /
André Teixeira Lellis ; orientador(a) Glaucie Jussilane Alves - São Paulo, 2023.
92 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Programa de
Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em Biotérios.

1. Parasitologia 2. Bacteriologia. 3. Virologia. 4. Biotério I. Alves, Glaucie Jussilane
. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação Lato Sensu
- Especialização em Biotérios. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

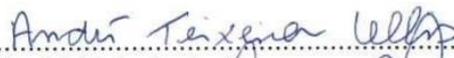
AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

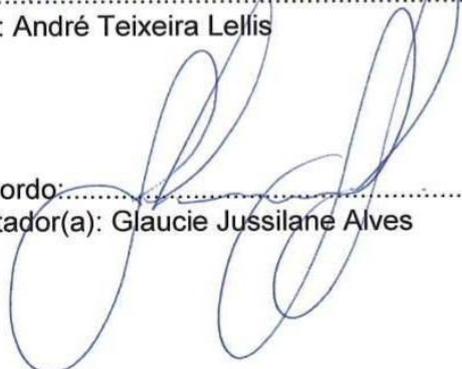
Eu, André Teixeira Lellis, aluno do Curso de Especialização em Biotérios, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 23 de janeiro de 2023


.....
Aluno: André Teixeira Lellis


De acordo:
Orientador(a): Gláuciele Jussilane Alves

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora pelo apoio.

Aos amigos e professores pela agradável convivência.

Ao Instituto Butantan, em especial a Dra. Vania G. Moura Mattaraia, por acreditar nos seus colaboradores.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

LELLIS, André Teixeira. **Tipos de modelos de análise para controle sanitário de animais de laboratório**. 2023. 93 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

O uso de animais em pesquisas permitiram ganhos no conhecimento acadêmico e em novas abordagens terapêuticas pois são modelos com características comuns ao homem. A qualidade dos animais utilizados tem forte impacto na validade e reprodutibilidade dos resultados da pesquisa, além de reduzir o número de animais no estudo. Para se conseguir esse tipo de padrão de qualidade, devem ser adotados programas de monitoramento sanitário afim de evitar contaminação biológica por animais, materiais biológicos, insetos, pessoas e equipamentos. Além de evitar a entrada de patógenos nas colônias, deve-se conhecer o padrão sanitário do ambiente e dos animais já presentes no biotério, evitando que haja surto coletivo de doenças. Como animais de laboratório podem ser potencialmente portadores assintomáticos de patógenos, torna-se ainda mais desafiador o controle sanitário. De acordo com o abordado, tem-se como objetivo neste estudo o levantamento de informações sobre o controle sanitário de animais utilizados em pesquisas. Nesta revisão de literatura, inclui-se informações, recomendações e metodologias para o monitoramento parasitológico, bacteriológico e virológico das principais espécies de animais destinados a pesquisa, incluindo camundongos, ratos, cobaias e coelhos.

Palavras-chave: Parasitologia. Bacteriologia. Virologia. Biotério.

ABSTRACT

LELLIS, André Teixeira. **Types of analysis models for sanitary control of laboratory animals**. 2023. 93 p. Monograph (Specialist in Bioterium) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

The use of animals in research allowed gains in academic knowledge and in new therapeutic approaches, as they are models with characteristics common to humans. The quality of the animals used has a strong impact on the validity and reproducibility of research results, in addition to reducing the number of animals in the study. To achieve this type of quality standard, sanitary monitoring programs must be adopted in order to avoid biological contamination by animals, biological materials, insects, people and equipment. In addition to preventing the entry of pathogens into the colonies, the sanitary standard of the environment and of the animals already present in the vivarium must be known, preventing a collective outbreak of diseases. As laboratory animals can potentially be asymptomatic carriers of pathogens, sanitary control becomes even more challenging. According to what has been discussed, the objective of this study is to collect information on the sanitary control of animals used in research. This literature review includes information, recommendations and methodologies for parasitological, bacteriological and virological monitoring of the main species of animals intended for research, including mice, rats, guinea pigs and rabbits.

Keywords: Parasitology. Bacteriology. Virology. Biotery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Visão microscópica de cistos de <i>Entamoeba muris</i> em amostra de fezes corada com corante de iodo, amplificada 40 vezes.....	29
Figura 2 - Visão microscópica de trofozoítos de <i>Giardia muris</i> corada com solução de iodo de Lugol, ampliada 100 vezes.	30
Figura 3 - Micrografia eletrônicas de varredura de <i>Spironucleus muris</i> mostrando oito flagelos.....	31
Figura 4 - Fotomicrografia de contraste de <i>Chilomastix bettencourti</i> (400 vezes)	32
Figura 5 - <i>Tricomonas</i> spp. extraído de raspado intestinal com coloração de Giemsa-Wright, ampliado 800-1000 vezes	33
Figura 6 - Imagem microscópica de <i>Cryptosporidium parvum</i>	33
Figura 7 - Oocistos de <i>Eimeria nieschulzi</i>	34
Figura 8 - Fotomicrografias de oocistos esporulados de <i>Eimeria caviae</i>	34
Figura 9 - Estágio trófico de <i>Balantidium</i> spp, mostrando a superfície coberta por cílios, o vacúolo contrátil (CV), o macronúcleo (Mn) e o aparelho oral (AO).....	35
Figura 10 - Imagem microscópica de <i>Giardia duodenalis</i>	36
Figura 11 - Cabeça (A), cauda (B) e ovo (C) de oxiúros fêmea adulta de <i>Syphacia muris</i> . Cabeça e cauda com aproximação de 250 vezes e ovo em 400 vezes	38
Figura 12 - Cabeça (A), cauda (B) e ovo (C) de oxiúros fêmea adulta de <i>Syphacia obvelata</i> . Cabeça e cauda com aproximação de 250 vezes e ovo em 400 vezes ...	39
Figura 13 - Cabeça (A), cauda (B) e ovo (C) de oxiúros fêmea adulta de <i>Aspicularis tetráptera</i> . Cabeça e cauda com aproximação de 250 vezes e ovo em 400 vezes..	40
Figura 14 - Imagem da cabeça de <i>Passalurus ambiguous</i>	41
Figura 15 - Escolex com rostelo desarmado de <i>Hymenolepis diminuta</i> em 250 vezes	42
Figura 16 - Ovos de <i>Hymenolepis nana</i>	42
Figura 17 - Porção anterior (A e B) e ovo (C) de <i>Paraspidodera uncinata</i>	43
Figura 18 - Imagem ventral de um adulto de <i>Poliplax serrata</i> , mostrando as primeiras pernas menores	44
Figura 19 - <i>Myobia musculi</i> em uma amostra de pelo em fita gomada	45
Figura 20 - <i>Myocoptes musculus</i> em uma amostra de pelo em fita gomada	46
Figura 21 - Desenho do piolho <i>Gliricola porcellil</i>	46

Figura 22 - Desenho do ácaro <i>Chirodiscoides caviae</i> , A (macho) e B (fêmea)	47
Figura 23 - <i>Listrophorus gibbus</i> em raspado cutâneo de coelho visualizados em microscopia óptica com objetiva de 10 vezes	48
Figura 24 - Imagem microscópica de <i>Cheyletiella</i> spp	49
Figura 25 - Imagem de microscopia de <i>Psoroptes</i> spp	50
Figura 26 - Técnicas de isolamento em meio de cultura sólido, (1) estria simples e (2) estria composta	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recomendação de monitoramento de bactérias e fungos em camundongos	52
Tabela 2 - Recomendação de monitoramento de bactérias e fungos em ratos	52
Tabela 3 - Recomendação de monitoramento de bactérias e fungos em cobaias	53
Tabela 4 - Recomendação de monitoramento de bactérias e fungos em coelhos	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
3	METODOLOGIA	17
4	RESULTADOS	18
4.1	Módulo I: controle sanitário em biotérios	18
4.1.1	Coleta de amostras	18
4.1.2	Frequência de monitoramento	18
4.1.3	Envio de animais para avaliação sanitária	19
4.1.4	Controle de qualidade no laboratório	20
4.1.5	Descontaminação e descarte de resíduos	20
4.1.6	Barreiras sanitárias	21
4.2	Módulo II: controle sanitário parasitológico	21
4.2.1	Importância do estudo parasitológico na saúde do animal.....	21
4.2.2	Frequência de monitoramento	22
4.2.3	Controle sanitário endoparasitário	22
4.2.3.1	<i>Metodologias para diagnóstico</i>	22
4.2.3.2	<i>Protozoários encontrados em colônias de animais de laboratórios</i>	29
4.2.3.3	<i>Nematódeos encontrados em colônias de animais de laboratórios</i>	37
4.2.3.4	<i>Cestódeos encontrados em colônias de animais de laboratórios</i>	41
4.2.4	Controle sanitário ectoparasitário.....	43
4.2.4.1	<i>Metodologias para diagnóstico</i>	43
4.2.4.2	<i>Ectoparasitas encontrados em colônias de animais de laboratórios</i>	44
4.2.5	Descontaminação das colônias.....	50
4.2.5.1	<i>Limpeza periódica</i>	50
4.2.5.2	<i>Técnica de derivação cesariana</i>	50

4.3	Módulo III: controle sanitário bacteriológico	51
4.3.1	Importância da detecção de agentes bacterianos em biotérios	51
4.3.2	Frequência de monitoramento	51
4.3.3	Resistencia a antibióticos	53
4.3.4	Coleta de material	54
4.3.5	Procedimento para colheita do material	55
4.3.6	Metodologias para detecção e identificação	55
4.3.6.1	<i>Isolamento</i>	55
4.3.6.2	<i>Meios de cultura</i>	56
4.3.6.3	<i>Formação de halos de hemólise</i>	57
4.3.6.4	<i>Coloração Gram</i>	58
4.3.6.5	<i>Testes colorimétricos semi-automatizados</i>	58
4.3.6.6	<i>Testes colorimétricos automatizados (VITEK)</i>	59
4.3.6.7	<i>Testes moleculares (PCR)</i>	59
4.3.6.8	<i>Espectometria ionica (MALDI-TOF MS)</i>	60
4.3.6.9	<i>ELISA</i>	60
4.3.7	Agentes bacterianos	61
4.4	Módulo IV: controle sanitário virológico	72
4.4.1	Importância do monitoramento do padrão virológico	72
4.4.2	Amostragem de animais	72
4.4.3	Frequência dos testes de monitorização sanitária das colônias	73
4.4.4	Metodologias para diagnóstico	73
4.4.4.1	<i>Reação de inibição da hemaglutinação (IHA)</i>	73
4.4.4.2	<i>Reação de imunofluorescência indireta (IFI)</i>	74
4.4.4.3	<i>ELISA</i>	74
4.4.4.4	<i>Reações sorológicas multiplexadas</i>	74
4.4.4.5	<i>Reação de produção anticorpos em animais (MAP/RAP/HAP)</i>	75

4.4.4.6	<i>Métodos Moleculares</i>	75
4.4.5	Agentes infecciosos	76
5	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS ¹	86

1 INTRODUÇÃO

A produção dos animais exige monitoramento constante do status sanitário, na busca de informações relevantes sobre a qualidade dos animais e de sua colônia. A criação e manutenção de animais de qualidade garantem a confiabilidade e repetibilidade dos resultados obtidos nos testes de produção de imunobiológicos, pesquisa e nutrição de diversas espécies. Tanto a pesquisa nacional quanto a internacional ainda utiliza modelos animais, sendo os camundongos e ratos, os animais de laboratório mais comuns usados em testes (GILIOLI *et al.*, 2000).

O monitoramento periódico do estado sanitário dos animais de pesquisa é indispensável, pois doenças e outras condições que possam interferir no resultado experimental podem tornar a pesquisa não reprodutível (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Infecções, mesmo as subclínicas, podem influenciar a fisiologia, imunidade e comportamento de camundongos, principalmente em animais imunossuprimidos, tornando estes modelos inadequados para pesquisas (MAHLER *et al.*, 2014).

Potencialmente qualquer agente infeccioso pode provocar alterações nas respostas fisiológicas dos animais, principalmente em pesquisas com longo período de observação ou quando utilizado animais de laboratório idosos (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Como animais de laboratório podem ser portadores assintomáticos de patógenos, a FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) recomenda o monitoramento de parasitas, bactérias, fungos e vírus.

De acordo com Andrade *et al.* (2002), os animais podem ser classificados quanto ao seu status sanitário pela relação dos animais com o seu particular e específico ambiente. Neste ambiente, limitado por barreiras sanitárias, podem estar presentes organismos que tem potencial de se associar aos animais, onde quanto mais eficientes forem as barreiras sanitárias, menores as chances dessa contaminação. Além disso, de acordo com essa classificação será definida a frequência que os exames deverão ser realizados. É possível classificá-los nos seguintes grupos:

- Animais Gnotobióticos: animais que possuem microbiota associada definida, devendo ser criados em ambientes dotados de barreiras sanitárias absolutas.

- Germfree (GF) ou Axênicos: são animais livres de vida associada, ou seja, totalmente livres de microbiota, parasitas internos e externos, bactérias, fungos, protozoários, algas, rickettsia e vírus.

- Flora Definida (FD): animais que inicialmente eram GF e que foram intencionalmente contaminados com microrganismos ou parasitos específicos. São continuamente monitorados para confirmar a presença dos organismos inserido e a ausência de outros.

- Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos (Specific Pathogen Free – SPF): são animais livres de microrganismos e parasitos específicos, porém não necessariamente livres de outros não-específicos.

- Animais Convencionais: animais que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.

Para que aconteça essa classificação, os biotérios de criação de animais devem criar um programa de controle sanitário, utilizando diferentes métodos de diagnóstico para detecção de agentes patogênicos como parasitos, vírus, bactérias e fungos.

Quando se trata de animais convencionais, a realização deste controle sanitário se torna difícil e limitante devido à falta de barreiras sanitárias. Deve-se estabelecer uma rotina de monitoramento, com amostragens regulares, baseadas em fatores como: importância do agente, tipo de instalações onde os animais são mantidos, tipos de equipamentos, equipe e introdução de animais na colônia.

2 OBJETIVOS

De acordo com o abordado acima, tem-se como objetivo a busca de informações sobre o controle sanitário de animais utilizados em pesquisas, para serem utilizadas em biotérios de camundongos, ratos, cobaias e coelhos.

3 METODOLOGIA

Foi utilizada pesquisa bibliográfica como ferramenta para coletar informações sobre controle sanitário em animais destinados a pesquisas.

Os animais abordados nesta revisão são: Camundongos (*Mus musculus*), Ratos (*Rattus norvegicus*), Cobaias (*Cavia porcellus*) e Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

4 RESULTADOS

Após pesquisa bibliográfica foram criados módulos com informações, orientações e metodologias, para serem usados em biotérios de criação de animais para pesquisa.

4.1 Módulo I: controle sanitário em biotérios

Em função das características biológicas inatas de cada espécie, além do seu habitat, tipo de alojamento e técnicas de manejo adotadas, os modelos animais podem ser afetados por diferentes agentes infecciosos e parasitários. Alguns agentes infecciosos como fungos, bactérias, vírus e parasitos podem ser espécie-específicos ou causarem doenças comuns a mais de uma espécie animal, incluindo-se aqui os agentes causadores de doenças humanas transmitidos por animais (zoonoses).

4.1.1 Coleta de amostras

A periodicidade das coletas é determinada de acordo com a qualidade sanitária da colônia. O procedimento de coleta deve ser aleatório, evitando que o grupo formado seja de uma mesma gaiola e mesma prateleira. Sugere-se, quando possível, que se utilizem casais (machos e fêmeas), contemplando todos os lados da sala. O número de animais depende de alguns fatores como tamanho da colônia, tipo de gaiola onde os animais são mantidos (estantes abertas ou racks ventiladas), além de número de animais infectados dentro da colônia (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Em colônias onde não se permite a retirada de animais para realização dos testes, podem-se utilizar animais sentinelas. As sentinelas, que possuem seu nível sanitário conhecido, deverão permanecer nas gaiolas com camas sujas de onde foram retirados animais submetidos ao controle (REHBINDER *et al.*, 1996).

4.1.2 Frequência de monitoramento

Vários fatores são levados em consideração para se determinar a frequência de monitoramento das colônias. Cada patógeno possui um risco de contaminação diferente, sendo que os de alto risco de disseminação devem ser monitorados com

intervalos menores e vice-versa. Além disso, o objetivo da colônia, a importância do agente patogênico, as formas de disseminação e as condições econômicas de cada biotério devem ser considerados (NICKLAS *et al.*, 2002).

Os próximos módulos deste manual possuem sugestões de frequências mínimas de monitoramento dos principais patógenos, conforme orientação da FELASA. Estes agentes infecciosos podem ser classificados pela sua probabilidade de detecção ou prevalência. Abaixo seguem algumas classificações:

- Agentes infecciosos primários: são agentes com significativo potencial de causar doenças, com conhecida interferência na pesquisa, alta probabilidade de detecção e prevalência. Estes agentes podem ser facilmente controlados através de barreiras sanitárias. Como exemplo tem-se: vírus da hepatite murina (MHV), vírus Sendai e *Salmonella sp.*

- Agentes infecciosos oportunistas: são comuns no meio ambiente dos animais de laboratório e podem ser carreados pelo homem. Possuem baixa probabilidade de causar doenças, tendo como exemplo: *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella pneumotropica* e *Staphylococcus aureus*.

- Agentes infecciosos mistos: são aqueles cujo papel como oportunista ou patógeno é limitado ou inexistente.

4.1.3 Envio de animais para avaliação sanitária

Para que haja sucesso em um controle sanitário, é importante que os animais sejam enviados ao laboratório de maneira adequada para que não haja quebra de barreira sanitária. Além disso, o estresse do transporte também pode proporcionar alterações que vão prejudicar ou impossibilitar a realização dos exames.

Para isso, os animais devem ser enviados em gaiolas compatíveis com seu nível sanitário e respeitando as normas de transporte de animais para experimentação. As gaiolas utilizadas devem conter enriquecimento ambiental, fonte de água e ração. As gaiolas devem ser individuais, evitando que haja qualquer tipo de contaminação cruzada entre os animais, além de proporcionar bem-estar durante o transporte (REHBINDER *et al.*, 1996). Além disso, as próprias gaiolas onde os animais são mantidos podem ser utilizadas para a busca de patógenos, pois elas contêm resíduos biológicos dos animais, como as fezes.

Para o transporte dos animais, além de veículo adequado, também é necessário gerar o documento GTA (Guia de Transporte Animal). Este é um documento oficial e de emissão obrigatória para o trânsito intradistrital e interestadual de animais para qualquer finalidade. A solicitação para emissão do documento somente poderá ser realizada pelo médico veterinário responsável (SEAGRI 2021).

4.1.4 Controle de qualidade no laboratório

Todas as atividades, procedimentos e instruções de uso de equipamentos devem possuir seu respectivo Procedimento Operacional Padrão (POP). Os protocolos devem estar claramente delineados e colocados em local acessível para a consulta regular pelos colaboradores.

Além disso, todo laboratório deve possuir um programa de qualidade efetivo, onde parâmetros de qualidade devem ser definidos e monitorados, de acordo com a necessidade de cada procedimento ou equipamento (LEVY *et al.*, 2004).

Meios de cultura, por exemplo, devem seguir sérios padrões de qualidade. Para meios de cultura prontos, deve-se seguir protocolos de controle de qualidade do fabricante, mantendo o material nas embalagens originais e na temperatura orientada pelo fabricante (BISWAS *et al.*, 2013).

Em relação aos meios de cultura preparados no laboratório, deve-se registrar a quantidade produzida, número do lote interno, método de esterilização, data de preparo, prazo de validade e nome do preparador. Se possível o material deve passar por testes de validação de qualidade.

Os reagentes e kits comerciais devem estar rotulados contendo informações de concentração, data de fabricação, prazo de validade, número do lote, volume, recomendação de armazenamento e de descarte.

4.1.5 Descontaminação e descarte de resíduos

Todos os resíduos do laboratório e do biotério deverão ser descontaminados com metodologia validada como, por exemplo, esterilização por calor úmido (autoclave). Os materiais para a descontaminação na autoclave devem ser colocados em sacos plásticos apropriados e autoclaváveis.

É recomendado um sistema de separação e identificação do material infeccioso, não infeccioso, resíduo reciclável e perfuro cortante infeccioso.

4.1.6 Barreiras sanitárias

Para que haja padronização do animal de experimentação, são necessários procedimentos que impeçam a entrada de patógenos nas áreas de criação. Em instalações convencionais, SPF (Specific Pathogen Free) ou gnotobioticos, devem-se implantar barreiras sanitárias como medidas para evitar a invasão de agentes patogênicos (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Entende-se como barreira sanitária, equipamentos, procedimentos, EPI's ou instalações que impeçam a entrada dos agentes infecciosos nas áreas de criação dos animais. Alguns exemplos de barreiras sanitárias são:

- Limpeza: pode ser manual, utilizando detergentes, água e artefatos ou automatizada, utilizando lavadoras ultrassônicas e lavadoras de túnel para gaiolas.
- Desinfecção: utilização de produtos químicos, temperatura e umidade.
- Esterilização: podem-se utilizar autoclaves (temperatura, pressão e vapor), filtração (membranas), radiação (ultravioleta), calor seco ou agentes químicos.

4.2 Módulo II: controle sanitário parasitológico

4.2.1 Importância do estudo parasitológico na saúde do animal

Os parasitas são um grupo de invertebrados caracterizados por se associarem com outros organismos classificados como hospedeiros, dos quais retiram os meios para a sua sobrevivência, podendo provocar doenças clínicas, alterações comportamentais e fisiológicas (TANIDEH *et al.*, 2010).

A principal função do sistema digestório é prover ao organismo contínuo suprimento de água, eletrólitos e nutrientes, através da absorção e digestão, devendo o alimento ser conduzido ao longo do tubo digestivo a uma velocidade apropriada. Parasitas intestinais tem potencial para causar efeitos no trânsito gastrointestinal em animais (MATHISON *et al.*, 2022).

A maioria dos biotérios não possui um sistema de barreiras sanitárias eficiente, não conseguindo manter animais sob condições sanitárias controladas, podendo ser encontradas infestações por ectoparasitas e endoparasitos (SILVA *et al.*, 2006).

4.2.2 Frequência de monitoramento

De acordo com recomendações da FELASA (MAHLER *et al.*, 2014), camundongos, ratos, cobaias e coelhos devem ser monitorados para endoparasitas e ectoparasitas a cada 3 meses ou 6 meses, dependendo da qualidade sanitária de cada colônia.

- Colônia Axênica: coleta a cada 3 meses, em animais com idade entre 1 e 2 meses.
- Colônia SPF: coleta a cada 3 meses, em animais com idade entre 1 e 2 meses.
- Colônia Convencional: coleta a cada 3 meses, em animais com idade entre 1 e 2 meses.

4.2.3 Controle sanitário endoparasitário

4.2.3.1 Metodologias para diagnóstico

Existem diversas técnicas de pesquisas de ovos e cistos, porém nenhuma é totalmente eficiente, dificultando o diagnóstico, fator significativo na predominância da continuidade da infestação (TANIDEH *et al.*, 2010).

De acordo com SANT'ANNA *et al.* (2013), para o diagnóstico de endoparasitas, são indicadas técnicas de sedimentação e de flutuação, que aumentam a concentração de ovos, larvas ou cistos. Algumas metodologias parasitológicas serão descritas a seguir.

a. Técnica de Sheather

A metodologia descrita por Sheather (1923) é uma técnica de centrífugo-flutuação, inicialmente criada para detectar a presença de ovos de helmintos, porém foi observado que era também aplicável no diagnóstico de outras parasitoses. Nesta técnica para a flutuação é utilizado uma solução saturada de sacarose.

- Procedimento técnico:

1. Homogeneizar as fezes em um Becker utilizando água destilada e um bastão de vidro, até que fique em consistência pastosa e fina;
2. Filtrar utilizando uma gaze de 4 dobras sobre um Becker;
3. Transferir para um tubo cônico de 10 mL o filtrado misturado com um volume igual da solução de açúcar saturada (500g de açúcar, 320 mL de água destilada e 6g de fenol);
4. Centrifugar por 2 minutos de 2000 a 2500 rpm;
5. Gotejar solução de sacarose até formar menisco;
6. Colocar uma lamínula em contato com o menisco do sobrenadante;
7. Retirar a lamínula e colocar sobre uma lâmina de vidro. Na lâmina de vidro já contém uma pequena gota de ovoalbumina, feita com 50% de clara de ovo e 50% de glicerina;
8. Realizar a leitura em microscópio óptico no aumento de 100 vezes e utilizar aumento de 400 vezes para confirmação, se necessário.

b. Técnica de Willis

A técnica descrita por Willis (1921) é um método de flutuação, que utiliza solução saturada de cloreto de sódio. Esta metodologia é aplicada para a identificação de cistos de protozoários e alguns ovos leves de helmintos, o qual devido a sua densidade irá flutuar.

- Procedimento técnico:

1. Dissolver as fezes em solução de cloreto de sódio saturada utilizando água um bastão de vidro;
2. Filtrar utilizando uma gaze de 4 dobras sobre um Becker;
3. Transferir para um tubo cônico de 10 mL o filtrado e completar o volume com a mesma solução saturada, até formar um menisco convexo;
4. Colocar uma lâmina sobre a boca do recipiente com o cuidado de não formar bolhas e aguardar por 10 minutos;

5. Retirar a lâmina cuidadosamente e cobrir com lamínula;
6. Observar em microscópio nos aumentos de 100x e 400x.

c. Técnica de Hoffmann

A técnica de sedimentação espontânea pelo método de Hoffman, Pons e Janer (1934) foi desenvolvida para o diagnóstico das enteroparasitoses. É uma técnica considerada padrão ouro por ser a técnica mais utilizada nos laboratórios de parasitologia, pelo fato de apresentar fácil manuseio e baixo custo.

Nesta técnica pode-se detectar cisto de protozoários, larva e ovos de helmintos em amostras formada, pastosa ou semi-pastosa. Nas análises coproparasitológicas pode haver melhora na recuperação e na identificação de parasitos com a utilização de métodos de concentração, podendo se encontrar parasitas em diferentes estágios de desenvolvimento.

Sempre deve-se respeitar o tempo de sedimentação (1-2h), para ter a certeza de que todas as estruturas parasitárias se sedimentaram.

- Procedimento técnico:

1. Dissolver 2 a 5 gramas de fezes em 10 mL de água, misturando vigorosamente com a ajuda de um bastão de vidro;
2. Adicionar cerca de 20 mL de água e filtrar a suspensão utilizando uma gaze de 4 dobras sobre um Becker;
3. Transferir para um tubo cônico de sedimentação;
4. Adicionar água corrente até completar o volume do copo;
5. Deixar sedimentar por pelo menos 1 a 2 horas;
6. Retirar o material para observação introduzindo uma pipeta Pasteur vedada no fundo do tubo cônico e deixar o sedimento ser parcialmente aspirado pela pipeta;
7. Transferir o material para uma lâmina de vidro e realizar a leitura em microscópio óptico no aumento de 100 vezes, utilizando ou não adição de corante ou solução de Lugol.

d. Técnica de Faust

A técnica de flutuação Faust *et al.* (1938), utiliza a densidade das formas evolutivas de parasitos. A maioria dos ovos de helmintos e cistos de protozoários tem uma densidade específica entre 1,05 e 1,20.

Nesta técnica a solução diluente utilizada é o sulfato de zinco com densidade de 1.180 kg/m³.

- Procedimento técnico:

1. Homogeneizar uma porção da amostra fecal com água destilada em um béquer até total dissolução;

2. Filtrar a suspensão em tamiz forrado com um pedaço de gaze 8 fios com quatro dobras sobre um béquer;

3. Descartar a gaze com detritos fecais em lixo biológico e retirar o tamiz;

4. Homogeneizar o filtrado;

5. Transferir 15 mL do filtrado para um tubo de fundo cônico;

6. Centrifugar o tubo por 2500 rpm durante 1 minuto;

7. Descartar o sobrenadante;

8. Suspender o sedimento em 15 mL de água destilada;

9. Realizar os procedimentos 6, 7 e 8 até o sobrenadante ficar límpido;

10. Adicionar 5 mL do sulfato de zinco;

11. Centrifugar a amostra por 2500 rpm durante 1 minuto;

12. Coletar a película de flutuação com uma alça de platina;

13. Depositar o material sobre uma lâmina para microscopia;

14. Cobrir com lamínula 22 x 22 mm;

15. Realizar a leitura em microscópio óptico no aumento de 100 vezes e utilizar aumento de 400 vezes para confirmação, quando necessário;

16. Após a leitura, o material deve ser descartado em solução de hipoclorito de sódio 1%.

e. Técnica de Baermann modificada por Moraes

A técnica de Baermann (1917), modificada por Moraes (1948), se destaca devido ao seu amplo espectro na observação e identificação de espécies parasitas a baixo custo, pois não necessita de centrifugação, dispensa reagentes e economiza nas vidrarias.

É uma técnica para pesquisa de larvas de nematóides feita através da atração larvar por água aquecida, seguida por sedimentação. Na técnica, utiliza-se tamiz coberto com gaze, funil de vidro, tubo de borracha ou silicone, pinça de Morh e vidro relógio para a coleta do material sedimentado para procura das larvas.

Este método explora a tendência das larvas de migrar de um meio sólido para um meio líquido (hidrotropismo), quando estimuladas por uma temperatura ligeiramente elevada (termotropismo) e em seguida, depositar-se em um substrato.

- Procedimento técnico:

1. Separar uma parte de amostra fecal fresca;
2. Colocar um tamiz no interior do funil;
3. Colocar uma gaze 8 fios com 4 dobras sobre o tamiz;
4. Adicionar água aquecida 40-42° C no funil;
5. Transferir a amostra fecal para a gaze, de forma que as fezes fiquem em contato com a água;
6. Esperar 1 hora;
7. Abrir a pinça de Morh;
8. Transferir parte do material sedimentado para um vidro de relógio côncavo;
9. Fazer leitura em microscópio para a procura de larvas;
10. Após a leitura, o material deve ser descartado em solução de hipoclorito de sódio 1%.

f. Método direto com raspado da luz intestinal

Utilizado para pesquisa de protozoários, ovos, cistos, larvas e adultos de helmintos (GILIOLI *et al.*, 2000)

- Procedimento técnico:

1. Fixar as patas do animal em decúbito dorsal com alfinetes ou agulhas no suporte ou prancha;
2. Fazer a incisão abdominal no sentido longitudinal;
3. Expor as vísceras do animal rebatendo as peles da lateral do abdômen;
4. Cortar o intestino na região do ânus e puxar com pinça o segmento do intestino, desprendendo as veias mesentéricas;
5. Colocar o segmento do intestino grosso numa placa de petri previamente abastecida com solução fisiológica;
6. Da mesma forma, recolher o ceco, o intestino delgado e o duodeno, deixando as 4 placas isoladas e identificadas;
7. Fazer a abertura da luz do intestino com tesoura cirúrgica de ponta fina, expondo o conteúdo intestinal. Nesta etapa é importante utilizar instrumentos autoclavados ou esterilizados em álcool etílico 70 INPM;
8. Raspar a luz intestinal com uma espátula ou lâmina de vidro, de modo a varrer a superfície do epitélio;
9. Colocar uma gota dos conteúdos raspados nas lâminas de vidros previamente separadas;
10. Cobrir com uma lamínula e observar rapidamente em microscópio nos aumentos de 100 vezes e 400 vezes, possibilitando a visualização dos parasitos ainda vivos.

g. Técnica de Zielh-Neelsen modificada

É uma coloração descrita por Henriksen *et al.* (1981), utilizada para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium sp.*

- Procedimento técnico:

1. Realizar esfregaço em lâmina;
2. Secar a temperatura ambiente;
3. Fixar em metanol por 5 minutos;

4. Secar à temperatura ambiente;
5. Corar com Carbofuccina por 5 minutos,
6. Lavar em álcool etílico 50%;
7. Lavar em água corrente;
8. Descorar em álcool;
9. Lavar em água corrente;
10. Contra corar com verde de malaquita por 3 minutos;
11. Lavar em água corrente;
12. Secar à temperatura ambiente;
13. Montar as lâminas com bálsamo do Canadá.

h. Swab anal (fita gomada)

Utilizado para pesquisa de ovos de oxiurídeos através de fita gomada que é colocada na região perianal dos animais e, em seguida, pressionada em uma lâmina de microscópio.

i. Técnicas genéticas

De acordo com PAREL *et al.* (2008) é possível diferenciar os oxiúros de roedores comuns de laboratório, como *Syphacia obvelata* e *Syphacia muris*, utilizando técnicas genéticas como PCR.

A autor citado acima, inicialmente amplifica e realiza o sequenciamento da região de interesse do DNA ribossômico seguido pela concepção de primers específicos da espécie para uso futuro na identificação dos parasitas.

O uso de endonucleases de restrição permite delimitação entre espécies, seguido pela identificação específica sem amplicons, onde são amplificados a partir de amostras de DNA, sendo posteriormente realizado o sequenciamento para confirmar a identidade das sequências amplificadas.

Dessa maneira, o uso de primers específicos junto com PCR-RFLP pode servir como ferramenta útil para a identificação de oxiúros em camundongos e ratos.

4.2.3.2 Protozoários encontrados em colônias de animais de laboratórios

Os protozoários são células eucarióticas de vida independente e apresentam uma variedade de organelas, com características de organização e funções específicas (FIRAS *et al.*, 2020).

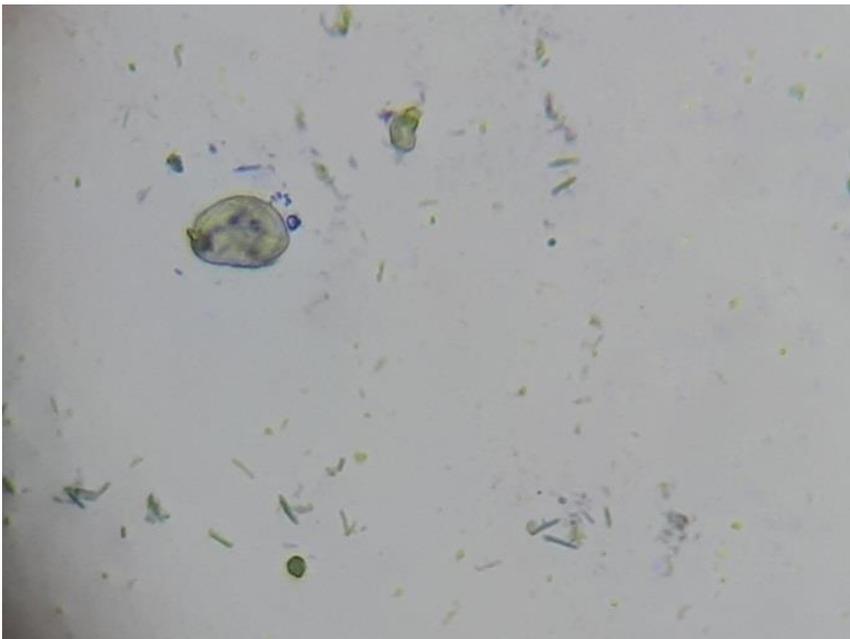
Podem ser encontradas com grande incidência no ceco e cólon de camundongos, ratos, hamsters, cobaias e coelhos em colônias convencionais (LAPCHIK *et al.*, 2009).

a. Protozoários encontrados em camundongos, ratos e hamsters

- *Entamoeba muris*

Em camundongos, é comum encontrar *Entamoeba muris* (Figura 1), espécie comensal não patogênica medindo entre 8 e 30µm de comprimento e o cisto de 9 a 20 µm de diâmetro, contendo oito núcleos quando estão maduros. Sua transmissão corre pela ingestão de cistos nas fezes (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Figura 1 - Visão microscópica de cistos de *Entamoeba muris* em amostra de fezes corada com corante de iodo, amplificada 40 vezes.



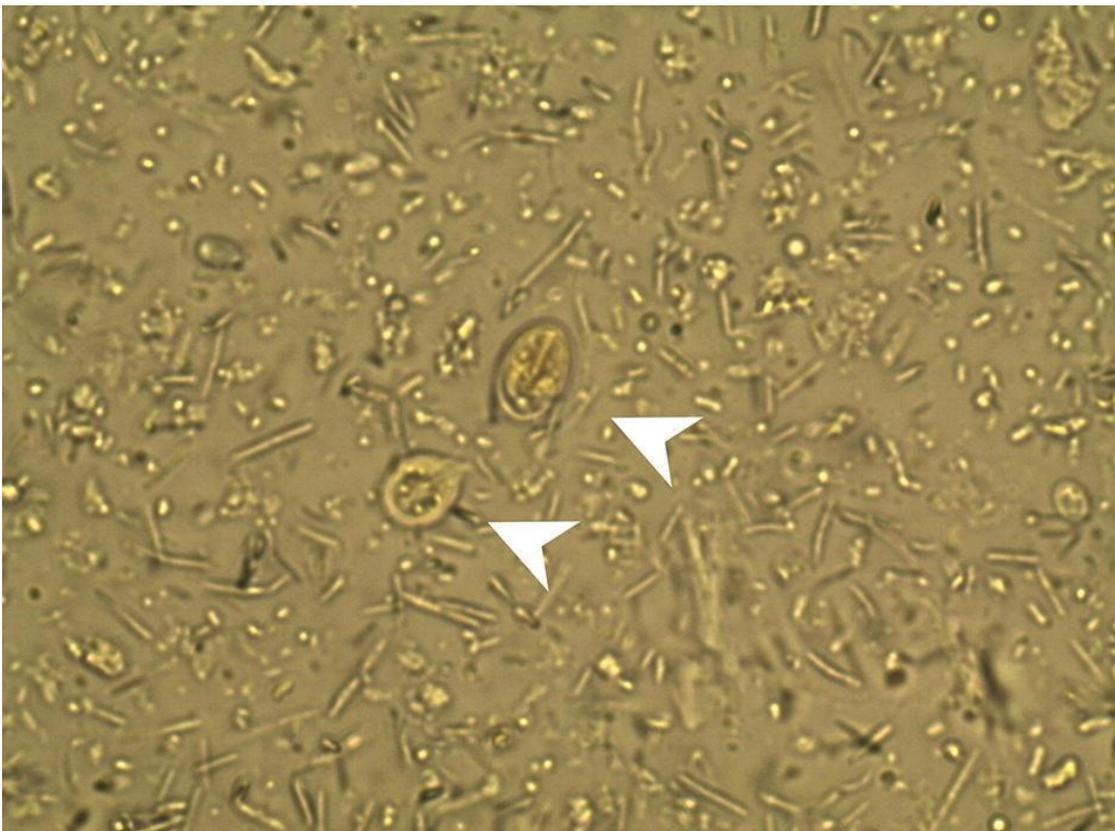
Fonte: adaptado de FIRAS, 2020.

- *Giardia muris*

É um flagelado patogénico que ocorre no intestino delgado de ratos e camundongos, podendo também ser encontrado em hamsters (Figura 2). É comum em animais mantidos em laboratórios de colónias convencionais (LAPCHIK *et al.*, 2009). O trofozoita mede 7 a 13 µm de comprimento por 5 a 10 µm de largura, causando enterite crónica especialmente em camundongos jovens (SURSAL *et al.*, 2020).

Existe uma similaridade entre a *Giardia* presente em humanos e em outras espécies de mamíferos, havendo assim possibilidade de transmissão entre diferentes espécies, sendo considerada zoonose.

Figura 2 - Visão microscópica de trofozoítos de *Giardia muris* corada com solução de iodo de Lugol, ampliada 100 vezes.



Fonte: adaptado de SURSAL, 2020.

- *Spironucleus muris* (Hexamita muris)

Ocorre no intestino delgado e seco de camundongos, ratos e hamsters. Com as medidas de 7 a 9 um de comprimento e 2 a 3 um de largura, é piriforme e bilateralmente simétrico, com dois núcleos anteriores, seis flagelos anteriores e dois flagelos posteriores (LAPCHIK *et al.*, 2009) (Figura 3).

Enterites em animais de laboratório são associadas a este flagelado. Animais jovens desenvolvem uma forma aguda da doença, com sintomas como diarreia, perda de peso rápida e morte (PAULL *et al.*, 2001).

Figura 3 - Micrografia eletrônicas de varredura de *Spironucleus muris* mostrando oito flagelos

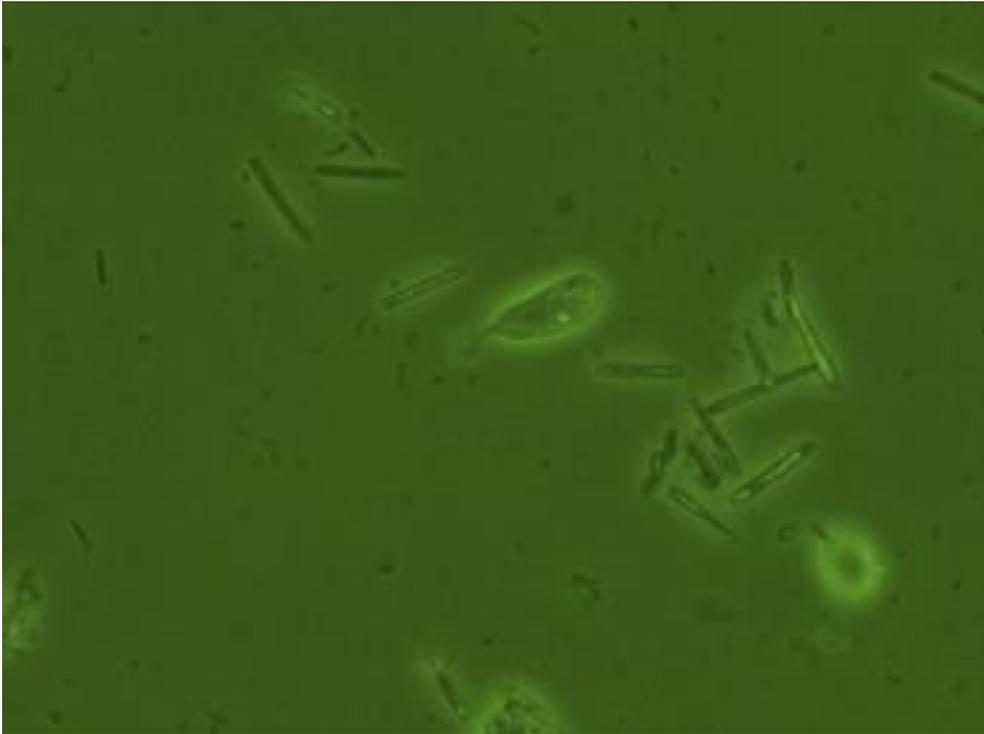


Fonte: adaptado de PAULL & MATTHEWS, 2001.

- *Chilomastix Bettencourt*

São trofozoitas piriformes, flagelados e não patogênicos, encontrados no ceco de camundongos, ratos e hamsters mantidos em colônias convencionais (LAPCHIK *et al.*, 2009) (Figura 4).

Figura 4 - Fotomicrografia de contraste de *Chilomastix bettencourti* (400 vezes)

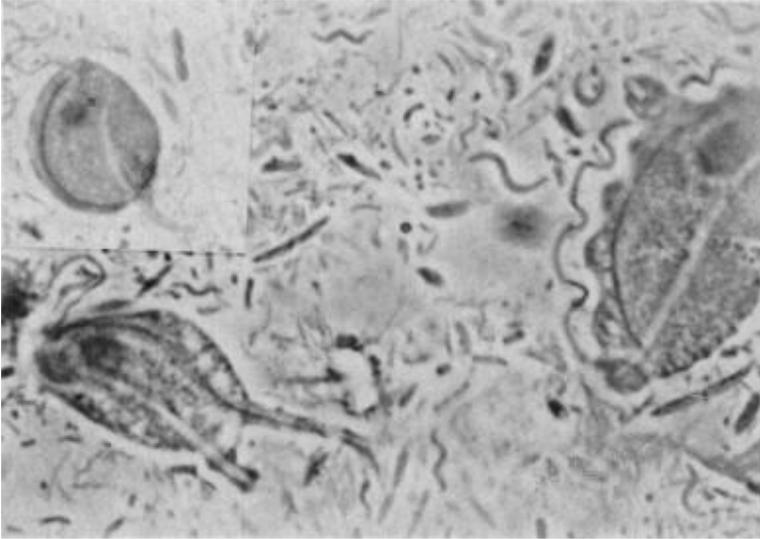


Fonte: adaptado de BLANE, 2022.

- *Tritrichomonas muris*

Flagelado não patogénico, comum no ceco, intestino grosso e delgado de camundongos, ratos e hamsters (Figura 5). Mede de 16 a 26 μm a 10 a 14 μm e possui um núcleo vesicular anterior, formato piriforme, três longos flagelos na região apical e uma membrana ondulante que percorre toda a extensão longitudinal do corpo, exteriorizando como flagelo livre. Sua reprodução é por fusão binária e sua transmissão é por ingestão de trofozoitas, podendo haver infecção cruzada entre camundongos, ratos e hamsters (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Figura 5 - *Tricomonas* spp. extraído de raspado intestinal com coloração de Giemsa-Wright, ampliado 800-1000 vezes

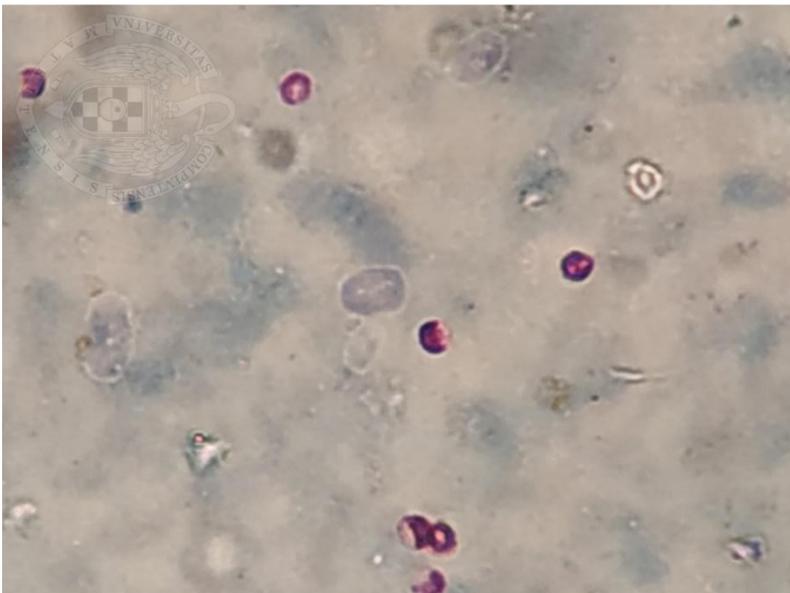


Fonte: adaptado de BRABB *et al.*, 2012.

- *Cryptosporidium parvum*

Não é considerado patogênico, podendo ser encontrado raramente no intestino delgado de camundongos utilizados em laboratório. O oocisto é ovoide ou esférico, medindo 4 a 5 μm por 3 μm (LAPCHIK *et al.*, 2009) (Figura 6).

Figura 6 - Imagem microscópica de *Cryptosporidium parvum*



Fonte: adaptado de CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA VETERINÁRIA (VISAVET), 2022.

- *Eimeria* ssp

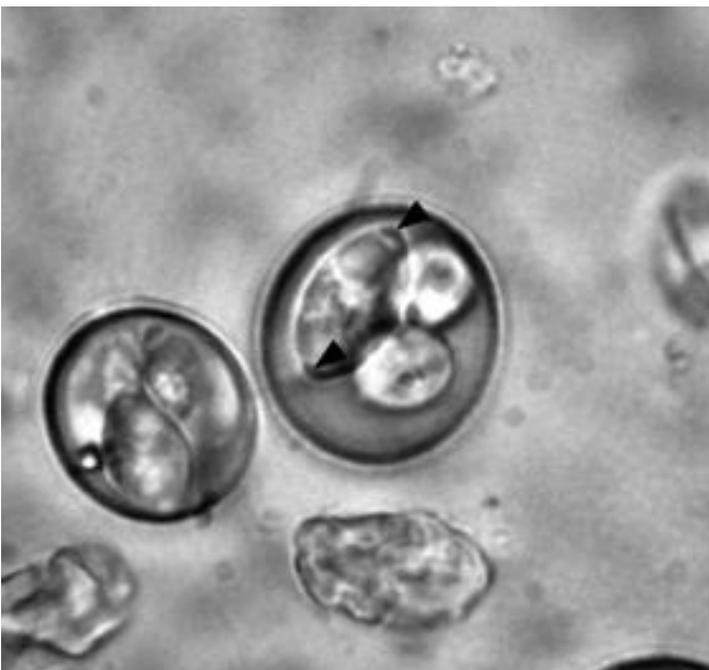
São coccídeos microscópios considerados patogênicos, encontrados no intestino de camundongos, ratos, cobaias e coelhos (FIGUEIREDO *et al.*, 1984) (Figura 7 e Figura 8).

Figura 7 - Oocistos de *Eimeria nieschulzi*



Fonte: adaptado de ANIMAL PARASITOLOGY, 2022.

Figura 8 - Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria caviae*



Fonte: FLAUSINO *et al.*, 2014.

b. Protozoários encontrados em cobaias

- *Entamoeba caviae*

Pode ser encontrado no ceco de cobaias mantidas em laboratório, não sendo considerado um microrganismo patogênico. Seu trofozoita mede de 10 a 20µm de diâmetro e o cisto 11 a 17µm. Quando maduro são observados oito núcleos (LAPCHIK *et al.*, 2009).

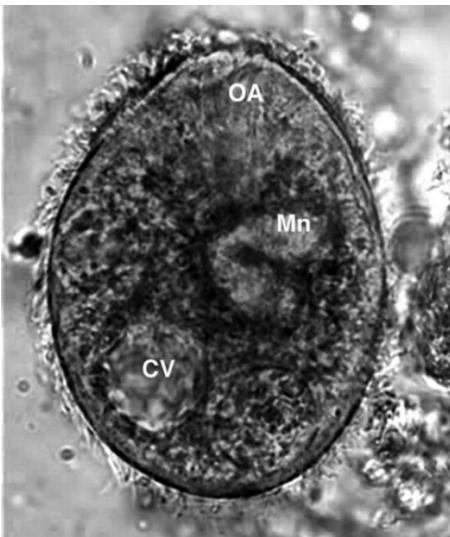
- *Giardia caviae*

Organismo não patogênico, ocorrendo no intestino delgado de cobaias. Sua forma trofozoita mede de 8 a 15 µm por 6 a 10 µm (FOREYT 2005).

- *Balantidium caviae*

É um protozoário ciliado, considerado não patogênico, comum no ceco e intestino grosso de cobaias mantidas em colônias convencionais. Mede de 55 a 115 um por 45 a 73 µm de largura. Sua reprodução é por fusão binária ou por conjugação e os cistos medem de 40 a 50 µm (LAPCHIK *et al.*, 2009) (Figura 9).

Figura 9 - Estágio trófico de *Balantidium spp*, mostrando a superfície coberta por cílios, o vacúolo contrátil (CV), o macronúcleo (Mn) e o aparelho oral (AO)



Fonte: PARASITE IMAGE LIBRARY, 2022.

- *Cryptosporidium wrairi*

É encontrado no intestino delgado de cobaias, podendo causar diarreia e morte (LAPCHIK *et al.*, 2009).

c. Protozoários encontrados em coelhos

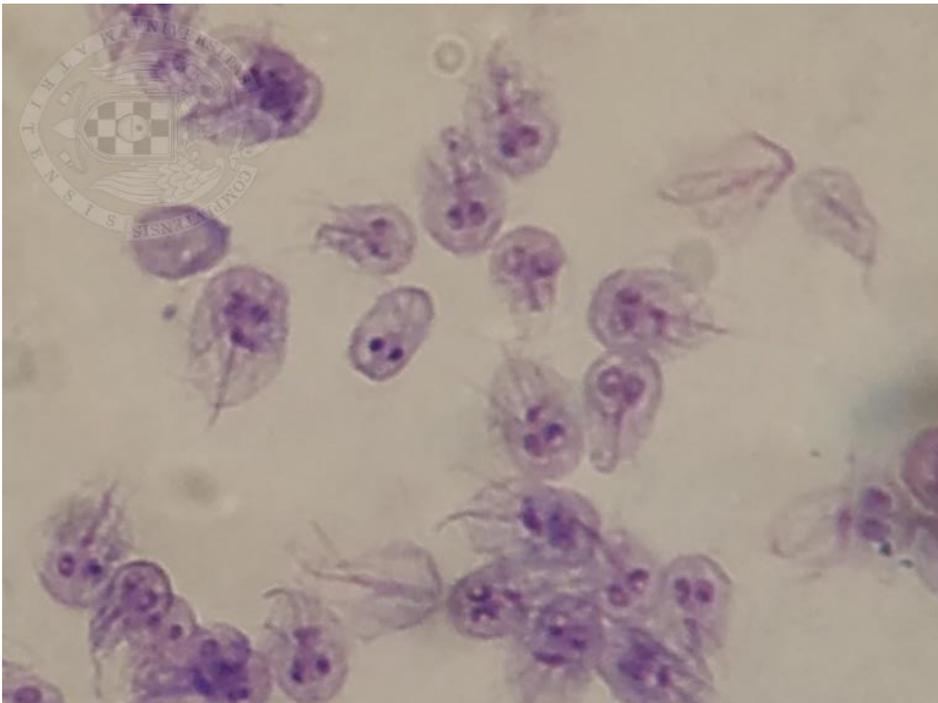
- *Entamoeba cuniculi*

Microrganismo considerado não patogênico, sendo encontrado no ceco e cólon de coelhos. O trofozoita mede de 12 a 30µm de comprimento e o cisto 7 a 21µm de diâmetro. Quando maduro são observados oito núcleos (FOREYT 2005).

- *Giardia duodenalis*

Comum no intestino delgado de coelhos, não sendo considerada patogênica. Seu trofozoita mede de 13 a 19 um por 8 a 11 um (LAPCHIK *et al.*, 2009) (Figura 10).

Figura 10 - Imagem microscópica de *Giardia duodenalis*



Fonte: adaptado de CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA VETERINÁRIA (VISAVET), 2022.

- *Chilomastix cuniculi*

É comum no ceco de coelhos, com seu trofozoita medindo 10 a 15 µm de comprimento, podendo oscilar entre 3 e 20 µm (LAPCHIK *et al.*, 2009).

4.2.3.3 *Nematódeos encontrados em colônias de animais de laboratórios*

São parasitas comuns no ceco e intestino grosso de animais de laboratório. Seus ovos são alongados e encurvados, facilmente identificados em exames de flutuação fecal (SANT'ANNA *et al.*, 2013).

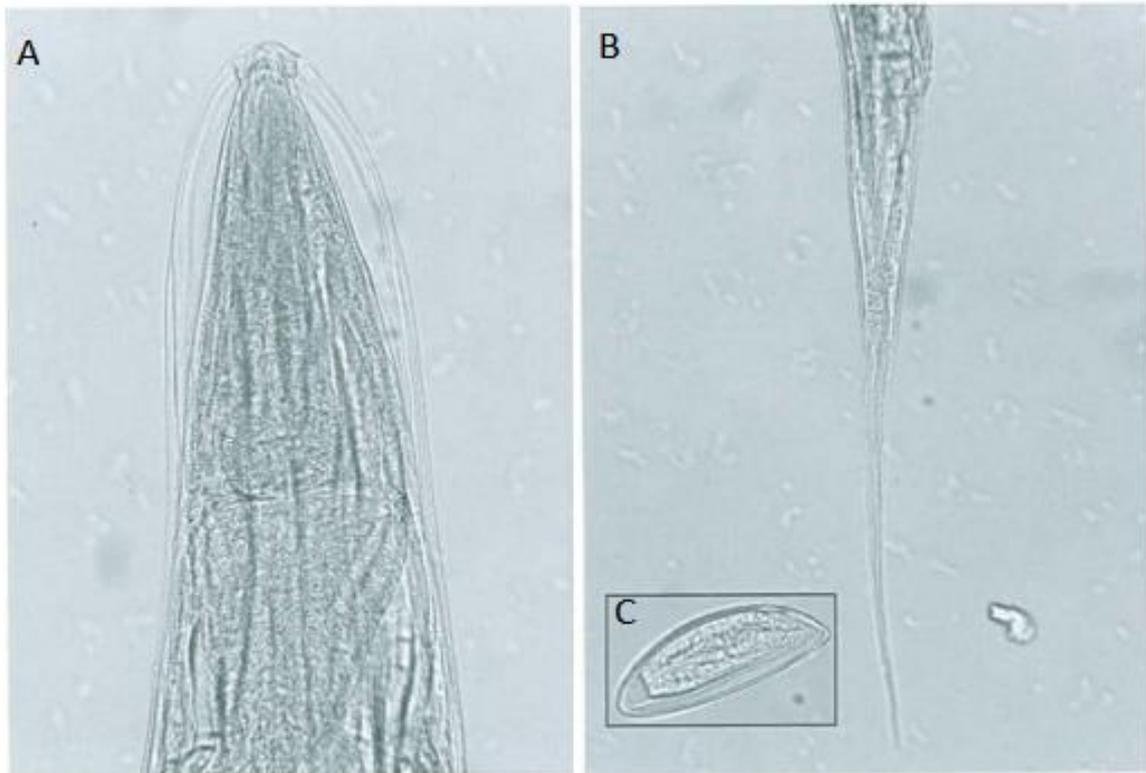
Uma vez ingeridos com as fezes, os ovos chocam no intestino delgado e ceco dentro das primeiras 2 horas, terminando então seu desenvolvimento até a fase adulta no ceco. As fêmeas grávidas migram para o ânus e colocam seus ovos na região perianal antes de morrer.

a. Nematódeos encontrados em camundongos, ratos e hamsters

- *Syphacia muris*

Está presente na maioria das colônias convencionais de ratos, podendo infectar camundongos mantidos em salas compartilhadas. O macho mede 1,2 a 1,3 mm de comprimento por 100 µm de largura e seu ciclo de vida completo é de 7 a 8 dias. Cada fêmea coloca em média 450 a 550 ovos. A cauda é fina e cerca de duas vezes mais longa que a largura do corpo (FOREYT 2005) (Figura 11).

Figura 11 - Cabeça (A), cauda (B) e ovo (C) de oxiúros fêmea adulta de *Syphacia muris*. Cabeça e cauda com aproximação de 250 vezes e ovo em 400 vezes



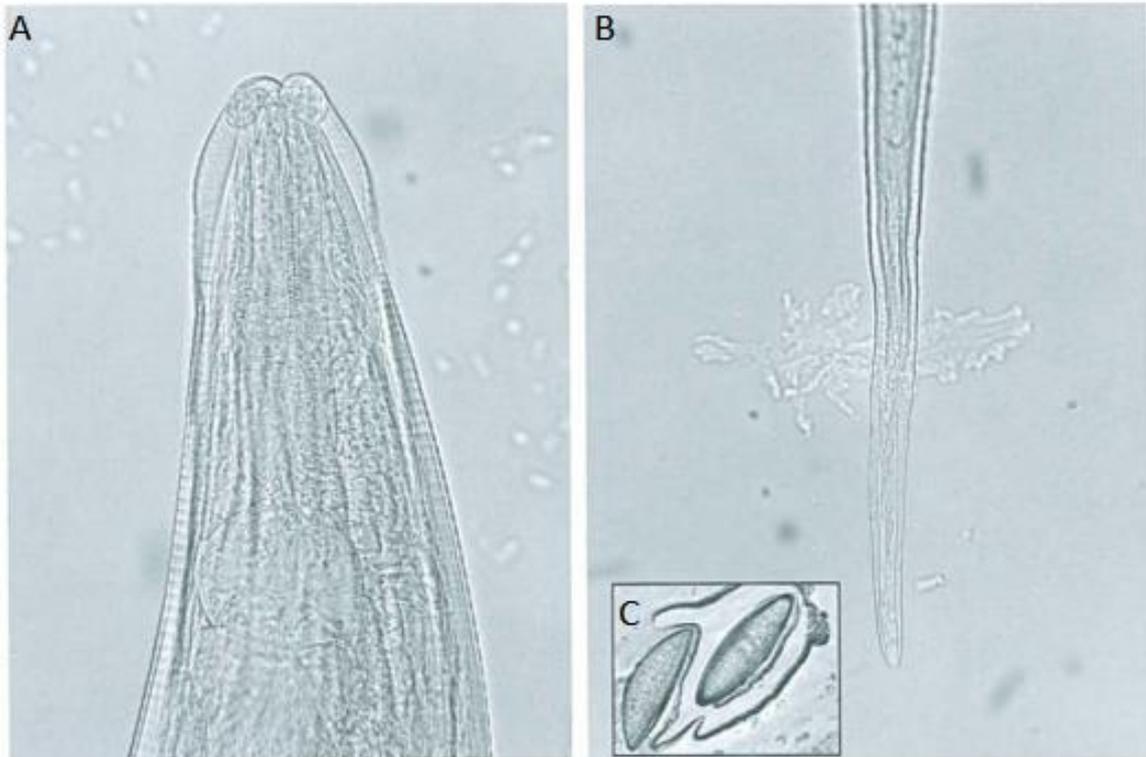
Fonte: OTTO *et al.*, 2006.

- *Syphacia obvelata*

Ocorrem no ceco e colón de camundongo, rato e hamsters mantidos em colônias convencionais. O macho mede de 1,1 a 1,5 mm por 120 a 140 μm e as fêmeas 3,4 a 5,8 mm por 240 a 400 μm (FOREYT 2005) (Figura 12).

Os ovos se destacam pela leveza que proporciona sua dispersão pelo ar, medindo 118 a 153 μm por 33 μm a 55 μm . Seu ciclo de vida completo é de 12 dias, cada fêmea colocando aproximadamente 350 ovos.

Figura 12 - Cabeça (A), cauda (B) e ovo (C) de oxiúros fêmea adulta de *Syphacia obvelata*. Cabeça e cauda com aproximação de 250 vezes e ovo em 400 vezes

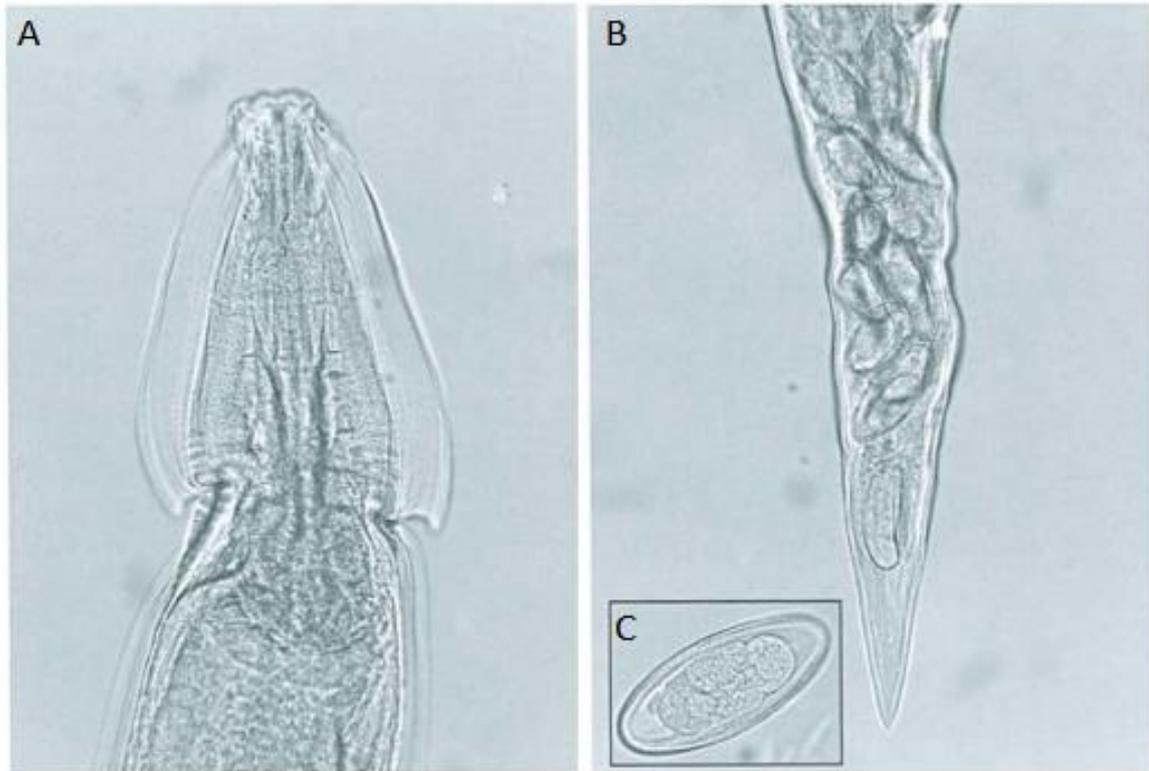


Fonte: OTTO *et al.*, 2006.

- *Aspicularis tetráptera*

Oxiurídeo encontrado no ceco e cólon de camundongos, ratos e hamsters. A fêmea mede de 3 a 4 mm de comprimento e o macho de 2 a 4 mm, o ovo é simetricamente elipsoidal, medindo de 89 a 93 μm por 36 a 42 μm (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Figura 13 - Cabeça (A), cauda (B) e ovo (C) de oxiúros fêmea adulta de *Aspicularis tetráptera*. Cabeça e cauda com aproximação de 250 vezes e ovo em 400 vezes



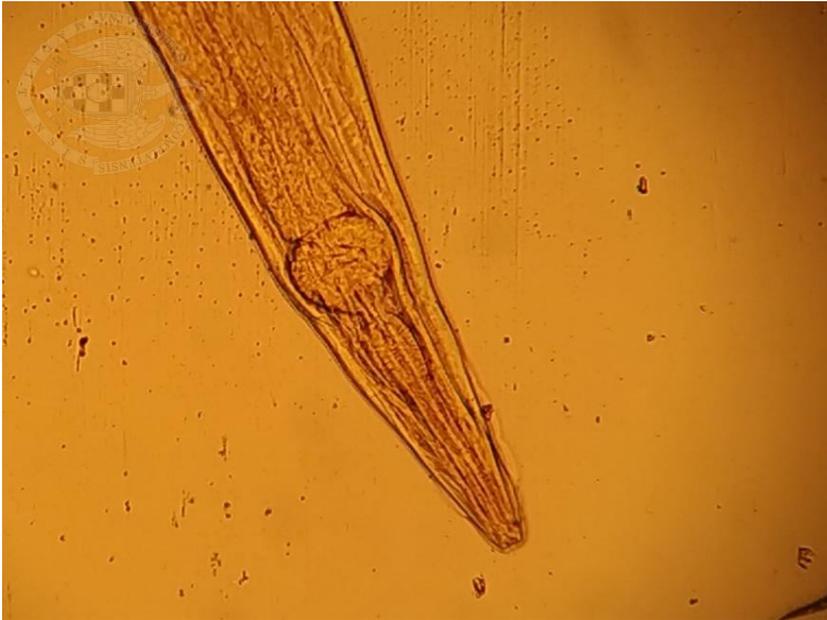
Fonte: OTTO *et al.*, 2006.

b. Nematódeos encontrados em coelhos

- *Passalurus ambiguous*

Encontrado no ceco e cólon de coelhos mantidos em colônias convencionais com o parasita macho medindo de 4 a 5 mm de comprimento e fêmea 9 a 11 mm. Os ovos têm parede fina e ligeiramente achatada de um lado medindo 95 a 103 μm por 43 μm (Figura 14). A infecção ocorre por ingestão dos ovos (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Figura 14 - Imagem da cabeça de *Passalurus ambiguus*



Fonte: adaptado de CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA VETERINÁRIA (VISAVET), 2022.

4.2.3.4 Cestódeos encontrados em colônias de animais de laboratórios

As espécies mais importantes para animais de laboratório são *Hymenolepis nana* e *H. diminuta*, organismos de importância para a saúde pública, encontrados na classe de risco 2, proporcionando moderado risco individual e limitado risco para a comunidade (BAKER *et al.*, 1998).

a. Cestódeos encontrados em camundongos, ratos e hamsters

- *Hymenolepis diminuta*

Requer hospedeiro intermediário, podendo ser encontradas no intestino de ratos, camundongos e hamsters. O parasita adulto mede de 20 a 60 mm de comprimento por 4 mm de espessura (Figura 15). Estes cestódeos não apresentam acúleos na escólex (MARTINS 2019).

Figura 15 - Escolex com rostelo desarmado de *Hymenolepis diminuta* em 250 vezes



Fonte: adaptado de BAKER 2006.

- *Hymenolepis nana*

Ocorre em camundongos, ratos e hamsters. O adulto mede de 25 a 40 mm de comprimento por 1 mm de espessura, apresentando aculeos na escolex (rostelo armado), o ovo mede de 44 a 62 μm por 30 a 55 μm (Figura 16) e o embrião mede de 24 a 30 μm por 16 a 25 μm , possuindo três pares de pequenos ganchos (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Figura 16 - Ovos de *Hymenolepis nana*



© Lenilza Mattos Lima

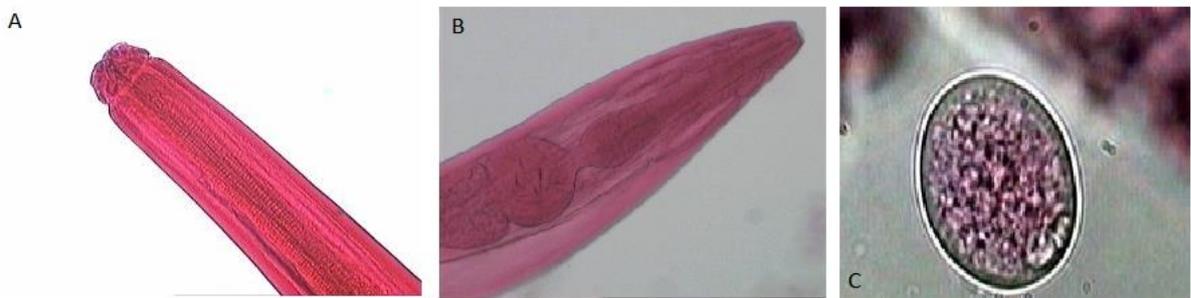
Fonte: adaptado de ATLAS PARASITOLÓGICO, 2022.

b. Cestódeos encontrados em cobaias

- *Paraspidodera uncinata*

Ocorre no intestino grosso e ceco de cobaias, não sendo considerado patogénico. O macho mede de 16,3 a 17,6 mm de comprimento, a fêmea 18,4 a 20,9 mm e o ovo 43 por 31µm (LAPCHIK *et al.*, 2009) (Figura 17).

Figura 17 - Porção anterior (A e B) e ovo (C) de *Paraspidodera uncinata*



Fonte: adaptado de TANIDEH *et al.* 2010.

4.2.4 Controle sanitário ectoparasitário

4.2.4.1 Metodologias para diagnóstico

a. Swab do pelo (fita gomada)

Utilizada na pesquisa de ácaros, piolhos, pulgas e carrapatos.

- Procedimento técnico:

1. Recortar 3 segmentos de fita gomada transparente;
2. Colocar as fitas em contato com o dorso, cabeça e focinho do animal, tomando o cuidado de aderir a fita no sentido contrário do pelo;
3. Posicionar as fitas em lâminas de vidro para leitura em microscópio nos aumentos de 50, 100 e 400 vezes.

4.2.4.2 Ectoparasitas encontrados em colônias de animais de laboratórios

a. Ectoparasitas encontrados em camundongos, ratos e hamsters

- *Poliplax serrata*

Os piolhos são insetos ápteros, achatados dorsoventralmente com todos os instares vivendo sobre os hospedeiros (ectoparasitos permanentes) (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Poliplax serrata, conhecido como piolho do camundongo tem seu comprimento variado entre 600 e 1.500 µm, podendo ser visualizado a olho nu (Figura 18). Seu ciclo de vida varia em cerca de 13 dias. O *P. serrata* atua como vetor do *Eperythrozoon coccoides* e *Francisella tularensis*.

Figura 18 - Imagem ventral de um adulto de *Poliplax serrata*, mostrando as primeiras pernas menores



Fonte: MEHLHORN, 2008.

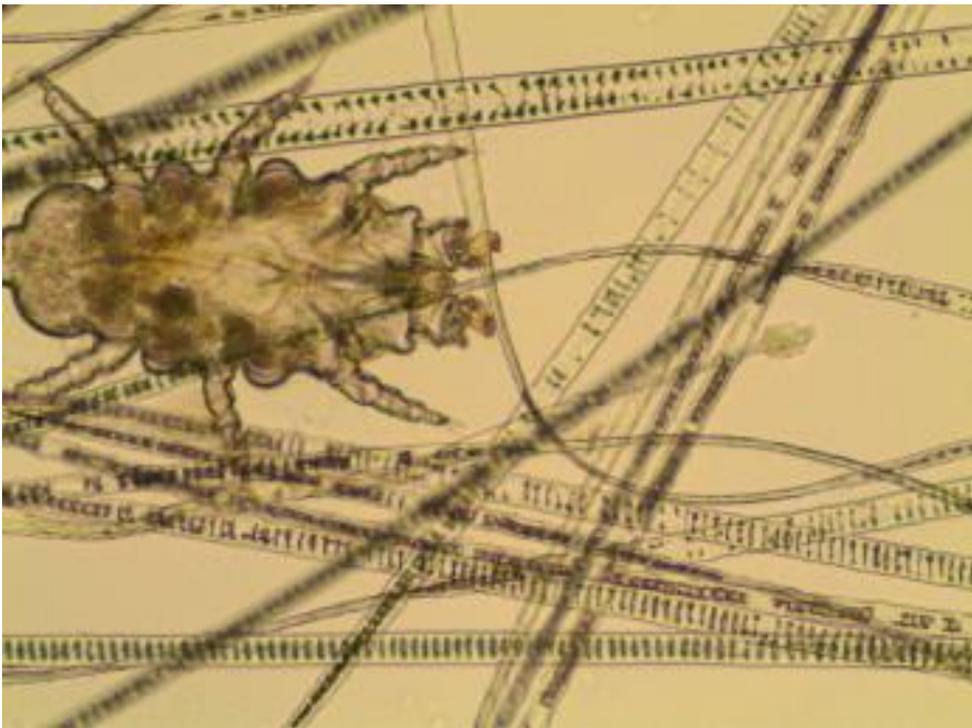
- *Myobia musculi*

Comum em colônias de camundongos, ratos e hamsters convencionais estando associados à alopecia e dermatites, se alimentando de secreções dos

folículos pilosos (Figura 19). As fêmeas medem de 400 μm a 500 μm de comprimento e os machos 285 a 320 μm (FOREYT 2005).

Possuem os estágios de larva, protoninfa, deutoninfa e adultos, realizando todo o ciclo sobre o hospedeiro. Sua transmissão para outro hospedeiro acontece por contato direto e através de substrato dos ninhos.

Figura 19 - *Myobia musculi* em uma amostra de pelo em fita gomada



Fonte: adaptado de TULLY, 2009.

- *Myocoptes musculus*

Ácaro de ocorrência em ratos, permanecendo durante todo o seu ciclo evolutivo preso aos pelos e se alimentando dos mesmos (Figura 20). Sua transmissão acontece por contato direto, sendo que a fêmea é oval e mede 300 μm por 130 μm (FOREYT 2005).

Figura 20 - *Myocoptes musculus* em uma amostra de pelo em fita gomada



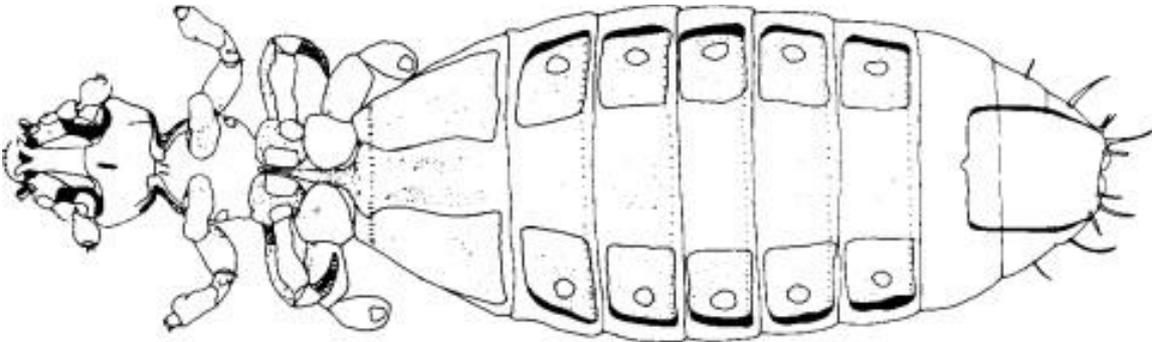
Fonte: adaptado de RONALD *et al.*, 1976.

b. Ectoparasitas encontrados em cobaias

- *Gliricola porcelli*

Piolho encontrado em cobaias e roedores (Figura 21). De acordo com a intensidade da infestação, causa irritação produzindo intenso prurido e feridas na pele, que quando agravada causam infecções bacterianas (LAPCHIK *et al.*, 2009).

Figura 21 - Desenho do piolho *Gliricola porcellii*

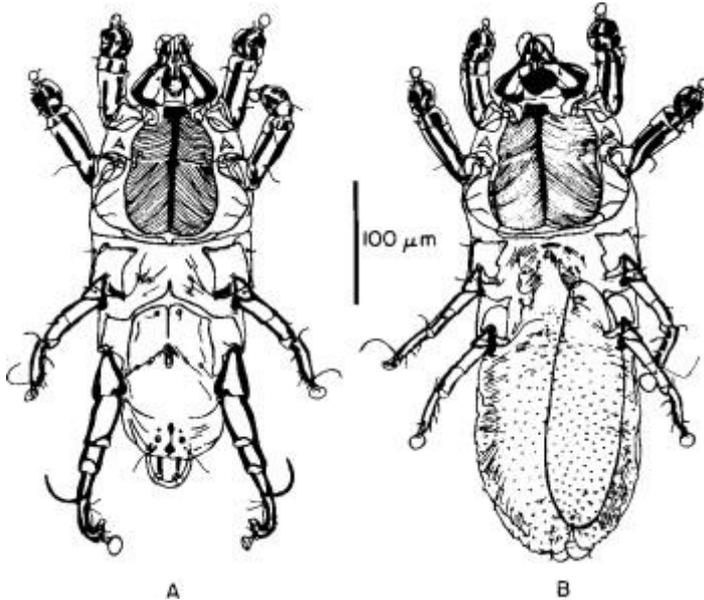


Fonte: adaptado de RONALD *et al.*, 1976.

- *Chirodiscoides caviae*

Este ácaro é comum em pelagem de cobaia e pode causar pouco ou nenhum sinal clínico nos animais infestados. São transmitidos por contato direto com o animal hospedeiro, cama, pelos ou detritos (LAPCHIK *et al.*, 2009) (Figura 22).

Figura 22 - Desenho do ácaro *Chirodiscoides caviae*, A (macho) e B (fêmea)



Fonte: adaptado de O'ROURKE, 2004.

c. Ectoparasitas encontrados em coelhos

- *Listrophorus gibbus*

Ácaro de pelo de coelho, lateralmente achatado, com um revestimento anterior marrom. Por serem grandes, são capazes de serem vistos como pequenos pontos nos pelos (LAPCHIK *et al.*, 2009) (Figura 23).

Figura 23 - *Listrophorus gibbus* em raspado cutâneo de coelho visualizados em microscopia óptica com objetiva de 10 vezes



Fonte: adaptado de SILVA *et al.*, 2006.

Legenda: A (macho) com dois processos alongados com ventosas diferenciadas e B (fêmea), com corpo subcilíndrico, pernas curtas e cabeça com capuz.

- *Cheyletiella parasite rex* e *Cheyletiella parasitovorax*

Produzem uma condição chamada caspa ambulante. Se as crostas da pele forem raspadas sobre um fundo escuro, pequeninos pontos brancos poderão ser vistos se movimentando (FOREYT 2005).

São ácaros da família Cheyletidae, que parasitam mamíferos e normalmente são encontrados na pelagem de coelhos. *Cheyletiella spp.* são facilmente reconhecidos por suas grandes garras palpais, peritremas gnatosômicos em forma de M e apêndices tarsais em forma de pente (Figura 24)

Figura 24 - Imagem microscópica de *Cheyletiella* spp



Fonte: adaptado de HARCOURT-BROWN, 2002.

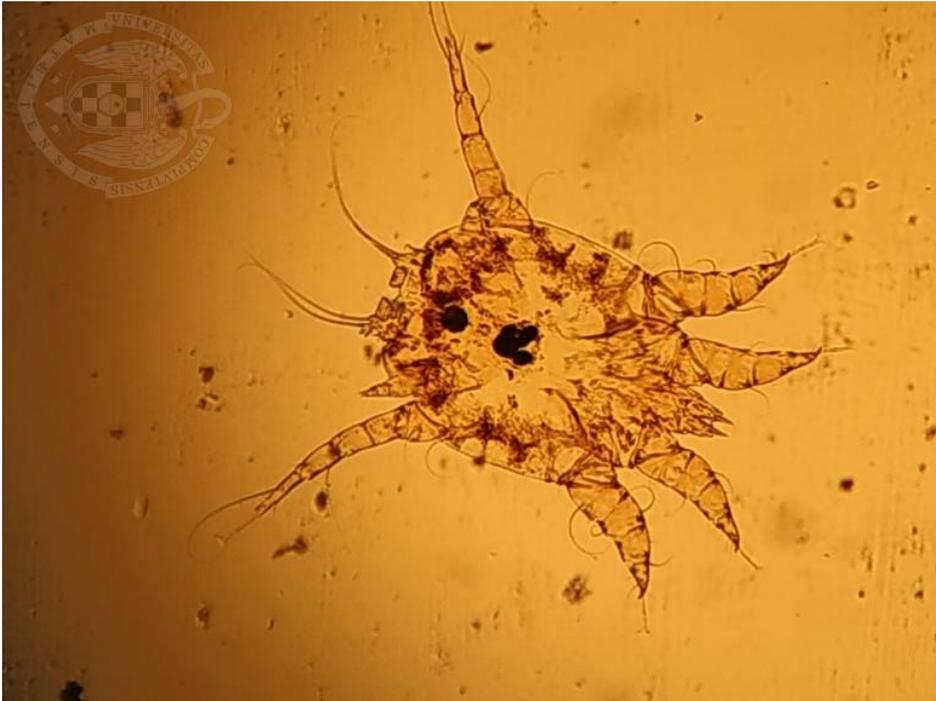
- *Psoroptes cuniculi*

Ácaro comum em coelhos, que causam lesões na parte interna da orelha, começando pela concha auditiva até atingir a superfície interna do pavilhão auricular (CUBAS, 2006).

Os animais doentes podem apresentar sinais clínicos como, agitação da cabeça e ação de coçar as orelhas com os pés. Com o tempo pode levar a infestar outras partes do corpo, como cabeça, pescoço e patas (MONTEIRO, 2010).

As fêmeas são relativamente grandes, medindo de 400 a 750 μm . Os machos são menores e medem de 370 a 550 μm . O ciclo de vida do parasita se completa em torno de 21 dias e seus ovos permanecem viáveis por, pelo menos, 30 dias (Figura 25).

Figura 25 - Imagem de microscopia de *Psoroptes spp*



Fonte: adaptado de CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA VETERINÁRIA (VISAVET), 2022.

4.2.5 Descontaminação das colônias

4.2.5.1 *Limpeza periódica*

É importante descontaminar estantes e cabines de segurança biológica utilizadas para proteger os animais dos micro-organismos patogênicos, impedindo que elas sirvam como fontes de contaminação (LEVY 2004).

4.2.5.2 *Técnica de derivação cesariana*

A técnica de derivação cesariana, também conhecida como Histerectomia, vem sendo utilizada como forma de suporte a programas de erradicação de patógenos em colônias contaminadas de camundongos e ratos. É uma técnica simples, onde são retirados os neonatos dos cornos uterinos de fêmeas doadoras e é implantado em fêmeas receptoras. Para alguns patógenos como vírus e micoplasma, o sucesso na eliminação do agente pode ser comprometido, pois tem a capacidade de atravessar a barreira placentária, contaminando o feto ainda no útero (ANDRADE *et al.*, 2002).

Para aumentar sua eficiência, pode ser associado a programas de coleta, lavagem e transferência de embriões, podendo o número de casos bem-sucedidos de descontaminação por esses agentes aumentar significativamente. Repetidas lavagens da zona pelúcida do embrião durante a execução do protocolo também podem potencializar a descontaminação utilizando esta técnica (LAPCHIK *et al.*, 2009).

4.3 Módulo III: controle sanitário bacteriológico

4.3.1 Importância da detecção de agentes bacterianos em biotérios

A detecção e o controle microbiano patogênico em instalações de animais de laboratório são essenciais para garantir o bem-estar animal, a validade e a reprodutibilidade dos dados. O objetivo do controle sanitário bacteriológico é detectar a presença de micro-organismos patogênicos. A partir da detecção do agente em uma amostra representativa, considera-se que os outros animais da unidade também são portadores potenciais do mesmo agente (GODOY *et al.*, 2012).

A alta prevalência de agentes bacterianos em animais mantidos em colônias estabelece a necessidade de ferramentas para sua detecção e identificação, utilizando ensaios não invasivos, rápidos e reprodutíveis (NICKLAS *et al.*, 2002).

4.3.2 Frequência de monitoramento

De acordo com recomendações da FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), a frequência mínima de monitoramento para bactérias deve ocorrer a cada três meses ou anualmente. Nas tabelas abaixo estão apresentadas listas de bactérias e fungos que devem ser monitoradas em colônias de camundongos, ratos, cobaias e coelhos, além de sua frequência mínima de monitoramento (MAHLER *et al.*, 2014).

Todos os agentes listados nas tabelas devem ser relatados se encontrados em exames diagnósticos, independente de quando foram encontrados.

Tabela 1 - Recomendação de monitoramento de bactérias e fungos em camundongos

Bactéria	Frequência
<i>Helicobacter hepaticus</i>	*
<i>Helicobacter bilis</i>	*
<i>Helicobacter typhlonius</i>	*
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	*
<i>Streptococci b-haemolytic</i> (não grupo D)	*
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	*
<i>Citrobacter rodentium</i>	**
<i>Clostridium piliforme</i>	**
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	**
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	**
<i>Salmonella spp</i>	**
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	**

* Monitoramento a cada três meses ** Monitoramento anual

Fonte: adaptado de MAHLER *et al.*, 2014.

Tabela 2 - Recomendação de monitoramento de bactérias e fungos em ratos

Bactéria/Fungo	Frequência
<i>Clostridium piliforme</i>	*
<i>Helicobacter bilis</i>	*
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	*
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	*
<i>Streptococci b-haemolytic</i> (não grupo D)	*
<i>Streptococcus pneumonia</i>	*
<i>Cilia-associated respiratory bacillus</i>	**
<i>Pneumocystis spp.</i>	**
<i>Salmonella spp.</i>	**
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	**

* Monitoramento a cada três meses ** Monitoramento anual

Fonte: adaptado de MAHLER *et al.*, 2014.

Tabela 3 - Recomendação de monitoramento de bactérias e fungos em cobaias

Bactéria/Fungo	Frequência
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	*
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	*
<i>Streptococci b-haemolytic (não grupo D)</i>	*
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	*
<i>Clostridium piliforme</i>	**
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	**
<i>Salmonella spp.</i>	**
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	**

* Monitoramento a cada três meses ** Monitoramento anual

Fonte: adaptado de MAHLER *et al.*, 2014.

Tabela 4 - Recomendação de monitoramento de bactérias e fungos em coelhos

Bactéria/Fungo	Frequência
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	*
<i>Clostridium piliforme</i>	*
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	*
<i>Pasteurella multocida</i>	*
<i>Cilia-associated respiratory bacillus</i>	**
<i>Salmonella spp.</i>	**

* Monitoramento a cada três meses ** Monitoramento anual

Fonte: adaptado de MAHLER *et al.*, 2014.

Recomenda-se que em colônias SPF, a frequência de monitoramento seja trimestral e em colônias de animais axênicos a cada 15 dias.

4.3.3 Resistência a antibióticos

A resistência a antimicrobianos, denominada AMR, é atualmente considerada um dos maiores problemas para a saúde pública global (ECDC, 2016).

O uso indiscriminado (inadequado e excessivo) de antimicrobianos na produção animal, com o propósito de tratar e prevenir infecções, bem como para

promover o crescimento animal, pode promover pressão seletiva nos microrganismos os tornando resistentes (ROCA *et al.*, 2015).

A resistência pode envolver mutações, transdução ou seleção, ambas com alteração no seu DNA. Essas variações podem ocorrer como uma resposta da bactéria à utilização de antibióticos e sua presença no ambiente (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Com o uso impróprio dos antibióticos, haverá a eliminando dos microrganismos menos resistentes, restando apenas os que possuem mecanismos biológicos de barreira, ou seja, os mais resistentes (KADOSAKI *et al.*, 2012).

Para um antibiótico ser eficiente, deve alcançar os alvos moleculares intracelulares, precisando ultrapassar a membrana celular bacteriana, a fim de interagir com sua molécula-alvo de modo a desencadear a morte da bactéria, evitando a ação das bombas de efluxo que jogam os antimicrobianos para fora da célula (ANVISA, 2007).

4.3.4 Coleta de material

A coleta e o transporte inadequados das amostras podem ocasionar falhas no isolamento do agente patogénico, favorecendo o desenvolvimento da flora contaminante. Dessa maneira desde a etapa da coleta, até o momento da identificação, deve-se evitar contaminação com as áreas adjacentes (LEVY *et al.*, 2002).

Procedimentos adequados de coleta devem ser adotados para evitar o isolamento de um “falso” agente patológico, resultando em um monitoramento inadequado. A identificação do material deve ser feita de forma legível e correta, antes do envio ao laboratório de microbiologia, devendo ser realizado o mais brevemente possível (RUOFF *et al.*, 2003)

Para uma adequada coleta, os colaboradores envolvidos no procedimento devem ser devidamente capacitados e periodicamente treinados, sendo que toda amostra deve ser tratada como potencialmente patogênica.

4.3.5 Procedimento para colheita do material

O procedimento de coleta microbiológica inicia-se com a eutanásia do animal, seguindo pela colheita do trato respiratório e na sequência trato digestório. É retirado material oral, introduzindo-se um swab estéril, para semeadura em meios adequados. Em seguida, faz-se uma incisão longitudinal na região anterior do pescoço, para total visualização da traqueia, onde se isola o trato respiratório superior pinçando-se a traqueia com pinça hemostática, onde na luz da traqueia é coletado material, para posterior crescimento e identificação dos microrganismos (ANDRADE *et al.*, 2002).

Após a colheita do trato respiratório, se inicia a colheita de material do trato digestório, realizando uma incisão no abdômen sobre a linha alba, exteriorizando o intestino, onde deve ser removido e estendido em uma placa de Petri estéril. Em seguida, faz-se uma incisão longitudinal no cólon ascendente e, após remoção das fezes, raspa-se a mucosa com uma alça de platina para colheita. Também deve-se realizar incisão longitudinal no duodeno, ceco e cólon descendente (ANDRADE *et al.*, 2002).

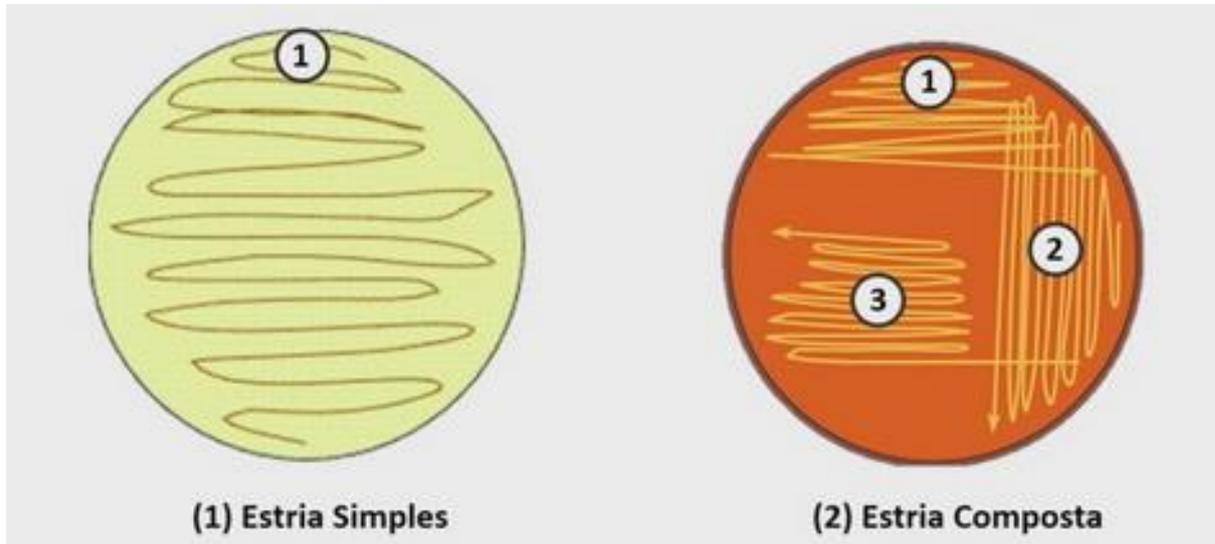
4.3.6 Metodologias para detecção e identificação

4.3.6.1 *Isolamento*

O responsável pelos testes microbiológicos deve desenvolver uma rotina para cultivar os organismos de seu interesse, pois existem diversos meios de cultura que promovem um bom desenvolvimento para cada micro-organismo.

É necessária boa distribuição do microrganismo no meio de cultura sólido, podendo utilizar método de esgotamento em estrias sucessivas (Figura 26), para se conseguir o isolamento do microrganismo pesquisado (VETPROFISSIONAL 2022).

Figura 26 - Técnicas de isolamento em meio de cultura sólido, (1) estria simples e (2) estria composta



Fonte: adaptado de VET PROFISSIONAL, 2022.

4.3.6.2 Meios de cultura

Alguns meios de cultura são indicados para serem utilizados no transporte de microrganismo. De acordo com LEVY *et al.* (2002), os meios de cultura utilizados para esta finalidade são:

- Cary Blair: transporte de material fecal e conservação dos microrganismos.
- Salina tamponada: meio líquido tamponado que mantém a bactéria viável, ideal para o transporte de fezes.

- Meio Stuart: utilizado para o transporte de diversos materiais, ideal para conservação de microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp.

- Ágar nutriente: meio relativamente barato com várias aplicações no laboratório de microbiologia. Pode ser utilizado para análise de água, alimentos e para a conservação e manutenção de culturas em temperatura ambiente, como método opcional para os laboratórios que não dispõem do congelamento das cepas em freezer à - 70°C. Também é usado para observar esporulação de espécies de bacilos gram-positivos.

Já para crescimento e isolamento, os meios de cultura indicados são:

- Ágar chocolate: é amplamente utilizado para o cultivo de microrganismos exigentes, embora cresçam neste meio quase todos os tipos de microrganismos.

- Ágar Salmonella-Shigella (SS): utilizado para isolar espécies de Salmonella em amostras de fezes, alimentos e água.
- Caldo Selenito: inibem coliformes e outras espécies da flora intestinal como estreptococos, sendo utilizado para o isolamento de Salmonella spp. em amostras de fezes e urina
- Caldo Tetrionato: possui sais de bile que inibem microrganismos gram-positivos. A adição da solução de iodo inibe a flora intestinal normal de espécies fecais, sendo útil para o isolamento de Salmonella spp.
- Caldo Tioglicolato: possui substâncias redutoras tioglicolato, cisteína e sulfito de sódio que produzem uma anaerobiose suficiente para microrganismos anaeróbios exigentes, sendo útil para cultivo de microrganismos anaeróbios.
- Ágar Mac Conkey: o cristal violeta presente neste meio inibe o crescimento de microrganismos gram-positivos, especialmente enterococos e estafilococos.
- Ágar Sangue: oferece ótimas condições de crescimento a maioria dos microrganismos, favorecendo a formação de halos de hemólise, úteis para a diferenciação de Streptococcus spp. e Staphylococcus spp.
- Ágar Cled: usado para isolamento e quantificação de microrganismos presentes em amostras urina, inibindo o véu de cepas de Proteus.
- Caldo BHI: meio para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos.
- Ágar Cetrimida: é um meio seletivo para o isolamento e contagem de Pseudomonas spp.
- Ágar XLD. meio moderadamente seletivo recomendado para isolamento de Salmonella spp.

4.3.6.3 *Formação de halos de hemólise*

Alguns microrganismos são capazes de causar halos de hemólise em meios de cultura suplementados com sangue de carneiro desfibrinado, como por exemplo o ágar sangue (BISWAS *et al.*, 2013).

A formação dos halos após crescimento do microrganismo pode ser utilizado como ferramenta para diferenciar e identificar microrganismos.

4.3.6.4 Coloração Gram

Vários métodos de coloração podem ser utilizados na identificação dos microrganismos, sendo o mais utilizado a coloração de Gram, onde se classificam os microrganismos por sua coloração, tamanho, arranjo celular e forma (LING *et al.*, 2003).

A técnica foi criada pelo médico dinamarquês Hans Christian Gram, baseada na diferença existente na parede celular das bactérias, as dividindo em dois grupos: Gram-negativas (coradas em rosa) e Gram-positivas (coradas em roxo).

As bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular mais delgada, porém estruturalmente mais complexa enquanto os microrganismos Gram-positivos apresentam uma constituição de parede celular com aproximadamente 80 nm de espessura, sendo composta principalmente por glicopeptídeos (LEVY *et al.*, 2002).

Para realização da técnica deve-se seguir os seguintes passos:

1. Fazer esfregação em uma lâmina seca;
2. Fixar p esfregação no fogo;
3. Cobrir o esfregação com cristal de violeta durante 1 minuto;
4. Retirar o excesso de corante com água corrente;
5. Cobrir a lâmina com Lugol (2%), deixando agir durante 1 minuto;
6. Escorrer o Lugol e lavar com água corrente;
7. Acrescentar solução de álcool etílico (95%) até não se observar mais desprendimento do corante;
8. Lavar com água corrente;
9. Cobrir a lâmina com Safranina, deixando agir por 30 segundos;
10. Lavar em água corrente;
11. Deixar secar ao ar livre ou secar cuidadosamente com auxílio de papel;
12. Colocar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregação;
13. Fazer a leitura em objetiva de imersão (100 vezes).

4.3.6.5 Testes colorimétricos semi-automatizados

Existem vários Kits comerciais que possuem reagentes e galerias de incubação, baseados em reações enzimáticas e fermentativas.

O Bac-Tray (Inlab) é um sistema destinado à identificação bioquímica de bacilos Gram negativos (BGN) com oxidase negativa ou positiva, fermentadores ou não da glicose ou não fastidiosos. Este sistema é composto por 3 conjuntos de provas bioquímicas, denominados Bactray I, II e III, que totalizam 30 substratos destinado à identificação dos microrganismos (BACTRAY, 2022).

Outro kit utilizado é o API (bioMérieux), com metodologia simples, rápida e confiável, cobrindo mais de 600 espécies diferentes de bactérias, também possuindo identificação microbiana padronizada (BIOMERIEUX, 2022).

4.3.6.6 *Testes colorimétricos automatizados (VITEK)*

A Colorimetria automatizada oferece um extenso portfólio de identificação e suscetibilidade a antibióticos, fornecendo alta discriminação entre espécies e reduzindo o tempo entre os testes. Outra vantagem desta metodologia é que atende às necessidades de qualquer tamanho de laboratório. Através de equipamentos totalmente automatizados, é possível gerar resultados de identificação de bactérias e leveduras, testes de suscetibilidade a antibióticos, com a detecção do mecanismo de resistência e relatórios de tendências epidemiológicas (BIOMERIEUX, 2022).

O uso de equipamentos como o sistema VITEK® MS (bioMérieux Inc.), além de investigar alto número de cepas, pode alcançar grande taxa de acerto, chegando até o nível de espécie (LING *et al.*, 2003).

Outra vantagem, quando comparado aos métodos convencionais, é a redução na duração da identificação direta. Métodos semi-automatizados requerem 1 ou 2 dias, sendo que este método pode possibilitar a notificação no mesmo dia e, assim, permitir melhor tomada de decisão (LING *et al.*, 2003).

4.3.6.7 *Testes moleculares (PCR)*

De acordo com Godoy *et al.* (2012), amostras de fezes coletadas do intestino delgado, ceco e intestino grosso de animais podem ser utilizadas para extração de DNA, na busca de bactérias patogênicas. O material coletado pode ser acondicionado em microtubos livres de DNases e RNases, sendo mantido a -80°C ou em nitrogênio líquido até o momento do uso.

Resumidamente, para a extração de DNA é utilizada solução de lise preparada com Tris-HCL (0,5M), NaCl (5M), SDS (10%), EDTA (0,5M), Proteinase K, diferenciando da original que utiliza fenol/ clorofórmio/álcool isoamílico.

Para a reação de PCR, é utilizado pul de DNA a 100 ng; 0.2 mM dNTPs mix (desoxiribonucleotídeos trifosfato); tampão da Taq DNA polimerase: 1,5 mM MgCl₂, 1U (unidade) de Taq DNA polimerase Platinum; água milli-Q autoclavada em quantidade suficiente para uma reação de 20 µl e 0,5 µmol/L de cada oligonucleotídeo iniciador.

Para amplificação é necessário termociclador, mantido nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 7 minutos e ao final foi mantido a 4°C. Os produtos obtidos pela PCR, devem ser separados por eletroforese em gel de agarose. Deve-se usar marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder. A visualização e fotodocumentação é realizada sob luz ultravioleta.

4.3.6.8 *Espectrometria ionica (MALDI-TOF MS)*

A espectrometria MALDI Biotyper CA System (Bruker Daltonics Inc.) atua captando impressões digitais espectrais de massa características, que são exclusivas de cada microrganismo, sendo útil como método de identificação microbiológica confiável a nível de espécie e usado para identificação de cepas.

Em uma linguagem mais simples, é uma técnica que usa ionização para diagnosticar as proteínas de uma bactéria. O MALDI-TOF MS é uma tecnologia que apresenta um alto potencial para substituir integral ou parcialmente os testes convencionais para cepas bacterianas em laboratórios de microbiologia (BISWAS *et al.*, 2013).

4.3.6.9 *ELISA*

ELISA é uma das técnicas mais utilizadas no monitoramento sanitário de animais de laboratório devido a sua simplicidade, versatilidade e velocidade, sendo capaz de testar várias amostras simultaneamente.

É um teste indireto para detecção de anticorpos, ou seja, é um método que não necessita eutanasiar os animais como no caso de testes de cultura e Histopatologia.

Porém é aplicável quando há quadro clínico, não permitindo a detecção em animais jovens, por não possuírem o seu sistema imune desenvolvido. Além disso, animais recém infectados podem demorar até três meses para que seu sistema imune desenvolva anticorpos específicos e detectáveis (ANDRADE *et al.*, 2002).

4.3.7 Agentes bacterianos

Conhecer as particularidades de cada microrganismo permite escolher qual microrganismo deverá ser pesquisado além de uma melhor interpretação dos resultados encontrados. Para esta escolha leva-se em consideração o potencial patogénico dos micro-organismos, suas interferências nos resultados experimentais, alterações fisiológicas provocadas no hospedeiro além do potencial zoonótico do agente (RUOFF *et al.*, 2003).

De acordo com a FELASA, os agentes bacterianos que devem ser monitorados em animais mantidos em laboratório são:

- *Helicobacter* spp. (*H. hepaticus*, *H. typhlonius*, *H. bÍlis*)

O gênero *Helicobacter* compreende um grupo de gram-negativos, altamente prevalentes em instalações de animais em todo o mundo (FOX *et al.*, 1993).

A infecção por *Helicobacter* em camundongos C57/BL6 é normalmente assintomática, porém outras cepas como A/JCr, BALB/c, SJL, B6C3F1, C3H/He, Rag-deficiente e SCID podem desenvolver doença inflamatória intestinal (DII), câncer intestinal, hepatite e carcinoma hepatocelular, podendo também afetar sua reprodução (FOX *et al.*, 2011).

De acordo com as recomendações da FELASA, se positivo para o gênero *Helicobacter* spp., deve-se identificar as seguintes espécies: *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter bÍlis* e *Helicobacter typhloni* (MAHLER *et al.*, 2014).

As bactérias do gênero *Helicobacter* são organismos de difícil crescimento em meios de cultura, necessitando de outros métodos mais sensíveis para sua detecção. É indicado o cultivo em meio ágar sangue, contendo trimetoprim, vancomicina e polimixina (Remel Labs), a 37°C, sob condições microaerófilas (FOX *et al.*, 1993).

- Localização: superfície do epitélio intestinal e na profundidade das criptas, particularmente ceco, além do fígado e vesícula biliar.
- Tamanho: É uma bactéria espiral com 1,5-5 µm de comprimento e 0,2-0,3 µm de largura.
- Morfologia: película mucóide ou colônias espalhadas.
- Resistência: É resistente à cefalotina e ao ácido nalidíxico, mas suscetível ao metronidazol.
- Reação de coloração de gram: gram-negativa.
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: catalase e oxidase positivo e hidrolisa rapidamente a ureia.
- Crescimento: Esta espécie pode crescer em condições anaeróbicas e microaerofílicas a 37°C.
- Potencial patogénico: patogenicidade em camundongos e humanos.

- *Pasteurella pneumotropica*

Animais infectados com estes organismos são usualmente portadores assintomáticos, o que facilita a transmissão (BOOTZ *et al.*, 1998).

A *Pasteurella pneumotropica*, considerada a mais patogénica da família Pasteurellaceae em roedores, deve ser monitorada como rotina em controle sanitário (REHBINDER *et al.* 1996).

Seu diagnóstico pode ser realizado através de cultura de bactérias com período mínimo de incubação de 48 horas (NICKLAS *et al.*, 2002)

Outros métodos utilizados para a identificação de *P. pneumotropica* em roedores são os testes sorológicos. Contudo, não muito confiáveis devido à possibilidade de reações cruzadas com outras espécies de microorganismos da família Pasteurellaceae e/ou reações falso-positiva (BOOTZ *et al.*, 1998).

A comparação da sensibilidade entre os dois testes demonstrou a superioridade da PCR em comparação com culturas de bactérias para detectar *Pasteurella pneumotropica* em colônias de roedores (GODOY *et al.*, 2012).

- Localização: mucosa nasofaríngea, traquéia, pulmões, aparelho digestório e vagina.

- Morfologia: coco bacilos formando colônias circulares com a superfície lisa, cinza translúcidas.
- Reação de coloração de gram: cocobacilos gram-negativa.
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: oxidase e catalase positivos.
- Crescimento: semeado em BHI ou TSB (tryptic soy broth) caldo com vancomicina, por 1 hora. Em seguida, repicado em ágar-sangue a 5% e incubado em estufa a 37°C por 24 horas. São anaeróbias facultativas, com crescimento a 37°C em ágar sangue de carneiro com incubação mínima de 48 horas.
- Potencial patogénico: Em pacientes imunocomprometidos, pode causar bacteremia e septicemia.

- *Pasteurella multocida*

Pasteurella multocida é uma bactéria não móvel, sensível a penicilina da família Pasteurellaceae. É responsável por infecções enzoóticas em humanos e animais. Muitos mamíferos e aves abrigam essa bactéria nos seus tratos respiratórios como integrante da microbiota normal (KIMURA *et al.*, 2004).

Os membros do gênero *Pasteurella* são bactérias pequenas, cocobacilos de 1 a 2µm de comprimento não móveis, não formadoras de esporos, gram-negativas, anaeróbias facultativas; na coloração de Gram, aparecem como bacilos únicos (TOWNSEND *et al.*, 1998).

- Localização: Trato respiratório.
- Morfologia: coco bacilos, formando colônias grandes, acinzentadas, não hemolíticas,
- Reação de coloração de gram: cocobacilo gram-negativo encapsulado.
- Atividade de uréase, catalase, oxidase:
- Crescimento: semeadura em placas de ágar sangue ovino 5%, ágar colúmbia e caldo BHI.
- Potencial patogénico: pode causar pneumonia e septicemia. Nos casos agudos, observam-se hiperemia, petéquias ou hemorragias nas mucosas e serosas de órgãos.

- *Streptococcus β-hemolítico* (não grupo D)

Streptococcus β-hemolíticos são alguns dos mais importantes patógenos bacterianos Gram-positivos na medicina humana. Os estreptococos podem ser diferenciados de acordo com sua aparência na placa de ágar sangue após incubação a 35°C em presença de 5% de CO₂, podendo apresentar: hemólise total (beta), parcial (alfa, de cor esverdeada) ou nenhuma (gama).

A identificação de espécie de estreptococos beta hemolíticos é feita através de aglutinação com soros específicos contra os antígenos de Lancefield (A, B, C, D, F e G), que é uma metodologia rápida, porém de elevado custo (RUOFF *et al.*, 2003).

- Localização: região orofaringe.
- Morfologia: cocos dispostos em cadeias que se agrupam em colônias lineares em pares com tamanhos variáveis. Observa-se zona de hemólise em torno das colônias. Suas colônias são pequenas, de cor alaranjada ou vermelho-tijolo.
- Reação de coloração de gram: gram-positiva.
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: catalase e oxidase negativa.
- Crescimento: são anaeróbios facultativos, o material coletado da orofaringe é semeado em ágar-sangue.
- Potencial patogénico: possuem vários fatores de virulência, incluindo a proteína M, podendo causar fascíte necrosante e síndrome do choque tóxico.

- *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ou pneumococo é uma bactéria gram-positiva, capsulada, que tem 90 sorotipos imunologicamente distintos de importância epidemiológica mundial na distribuição das doenças pneumocócicas invasivas. Pode levar a infecções graves nos pulmões (pneumonia), no sangue (bacteremia), sepsis (infecção generalizada) e na membrana que reveste o cérebro (meningite) (RUOFF *et al.*, 2003).

- Localização: região orofaringe.

- Morfologia: são capsuladas, com morfologia de diplococos lanceolados ou em cadeias curtas (divisão em apenas um plano), imóveis, não formadoras de esporos,
- Reação de coloração de gram: gram-positivas.
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: catalase negativa e citocromo oxidase negativa.
- Crescimento: O material da orofaringe é semeado em BHI + gentamicina por 1 hora e repicado em ágar-sangue. Em seguida, incubado a 37°C por 24 horas em câmara de CO₂. São anaeróbios facultativos
- Potencial patogénico: A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência do pneumococo. Podem causar pneumonias, meningite, sepse, sinusite, otite média aguda, conjuntivite e bronquite.

- *Citrobacter rodentium*

Citrobacter rodentium é um patógeno da mucosa de camundongos que compartilha vários mecanismos patogénicos com *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (COLLINS *et al.*, 2014).

- Localização: mucosa do lúmen intestinal.
- Morfologia: morfologia de cocos, não móveis.
- Reação de coloração de gram: gram-negativa.
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: são oxidase negativa, catalase positiva e não descarboxilam a lisina.
- Crescimento: ágar MacConkey.
- Potencial patogénico: Causa lesão na região apical dos enterócitos e deleção de microvilosidades e reorganização do citoesqueleto de actina do hospedeiro para formar as estruturas semelhantes a pedestais de células epiteliais abaixo da bactéria aderente.

- *Clostridium piliforme*

Roedores de laboratório e coelhos são suscetíveis a infecção sintomática chamada Tyzzer, que ocorre principalmente em condições de má criação ou com imunossupressão.

A transmissão se dá pela ingestão de esporos do ambiente ou nas fezes de um animal infectado. Os esporos são resistentes e podem permanecer infecciosos por pelo menos um ano.

Os animais são inapetentes, magros, com pelos eriçados. Os ratos podem ter uma grande distensão do abdômen. Pode ou não haver diarreia em roedores, havendo geralmente em coelhos.

É considerado não cultivável em meios artificiais, dificultando sua detecção. A sorologia pode ser usada como uma ferramenta de triagem, no entanto, devido a natureza complexa dos antígenos bacterianos, podem haver resultados falsos positivos.

Também pode-se realizar PCR das fezes, buscando se um animal está eliminando esporos, além de PCR de lesões como complemento à histopatologia (CHARLES RIVER, 2009).

- Localização: intracelular obrigatória (citoplasma das células infectadas)
- Morfologia: bacilo longo e delgado (piliforme), porém podem-se encontrar formas mais curtas e espessas (forma de charuto).
- Tamanho: aproximadamente 8 a 10 μm de comprimento e 0,5 μm de largura.
- Reação de coloração de gram: gram-negativa.
- Crescimento: bactéria anaeróbica, móvel. podendo ser cultivado em linhagens de células intestinais, em células primárias de fígado de galinha ou camundongo ou em ovos de galinha embrionados.
- Potencial patogénico: doença hepática e intestinal. Pode produzir manchas brancas no fígado (hepatite necrotizante), muitas vezes ileíte necrotizante, tífite ou colite, linfonodos mesentéricos e íleo aumentados. Pálidas estrias no epicárdio ou miocárdio. Também é observado morte aguda sem sinais.

- *Corynebacterium kutscheri*

Sua transmissão ocorre por contato direto ou exposição oro-nasal, sendo que as infecções com *C. kutscheri* são raras e geralmente clinicamente silenciosas.

Sinais clínicos podem ser observados na doença avançada, como pelo eriçado, postura encurvada, dispneia e estertores, porfíria, descargas oculares e nasais mucopurulentas, letargia e claudicação, seguidos por morte em 1-7 dias (WEISBROTH *et al.*, 2006).

- Localização: região orofaríngea, conteúdo cecal, cólon e reto.
- Morfologia: bastonetes imóveis e pleomórficos (cocóides), formando pequenas colônias amareladas ou branco-acinzentadas (0,1-0,3 mm de diâmetro).
- Reação de coloração de gram: gram-positiva
- Atividade de urease, catalase, oxidase: urease positiva, catalase positiva e oxidase negativa.
- Crescimento: bactéria anaeróbica facultativa causadora de hemólise em ágar sangue.
- Potencial patogénico: pode causar pseudotuberculose em ratos, camundongos, cobaias e hamsters. As lesões macroscópicas da infecção por *C. kutscheri* consistem em abscessos únicos ou múltiplos distribuídos aleatoriamente no pulmão, fígado, rim, pele e articulações.

- *Mycoplasma pulmonis*

O *Mycoplasma pulmonis* é o agente causador da micoplasmose murina, infecção de curso crônico, lento e persistente por toda a vida do animal. que ainda hoje representa um grande desafio para a experimentação animal em todo o mundo (WEISBROTH *et al.*, 2006).

- Localização: epitélio pulmonar.
- Morfologia: móvel, podendo deslizar sobre superfícies. Forma colônias pequenas e muito típicas, com aparência de "ovo frito", podendo ser observadas ao microscópio.

- Reação de coloração de gram: gram-negativo, mas não se cora facilmente.
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: oxidase negativa.
- Crescimento: anaeróbico facultativo, tendo a glicose como sua fonte de energia.
- Potencial patogénico: pode causar em ratos lesões como rinite supurativa (formação de pus), otite média, traqueíte, broncopneumonia, endometrite purulenta, salpingite e perioforite.

- *Salmonella spp*

As espécies que fazem parte deste gênero são: *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica* e *Salmonella subterrânea*.

Todos os roedores de laboratório são suscetíveis a infecção com *Salmonella*, sendo potencialmente considerada uma zoonose (NEWSOME *et al.*, 2012).

- Localização: trato gastrointestinal.
- Morfologia: colônias de 2-4 mm de diâmetro), com forma de bastonetes (0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm), sendo móvel com flagelos peritricos.
- Reação de coloração de gram: gram-negativo
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: urease negativa, catalase positiva e oxidase negativa.
- Crescimento: anaeróbica facultativa, fermentadora de glicose, com fermentação de lactose mediante a transferência de plasmídeo.
- Potencial patogénico: A infecção em camundongos e ratos é comumente subclínica, porém quando os sinais clínicos estão presentes podem incluir diarreia, anorexia, pele enrugada, postura encurvada e perda de peso.

- *Streptobacillus moniliformis*

Esta bactéria causa uma infecção zoonótica, podendo atingir roedores e primatas. Camundongos desenvolvem doença clínica, porém ratos são assintomáticos. *S. moniliformis* é geralmente transmitido através da saliva após mordida, via ocular ou secreções nasais (BAKER *et al.*, 2006).

- Localização: nasofaringe de camundongos e ratos.
- Morfologia: bactéria em formato de bastonete, não móvel. Mede de 0,3 a 0,7 por 1 a 5 μm , aparecendo em filamentos ou cadeias.
- Reação de coloração de gram: gram-negativo.
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: negativa para as três enzimas.
- Crescimento: forma pequenas colônias redondas, acinzentadas e amanteigadas com 1-2 mm de diâmetro, não sendo capaz causar hemólise em ágar sangue.
- Potencial patogénico: pode causar febre, septicemia, artrite, sinovite, otite média, hepatite e aborto em roedores. Além de linfadenite, diarreia, conjuntivite e cianose.

- *Cilia-associated respiratory bacillus*

O bacilo respiratório associado aos cílios (CAR) é um patógeno recentemente identificado em ratos, camundongos e coelhos. Tem classificação incerta, sendo que estudos recentes sugerem que as cepas de ratos e coelhos são distintas.

Seus efeitos em animais de laboratório não estão bem caracterizados, podendo causar aumento da morbidade e mortalidade dos animais de uma colônia.

A maneira mais eficaz de erradicar estas infecções é eutanasiar a colônia e obter novo estoque limpo. Caso não seja possível, deve-se utilizar as técnicas de rederivação cesariana e transferência de embriões (BAKER *et al.*, 1998).

- Localização: trato respiratório.
- Morfologia: bactéria filamentosa em forma de bastonete.
- Reação de coloração de gram: gram-negativa.
- Crescimento: Difícil ter sucesso na cultura dessas bactérias sem a utilização de células, havendo a necessidade de teste de ELISA para identificação.
- Potencial patogénico: postura curvada, letargia, pelagem áspera e coloração periocular porfirina.

- *Pneumocystis spp.*

O *Pneumocystis spp.* é um fungo oportunista, principalmente transmitido por via aérea e responsável por severa pneumonia em grande número de mamíferos. A falta de um método de cultivo contínuo dificultam a identificação de como as infecções fúngicas se espalham pelo pulmão, os ciclos de vida dos organismos e suas estratégias usadas para sobrevivência dentro do hospedeiro.

A forma de cisto é a responsável pela transmissão a novos hospedeiros. Após a inalação, os cistos são depositados nos alvéolos e liberam oito esporos que se desenvolvem em formas tróficas e iniciam o ciclo de vida novamente (CUSHION 2009).

- Localização: alvéolos pulmonares de camundongos, ratos e coelhos.
- Morfologia: A forma trófica possui parede celular fina e flexível (20 a 30 nm), possuindo muitas saliências, denominadas extensões tubulares, que se projetam em direção à célula hospedeira penetrando nas invaginações. A forma do cisto tem forma esférica com superfície espessa e lisa com parede celular medindo entre 100 a 160 nm de espessura.
- Reação de coloração: as espécies de *Pneumocystis* contêm uma família de glicoproteínas de superfície (MSGs), que são o principal componente antigênico na superfície desses organismos. Os biofilmes podem ser validados quanto à presença de MSGs pela coloração com um anticorpo monoclonal (RA-E7).
- Crescimento: o crescimento de *Pneumocystis* dentro dos alvéolos pulmonares é semelhante à formação de um biofilme. Tem potencial de se desenvolver com baixa concentração de oxigênio.
- Potencial patogênico: causam pneumonia muitas vezes letal em mamíferos com estado imunológico comprometido.

- *Bordetella bronchiseptica*

É uma bactéria zoonótica, com sua virulência ligada à pertactina, fímbrias e à hemaglutinina filamentosa. São esses fatores que garantem a ligação aos cílios do

trato respiratório do animal. Estes fatores acima são controlados por um sistema de genes de virulência, sendo só expressados na fase virulenta da bactéria. Especificamente, a *Bordetella bronchiseptica* produz uma hemolisina-adenilato ciclase, toxina essa que tem como alvo principal os fagócitos (LEVY *et al.*, 2002).

- Localização: epitélio pulmonar (brônquios).
- Morfologia: Pequenos bastonetes móveis (0,2-0,5 x 0,5-2,0 µm), que aparecem sozinhos ou em pares.
- Reação de coloração de gram: gram-negativa
- Atividade de uréase, catalase, oxidase: ambas positivas.
- Crescimento: aeróbico obrigatório móvel, formam pequenas colônias brancas acinzentadas e brilhantes (1-2 mm de diâmetro após 24-48 horas de incubação). Pode dar uma fina zona de hemólise em ágar de sangue bovino (mas não em ágar de sangue de cavalo). Tem temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 37°C, sendo o meio Smith-Baskerville o ideal para cultivo de *B. bronchiseptica*.
- Potencial patogénico: podem causar pneumonia, corrimento nasal, dispneia e anorexia. Infecções subclínicas são comuns.

- *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi é um protozoário intracelular obrigatório, com potencial de causar infecções espontâneas em uma grande variedade de animais de laboratório, incluindo coelhos e ratos (SCHMIDT *et al.*, 1984).

- Localização: células e órgãos (cérebro e rim).
- Morfologia: *E. cuniculi* é oval, mede 1,5 x 2,5 µm e é circundado por uma espessa camada de esporos. Seu estágio de esporo possui um filamento polar que é enrolado, com o interior do esporo em aproximadamente cinco ou seis voltas. Preso à extremidade do filamento polar está o esporoplasma, que contém a informação genética do parasita.
- Reação de coloração de gram: gram-negativo.

- Crescimento: tentativas de cultivar *Encephalitozoon cuniculi* em meios artificiais não tiveram sucesso.
- Potencial patogénico: causam lesões no cérebro, rim, vísceras e até na medula, podendo produzir paralisia motora.

4.4 Módulo IV: controle sanitário virológico

4.4.1 Importância do monitoramento do padrão virológico

Infecções virais dentro de uma colônia são, em sua maioria, enzoóticas e assintomáticas, podendo passar despercebida pelos bioteristas, o que torna um desafio maior para seu controle. Mesmo assintomáticos, os vírus podem interferir de maneiras variadas nos resultados experimentais obtidos de animais infectados.

Pelo caráter enzoótico, uma vez presente em uma colônia, dificilmente será erradicado. Uma colônia infectada, deve-se realizar avaliação para tomada de decisões que podem envolver até a eliminação da colônia.

4.4.2 Amostragem de animais

A escolha dos animais para monitorização de infecções virais dentro de uma colônia deve ser realizada de forma aleatória, sendo constituída de animais de ambos os sexos, com idades variando entre 8 e 12 semanas, animais mais velhos com idade superior a 6 meses e casais de matrizes de descarte, que tenham ficado tempo suficiente dentro das salas de criação para ter contato com o agente infeccioso.

Devem-se priorizar nos testes animais mais velhos, uma vez que técnicas de reações sorológicas são utilizadas para a detecção do vírus, devendo haver tempo suficiente para que ocorra resposta imunológica, com produção de anticorpos séricos em níveis suficientes para serem detectados.

Quando houver indícios de doença na colônia, a gaiola contendo animais suspeitos deverá ser isolada das demais e retirada o mais rápido possível da sala de criação.

4.4.3 Frequência dos testes de monitorização sanitária das colônias

Dependendo de cada tipo de biotério, pode se realizar avaliações quinzenais, mensais, bimestrais, trimestrais, semestrais ou anuais. Este intervalo depende do estado sanitário das colônias, práticas de manejo, tipos de equipamentos utilizados para alojamento dos animais e das barreiras sanitárias de contenção.

De acordo com a FELASA, são recomendados os seguintes intervalos de avaliações:

- Colônias convencionais: a cada 6 e 12 meses.
- Colônias de animais axénicos: a cada 15 e 20 dias.
- Colônias de animais gnotobióticos: a cada 20 e 30 dias.
- Animais SPF: a cada 2 e 3 meses.

Quando se trata de modelos animais imunodeficientes ou geneticamente modificados, deve-se redobrar a atenção para agentes que seriam considerados de menor importância ou oportunistas, pois pela imunodeficiência, podem causar infecções e doenças fatais.

4.4.4 Metodologias para diagnóstico

Diversas metodologias podem ser utilizadas para a detecção da presença de vírus em colônias de animais, sendo as mais utilizadas os métodos sorológicos de inibição da hemaglutinação (IHA), ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e Imunofluorescência indireta (IFI) (OTTO *et al.*, 2006).

Métodos sorológicos buscam anticorpos séricos formados pela ativação do sistema imunológico de animais imunocompetentes que entraram em contato com o agente infeccioso. Testes sorológicos podem ser limitantes quando se trata de linhagens de animais com imunodeficiências, onde há o comprometimento da resposta imune humoral (OTTO *et al.*, 2006).

4.4.4.1 *Reação de inibição da hemaglutinação (IHA)*

Alguns vírus possuem a capacidade de se ligarem a receptores presentes nas hemácias, promovendo aglutinação, ou seja, possuem atividade hemaglutinante. Em condições específicas de pH e temperatura, a hemaglutinação é bloqueada por

anticorpos específicos presentes no soro que se ligam ao antígeno viral, podendo ser detectado. É indicado para diagnóstico confirmatório e diferencial das parvovirose murinas MMV, KRV, Toolan H-1, MPV, RPV, HaPV, RMV, porém é menos sensível que a imunofluorescência indireta e a ELISA (OTTO *et al.*, 2006).

4.4.4.2 *Reação de imunofluorescência indireta (IFI)*

Através de um fluorocromo anticorpo conjugado, onde há a conexão antígeno-anticorpo, é realizada a identificação. Esta metodologia possui alta sensibilidade e especificidade, sendo indicada para diagnóstico sorológico de infecções virais. Pode ser utilizada como método complementar para a confirmação da especificidade ou inespecificidade de resultados duvidosos, utilizando outras metodologias (OTTO *et al.*, 2006).

4.4.4.3 *ELISA*

Elisa é uma técnica muito sensível, tendo boa especificidade, por isso é bastante utilizada pelos laboratórios que realizam rotinas de diagnóstico virológico. Permite automatizar as suas etapas, facilitando o processamento de grande quantidade de amostras de soros, reduzindo o tempo até o resultado quando comparado com a técnica de imunofluorescência (LEVY 2004).

Esta técnica utiliza a reação antígeno-anticorpo através de produtos corados formados pela ação de enzimas (peroxidase, fosfatase ou urease) acopladas a um anticorpo conjugado sobre algumas soluções contendo substratos da enzima (peróxido de hidrogênio, ONPG, Ureia) e um reagente de cor (composto cromogénico) indicador da ação da enzima sobre o seu substrato (OTTO *et al.*, 2006).

4.4.4.4 *Reações sorológicas multiplexadas*

Utilizam misturas de diferentes antígenos virais acoplados a um suporte, podendo ser testados ao mesmo tempo em uma única amostra de soro (ELISA multiplexado) ou antígenos virais solúveis acoplados a microesferas onde se utilizam anti-anticorpos acoplados com diferentes tipos de fluorocromos (chamados simplesmente de conjugados) utilizados nas reações denominadas MFIA (Multiplexed

Fluorimetric Immuno Assay). Estes sistemas são automatizados, econômicos e utilizarem pequenas quantidades de reagente, permitindo testar vários antígenos numa única amostra de soro (OTTO *et al.*, 2006).

4.4.4.5 *Reação de produção anticorpos em animais (MAP/RAP/HAP)*

O teste de produção de anticorpos em camundongos, ratos e Hamsters são métodos indiretos para pesquisa de vírus contaminantes de materiais biológicos.

O teste consiste em inocular grupos da espécie animal avaliada com 4 semanas de idade, livres de agentes patogênicos especificados (SPF) imunocompetentes pelas vias oral, nasal, intra-peritoneal e intra-cerebral com amostras do material biológico. Após um período de 28 dias, testar o soro dos animais inoculados para verificar a presença de anticorpos contra agentes infecciosos.

Os animais inoculados devem ser mantidos sob rigoroso sistema de barreiras de proteção para evitar a sua contaminação, bem como a disseminação e contaminação do ambiente no caso de o material biológico estar contaminado com algum tipo de agente infeccioso.

4.4.4.6 *Métodos Moleculares*

Os diferentes tipos de reações em cadeia da enzima polimerase são utilizadas para detectar e identificar determinada sequência de ácidos nucleicos DNA ou RNA de vírus presentes nos mais diversos tipos de materiais biológicos: fezes, sangue, urina, células, tecidos, órgãos etc.

As técnicas mais utilizadas são PCR, RT-PCR, Nested PCR e Q-PCR, onde apresentam vantagens em relação aos outros métodos, sendo mais rápido e evitando a etapa de culturas para isolamento do agente infeccioso. Além disso apresentam alta especificidade e sensibilidade (OTTO *et al.*, 2006).

Apesar das vantagens, estas técnicas necessitam de reagentes caros, facilmente contamináveis, equipamentos específicos e mão de obra qualificada. Falhas na utilização destas metodologias como baixa qualidade do DNA/RNA extraído, amostragem de tecido inadequada, manuseio e processamento incorreto da amostra e escolha de primers pouco sensíveis, podem resultar em falsos positivos e falsos negativos (OHSAWA *et al.*, 1998).

4.4.5 Agentes infecciosos

- Vírus da Hepatite de camundongo

É um coronavírus encontrado em camundongo, onde sua susceptibilidade varia com a idade, a linhagem, o sexo e a virulência da cepa viral. Este vírus pode interferir em estudos imunológicos tanto em linhagens sensíveis quanto em resistentes (DORA 2022).

As vias de contaminação são a oral e a respiratória, onde aparentemente não há infecção placentária. Em animais expostos ao vírus sem prévia aquisição de imunidade, a sintomatologia começa entre 4 a 7 dias após a infecção. A urina se torna amarronzada e mancha a região perineal, há icterícia e sinais neurológicos como espasmos, incoordenação, tremores e morte, sem achados de necropsia. Podem surgir manchas pálidas no fígado e necrose no fígado, no cérebro e em alguns órgãos linfoides (SCHMALJOHN 1999).

O ELISA é o teste de escolha para monitoramento sorológico rotineiro, sendo o fígado o órgão de eleição para isolamento do vírus e a derivação cesariana é o método mais prático para eliminar o vírus de uma colônia (LEVY 2004). Recomenda-se a monitoração deste vírus a cada 3 meses.

- Rotavírus Murino

O rotavírus é um vírus RNA fita dupla, encontrado em camundongos, com período de incubação dependente da dose infectante e da idade do camundongo. O vírus pode ser eliminado continuamente do intestino até 17 dias depois da infecção, porém alguns camundongos podem apresentar anticorpos neutralizantes e continuar eliminando vírus pelas fezes (ANDRADE et al., 2002).

As fêmeas desenvolvem anticorpos neutralizantes quando expostas ao vírus e infectam sua primeira ninhada, porém oferecem considerável proteção passiva às ninhadas seguintes (ANDRADE et al., 2002).

O vírus pode ser achado em vários órgãos, mas principalmente no intestino e no conteúdo intestinal. O exame de animais infectados mostra fezes líquidas, de cor amarela, com presença de gases e lesões no intestino delgado que consistem no desprendimento das células das microvilosidades, porém camundongos adultos

infectados não apresentam lesões, ainda que estejam disseminando vírus (SCHMALJOHN 1999).

É aconselhável a monitoração deste vírus em camundongos a cada 3 meses, sendo o controle eficaz realizado através da derivação cesariana.

- Norovírus murino (MNV)

O MNV é um patógeno causador de doenças em animais de laboratório, principalmente os camundongos imunocomprometidos. Sua infecção vai de assintomática até pneumonia, hepatite e peritonite. MNV é um vírus de RNA de fita simples com polaridade positiva e simetria icosaédrica. Ele possui aproximadamente 40nm de diâmetro e é constituído de 7,7kb (TANG *et al*, 2010).

É sugerido a monitoração deste vírus em camundongos a cada 3 meses.

- Vírus minuto de camundongo (MVM)

O MVM é um pequeno vírus não envelopado pertencente à família *Parvoviridae*. Os hospedeiros naturais do MVM são camundongos de laboratório e selvagens, mas a infecção pode atingir ratos e hamsters (SCHMALJOHN 1999).

Apesar da infecção normalmente não causar sintomas em camundongos adultos saudáveis, a infecção que ocorre durante o desenvolvimento fetal ou logo após o nascimento pode resultar em danos graves a múltiplos órgãos (DORA 2022).

O MVM, como a maioria dos parvovírus, é altamente contagioso e capaz de persistir em superfícies por longos períodos, sendo transmitida principalmente por urina, fezes contaminadas e secreções nasais (SCHMALJOHN 1999).

É sugerido a monitoração deste vírus em camundongos a cada 3 meses.

- Parvovírus de camundongo

É um vírus de DNA, não envelopado comum entre camundongos de laboratório e selvagens, transmitido pela urina, fezes e secreções oro-nasais. As infecções em camundongos não provocam sinais clínicos, mesmo em animais imunodeficientes. O diagnóstico de infecção por parvovírus em camundongos geralmente é feito com

sorologia (ELISA ou IFA) ou também por PCR em tecidos ou fezes (OTTO *et al.*, 2006).

A infecção por este vírus afeta a pesquisa imunológica no camundongo, causando desarranjo da função imunológica, sendo também considerado como agente anticancerígenos devido às suas características oncolíticas e oncolíticas (DORA 2022).

É sugerido a monitoração deste vírus em camundongos a cada 3 meses.

- Parvovirose de ratos (Kilham rat vírus, Rat minute vírus, Rat parvovirus, - Toolan's H-1 virus)

São vírus de DNA, não envelopados da família Parvoviridae, com potencial de afetar ratos. Sua transmissão ocorre através da urina, fezes e secreções oro-nasais, sendo as duas últimas vias os modos mais comuns de transmissão. Também pode ocorrer por via transplacentária e resultar em infertilidade e absorção fetal (DORA 2022).

A capacidade dos parvovírus de persistir no ambiente, em equipamentos e materiais é um importante meio de transmissão. Em ratos adultos infectado pode-se observar hemorragia escrotal, emagrecimento e congestão dos gânglios linfáticos. O diagnóstico da infecção por parvovírus em ratos geralmente é feito com sorologia ou PCR detectado no pulmão (OTTO *et al.*, 2006).

É sugerido a monitoração deste vírus em ratos a cada 3 meses.

- Vírus da Encefalomielite de Theiler

O vírus é encontrado na mucosa intestinal e linfonodos mesentéricos, onde a infecção acontece por via oral-fecal. Quando ocorre viremia, o vírus se propaga do intestino para a medula espinhal, determinando um quadro clínico caracterizado por paralisia flácida de um ou ambos os membros posteriores. A lesão típica da doença é a poliomielite não supurativa com necrose e neuronofagia. O diagnóstico é sorológico, sendo mais definitivo a partir do isolamento do vírus, presente na medula espinhal e no cérebro de animais doentes, em células BHK-21 (DORA 2022).

É sugerido a monitoração deste vírus em camundongos a cada 3 meses.

- Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV)

Trata-se de um arenavírus envelopado onde apenas os camundongos e os hamsters são transmissores da doença, podendo eliminar altas concentrações do vírus na urina, saliva e leite. A evolução do vírus pode ser fatal dependendo da linhagem do hospedeiro, via de inoculação e idade. Quando inoculado por via intracerebral, o vírus causa convulsões e morte, porém quando inoculado por via intravenosa, produz baixa incidência da doença com pelagem áspera e letargia (DORA 2022).

O diagnóstico é realizado por meio da sorologia (imunofluorescência, ELISA) e da inoculação de animais com amostras do fígado de animais suspeitos. Por se tratar de enfermidade transmitida verticalmente, tanto pelas células germinais quanto pela placenta, a derivação cesariana é uma ferramenta eficiente para conter o vírus (OTTO *et al.*, 2006).

É sugerido a monitoração deste vírus em camundongos anualmente e em hamsters a cada 3 meses.

- Adenovírus de camundongo tipo 1 (FL)

O adenovírus de camundongo tipo 1 causa uma doença fatal em camundongos recém-nascidos e adultos imunocompetentes mesmo em doses muito baixas. A infecção em camundongos imunodeficientes pode resultar em pneumonia, hepatite, encefalite, gastroenterite e doença disseminada envolvendo múltiplos órgãos. Este vírus tem como alvo as células endoteliais em todo o camundongo, com os níveis mais altos de vírus sendo encontrados no cérebro, medula espinhal e baço (MOORE *et al.*, 2004).

É sugerido a monitoração deste vírus em camundongos e ratos anualmente.

- Adenovirus de camundongo tipo 2 (K87)

O adenovírus tipo 2 (K87) foi isolado de fezes de camundongos de laboratório no Japão em 1966. Tanto em células cultivadas quanto em camundongos este vírus tem tropismo por células do trato intestinal, mas aparentemente não causa doença em camundongos. É um vírus não envelopado, enterotrópico, sendo transmitido pelas

fezes. Seus sintomas podem ser corrimento e inclusões intranucleares no epitélio da mucosa do intestino delgado e do ceco (DORA 2022).

É sugerido o monitoramento em camundongos e ratos anualmente.

- Vírus da Ectromélia (Mousepox vírus)

São vírus envelopados considerados como um dos mais importantes em camundongos, sendo capazes de alterar resultados experimentais. A enfermidade pode existir em três formas: aguda, crônica e latente. A forma aguda é rapidamente letal, podendo matar mais de 90% da colônia. A forma crônica se desenvolve com lesões típicas na epiderme do camundongo. A forma latente pode ser totalmente inaparente, no entanto, porém os camundongos podem transmitir a enfermidade sem apresentar anticorpos detectáveis (DORA 2022).

Sua transmissão pode ser por escoriações na pele, inalação ou por ingestão. Os filhotes sobrevivem, porém ficam infectados e posteriormente atuam como disseminadores de vírus.

Deve-se monitorar este vírus em camundongos anualmente.

- Vírus da Pneumonia Murina

O vírus da pneumonia murina é um paramixovírus, com RNA de fita simples, termolábil, sensível ao éter e apresenta afinidade pelo tecido pulmonar de uma variedade de mamíferos, somente transmitido por instilação nasal.

Pode ser encontrado em camundongos, ratos e hamsters, com sintomas encontrados em necropsias, com pulmões difusamente congestionados de coloração vermelha escura. O diagnóstico de laboratório se baseia na demonstração da presença de anticorpos de inibição da hemaglutinação (HI), anticorpos fixadores do complemento (FC) e passagens seriadas em camundongos de 7 a 9 dias, com o aparecimento de sinais típicos da infecção e o isolamento do vírus (DORA 2022).

Pela incapacidade do vírus de atravessar a barreira placentária, a derivação cesariana pode ser utilizada como ferramenta eficiente, quando combinada com exames sorológicos periódicos (OTTO *et al.*, 2006).

É recomendável a monitoração em camundongos anualmente e ratos a cada 3 meses.

- Reovírus tipo 3

O reovírus é um vírus de RNA não envelopado da família Reoviridae, considerada uma infecção rara. É transmitido por via fecal-oral, contato direto e vias respiratórias, bem como por exposição a fômites. Geralmente não há sinais clínicos associados à infecção natural por Reovirus, nem há patologia associada. O diagnóstico é realizado por sorologia (MFI, IFA) ou PCR (OTTO *et al.*, 2006).

Se recomenda o monitoramento deste vírus em camundongos e ratos anualmente.

- Vírus Sendai

É um vírus envelopado, sensível aos solventes orgânicos (éter, clorofórmio). O vírus já foi isolado em camundongos, ratos e hamsters. Em cobaias, já foi detectada evidência sorológica, porém o vírus ainda não foi isolado.

Sua transmissão se dá por contato direto ou por aerossóis. A via de infecção é a nasal e o período de incubação é de 9 a 14 dias. Microscopicamente, observa-se pneumonia intersticial complicada por infecções bacterianas secundárias. O diagnóstico é confirmado através da sorologia, isolamento do vírus em ovo embrionado ou em culturas de células renais de macaco, onde se observa o efeito citopático (DORA 2022).

Se recomenda o monitoramento deste vírus em camundongos e ratos anualmente e em cobaias e hamsters a cada três meses.

- Coronavirus de rato (Sialodacrioadenitis vírus)

O coronavírus é um vírus de RNA envelopado com duas cepas identificadas como causadoras de doenças em ratos. O coronavírus de rato (RCV ou coronavírus de rato de Parker) causa infecção respiratória, enquanto o vírus da sialodacrioadenite (SDAV) infecta o trato respiratório superior, as glândulas lacrimais de Harder e exorbitais e as glândulas salivares submandibular e parótida. As infecções por coronavírus são geralmente subclínicas, mas podem causar doença clínica em ratos imunodeficientes. Ratos infectados podem exibir secreção oculonasal de porfirina. A

glândula salivar submandibular pode estar aumentada palpavelmente devido a sialoadenite (DORA 2022).

O teste diagnóstico mais comum é a sorologia usando MFI e IFA (OTTO *et al.*, 2006). É recomendável o monitoramento deste vírus em ratos a cada três meses.

- Theilovirus de rato

O teilovírus de rato pertence à família picornaviridae. É um vírus de RNA de sentido positivo, não envelopado, de cadeia simples (CASTRUCCI *et al.*, 1984).

Sua transmissão ocorre pelo contato com fezes e urina (cama suja). A maioria dos ratos infectados não expressa sinais clínicos da doença, nem lesões macroscópicas ou histológicas. A detecção sorológica pode ser usada usando MFI ou IFA, ou também a PCR utilizando amostra de fezes (GUO *et al.*, 2012).

É recomendado o monitoramento deste vírus em ratos a cada 3 meses.

- Hantaviruses

Os hantavírus são vírus envelopados com genoma de RNA de cadeia negativa tripartid. É um extenso grupo de vírus que circula em roedores, animais insetívoros e morcegos, mas causam doenças em humanos. Faz parte do gênero Orthohantavirus da família Hantaviridae da ordem Bunyvirales (SCHMALJOHN 1999).

Os hantavírus causam duas formas de doença aguda grave: febre hemorrágica com síndrome renal (HFRS) e síndrome cardiopulmonar por hantavírus (HCPS), também conhecida como síndrome pulmonar por hantavírus (HPS). Sua transmissão acontece pelo contato com a urina e saliva ou por via sexual, onde cada hantavírus é transportado principalmente por uma espécie distinta de roedor, embora várias trocas de hospedeiros pareçam ter ocorrido durante milhões de anos (SCHMALJOHN 1999).

É aconselhável a monitoração em ratos anualmente.

- Guinea pig adenovírus

Adenovírus é um vírus de DNA não envelopado que causa doenças respiratórias em cobaias, transmitido por contato direto (KAJON *et al.*, 2020).

Alguns sinais como anorexia e dispnéia pode ser encontrados nesta infecção. A traqueobronquite é a manifestação mais comum desta doença, podendo desenvolver pneumonia com consolidação cranioventral mínima a moderada dos pulmões. A infecção causa bronquiolite necrotizante com descamação do epitélio e infiltrações peribronquiolares e perivasculares granulomatosas (DORA 2022).

O diagnóstico pode ser feito por identificação histopatológica de inclusões e sorologia, sendo recomendado o monitoramento de cobaias a cada três meses.

- Guinea pig parainfluenza virus 3

Os vírus parainfluenza (PI-1, -2 e -3) são vírus de RNA envelopados, transmitidos por contato direto e aerossol, raramente sendo encontrado. O diagnóstico é feito por sorologia (MFI, IFA) (OTTO *et al.*, 2006).

Alguns vírus podem induzir defeitos nas atividades de macrófagos alveolares pulmonares (PAMs), leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e linfócitos. No caso deste vírus, ele estimula dose-dependente a geração de quimioluminescência por PAMs e induz a agregação de PAMs. Esses defeitos prejudicam a depuração bacteriana nos pulmões e podem ser parcialmente responsáveis pelo aumento da suscetibilidade do hospedeiro a infecções bacterianas secundárias após infecção viral (OHSAWA *et al.* 1998).

É aconselhável monitorar este vírus em cobaias cada três meses.

- Citomegalovírus de cobaia (GPCMV)

O citomegalovírus da cobaia (GPCMV) é um vírus de DNA envelopado e membro da subfamília beta do herpesvírus. O CMV causa infecções agudas e latentes em várias espécies, cada CMV é específico do hospedeiro e é identificado pelo hospedeiro animal (HORNIG *et al.*, 2017).

É um vírus transmitido por contato com saliva ou urina, podendo permanecer latente por toda a vida do animal. Este vírus está associado à imunossupressão, causando geralmente doença aguda subclínica. Em animais jovem ou imunossuprimido pode-se observar necrose coagulativa multifocal no fígado e baço associada a inclusões intranucleares e intracitoplasmáticas (HORNIG *et al.*, 2017).

Sugere-se monitoração deste vírus em cabaias anualmente.

- Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)

RHDV é um vírus de RNA não envelopado, raramente encontrado em coelhos. Sua transmissão é principalmente por contato direto, onde mesmo após o coelho se recuperar da doença, pode continuar disseminando o vírus por até um mês. Esta doença ocorre em animais com mais de 2 meses de idade, com curso clínico durando aproximadamente 2 semanas, porém a morte do animal pode ocorrer dentro de 2 a 3 horas após o início dos sinais clínicos (DORA 2022).

Os sinais clínicos da doença aguda são: anorexia, letargia, febre e depressão, seguidos de respiração difícil, taquicardia, distensão abdominal, constipação ou diarreia. Hipotermia, epistaxe e convulsões ocorrem nos estágios terminais. Podem ser observadas hemorragias traqueais, petéquias no miocárdio, rim e baço, edema e congestão pulmonar e necrose hepática generalizada, podendo ser vistos na necropsia (ABRANTES *et al.*, 2012).

É sugerido a monitoração deste vírus em coelhos a cada 3 meses.

- Rabbit rotavírus

Rotavírus é um vírus RNA da família Reoviridae, encontrado em coelhos, transmitido via fecal-oral, com a infecção ocorrendo em animais entre 4 a 7 semanas de idade. Sua morbidade e mortalidade são geralmente baixas, mas aumentam quando a doença é complicada por outras doenças.

Os sinais clínicos podem se complicar por patógenos entéricos concomitantes, podendo incluir diarreia, variando de mole a aquosa além de letargia, anorexia e desidratação, consequências da diarreia. Além do ceco cheio de líquido, pode-se observar nesta infecção linfonodos mesentéricos aumentados. A partir de análise histológica, percebe-se vacuolização e descamação de enterócitos apicais com fusão vilosa e atrofia principalmente no jejuno e íleo, com edema na mucosa e submucosa (CASTRUCCI *et al.*, 1984).

O vírus pode ser detectado usando testes sorológicos ou amplificação de fezes por RT-PCR, usando as lesões histológicas no trato intestinal para confirmar o diagnóstico (OTTO *et al.*, 2006).

É sugerido a monitoração deste vírus em coelhos a cada 3 meses.

5 CONCLUSÕES

Diversos agentes patogênicos possuem fatores de interferência em resultados experimentais, havendo a necessidade de estudos detalhados para sua detecção, identificação e eliminação.

Muitos sinais clínicos podem não estar relacionados a doenças infecciosas, podendo ocorrer por fatores genéticos, causas nutricionais, estresse, desidratação, variações do ambiente e à idade. Dessa maneira, o diagnóstico efetivo deve ser realizado em conjunto com os resultados de provas complementares realizadas.

A identificação dos agentes patogênicos representa uma das principais etapas no controle sanitário, pois é a partir daí que se escolhe como combatê-lo. Além disso, conhecer características de cada patógeno auxilia na escolha da metodologia para sua identificação.

O conhecimento dos tipos de barreiras sanitárias, suas vantagens e desvantagens também deve ser foco para uma efetiva implementação de controles sanitários em um biotério, pois através dessas informações pode-se evitar contaminações.

Conclui-se que a busca de informações relacionadas ao monitoramento de agentes infecciosos e patológicos, deve ser uma rotina efetiva e permanente em biotérios de produção de animais.

REFERÊNCIAS ¹

- ABRANTES, J.; VAN DER LOO, W.; LE PENDU, J. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. **Vet. Res.**, v. 43, n. 12, 2012.
- ALVES, W. **Trânsito gastrintestinal em camundongos C57 durante parasitose por *Strongyloides venezuelensis***. Monografia apresentada à banca examinadora do curso de biomedicina do Campus Universitário do Araguaia – UFMT, como pré-requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, Barra do Garças – MT, 2019.
- ANDRADE, A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 2002.
- ANIMAL PARASITOLOGY - SUPPLEMENTAL VISUAL MATERIAL. K-State, 2022. Disponível em: <<https://www.k-state.edu/parasitology/625tutorials/Apicomplexa02.html>>. Acesso em: 2 dez 2022.
- API/ID32. Biomerieux, 2022. Disponível em: <<https://www.biomerieux.com.br/alimentos/apirid32>>. Acesso em: 28 nov 2022.
- AUSUBEL F.M. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley; vol. 1. p. 221-3, 1994.
- BACTRAY. wiki.ecdc.europa.eu, 2019. Disponível em: <<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/06/BACTRAY.pdf>>. Acesso em: 20/11/2022.
- BAERMANN, G. **Eine einfache methode zur auffindung von ankylostomum (Nematoden) larven in erdproben. Geneeskunding Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië**. Batavia: Javasche Boekhandel & Drukkerij, 1917.
- BAKER, D. G. **Parasitic Diseases, Chapter 13**, In American College of Laboratory Animal Medicine, The Laboratory Rat (Second Edition), Academic Press, 2006.
- BAKER, D. G. Patógenos naturais de camundongos, ratos e coelhos de laboratório e seus efeitos na pesquisa. **Clinical microbiology reviews**, v. 11.2, p 231-266, 1998.
- BISWAS, S.; ROLAIN, J. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. **Journal of microbiological methods**, v. 92, n. 1, p. 14-24, 2013.
- BOOTZ F.; KIRSCHNEK S.; NICKLAS W.; WYSS S.K.; HOMBERGER F.R. Detection of *Pasteurellaceae* in rodents by polymerase chain reaction analysis. **Lab An Sci**. v. 48, n 5, p. 542-6,1998.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação- referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; CILLI, V.; ALDROVANDI, V.; CALEFFI, F.; GATTI, R. Comparative study of rotavirus strains of bovine and rabbit origin, Comparative Immunology. **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 3–4, 1984.

CHRISTENSEN H.; BOJESEN A.M.; BISGAARD M. *Mannheimia caviae* sp. Nov., isolated from epidemic conjunctivitis and otitis media in guinea pigs. **Int J Syst Evoluc Microb.** v.61, n. 7, p. 1699-704, 2011.

CLOSTRIDIUM PILIFORME. Charles River, 2009. Disponível em: <<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/ClostridiumpiliformeTyzzer%27sDiseaseTechnicalSheet.pdf>>. Acesso em: 1 dez 2022.

COLLINS, J.; KEENEY, K.; CREPIN, V. *Citrobacter rodentium*, infecção, inflamação e microbiota. **Nat. Rev. Microbiol.** v.12, p. 612–623, 2014.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

CUBAS, Z. S. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

CUSHION, M. T.; COLLINS, M. S.; LINKE, M. J. Biofilm Formation by *Pneumocystis spp.* **Eukaryotic Cell**, p. 197-206, 2009.

DORA. ADENOVÍRUS - Doenças de animais de pesquisa. 2022. Disponível em: <<https://dora.missouri.edu/guinea-pig/adenovirus/>>, Acesso em: 20 nov. 2022.

DORA. Doenças de animais de pesquisa. 2022. Disponível em: <<https://dora.missouri.edu/rabbits/rotavirus/>>. Acesso em: 03 dez 2022.

ECDC Programme on antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. wiki.ecdc.europa.eu, 2016. Disponível em: <<https://wiki.ecdc.europa.eu/fem/Pages/ECDC%20Programme%20on%20antimicrobial%20resistance%20and%20healthcare-associated%20infections.aspx>>. Acesso em: 19/11/2022.

EMISSÃO DE GUIA DE TRANSPORTE ANIMAL – GTA. SEAGRI, 2021. Disponível em: <<https://www.agricultura.df.gov.br/emissao-de-guia-de-transporte-animal-gta/>>. Acesso em: 1 dez 2022.

ESGOTAMENTO DE INÓCULO: COMO REALIZAR ESSE MÉTODO DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS? *Vet Profissional*, 2022. Disponível em: <<https://www.vetprofissional.com.br/artigos/esgotamento-de-inoculo-como-realizar-esse-metodo-de-isolamento-de-microrganismos>>. Acesso em: 18 dez 2022.

FAUST, E. C.; D'ANTONI, J. S.; ODOM, V. Um estudo crítico da técnica laboratorial clínica para o diagnóstico de cistos de protozoários e ovos de helmintos nas fezes. Comunicação preliminar. **Sou. J. Trop. Med.**, v.18, p.169-183, 1938.

FELASA. The Federation of European Laboratory Animal Science Associations. FELASA, 2022. Disponível em: <<https://felasa.eu/>>. Acesso em: 25 nov 2022.

FICHAS TÉCNICAS. Visavet, 2022. Disponível em: <<https://www.visavet.es/guessparasite/en/fichas.php>>. Acesso em: 03 dez 2022.

FIGUEIREDO, P. C.; SERRA-FREIRE, N. M.; GRISI, L. Eimerias de bovinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro: Técnica de diagnóstico e espécies identificadas. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 24, p. 3-10, 1984.

FIRAS M.B. Detecting intestinal parasitic infections in laboratory mice. **Journal of World Poultry Research** v. 10, n. 2, p. 183-189, 2020.

FLAUSINO, G.; BERTO, B.; MCINTOSH, D.; FURTADO, T.; FILHO, W.; LOPES, C. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Eimeria caviae* from Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). **Acta protozoologica** v.53, p. 269-276. 2014.

FOTOGRAFIAS EM MICROSCÓPIO. Parasitologia Clínica UFSC, 2022. Disponível em: <<https://parasitologiaclinica.ufsc.br/index.php/info/conteudo/fotografias/ovos-hnana/>>. Acesso em: 29 nov 2022.

FOREYT, W. J. Parasitologia veterinária: manual de referência. São Paulo: **Roca**, 2005.

FOX, J. G.; DEWHIRST, F. E.; TULLY, J. G.; PASTER, B. J.; YAN, L.; TAYLOR, N. S.; COLLINS, M. J.; GORELICK, P. L.; WARD, J. M. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. **J. Clin. Microbiol.** v.32, p. 1238–1245. 1994.

FOX, J. G.; DROLET, R.; HIGGINS, R. MESSIER, R.; YAN, L.; COLEMAN, B.E.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E. *Helicobacter canis* isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, p.2479-2482, 1996.

GAJDÁCS, M.; ÁBRÓK, M.; LÁZÁR, A.; BURIÁN, K. Beta-Haemolytic Group A, C and G *Streptococcal* Infections in Southern Hungary: A 10-Year Population-Based Retrospective Survey (2008-2017) and a Review of the Literature. **Infect Drug Resist.** 2020.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, 2000.

GODOY, C. M. S. C.; MOTTA, M. C.; SPINELLI, M. O.; CRUZ, R. J.; SARTOREL, J. F. Estudo comparativo de sensibilidade das técnicas de cultura bacteriana e PCR para a detecção de *Pasteurella pneumotropica* em roedores. **RESBCAL**, São Paulo, v.1 n.3, p. 229-235, 2012.

GUO, D.; LIU, J.; LU, Y.; SUN, Y.; YUAN, D.; JIANG, Q.; LIN, H.; LI, C.; SI, C.; QU, L., Full genomic analysis of rabbit rotavirus G3P[14] strain N5 in China: Identification

of a novel VP6 genotype. **Infection Genetics and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1567-1576, 2012.

HARCOURT-BROWN, F. **Skin diseases**, Editor(s): Frances Harcourt-Brown, Textbook of Rabbit Medicine, Butterworth-Heinemann, p. 224-248, 2002.

HENRIKSEN S. A.; POHLENZ J. F. L. Staining of Cryptosporidia by a Modified Ziehl-Neelsen Technique. **Scandinavia Acta Veterinaria**, v. 22, p 594-596,1981.

HJORT, K.; GOLDBERG, A.; TSAOUSIS, A. D.; HIRT, R; EMBLEY, T. Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, **Biological sciences**. v. 365, p. 713-27, 2010.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J.L. O método de sedimentação-concentração na esquistossomose mansônica. Porto Rico, **J. Publ. Saúde**, n. 9, p. 281-298, 1934.

HORNIG, J.; CHOI, K. Y.; MCGREGOR, A. The essential role of guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) IE1 and IE2 homologs in viral replication and IE1-mediated ND10 targeting. **Virology**, v. 504, p. 122-140, 2017.

KADOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Rev. Bras. Farm.** v. 93, n.2, p. 129-133, 2012.

KAJON A. E.; LI, X.; GONZALEZ, G. **Isolamento e propagação inicial do adenovírus de cobaia (GPAdV) em linhagens celulares**. F1000Research 2020, 8:1597 MAR 2022.

KIMURA, R.; HAYASHI, Y.; TAKEUCHI, T.; SHIMIZU, M.; IWATA, M.; TANAHASHI, J.; ITO, M. *Pasteurella multocida* septicemia caused by close contact with a domestic cat: case report and literature review. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 10, p. 250-252, 2004.

LAPCHIK V. B. V.; MATTARAIA V. G. M.; KO G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 708p, 2009.

LEVY, C. E. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Salvador, 2004.

LING, T. K.; LIU, Z. K.; CHENG, A. F. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. **J Clin Microbiol**. v. 41, n. 10, 2003.

MÄHLER, M.; BEDIGIAN, H. G.; BURGETT, B. L.; BATES, B. R.; HOGAN, M. E.; SUNDBERG, J. P. Comparison of four diagnostic methods for detection of *Helicobacter* species in laboratory mice. **Lab Anim Sci**. v. 48, n.1, p. 85-91,1998.

MAHLER, M.; BERARD, M.; FEINSTEIN, R.; GALLAGHER, A.; ILLGEN-WILCKE, B.; PRITCHETT-CORNING, K.; RASPA, M. FELASA working group on revision of

guidelines for health monitoring of rodents and rabbits. **Laboratory Animals** v. 48, n.3, p. 178–192, 2014.

MATHISON, B. A.; PRITT, B. S. Parasites of the Gastrointestinal Tract. Editor Rezaei, Encyclopedia of Infection and Immunity, **Elsevier**, p. 136-203, 2022.

MEHLHORN, H. *Polyplax serrata*, Enciclopédia de Parasitologia. Disponível em: <https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-540-48996-2_2487#citeas>. Acessado em: 15 dez 2022.

MOORE, M. L.; MCKISSIC, E. L.; BROWN, C. C.; WILKINSON, J. E.; SPINDLER, K. R. Fatal disseminated mouse adenovirus type 1 infection in mice lacking B cells or Bruton's tyrosine kinase. **J. Virol.** v. 78, p. 5584–5590, 2004.

MORAES, R.G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço de Saúde Pública** (Rio de Janeiro), v. 1, p. 507-624, 1948.

NEWSOME, B. T.; BURICH, A., HANES, M., **Infectious Diseases**. In American College of Laboratory Animal Medicine, The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents, Academic Press, 2012.

NICKLAS, W.; BANEUX, P.; BOOT, R.; DECELLE, T. DEENY, A. A.; FUMANELLI, M. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Lab Anim.** v.36, n. 1, p 20-42, 2002.

OHSAWA, K.; YAMADA, A.; TAKEUCHI, K.; WATANABE, Y.; MIYATA, H.; SATO H. Genetic characterization of parainfluenza virus 3 derived from guinea pigs. **J Vet Med Sci.** v. 60, n. 8, p. 919-22, 1998.

O'ROURKE, D. **Disease Problems of Guinea Pigs, Rabbits, and Rodents** (Second edition), W.B. Saunders, p. 245-254, 2004.

OTTO, G.; FRANKLIN, C. L. **Medical Management and Diagnostic Approaches**. American College of Laboratory Animal Medicine, The Laboratory Rat (Second Edition), Academic Press, p. 547-564, 2006.

PAREL, J. D.; GALULA, J. U.; OOI, H. K. Characterization of rDNA sequences from *Syphacia obvelata*, *Syphacia muris*, and *Aspicularis tetraptera* and development of a PCR-based method for identification. **Vet Parasitol.** 2008.

PAULL, G.; MATTHEWS, R. *Spiroucleus vortens*, a possible cause of hole-in-the-head disease in cichlids. **Diseases of aquatic organisms**, v. 45, n. 3, p. 197-202, 2001.

REHBINDER, C.; BANEUX, P.; FORBES, D.; VAN HERCK, H.; NICKLAS, W.; RUGAYA, Z.; WINKLER, G. Report of FELASA working Group on Animal Health. Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guineapig and rabbit experimental units. **Lab Anim.** 1996.

Resistência microbiana – Mecanismos e Impacto Clínico. www.anvisa.gov.br. Disponível em:

<https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opus_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 19/11/2022.

ROCA, I.; AKOVA, M.; BAQUERO, F. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New microbes and new infections**. v. 6, p. 22-29, 2015.

RONALD, N.; WAGNER, J. The Arthropod Parasites of the Genus *Cavia*. In American College of Laboratory Animal Medicine, The Biology of the Guinea Pig, **Academic Press**, 1976.

RUOFF, K. L.; WHILEY, A.; BEIGHTON, D. **Streptococcus. Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, DC, 2003.

SANT'ANNA, L. M. L.; OLIVEIRA, F. J. O.; MELO, C. M. M. Estudo comparativo de técnicas parasitológicas baseada no princípio de sedimentação espontânea (Hoffman) e Parasitokit®. **Scire Salutis** v.3, n.1, p.6-15, 2013.

SASAKI, H.; KAWAMOTO, E. E.; TANAKA, Y.; SAWADA, T.; KUNITA, S.; YAMAGMI, K. Comparative analysis of *Pasteurella pneumotropica* isolates from laboratory mice and rats. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 95, p. 311-7, 2009.

SCHMALJOHN, C. S. HANTAVIRUSES (BUNYAVIRIDAE). **Encyclopedia of Virology** (Second Edition), Elsevier, p. 621-630, 1999.

SCHMIDT, E. C.; SHADDUCK, J. A. Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. **The Journal of Immunology**, v.133, p. 2712, 2719, 1984.

SHADDUCK, J. A.; PAKES, S. P. Encephalitozoonosis (Nosematosis) and toxoplasmosis. **Am. J. Pathol.** v. 64, n. 657. 1971.

SHEATHER, A. The Detection of Intestinal Protozoa and Mange Parasites by a Floatation Technique. **Journal of Pathology and Therapy**, v. 36, n. 4, 1923.

SILVA, A.S.; TOCHETTO, C.; MAHL, D.L.; FACCIO, L.; DAU, S.L.; ZANETTE, R.A.; MONTEIRO, S.G. Infestação por *Leporacarus gibbus* em coelhos domésticos no Brasil. **Revista Estudos de Biologia**, v. 28, n. 65, p. 127-129, 2006.

SURSAL, N.; YILDIZ, K. The first record on *Giardia muris* from mice in Turkey. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, p. 457–461, 2020.

TANG, Q.; LI, D.; XU, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; LI, Z.; XUE, C. Mechanism of inactivation of murine norovirus-1 by high pressure processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 186-189, 2010.

TANIDEH, N.; SADJJADI, S.; MOHAMMADZADEH, T.; MEHRABANI, D. Helminthic Infections of Laboratory Animals in Animal House of Shiraz University of Medical Sciences and the Potential Risks of Zoonotic Infections for Researchers. **Iranian Red Crescent Medical Journal** v. 12, 2010.

TOWNSEND, K. M.; FROST, A. J.; LEE, C. W.; PAPADIMITRIOU, J. M.; DAWKINS, H. J. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. **J Clin Microbiol.** v.36, n. 4, p. 1096-100, 1998.

TULLY, T. N. MICE AND RATS. Manual of Exotic Pet Practice, W.B. **Saunders**, p. 326-344, 2009.

VÍRUS DA DOENÇA HEMORRÁGICA VIRAL (RHDV) - Doenças de animais de pesquisa. Dora, 2022. Disponível em:< <https://dora.missouri.edu/rabbits/viral-hemorrhagic-disease-virus-rhdv/>>, Acesso em: 20 nov 2022.

WEISBROTH, S. H.; KOHN, D. F.; BOOT, R. Chapter 11 - **Bacterial, Mycoplasmal and Mycotic Infections**, Editor(s): Mark A. Suckow, Steven H. Weisbroth, Craig L. Franklin, In American College of Laboratory Animal Medicine, The Laboratory Rat (Second Edition), Academic Press, Pages 339-421, 2006.

WEISER, J. N. The *pneumococcus*: why a commensal misbehaves. **J Mol Med (Berl)**. v. 88, n. 2, p. 97-102, 2010.

WILLIS, H. H. Um método simples de levitação para a detecção de óvulos de ancilostomídeos. **Med. J. Aust.** v.11, p.375-376, 1921.

YANG, J.; YANG, H.; SHUN, C.; WANG, T.; CHIEN, C.; KAO, J. Y. Catechins and Sialic Acid Attenuate *Helicobacter pylori*-Triggered Epithelial Caspase-1 Activity and Eradicate *Helicobacter pylori* Infection, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.