

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS (PPGMPA)

CARLOS ALBERTO MÜLLER

INTERFERÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NA MICROBIOTA DE
CAMUNDONGOS MANTIDOS EM BIOTÉRIOS DE EXPERIMENTAÇÃO.

NITERÓI
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CARLOS ALBERTO MÜLLER

INTERFERÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NA MICROBIOTA DE
CAMUNDONGOS MANTIDOS EM BIOTÉRIOS DE EXPERIMENTAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense, como requisito
parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. WALTER LILENBAUM

NITERÓI

2009

CARLOS ALBERTO MÜLLER

INTERFERÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NA MICROBIOTA DE
CAMUNDONGOS MANTIDOS EM BIOTÉRIOS DE EXPERIMENTAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em 06 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Otilio Machado Pereira Bastos
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Walter Lilenbaum - Orientador
Universidade Federal Fluminense

NITERÓI

2009

Dedicada, com o mais profundo afeto,

Aos meus pais, Dora e Orestes (*in memoriam*),
pelos ensinamentos e pelo amor incondicional,
dando sentido à minha vida.

Aos meus queridos filhos Marcelo,
Rodrigo e Leandro, que cresceram
superando todas as minhas expectativas.

À Rita Leal Paixão, pela amizade,
pelo carinho, pela compreensão, enfim,
por tudo e por tanto, o amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Não há como ter uma hierarquia nos agradecimentos. Este trabalho é o resultado de um conjunto de colaborações que serão citadas aqui sem uma ordem bem definida, sem grau de importância, sem julgar uma mais indispensável que outra.

Ao meu orientador e amigo, Walter Lilenbaum, pelo carinho e incentivo, apontando no momento certo o rumo desta dissertação.

Ao Dr. Carlos Henrique Klein pela ajuda nos resultados estatísticos.

Aos meus queridos colegas e funcionários do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz, pelo irrestrito empenho e dedicação em prol da ética, da biossegurança e do bem-estar dos animais.

Aos Drs. Simone Ramos e Alexandre Saísse e a toda equipe do Laboratório de Controle de Qualidade Animal do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz, pelo controle sanitário executado, imprescindível para a realização desta dissertação.

Ao Dr. Hermann Schatzmayr, amigo e companheiro, maior incentivador na minha vida de pesquisador.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas pela dedicação, competência e interação com a turma.

Aos meus colegas de turma pelos momentos de alegria e descontração.

*“Não é o mais forte nem o
mais inteligente que sobrevive.
É o mais adaptado a mudanças”*

Charles Darwin

RESUMO

Um adequado controle microbiológico dos animais utilizados em pesquisas é de fundamental importância, não apenas devido ao potencial patogênico de tais agentes para os animais e para as pessoas, mas também porque estes podem interferir nos resultados de experimentos, alterando a reprodutibilidade e qualidade das pesquisas realizadas. Atualmente diversas práticas de biossegurança e monitorização da saúde dos animais são preconizadas, a fim de garantir animais de adequado padrão microbiológico. Neste estudo, compararam-se dois biotérios de experimentação do Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, sendo um bioprotetido (A) e o outro não (B), quanto ao padrão microbiológico dos camundongos, objetivando verificar a influência da contaminação ambiental na microbiota dos animais utilizados em experimentação. Bactérias, vírus e endoparasitos foram investigados em ambos os biotérios, de acordo com a metodologia preconizada para cada agente. Para os testes bacteriológicos utilizou-se amostras de 222 animais do biotério A e 236 do biotério B; para os testes virológicos, 119 do biotério A e 236 do biotério B; já para os exames parasitológicos, utilizou-se 158 do biotério A e 316 do biotério B. Os dados foram submetidos à análise descritiva e ao teste do Qui-quadrado. Os resultados indicaram uma maior ocorrência de microrganismos e de parasitas no biotério não-bioprotetido. *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella sp.* e *Salmonella sp.* foram encontradas em ambos os biotérios, enquanto que vírus e parasitos só foram detectados no biotério não-bioprotetido. Dentre os vírus, nos animais infectados, o de maior ocorrência foi o Vírus da Hepatite de Camundongos (MHV) e, dentre os parasitos, o de maior ocorrência foi *Syphacia sp.* Concluiu-se que o biotério bioprotetido foi capaz de garantir padrões microbiológicos mais adequados para a experimentação animal e que esta deve ser uma prática constante nas instituições de pesquisa.

Palavras chave: biossegurança, biotérios, camundongos, contaminação, microrganismos.

ABSTRACT

An adequate control of microbiological quality of animals used in research is of fundamental importance, not only because of the pathogenic potential of such agents for animals and people, but also because they may interfere with the results of the experiments, changing the quality and reproducibility of researches. Currently various biosafety practices and monitoring of animal health are recommended to ensure adequate microbiological standard of animals. In this study, we compared two facilities of animal experimentation, one bioprotected (A) and the other not (B), in order to check the influence of environmental contamination in the microbiota of the animals used for experimentation. Bacteria, viruses and endoparasites have been investigated in both facilities, according to the methodology proposed for each agent. For the bacteriological tests, a sample of 222 animals in the facility A and 236 of the facility B was used; for the virological tests, 119 of the facility A and 236 of the facility B; and for parasitological examination, 158 of the facility A and 316 of the facility B. The data were submitted to descriptive analysis and to the Chi-square test. The results indicated a higher occurrence of microorganisms and parasites in animals from the not bioprotected facility. *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella sp.* and *Salmonella sp.* could be detected in both facilities, whereas viruses and parasites were found only in the non-bioprotected housed mice. Among the viruses in infected animals, the most common was the occurrence of Mice Hepatitis Virus (MHV) and among the parasites, the predominant was *Syphacia sp.* It was concluded that the bioprotected facility was able to ensure microbiological standards more suitable for animal testing and that this must be a constant practice of the research institutions.

Key words: biosafety, facilities, mice, contamination, microbiological.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS,	p. 11
LISTA DE ABREVIATURAS,	p.12
1 <u>INTRODUÇÃO</u> ,	p. 13
2 <u>OBJETIVOS</u> ,	p. 16
2.1 OBJETIVO GERAL,	p. 16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS,	p. 16
3 <u>REVISÃO DE LITERATURA</u> ,	p. 17
3.1 <u>EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</u> ,	p. 17
3.1.1 <u>Definição e importância</u> ,	p. 17
3.1.2 <u>Animais de laboratório e padrões microbiológicos</u> ,	p. 19
3.1.3 <u>Os números da experimentação animal</u> ,	p. 21
3.1.4 <u>O camundongo</u> ,	p. 24
3.1.5 <u>Ética e legislação</u> ,	p. 25
3.2 <u>BIOTÉRIOS DE EXPERIMENTAÇÃO</u> ,	p. 27
3.2.1 <u>Definição e classificação dos biotérios</u> ,	p. 27
3.2.2 <u>Instalações, macroambiente e microambiente</u> ,	p. 28
3.2.3 <u>Barreiras sanitárias e boas práticas</u> ,	p. 28
3.3 <u>BIOSSEGURANÇA</u> ,	p. 30
3.3.1 <u>Definição e importância</u> ,	p. 30
3.3.2 <u>Classificação de risco</u> ,	p. 31
3.3.3 <u>Níveis de biossegurança de laboratórios de experimentação animal</u> ,	p. 32
3.3.4 <u>Qualidade em biossegurança</u> ,	p. 33
3.3.5 <u>Aspectos da biossegurança nos processos de desinfecção</u> ,	p. 34
3.4 <u>MICROORGANISMOS EM BIOTÉRIOS</u> ,	p. 35
3.4.1 <u>Considerações gerais</u> ,	p. 35
3.4.2 <u>O risco da introdução de microrganismos indesejáveis</u> ,	p. 35
3.4.3 <u>O monitoramento dos agentes biológicos</u> ,	p. 36
3.4.3.1 Bactérias,	p. 38
3.4.3.2 Vírus,	p. 45
3.4.3.3 Parasitos,	p. 49
3.5 <u>MICROBIOTA DO ANIMAL E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL</u> ,	p. 52

4	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	p. 55
4.1	<u>DESENHO DO ESTUDO</u>	p. 55
4.2	<u>LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO</u>	p. 55
4.3	<u>ANIMAIS UTILIZADOS</u>	p. 56
4.4	<u>PROCEDIMENTOS</u>	p. 56
4.4.1	<u>Caracterização, descontaminação e controle dos biotérios</u>	p.56
4.4.2	<u>Bioproteção dos Biotérios</u>	p. 57
4.4.3	<u>Coleta das Amostras</u>	p. 58
4.4.4	<u>Análises microbiológicas e parasitológicas</u>	p. 58
4.5	<u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	p. 60
5	<u>RESULTADOS</u>	p. 61
6	<u>DISCUSSÃO</u>	p. 68
7	<u>CONCLUSÕES</u>	p. 74
8	<u>OBRAS CITADAS</u>	p. 75
9	<u>ANEXOS</u>	p. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação das proporções de categorias de animais utilizadas para fins experimentais e outros fins científicos, nos 25 Estados-Membros da União Europeia em 1996, 1999, 2002 e 2005..... p. 23

Tabela 2: Listagem de agentes a serem monitorados em biotérios de camundongos de acordo com as recomendações da FELASA (2002)..... p. 37

Tabela 3: Pontos de ambiente de cada um dos biotérios estudados submetidos à coleta de material para fins de investigação de presença de bactérias.... p. 63

Tabela 4. Presença de Bactérias, Vírus e Parasitos em Biotérios de Camundongos Bioprotetido (A) e Não-Bioprotetido (B)..... p. 64

Tabela 5 – Número de amostras positivas para a pesquisa de bactérias em Biotérios de camundongos Bioprotetido (A) e Não-Bioprotetido (B)..... p.65

Tabela 6 – Número de amostras positivas para a pesquisa de anticorpos antivirais em Biotérios de camundongos Bioprotetido (A) e Não-Bioprotetido (B)..... p. 66

Tabela 7 – Número de amostras positivas para a pesquisa de parasitos em Biotérios de camundongos Bioprotetido (A) e Não-Bioprotetido (B)..... p. 67

LISTA DE ABREVIATURAS

BPL - Boas Práticas de Laboratório
CEA - Centro de Experimentação Animal
CEC - Comissão das Comunidades Europeias
CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório
CSB - Cabine de Segurança Biológica
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDMI - Exame Direto da Mucosa Intestinal
ELISA - Imunoensaio enzimático adsorvido
FELASA - Federação das Associações Europeias de Ciência de Animais de Laboratório
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FD - Flora definida
GF - Livre de microrganismos
IOC - Instituto Oswaldo Cruz
LCMV - Vírus da Coriomeningite Linfocítica
MVM - Vírus diminuto de camundongo
MHV - Vírus de Hepatite de camundongo
NBA-1 - Nível de Biossegurança 1
NBA-2 - Nível de Biossegurança Animal 2
NBA-3 - Nível de Biossegurança Animal 3
NBA-4 - Nível de Biossegurança Animal 4
OECD - Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento
OGM - Organismo Geneticamente Modificado
OMS - Organização Mundial da Saúde
POP - Procedimento Operacional Padrão
PVM - Vírus da Pneumonia do Camundongo
RNA - Ácido ribonucleico
SPF – Livre de patógenos específicos
TMEV - Vírus da Encefalomielite Murina de Theiler
UE - União Europeia

1 INTRODUÇÃO

Os animais de laboratório, até o momento, são essenciais para a pesquisa biomédica, sendo em sua maioria roedores, principalmente camundongos. Cada uma de suas linhagens é recomendada a diferentes áreas de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, permitindo o conhecimento de mecanismos de processos vitais, como também no aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças. Embora sejam feitas pesquisas envolvendo animais há séculos, a “ciência dos animais de laboratório” só emergiu como campo profissional a partir dos anos 1950. Desde então, vem se desenvolvendo importantes padrões de cuidados para animais usados em pesquisas, considerando-se que as condições destes animais devem ser apropriadas para sua espécie e contribuir para sua saúde e bem-estar, assim como os resultados adquiridos nessas pesquisas devem ser confiáveis. Alojamentos e cuidados adequados aos animais são essenciais à saúde e à segurança tanto dos animais quanto das pessoas envolvidas com estes e a qualidade dos dados de pesquisa está diretamente relacionada à fidedignidade dos cuidados com os animais.

Neste cenário, o conhecimento do padrão microbiológico dos animais tornou-se fundamental para propiciar a adequada utilização e confiabilidade nos resultados adquiridos, a partir dos experimentos realizados em animais. A pesquisa biomédica exige, hoje, o uso somente de animais de alta qualidade, microbiologicamente definidos.

Podemos definir como animais “convencionais”, aqueles criados em biotérios que não possuem barreiras sanitárias adequadas para impedir a introdução de microrganismos; desta forma os animais albergam uma microbiota desconhecida (IVIS, 2003). Já os animais “livres de patógenos específicos” (“specific pathogen free” - SPF) são aqueles isentos de

organismos patogênicos definidos que causam doenças clínicas ou subclínicas ou, ainda, potencialmente patogênicos a uma determinada espécie animal. Esse padrão de saúde dependerá de uma lista individual de exclusão de microrganismos. Os animais SPF são mantidos em biotérios que possuem eficientes barreiras sanitárias ou são alojados em equipamentos que lhes garantam seu padrão microbiológico. Sua microbiota normal é controlada, de forma que alberguem somente agentes não patogênicos. A microbiota é desconhecida, porém os microrganismos patogênicos que são indesejáveis não devem ser detectados nos exames realizados (GÓRSKA, 2000).

A qualidade microbiológica implica na necessidade de segurança adicional, visto o alto risco de introduzir uma infecção em colônias de roedores no recebimento de animais. Esta prática é rotineira nos biotérios de experimentação animal, visto que a todo instante animais são introduzidos nessas instalações, colocando-se a população animal residente em risco cumulativo. A qualidade microbiológica dos animais de laboratório vem melhorando significativamente, devido aos programas de controle de saúde animal (MARQUES, 2006).

O recebimento de um único animal infectado pode causar uma epidemia nos animais albergados no biotério, acarretando perda de tempo, recursos e dados de pesquisa, já que a eliminação da contaminação de um patógeno no biotério é laboriosa e pode levar anos. Uma vez que a introdução de novos animais é imprescindível na realização de determinadas pesquisas, faz-se necessário minimizar os riscos por meio de exames do padrão de saúde para os novos animais. A ocorrência de enfermidades nos animais residentes pode ser evitada por precauções que devem ser tomadas na origem dos animais (IVIS, 2003; NRC, 2003). Assim, a qualidade começa com a definição do padrão microbiológico e parasitário do animal.

A decisão sobre quais agentes devem ser monitorados é específica para cada instituição. A tolerância ao risco, o uso de animais importados, o tempo de alojamento nas instalações e as implicações financeiras constituem fatores a serem considerados. Nicklas (1999) destaca ainda que, no monitoramento sanitário dos animais, deve-se definir quais os microrganismos mantidos, o tamanho da amostra, sua frequência e a idade dos animais.

Na interpretação do padrão microbiológico dos animais de laboratório, infecção não é sinônimo de doença (BAKER,1998). A infecção indica a presença do microrganismo, que pode ser patogênico, oportunista ou comensal, sendo os dois últimos mais numerosos. Poucos microrganismos encontrados hoje em animais de laboratório determinam manifestações clínicas. No entanto a presença destes, mesmo sem determinar doença, pode interferir nos resultados do experimento. Portanto, animais considerados saudáveis podem ser inadequados para pesquisas devido a falhas de avaliação dos sinais clínicos locais, sistêmicos ou comportamentais, causados pela presença de vírus, bactérias e parasitos que possam estar infectando ou parasitando o animal. Muitas infecções em roedores são subclínicas e modificações nos resultados de pesquisas ocorrem por infecções naturais com ausência de manifestações clínicas.

Segundo critérios estabelecidos internacionalmente, uma pesquisa só é válida quando feita em animais mantidos sob rigorosas barreiras sanitárias e monitorados constantemente, como os que recebem o selo SPF. Para garantir a continuidade dos trabalhos com segurança e qualidade, os animais são frequentemente monitorados por exames laboratoriais e o ambiente controlado por processos de higienização, desinfecção, sanitização e esterilização das áreas. Todo este processo é denominado de bioproteção.

Por todas essas razões, é fundamental que cada instituição estabeleça o seu programa de monitoramento de saúde animal, que leve em conta a padronização microbiológica e as práticas de biossegurança adequadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Observar se as práticas de biossegurança adotadas são capazes de controlar a microbiota normal, bacteriana, viral e parasitária, de camundongos alojados em biotérios de experimentação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Pesquisar microbiologicamente agentes bacterianos, virais e parasitários do ambiente e de animais de dois biotérios de experimentação do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, sendo um deles com o ambiente bioprotetido.

2. Comparar o impacto da contaminação ambiental sobre a microbiota normal de animais SPF (“Specific Pathogen Free”) e convencionais controlados.

3. Determinar se as práticas de biossegurança adotadas no biotério bioprotetido são suficientes para controlar a contaminação dos animais e do ambiente.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

3.1.1 Definição e importância

Considera-se experimentação animal os procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas, invasivas ou não, e pré-estabelecidas, como descrito na Lei N° 11.977/2005 do estado de São Paulo, que institui o Código Estadual de Proteção dos Animais (BRASIL, SP, 2005). De acordo com Rollin (1998: 414-415), as atividades que podem ser enquadradas como “experimentação animal” são classificadas como:

1. Pesquisa básica – biológica, comportamental ou psicológica. Refere-se à formulação e testagem de hipóteses sobre questões teóricas fundamentais, tais como, a natureza da duplicação do DNA, a atividade mitocondrial, as funções cerebrais, o mecanismo de aprendizagem, enfim, com pouca consideração para o efeito prático dessa pesquisa.

2. Pesquisa aplicada – biomédica e psicológica. Formulação e testes de hipóteses sobre doenças, disfunções, defeitos genéticos, as quais se não tem necessariamente consequências imediatas para o tratamento de doenças, são pelo menos vistas como diretamente relacionadas a essas consequências. Incluem-se nesta categoria os testes de novas terapias: cirúrgicas, terapia gênica, tratamento a base de radiação, tratamento de queimaduras. A distinção entre esta categoria e a categoria 1, muitas vezes, não apresenta um ponto específico de corte.

3. O desenvolvimento de substâncias químicas e drogas terapêuticas. A diferença entre essa categoria e as anteriores é que aqui se refere ao objetivo de se encontrar uma substância específica para um determinado propósito, mais do que o conhecimento por si próprio.

4. Pesquisas voltadas para o aumento da produtividade e eficiência dos animais na prática agropecuária. Isso inclui ensaios alimentares, estudos de metabolismo, estudos na área de reprodução, desenvolvimento de agentes que visam ao aumento da produção leiteira.

5. Testes de várias substâncias quanto à sua segurança, potencial de irritação e grau de toxicidade. Dentre essas substâncias incluem-se cosméticos, aditivos alimentares, herbicidas, pesticidas, químicos industriais, drogas. As drogas, que podem ser de uso veterinário ou humano, são testadas quanto à sua toxicidade, carcinogênese, mutagênese e teratogênese.

6. Uso de animais em instituições educacionais para demonstrações, dissecação, treinamento cirúrgico, indução de distúrbios com finalidades demonstrativas, projetos científicos relacionados ao ensino.

7. Uso de animais para extração de drogas e bioprodutos, tais como vacinas, sangue, soro, anticorpos monoclonais, proteínas de animais geneticamente modificados para produzi-las, dentre outros.

Historicamente, os animais utilizados de diversas formas em atividades científicas proporcionaram benefícios à sociedade, particularmente em relação ao avanço do conhecimento científico, à medicina humana e veterinária e em relação à segurança no uso de produtos químicos. As informações necessárias para o avanço de determinadas pesquisas não podem ser obtidas somente pela observação e pelo registro daquilo que normalmente acontece e, por isso, a experimentação científica é absolutamente necessária para que o ciclo do conhecimento se efetue (POLITI et al., 2008). Atualmente, apesar de muitos esforços a fim de reduzir e substituir a utilização de animais de laboratório na experimentação biomédica, ainda não foi possível abandonar o uso destes na avaliação de segurança dos mais diferentes produtos. Há exigências das farmacopéias e de manuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) que

preconizam testes *in vivo* (GAD, 1990; BLAAUBOER et al., 1999). Os modelos animais apresentam como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com outros métodos (HEYWOOD, 1987; RIBEIRO et al., 1995; CHORILLI et al., 2007).

É incalculável o valor da contribuição dos animais de laboratório às novas descobertas para a prevenção de doenças e para a sua cura, bem como para o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento clínicos e cirúrgicos.

3.1.2 Animais de laboratório e padrões microbiológicos

O termo “animal de laboratório” designa qualquer animal utilizado em pesquisa ou ensino (SIROIS, 2007). O pesquisador biomédico trabalha com modelos animais que, necessariamente, em grau variado, diferem do homem. Entretanto, tais modelos podem ser comparados com o homem, baseados, principalmente, no que consiste em uma semelhança geral sob o aspecto de caracteres anatômicos e fisiológicos. Necessário se faz, portanto, que sejam produzidos animais que, quando inoculados com uma determinada substância, apresentem reações semelhantes às do homem. Dessa forma, os animais criados para esse fim deverão possuir as seguintes características: fácil manejo; prolificidade; docilidade; pequeno porte; baixo custo; fisiologia conhecida; ciclo reprodutivo curto (ANDRADE, 2006).

Os animais produzidos com a finalidade de serem utilizados em pesquisa devem possuir características genéticas e sanitárias avaliadas rotineiramente, visando à certificação de padrões pré-estabelecidos (MAJEROWICZ, 2008).

Os animais de laboratório mais utilizados são os roedores, onde se destacam camundongos e ratos, e por isso, mais estudados quanto ao padrão microbiológico. Quanto ao padrão microbiológico, podemos classificar em três grupos distintos (COUTO, 2006b):

1. Animais Gnotobióticos – são os animais que possuem microbiota associada definida e devem ser criados em ambientes dotados de barreiras sanitárias absolutas. São também definidos como animais que possuem

microbiota conhecida, não existente ou não detectável. A aquisição desse padrão sanitário somente é possível com a manutenção dos animais em equipamentos especiais como os isoladores. Dentre os gnotobióticos, podemos classificá-los ainda como “Germfree” (GF) ou Flora Definida (FD), de acordo com a quantidade de microrganismos que estejam associados ao animal.

“Germfree” (GF) - são animais totalmente livres de microrganismos, isto é, isentos de quaisquer parasitos internos e externos, bactérias, fungos, protozoários, algas, riquetsias e vírus. Também são conhecidos como animais axênicos (animais livres de vida associada). O método de obtenção de animais GF é por meio de intervenção cirúrgica por histerectomia estéril do útero gravídico e sua subsequente introdução num isolador estéril.

Flora Definida (FD) – são animais GF que foram intencionalmente contaminados com microrganismos ou parasitos específicos. Devem ser continuamente monitorados para constatar a presença dos organismos selecionados e a ausência de outros. Também o termo monoxênico é usado quando o animal foi infectado, deliberadamente, com apenas um tipo de microrganismo, o que equivale a dizer que possui um tipo de microrganismo associado. Dixênico é o termo designado ao animal infectado, deliberadamente, com dois tipos de microrganismos e polixênico é relativo ao animal infectado, deliberadamente, com vários microrganismos.

2. Animais Livres de Microrganismos Patogênicos Específicos (“Specific Pathogen Free”- SPF) – são animais livres de microrganismos e parasitos específicos, porém não necessariamente livres de outros não específicos. Também são denominados animais SPF aqueles que não apresentam microrganismos capazes de lhes determinar doenças, ou seja, albergam somente microrganismos não patogênicos. Para se garantir esse tipo de status sanitário é fundamental que a criação seja realizada em ambientes protegidos por barreiras sanitárias rigorosas e que ocorra frequente monitoração dos animais, para se ter certeza que contaminantes indesejáveis não se estabeleceram. Os animais SPF estão sendo cada vez mais utilizados, à medida que os pesquisadores necessitam de respostas mais confiáveis e seguras de seus experimentos.

3. Animais Convencionais – são animais que albergam microrganismos indefinidos, por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.

3.1.3 Os números da experimentação animal

Atualmente, há uma grande dificuldade em se determinar qual é o número de animais utilizados em investigações científicas em todo o mundo. A ausência de registros ou a inadequação de alguns registros em diversos países contribuem para o problema da abordagem dos números da experimentação animal. No Brasil ainda não há um sistema nacional de registro, embora isso esteja previsto na Lei Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, também conhecida como a Lei Arouca, recentemente aprovada e que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

É possível encontrar um sistema de registro sobre o número de animais envolvidos em atividades científicas nos seguintes locais: União Européia (diversos países membros individualmente e coletivamente), Estados Unidos da América e Japão.

Até o momento há cinco relatórios da União Européia, incluindo o *“Quinto relatório relativo às estatísticas sobre o número de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nos Estados-Membros da União Européia”* (CEC, 2007).

Em 2005, foram utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, nos 25 Estados-Membros da União Européia, 12,1 milhões de animais (Tabela 1). Tal como nos relatórios anteriores, os roedores e os coelhos representaram quase 78% do número total de animais utilizados na UE. Os camundongos são, de longe, os animais mais utilizados (53% do total), seguidos dos ratos (19%). Tal como nos anos anteriores, o segundo grupo de animais mais utilizado foi o dos animais de sangue frio, que representaram 15%. O terceiro maior grupo de animais foi o das aves, com um pouco mais de 5% do total. Os artiodáctilos: suínos, caprinos, ovinos e bovinos e os

perissodáctilos: equinos, asininos e híbridos representaram apenas 1,1%. Os carnívoros representaram 0,3% do número total de animais utilizados em 2005 e os primatas não humanos 0,1%. Tal como em 2002, em 2005 não foi utilizado na UE para fins experimentais qualquer grande primata antropóide. Em relação às categorias de animais utilizados, o quadro a seguir apresentado (tabela 1) compara os percentuais ao longo dos anos. Com isso, destaca-se aqui a relevância do camundongo, como o modelo experimental mais utilizado em todo o mundo nos últimos anos (CEC, 2007).

Tabela 1: Comparação dos percentuais entre as categorias de animais utilizadas para fins experimentais e outros fins científicos, nos 25 Estados-Membros da União Europeia em 1996, 1999, 2002 e 2005.

Categoria	1996(*)	1999	2002(**)	2005(***)
Roedores/Coelhos (%)	81,3	86,9	78,0	77,5
Animais de sangue frio (%)	12,9	6,6	15,4	15,0
Aves (%)	-	4,7	5	5,4
Artiodáctilos e Perissodáctilos (%)	-	1,2	1,2	1,1

(*) 14 Estados-Membros apresentaram dados de 1996; um de 1997.

(**) 14 Estados-Membros apresentaram dados de 2002; um de 2001.

(***) 25 Estados-Membros apresentaram dados de 2005; um de 2004.

3.1.4 O camundongo

O camundongo é um mamífero classificado na ordem Rodentia, subordem Sciurognathi. Há três famílias principais: Muridae, Cricetidae e Platacanthomyidae. O camundongo de laboratório é um membro da família Muridae e seu nome taxonômico é *Mus musculus*. Os camundongos têm sido utilizados como objetos de pesquisa desde o século XIX. Muitas décadas de cruzamentos para características específicas forneceram um vasto arranjo de variantes genéticas que são bem definidas anatômica e fisiologicamente. Além disso, são animais fáceis de manter por causa do seu pequeno tamanho, apresentam alta fecundidade, gestação e vida-média curtas e, por isso, são amplamente utilizados em laboratórios. Tais características os tornaram bons modelos para estudos de teratologia, genética e gerontologia, dentre diversos outros tipos de estudos (SIROIS, 2007).

O camundongo se caracteriza por ser uma espécie cosmopolita adaptada a uma grande variedade de condições ambientais. O comportamento social depende de sua densidade populacional, sendo que esses animais podem viver bem adaptados tanto solitariamente quanto em grandes colônias, com padrões de hierarquia muito bem estabelecidos (CHORILLI et al., 2007).

Os camundongos são primariamente noturnos, mas algumas vezes são ativos ao longo do dia e da noite. Quando manipulados adequadamente, quase nunca são agressivos. Eles tendem a ser muito curiosos e podem se tornar peritos em escapar dos alojamentos (SIROIS, 2007).

Devido ao seu pequeno tamanho, o camundongo é extremamente susceptível a mudanças nas condições ambientais, de tal forma que pequenas alterações na temperatura (2 a 3 °C) podem causar modificações na sua fisiologia (CHORILLI et al., 2007).

A longa história de cruzamentos intencionais resultou na disponibilidade de diversas linhagens de camundongos, incluindo animais transgênicos. Nas últimas décadas, os geneticistas colocaram à disposição dos pesquisadores modelos animais para inúmeras patologias, disfunções ou mal-formações, em geral reproduzindo os mesmos males observados na espécie humana. Dentre

esses pode-se citar o camundongo “nude”, “hairless”, obeso, diabético e com distrofia muscular (SANTOS, 2006a).

3.1.5 Ética e Legislação

A experimentação animal tornou-se um importante debate ético, no qual se destacam duas questões:

1- Será que é possível obter os conhecimentos que os estudos com animais proporcionam através de outros meios?

2- É moralmente aceitável usar os animais de forma que lhes causem danos?

Embora pertencentes a diferentes campos, já que a primeira é uma questão científica e a segunda uma questão ética, ambas se relacionam e ampliam cada vez mais o debate. No entanto, em meio a esse polêmico debate, uma diretriz que tem buscado benefícios científicos e éticos tem sido os 3Rs (PAIXÃO, 2008). Em uma publicação original de 1959, Russel & Burch lançaram a idéia dos 3Rs (“replace”, “reduce”, “refine”) como uma importante meta a fim de se buscar um melhor tratamento para os animais, ao mesmo tempo fazendo progredir a ciência (RUSSEL & BURCH, 1992).

O 1º “R” (“replacement”) refere-se à substituição do uso do animal. Recomenda que se deva procurar substituir a utilização de animais vertebrados vivos por outros métodos que utilizem outros materiais ou outros seres, não sencientes, o que pode incluir invertebrados, plantas e microrganismos (RUSSEL & BURCH, 1992).

O 2º “R” (“reduce”) refere-se à redução e deve ser entendido como redução no número de animais usados para obter uma informação relevante e com precisão (RUSSEL & BURCH, 1992).

O 3º “R” (“refine”) refere-se ao refinamento, definido como qualquer diminuição na severidade ou na incidência de procedimentos não humanitários aplicados àqueles animais que são utilizados (RUSSEL & BURCH, 1992).

Nesse sentido, destaca-se que uma adequada monitorização da saúde dos animais e prevenção de infecções constitui-se em importante *refinamento* na pesquisa, no que diz respeito à garantia de bem-estar animal (BUCHANAN-

SMITH et al., 2005) e também importante estratégia de *redução*, visto que animais com qualidade em termos microbiológicos resultam em menor repetição de experimentos. Além disso, constituem-se cada vez mais em exigências legais questões relacionadas ao bem-estar dos animais nos diversos âmbitos em que são utilizados.

No Brasil o primeiro registro de proteção jurídica aos animais ocorreu em 1924, através do Decreto 16.590, que dispunha sobre distração pública e proibiu as rinhas de galo e canário, dentre outros, mas não mencionava a questão dos animais utilizados em atividades científicas (PAIXÃO, 2007). O Decreto 24.645, de 1934, conferiu maior proteção jurídica aos animais, porém ainda sem fazer referência aos experimentos (RODRIGUES, 2006). Em 1941, o Decreto-Lei 3.688 ou “Lei das Contravenções Penais”, em seu artigo 64 proibiu a realização em lugar público, ou exposto ao público, de experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos. A Lei nº 6.638 de 8 de maio de 1979 estabeleceu normas para a prática didático-científica da vivisseção em animais, mas nunca foi devidamente regulamentada.

Mais recentemente, a Lei nº 9.605 ou “Lei de Crimes Ambientais”, de 12 de fevereiro de 1998, relativa a atividades lesivas ao meio ambiente (SCHATZMAYR & MÜLLER, 2008), apresentou uma inovação importante quando em seu artigo 32 proibiu a utilização de animais para fins didáticos ou científicos quando existirem recursos alternativos. É importante destacar que há várias outras leis que envolvem os animais, porém não diretamente relacionadas à questão da experimentação animal. Também há regulamentações diretamente relacionadas aos animais silvestres envolvidos em pesquisas (MÜLLER, 2005). No entanto, é a Lei Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, que veio regulamentar a prática da experimentação animal, pautando-se por um sistema de controle dessa prática baseado nos 3Rs (“replace”, “reduce”, “refine”), de acordo com os preceitos atuais de boas práticas em relação aos animais de laboratório verificados em âmbito internacional. Essa atual legislação revogou a Lei Nº 6.638 de 8 de maio de 1979.

3. 2 BIOTÉRIOS DE EXPERIMENTAÇÃO

3.2.1 Definição e classificação dos biotérios

Biotérios são instalações capazes de produzir e manter espécies animais destinadas a servir como reagentes biológicos em diversos tipos de ensaios controlados, para atender às necessidades dos programas de pesquisa, ensino, produção e controle de qualidade nas áreas biomédicas, ciências humanas e tecnológicas segundo a finalidade da instituição (CARDOSO, 2001).

Os biotérios podem ser classificados de acordo com três critérios diferentes: a) quanto à finalidade a que se destinam: biotérios de criação, de manutenção ou de experimentação, b) quanto à rotina existente de métodos de acasalamento de animais: condição genética e c) quanto à existência ou não de uma rotina de controle microbiológico: condição sanitária. Em qualquer um desses as necessidades básicas de um biotério constituem-se em:

1- instalações – devem ser específicas para esse fim, porque somente assim conseguiremos condições ideais para a produção e/ou manutenção e/ou experimentação desses animais;

2- equipamentos – devido à especificidade do trabalho, necessário se faz que tenhamos máquinas especiais para a obtenção dos resultados desejados (máquinas de lavar gaiolas, autoclaves);

3- modelo animal - o animal desejado, de acordo com as pesquisa e os testes a serem realizados;

4- rotinas e procedimentos - devem ser adotadas rotinas diárias para que se possa cumprir um programa de produção, de controle ou de pesquisa. Os procedimentos operacionais dos equipamentos devem ser rigorosamente observados para sua melhor utilização e para a segurança do operador;

5- pessoal - as atividades desenvolvidas em um biotério exigem pessoal qualificado para que se possa obter resultados confiáveis. O bioterista deve fazer exames médicos rotineiros para preservar a sua saúde e a dos animais (ANDRADE, 2006).

3.2.2 Instalações: macroambiente e microambiente

Para manter animais de laboratório para criação ou experimentação é necessário que tenhamos instalações adequadas, uma vez que suas necessidades básicas deverão ser atendidas, para que possam sobreviver e tenham assegurado seu desenvolvimento fisiológico.

Arquitetura e manutenção adequadas influenciam diretamente no manejo. As áreas destinadas aos animais devem ser isoladas fisicamente. Além disso, devem possuir estrutura que as torne à prova de agentes infecciosos e vetores, como insetos e roedores silvestres. As instalações compreendem as salas para animais e as áreas de apoio, como as áreas de higienização e esterilização, salas de estoque de materiais limpos e insumos, corredores de acesso (SANTOS, 2006). Assim, tais instalações devem possuir temperatura, umidade, ventilação e pressão de acordo com as exigências de cada espécie a ser criada ou mantida, e de acordo com a finalidade do biotério.

O fluxo de pessoal e de materiais deve ser feito no sentido unidirecional, nos biotérios com este tipo de estrutura. Numa tentativa de aumento da área destinada aos animais, preconiza-se que mesmo biotérios de alto padrão sanitário podem operar com um corredor tanto para acesso e/ou distribuição quanto para retorno e/ou recolhimento. Todo o material a ser enviado para as salas de animais deve ser autoclavado e o material de retorno das salas também deve ser autoclavado.

3.2.3 Barreiras sanitárias e boas práticas

Barreira é um sistema que combina aspectos construtivos, equipamentos e métodos operacionais que buscam o controle das condições ambientais das áreas fechadas e a minimização das probabilidades de contaminação (SIMAS, 1996). Boas práticas de experimentação animal é o sistema da qualidade que diz respeito à organização e às condições sob as quais estudos em experimentação animal são planejados, realizados, monitorados, registrados, relatados e arquivados (OECD, 1992). Constitui um

conjunto de princípios que asseguram a confiabilidade dos laudos emitidos por um biotério experimental e é aplicado em estudos que dizem respeito ao uso seguro de produtos relacionados à saúde humana, vegetal, animal e ao meio ambiente.

Um sistema de boas práticas, como todo sistema da qualidade, é dinâmico com contínuas implementações, dependendo da evolução do estado da arte. Consequentemente apresenta várias dificuldades, como os diferentes modos de aplicação dos princípios da Boa Prática Laboratorial - BPL (MAJEROWIVZ, 2008).

Na utilização de animais experimentais vertebrados, a instituição deverá fornecer equipamentos e instalações adequadas, equipe para cuidar dos animais e estabelecer práticas que assegurem níveis apropriados para a qualidade, segurança e cuidados para com o meio ambiente.

Os equipamentos de segurança são considerados barreiras primária e referem-se aos tipos de equipamentos de proteção individual (EPI) e coletiva (EPC) utilizados no interior dos biotérios de experimentação para evitar a contaminação e a liberação de contaminantes biológicos, químicos ou radiológicos (GAMBLE & CLOUGH, 1976).

As cabines de segurança biológica (CSB), assim como outros dispositivos e/ou equipamentos de contenção física, como respiradores e protetores faciais, são usados ao conduzir procedimentos que apresentem um alto potencial de criação de aerossóis e devem estar ligadas ao sistema de emergência, no caso de falhas no fornecimento de energia (LIMA E SILVA, 1998). São classificadas em classe I, classe II, classe II A, classe II B 1, classe II B 2, classe II B 3 e classe III (FIOCRUZ, 2005).

As instalações (barreiras secundárias) para animais de laboratório consistem de um tipo especial de laboratório. Como princípio geral, os níveis de biossegurança são representados por instalações laboratoriais, práticas e requisitos operacionais, indicado para o trabalho envolvendo agentes infecciosos *in vivo* e *in vitro*, são similares. Porém, é oportuno lembrar que as salas onde se encontram animais podem apresentar problemas singulares. No laboratório, as condições de risco são provocadas pela equipe ou pelo equipamento usado por eles. Nas salas dos animais, as atividades dos próprios animais podem apresentar novos riscos.

Os animais podem produzir aerossóis, morder ou arranhar e podem estar infectados por uma doença zoonótica (MÜLLER, 2008). Essas recomendações presumem que as dependências de um biotério de experimentação, as práticas operacionais e a qualidade do tratamento ao animal atendam a padrões e regulamentos aplicáveis (“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1 e Laboratory Animal Welfare Regulations 2”), e que espécies adequadas tenham sido selecionadas para os experimentos animais.

3.3 BIOSSEGURANÇA

3.3.1 Definição e importância

Biossegurança pode ser definida como sendo um conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes a estas atividades e que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos (FIOCRUZ, 2005).

O conceito de risco está associado à probabilidade que um dano, um ferimento ou que uma doença ocorra. Nas atividades que envolvam materiais infecciosos ou potencialmente infecciosos, a avaliação do risco é um parâmetro essencial para a definição de todos os procedimentos de biossegurança sejam eles de natureza construtiva, de procedimentos operacionais ou informacionais (CARDOSO & SILVA, 2007).

O manejo de animais oferece aos humanos, basicamente, dois tipos de risco: o infeccioso e o traumático. Os animais podem excretar microrganismos nas fezes, urina, saliva ou aerolizá-los podendo originar, conseqüentemente, infecções, alergias e outros problemas. Existe ainda a possibilidade de inoculação de patógenos por mordeduras ou arranhaduras, assim como a transmissão direta, por contato com o animal, seu sangue ou tecidos coletados em necropsia, e indireta, por inalação de poeira originada das gaiolas e camas dos animais. Além disso, muitos animais podem apresentar infecções

assintomáticas, o que aumentam os riscos de contaminações (POLITI et al., 2008).

3.3.2 Classificação de risco

Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil publicou o manual "Classificação de Riscos dos Agentes Biológicos", onde a classificação do nível de biossegurança é norteada por diversos fatores. Dentre eles destaca-se a patogenicidade do microrganismo infectante, virulência, via de inoculação, estabilidade, endemicidade, concentração e volume, origem do agente biológico potencialmente patogênico, dose infectante, tipo de ensaio, consequências epidemiológicas, disponibilidade de tratamento eficaz e de medidas profiláticas (BRASIL, 2006).

Os agentes biológicos que afetam o homem, os animais e as plantas são distribuídos em classes de risco assim:

- Classe de risco 1 (baixo risco individual e para a coletividade): inclui os agentes biológicos conhecidos por não causarem doenças em pessoas ou animais adultos saudáveis. Exemplo: *Lactobacillus sp.*
- Classe de risco 2 (moderado risco individual e limitado risco para a comunidade): inclui os agentes biológicos que provocam infecções no homem ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, e para os quais existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Exemplo: *Schistosoma mansoni*.
- Classe de risco 3 (alto risco individual e moderado risco para a comunidade): inclui os agentes biológicos que possuem capacidade de transmissão por via respiratória e que causam enfermidades humanas ou animais, potencialmente letais, para as quais existem usualmente medidas de tratamento e/ou de prevenção. Representam risco se disseminados na comunidade e no meio ambiente, podendo se propagar de pessoa a pessoa. Exemplo: *Bacillus anthracis*.

- Classe de risco 4 (alto risco individual e para a comunidade): inclui os agentes biológicos com grande poder de transmissibilidade por via respiratória ou de transmissão desconhecida. Até o momento não há nenhuma medida profilática ou terapêutica eficaz contra infecções ocasionadas por estes. Causam doenças humanas e animais de alta gravidade, com alta capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Esta classe inclui principalmente os vírus. Exemplo: Vírus Ebola.
- Classe de risco especial (alto risco de causar doença animal grave e de disseminação no meio ambiente): inclui agentes biológicos de doença animal não existente no País e que, embora não sejam obrigatoriamente patógenos de importância para o homem, podem gerar graves perdas econômicas e/ou na produção de alimentos.

Portanto, as barreiras nos biotérios de experimentação serão determinadas por esta classificação. O desenho das instalações que compõem um biotério de experimentação constitui um dos fatores de maior importância assegurando a eficácia de seu funcionamento e, conseqüentemente, o cuidado e a vigilância adequada à manutenção dos animais ali alojados. A classificação dos biotérios é feita de acordo com a classe de risco do(s) microrganismo(s) ali manipulado(s) em quatro níveis de Biossegurança (NB-A) e consistem na combinação de práticas e técnicas de laboratório, equipamentos de segurança e instalações ou infra-estrutura laboratorial e representam as condições nas quais o agente pode ser manipulado com segurança (CARDOSO & SILVA, 2007).

3.3.3 Níveis de biossegurança de laboratórios de experimentação animal

A Biossegurança é demonstrada mediante a determinação dos níveis de contenção física, de seus requisitos e da utilização de procedimentos de boas práticas laboratoriais, os quais têm por objetivo o desenvolvimento de um trabalho seguro.

Os laboratórios de experimentação animal podem apresentar diferentes níveis de biossegurança.

Consideram-se quatro níveis de biossegurança animal - NBA-1, NBA-2, NBA-3 e NBA-4 (BRASIL, 2001), crescentes no maior grau de contenção e complexidade de proteção. O nível de biossegurança será determinado segundo o organismo de maior classe de risco envolvido (MÜLLER, 2008), sendo:

NBA-1 - requer procedimentos para o trabalho com microrganismos classe de risco 1 que normalmente não causam doença em seres humanos ou em animais.

NBA-2 - requer procedimentos para o trabalho com microrganismos classe de risco 2, não transmissíveis pelo ar, mas capazes de causar doenças em seres humanos ou em animais. O risco de contaminação é baixo, havendo tratamento efetivo e medidas preventivas disponíveis.

NBA-3 - requer procedimentos para o trabalho com microrganismos classe de risco 3, que geralmente causam doenças em seres humanos ou em animais e podem representar risco se disseminado na comunidade, mas usualmente existem medidas de tratamento e prevenção. Exige contenção para impedir a transmissão pelo ar.

NBA-4 - requer procedimentos para o trabalho com microrganismos classe de risco 4 que causam doenças graves ou letais para seres humanos e animais, com fácil transmissão por contato individual.

3.3.4 Qualidade em biossegurança

A gestão da qualidade de biossegurança em biotérios consiste numa estratégia de administração orientada a criar consciência da qualidade em todos os processos organizacionais. Compõe-se de diversos estágios, como o planejamento, a organização, o controle e a liderança. A conscientização para a qualidade e o reconhecimento da sua importância tornou a certificação de sistemas de gestão da qualidade indispensável uma vez que: aumenta a satisfação e a confiança dos pesquisadores usuários de animais; aumenta a produtividade; reduz os custos internos; melhora a imagem e os processos de modo contínuo. Não há pretensão, e nem se aplica, no momento, seguirmos a

série ISO 9000, que define as linhas básicas e oferece as orientações gerais para uma correta gestão da qualidade e garantia de qualidade, além de apresentar modelos de sistemas de qualidade. Tentamos atender a alguns requisitos de certificação, dentre esses podemos citar: a padronização de todos os processos de organização, processos que afetam a qualidade animal e conseqüentemente o usuário do animal; o monitoramento e medição dos processos de manutenção do animal para assegurar a qualidade do mesmo, através de indicadores de performance e desvios; implementar e manter os registros adequados e necessários para garantir a rastreabilidade do processo; inspeção de qualidade e meios apropriados de ações corretivas quando necessário; e revisão sistemática dos processos e do sistema da qualidade para garantir sua eficácia (ROSENBERG, 2007).

A importância da qualidade se reflete na confiabilidade nos resultados; reconhecimento da comunidade e de seus pares; facilita a rastreabilidade dos dados obtidos em ensaios e a documentação de um estudo; facilita a organização de trabalho e a comunicação dos dados obtidos; evita duplicidade de estudos, levando a economia de tempo, de recursos e o mais importante a redução do número de animais (ROSENBERG, 2007).

3.3.5 Aspectos da biossegurança nos processos de desinfecção.

Atualmente, o controle das doenças infecciosas continua a representar o maior obstáculo para a manutenção de animais. Prevenir as doenças é mais fácil, mais econômico e mais eficaz do que tentar tratar qualquer tipo de surto que venha a ocorrer. Portanto, a adoção de um programa preventivo de controle de doenças e infecções é essencial para a manutenção da saúde dos animais, validação dos dados de uma pesquisa e segurança das pessoas que cuidam dos animais (MIYAZAKI & BÔAS, 2007).

A desinfecção dos estabelecimentos de manutenção dos animais tem como objetivo eliminar patógenos, permitindo assim o que é conhecido como um ambiente bioprottegido.

3.4 MICROORGANISMOS EM BIOTÉRIOS

3.4.1 Considerações gerais

O contínuo desafio de se manter uma padronização microbiológica dos animais exige não somente a inovação tecnológica em biossegurança, mas também a elaboração de um programa de monitorização da saúde dos animais. Diversos autores (VAN DER LOGT, 1993; JACOBY & LINDSEY, 1997; SHEK, 2008; FONTES, 2008) têm enfatizado a importância de ambas as estratégias para prevenção da presença dos agentes biológicos em animais de laboratório: uma rigorosa biossegurança e uma monitorização da saúde dos animais.

3.4.2 O risco da introdução de microrganismos indesejáveis

O risco de se introduzir inadvertidamente microrganismos (vírus, bactérias, fungos e parasitos) é maior em biotérios de experimentação do que em biotérios de criação. A introdução indesejável de microrganismo pode ser devida aos seguintes fatores: contato com animais, materiais biológicos, equipamentos e pessoal (NICKLAS, 1993; FELASA, 2002).

Os biotérios de experimentação usualmente contêm várias espécies e linhagens de animais, com origens diferentes. Por isso é recomendável que animais sejam adquiridos em locais que também realizem uma monitorização da saúde animal segundo a Federation of European Laboratory Animal Science Associations - FELASA, mas nem sempre isso é possível para animais geneticamente modificados (FELASA, 2002). Uma outra estratégia importante é a quarentena, que visa o isolamento de animais recentemente adquiridos até que sua condição sanitária possa ser determinada (REGH & TOTH, 1998). O uso de materiais biológicos como células, soro, esperma, dentre outros podem resultar na introdução de agentes indesejáveis (NICKLAS, 1993; NICKLAS et

al., 1993, KOSZDIN & DIGIACOMO, 2002). Tais materiais devem ser considerados como contaminados e os experimentos que os utilizem devem ser realizados em condições de isolamento, a menos que tenham sido testados e estejam livres de contaminação (FELASA, 2002). Outro aspecto que deve ser considerado é a importância do pessoal que tem contato com os animais, sejam os técnicos ou pesquisadores. As pessoas que tiveram contato com animais infectados podem transportar microrganismos, nas mãos ou nas roupas, de um local para outro. Com isso, pessoas e equipamentos podem atuar como vetores na transmissão de microrganismos, mesmo antes de qualquer indicação de doenças nos animais, visto que eles podem transmitir microrganismos mesmo sem apresentar sinais clínicos (FELASA, 2002).

Wolfensohn & Lloyd (1994) enfatizaram que as principais fontes de infecção para os animais são: animais introduzidos na colônia, água, alimento, cama, ar além de outros fatores de contaminação. É importante verificar se todo o equipamento está descontaminado e não vai atuar como fonte de infecção para o animal. Exemplos de fontes potenciais de contaminação para o animal incluem máscaras, luvas/mãos sujas, jalecos, agulhas hipodérmicas, agulha de gavagem.

3.4.3 O monitoramento dos agentes biológicos

As recomendações da FELASA para um programa de monitorização em saúde animal são específicas para cada espécie de animal de laboratório e podem ser encontradas em “Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units” (FELASA, 2002). Os vírus, bactérias e parasitos que devem ser monitorados em camundongos são determinados pela FELASA (2002), conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Listagem de agentes a serem monitorados em biotérios de camundongos de acordo com as recomendações da FELASA (2002).

	Patógeno	Método
Bactérias	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CULTURA
	Cillia-associated respiratory <i>Bacillus</i>	ELISA
	<i>Citrobacter rodentium</i>	CULTURA
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CULTURA
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	ELISA
	<i>Pasteurella spp</i>	CULTURA
	<i>Pseudomonas spp</i>	CULTURA
	<i>Salmonella spp</i>	CULTURA
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CULTURA
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CULTURA
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CULTURA
	<i>Streptococcus</i> beta hemolítico (grupo D)	CULTURA
Vírus	Vírus Diminuto do Camundongo (MVM)	ELISA
	Vírus da Hepatite de Camundongos (MHV)	ELISA
	Pneumovírus (PVM)	ELISA
	Reovírus tipo 3	ELISA
	Sendai Vírus	ELISA
	Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCM)	ELISA
	Poliomavírus	ELISA
	Ectromelia vírus	ELISA
	Vírus da Encefalomielite Murina (TMEV) (Theiler's)	ELISA
Parasitas	Pulgas, ácaros e piolhos	MICROSCOPIA
	<i>Syphacia spp.</i>	EDMI*
	<i>Aspiculuris tetraptera</i>	EDMI
	<i>Rodentolepis nana</i>	EDMI
	Tricomonídeos	EDMI
	<i>Spironucleus muris</i>	EDMI
	<i>Giardia muris</i>	EDMI
	<i>Entamoeba spp</i>	EDMI

*EDMI: Exame Direto da Mucosa Intestinal.

As colônias devem ser monitoradas pelo menos trimestralmente, de acordo com as recomendações da FELASA (2002), sendo que dependendo das circunstâncias locais e necessidades, essa frequência pode ser alterada.

Doenças bacterianas em camundongos ocorrem espontaneamente ou estão presentes em estado latente, são numerosas, e o camundongo também é suscetível à infecção experimental por muitos patógenos de outras espécies. Devido ao pequeno tamanho do animal, seus hábitos e da complexidade dos métodos aplicados, é extremamente difícil avaliar a saúde de um único animal pelos métodos clínicos habituais. Em vez disso, é necessária uma abordagem coletiva, de toda a população ou de uma percentagem, observando fatores comuns que podem ser relacionados com os vários sinais de morbidade e de mortalidade (SHOPE, 1964; FELASA 2002).

Os agentes biológicos usualmente relacionados aos animais de laboratório devem ser bem conhecidos, pelos riscos que representam, portanto, informações básicas são apresentadas a seguir sobre a maioria dos agentes que podem afetar os camundongos.

3.4.3.1 Bactérias

Mycoplasma spp: A diferença principal dos micoplasmas das outras bactérias é que as últimas possuem uma parede celular sólida, e por esse motivo uma forma definida, o que facilita a sua identificação ao microscópio, ao passo que os micoplasmas possuem apenas uma membrana flexível, o que se junta ao pequeno tamanho para dificultar a sua identificação.

Mycoplasma pulmonis é o agente etiológico da micoplasmose respiratória murina (MRM) (TIMENETSKY et al., 1992) que acomete com frequência animais de laboratório (ORGANICK et al., 1966 e CASSELL & HILL, 1979), atualmente é a espécie mais relevante em camundongos e ratos. São extremamente ubíquias, seu habitat primário é a superfície das mucosas do trato respiratório (TRABULSI & MARTINEZ, 2005). Embora a detecção por PCR seja possível, a triagem é geralmente feita por imunodiagnóstico sorológico, mas a resposta dos anticorpos varia muito entre as linhagens de

camundongos e ratos. A cultura é difícil, mas pode-se também detectar várias outras espécies de micoplasmas.

.*Bordetella bronchiseptica*: É um bacilo ou cocobacilo pequeno, móvel e Gram negativo. A transmissão se dá por contato direto com animais clinicamente afetados, portadores, fomites e aerossóis respiratórios. Infecção subclínica, ocasionalmente ocorre em roedores, é mais frequente em coelhos. Existe uma alta prevalência de soropositividade em coelhos de laboratório.

Muitos surtos desta infecção são precipitados por fatores estressantes, tais como: desequilíbrios nutricionais, alterações de temperatura, superpopulação, alterações no alimento, procedimentos experimentais e dietas impróprias, especialmente aquelas deficientes em vitamina C, no caso da cobaia. Podem persistir no ambiente por longos períodos (COOTE, 2001). Em medicina veterinária, *Bordetella bronchiseptica* leva a uma série de patologias em diferentes hospedeiros. *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida* podem agir sinergicamente co-infectando o conduto nasal (MCGRAW, 2004).

.CAR *Bacillus*: É um bacilo que coloniza o epitélio ciliado do trato respiratório constituído pelos pulmões, traqueia, laringe e as fossas nasais. É alongado com extremidades arredondadas e tem três camadas da parede celular.

Tem sido implicado na doença crônica respiratória em camundongos, ratos e coelhos (BAKER, 1998), mas seu papel é mascarado por infecção simultânea frequente por *Mycoplasma* e vírus. A transmissão do CAR bacilo é através de aerossóis em contato com o sistema respiratório. A infecção gaiola entre as gaiolas é lenta, e CAR bacilos geralmente não são transmitidos para sentinelas, por cama suja. No entanto, pode causar doença sem estar associado. Pode causar aumento da morbidade e da mortalidade dos animais. No entanto, pode causar aumento de morbidade e mortalidade dos animais em uma colônia e interferir com os resultados da investigação (GANAWAY, 1986).

.*Chlamydia sp.* Bactéria Gram-negativa. As espécies dentro do grupo são pleomórficas, isto é, de forma variável, devido à ausência de peptidoglicano, e imóveis. Os membros do gênero *Chlamydia* são organismos intracelulares obrigatórios, que aproveitam todo o aparelho enzimático que infecta. As

infecções são geralmente persistentes e subclínicas. *C. psittaci* pode causar conjuntivite e pneumonia em cobaias. *C. muridarum* infecta, naturalmente, apenas os membros da família Muridae e vive nas células epiteliais dos vertebrados, principalmente camundongos, ratos e hamsters (ALDERTON, 1996), pode, sob certas circunstâncias, causar pneumonia em camundongos. Foi isolada a partir de pulmões de camundongos albinos suíços que tinham sintomas semelhantes (BRUNHAM et al., 2000). *C. muridarum* vive nas células epiteliais do oviduto em camundongos fêmeas e nas células epiteliais da próstata em camundongos machos. Quando as células se tornam infectadas com este patógeno, aumenta a absorção de diversas citocinas e quimiocinas, tais como genes TLR4, CD14, TLR2, e as moléculas que ajudam a recrutar células imunes (MACKERN-OBERTI et al., 2006).

Citrobacter rodentium: Gram-negativo, conhecido anteriormente como “*Citrobacter freundii* 4280”. Foi posteriormente caracterizado, e estudos taxonômicos demonstraram que ele é definitivamente uma espécie distinta (SCHAUER et al., 1995). É um patógeno não invasivo que infecta o cólon distal de camundongos e ratos. *C. rodentium* utiliza os mecanismos moleculares de *Escherichia coli* enteropatogênicas para colonizar as células epiteliais do intestino e, portanto, é um modelo ideal para estudar interações patógeno-hospedeiro *in vivo* (MACDONALD et al., 2003). A presença deste microrganismo pode causar hiperplasia colônica transmissível em camundongos.

Clostridium piliforme: Gram-positivo (DUNCAN, 1993), encontrado em focos necróticos em formas esporulantes. A transmissão ocorre, principalmente, através da via fecal-oral. A infecção por *Clostridium piliforme* (doença de Tyzzer) é caracterizada por lesões necróticas no fígado, órgãos digestivos e coração. Várias espécies animais são sensíveis a este organismo, incluindo camundongos, ratos, coelhos, cães, gatos, primatas, e cavalos.

Embora a doença de Tyzzer seja grave em muitas espécies animais, camundongos infectados muitas vezes não apresentam sintomas ou manifestações clínicas, tornando-se portadores sãos da doença o que facilita a

transmissão do patógeno tanto para outros camundongos quanto para outras espécies animais. Curiosamente, diferentes linhagens de camundongos diferem na sua suscetibilidade ao patógeno (WAGGIE et al., 1981).

.*Clostridium piliforme* – é o agente da doença de Tyzzer. O diagnóstico pode ser baseado no exame microscópico dos tecidos e testes sorológicos, pois não pode ser cultivado em meios artificiais. A triagem por histopatologia é insensível. Reações sorológicas positivas ocorrem frequentemente sem sinais clínicos da doença e podem ser indicativo de infecção ativa recente. A detecção deste patógeno pela reação em cadeia da polimerase é altamente sensível e específico. O teste pode ser realizado em amostras fecais em vez de sangue ou tecido, resultando em menor trauma e risco para os animais. Imunossupressão de um número significativo da população tem sido utilizada para demonstrar a presença deste agente em colônias de animais, a infecção tem sido reportada em camundongos *nude* (LIVINGSTON, et al. 1996).

.*Corynebacterium sp.* : Gram-positivos, se apresentam como pequenos bastonetes pleomórficos, com apresentação de bastonetes, cocóides, agrupadas ou filamentosas. Esfregaços corados, de tecidos animais, frequentemente revelam grupos de célula em paralelo (“em paliçada”) ou células forma de angular (“escrita chinesa”). Muitos possuem grânulos metacromáticos (polifosfato com alta energia) e melhor observado no *Corynebacterium diphtheriae*. Não formam esporos, não álcool-ácido-resistente, catalase positivos, oxidase negativos; geralmente facultativamente anaeróbios e os patógenos animais não são móveis.

Membros do gênero *Corynebacterium sp.* são primariamente parasitas obrigatórios das mucosas ou pele de mamíferos, ocasionalmente são encontrados em outras fontes; alguns são patogênicos para mamíferos, possuindo um grande número de espécies as quais vivem em uma variedade de habitat, incluindo alguns importantes patógenos para os animais e para o homem. Infecção sintomática e subclínica (pneumonia) por *Corynebacterium kutscheri* tem sido principalmente detectada em camundongos e ratos.

. *Helicobacter*. Várias espécies deste gênero têm sido descritas desde o seu primeiro isolamento de roedores. Atualmente, há indícios de que algumas espécies têm potencial para induzir a doença clínica ou podem ter impacto sobre as experiências com animais, como *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. typhlonicus* (FOX & LEE, 1997), considerando que nenhum desses efeitos tem sido descritos para outras espécies como, por exemplo, *H. rodentium*.

Espécies adicionais são prováveis de serem descritas em um futuro próximo, e uma recomendação geral em relação à quais agentes estão a ser monitorados não pode, portanto, ser dada neste momento.

.*Leptospira sp.* Espiroqueta que pertence à família Leptospiraceae. A classificação das espécies do gênero *Leptospira* está baseada no grau de parentesco do DNA. O gênero está dividido em 17 espécies definidas, com pelo menos, 70% de parentesco (DNA) e cuja sequência contém uma divergência de, pelo menos, 5% de bases não pareadas. Esta classificação coexiste com a antiga classificação sorológica na qual o antissoro era utilizado para estabelecer parentesco entre as amostras isoladas (LEVETT, 2001).

As amostras de Leptospiras ainda são comumente referidas pelo sorovar. Muitos sorovares estudados são representados por somente uma única cepa referência e, como mais cepas são estudadas, o número de espécies tende a aumentar (LEVETT, 2001). O monitoramento para estas bactérias zoonóticas pode ser considerado se animais de laboratório têm um risco aumentado de infecção, por exemplo, por contato com roedores silvestres. O monitoramento sorológico é feito por laboratórios especializados. Os custos são elevados visto que o monitoramento para diversos sorotipos é necessário. A ocorrência de *Leptospira sp.* em colônias contemporâneas não é clara. Leptospirose, no entanto, tem sido encontrada em colônias “convencionais” de camundongos (ALEXANDER, 1984).

.*Pasteurella sp.* Bactéria Gram-negativa, parte da microbiota oral, respiratória, genital e gastrointestinal de vários animais domésticos, por exemplo, *P. multocida gallicida* é frequentemente isolado de aves e, ocasionalmente, de suínos, e *P. pneumotropica* é isolada a partir de gatos e cães e raramente a partir de seres humanos. Algumas destas bactérias são também consideradas

patogênicas para os animais e humanos. Quando cultivadas em ágar sangue, *P. pneumotropica* forma colônias com coloração cinza claro a amarelo, de 0,5 a 1,2 micrômetros de tamanho, dentro de 24 horas (CHARLES RIVER LAB, 1991).

Como na recomendação anterior da FELASA para unidades experimentais, deve ser feito o monitoramento de todos os membros do gênero *Pasteurella*. *P. pneumotropica* descreve um grupo de organismos diversificados geneticamente. Tem sido repetidamente demonstrado que diferentes laboratórios chegaram a conclusões controversas sobre a identificação de uma mesma cepa de *Pasteurella* sp. de roedor. Pasteureloses devido a *P. pseudotuberculosis* ou *P. pneumotropica* podem ocorrer espontaneamente em camundongos de laboratório. Estes dois últimos microrganismos podem ser encontrados em vários tecidos de camundongos aparentemente normais. Animais com infecção latente submetidos a diferentes tipos de estresse, muitas vezes provocam sinais de doença aguda: anorexia, lassidão e mortes súbitas. O fígado dos animais infectados por *P. pseudotuberculosis* apresenta múltiplos abscessos focais. *P. pneumotropica* tem sido relatada em focos de pneumonia em roedores e também tem sido encontrado em condições normais, aparecendo do tecido pulmonar. Em outros casos este organismo foi isolado do cérebro, útero, testículos, fígado e baço de roedores aparentemente normais. Em casos raros, septicemia e morte foram atribuídas a *P. pneumotropica*.

Pseudomonas aeruginosa: Bactéria Gram negativa, aeróbica, pertencentes à família Pseudomonadaceae, que compreende apenas os membros do gênero *Pseudomonas*. Tal como outros membros do gênero, *P. aeruginosa* é uma bactéria de vida livre, comumente encontrada no solo e na água. No entanto, verifica-se regularmente sobre as superfícies de plantas e ocasionalmente na superfície de animais. No entanto, *P. aeruginosa* tem se tornado cada vez mais reconhecido como um patógeno oportunista, emergente e de relevância clínica. Vários estudos epidemiológicos monitoraram a sua ocorrência como um patógeno hospitalar e indicam que a resistência a maioria dos antibióticos é cada vez maior nos isolados clínicos. O significado é baixo em animais

imunocompetentes, mas pode causar doença clínica em hospedeiros imunodeficientes ou imunossuprimidos.

.*Salmonella sp.* Bactéria Gram-negativa, é um dos agentes mais comuns de infecções bacterianas de camundongos. A mais encontrada é a *Salmonella typhimurium*. Entretanto, camundongos são altamente suscetíveis à infecção pela maior parte delas. Roedores infectados e outros hospedeiros, incluindo pessoal, podem ser fontes de infecção. Tais riscos são especialmente grandes em institutos de pesquisa polivalentes que abrigam animais de diferentes *status* patogênicos. Os animais adultos portadores muitas vezes parecem saudáveis. A doença não é controlável por quaisquer medidas terapêuticas conhecidas. Saneamento é uma parte importante de prevenir a propagação da doença, uma vez que um importante meio de transmissão é por contato com objetos contaminados. O abastecimento alimentar e camas devem ser tratados como potenciais fontes de infecção.

.*Staphylococcus aureus*: Se apresentam como cocos Gram-positivos e pertencem a um grupo de microrganismos, não formadores de esporos, coagulase-positivos em sua maioria, anaeróbicos facultativos (MCGRAW, 2004). De forma esférica, aparecem no exame microscópico em pares, formando cadeias parecidas com cachos de uva, com cerca de 1 micrômetro de diâmetro, e formam colônias de cor amarelada, devido à produção de carotenoides. Cresce bem em ambientes salinos. É uma das espécies patogênicas mais comuns e a mais virulenta do seu gênero. Esta bactéria é encontrada também colonizando a cavidade nasal e a pele de pessoas normais e animais (KLUYTMANS et al., 1997).

Possui toxinas, que são proteínas produzidas e secretadas ou expostas à superfície pela bactéria, cuja atividade é destrutiva para as células do hospedeiro. Bactéria ubíqua em populações de roedores onde existe contato direto entre humanos e animais e tem potencial para induzir os sinais clínicos da doença (abscessos, feridas infeccionadas). Excepcionalmente, outras espécies de estafilococos também podem induzir sinais clínicos, particularmente em animais imunodeficientes (BRADFIELD et al., 1993).

.*Streptococcus sp.* Se apresentam como cocos Gram-positivos que se agrupam em colônias lineares ou em pares. São imóveis, já que não possuem estruturas de locomoção, como flagelos e cílios. Nenhum fabrica a enzima catalase, sendo, portanto catalase-negativos, uma distinção importante dos *Staphylococcus* (MCGRAW, 2004). Todos os estreptococos são aeróbios preferenciais e anaeróbios facultativos, podendo viver, também, na ausência de oxigênio.

Os estreptococos são classificados de acordo com a sua capacidade de provocar lise (morte celular) em eritrócitos, em alfa (hemólise incompleta), beta (hemólise total) ou gama-hemolítico (nenhuma hemólise). Também podem ser classificados de acordo com os carboidratos nas suas membranas, de acordo com a classificação de Lancefield de 1933, ainda usada.

S. pneumoniae α -hemolítico e outras espécies β -hemolíticas raramente induzem doença clínica e são importantes principalmente em animais imunodeficientes, mas também podem levar a sinais clínicos em indivíduos imunocompetentes.

3.4.3.2 Vírus

.Vírus Diminuto do Camundongo: "Murine Minute Vírus" (MVM) é um parvovírus DNA. Uma variante com propriedades imunossupressoras *in vitro* também foi identificado. O genoma codifica duas proteínas não estruturais, NS 1 e NS 2, que são altamente conservadas entre os roedores e parvovíroses têm proeminente reatividade cruzada em testes sorológicos genéricos. MVM *in vitro* tem uma ampla gama de hospedeiros. Ficou demonstrado que ambas as cepas de parvovírus de camundongo nem sempre fazem reação cruzada em testes sorológicos. Portanto, ambas as cepas (FL, K87) devem ser usadas como antígenos. Reações positivas também têm sido encontradas em ratos, e recomenda-se que os ratos também sejam monitorados.

Infecções naturais geralmente não apresentam sinais clínicos, são assintomáticas. MVM é percebido como um vírus comum de camundongos. Sua prevalência em colônias de camundongos inquiridas, durante os anos 1970 e 1980, foi relatada em aproximadamente 30-90%. Um inquérito recente

de grandes centros de investigação biomédica revelou uma prevalência global de infecção por parvovírus de cerca de 25% entre os camundongos isentos de agentes patogênicos específicos e 40% entre os convencionalmente em biotérios de camundongos (JACOBY & LINDSEY, 1997).

MVM é altamente contagioso para o camundongo, seu único hospedeiro natural conhecido. O vírus pode infectar o trato gastrointestinal e é excretado nas fezes e urina. Portanto, a contaminação de gaiolas, cama, comida, vestuário deve ser considerada, pois é um risco para a propagação da infecção. A transmissão ocorre também por exposição oronasal. Um contato permanente com animais infectados ou camas contaminadas geralmente induz uma resposta imune humoral dentro de três semanas, mas pode atrasar a soroconversão. Não há provas de que MVM seja transmitido no útero.

.Vírus da Hepatite do Camundongo: “Mouse Hepatite Vírus” (MHV) é um vírus RNA pertencente à família Coronaviridae, gênero *Coronavírus*; possui a estrutura de capsídeo com forma helicoidal e presença de envelope (THIEL, 2007). É altamente contagioso e a transmissão se faz pela via oral-fecal. A infecção natural produz títulos baixos de anticorpo. O vírus é excretado pelas fezes, sendo raramente encontrado no fígado (MARQUES, 2006). Produz infecções inaparentes que podem ser ativadas sob condições de estresse. As cepas mais virulentas induzem a alta mortalidade, especialmente entre as colônias de camundongos de laboratório. MHV em camundongos ocorrem com frequência e são fortemente imunomoduladores. Infecções são normalmente auto limitantes, mas podem ser persistentes em animais imunodeficientes.

Algumas cepas de MHV podem causar uma progressiva encefalite desmielinizante em camundongos, que tem sido utilizado como um modelo para esclerose múltipla.

.Vírus da Pneumonia do Camundongo: PVM é um Paramixovirus, com RNA de fita simples, e apresenta afinidade pelo tecido pulmonar. Não se dissemina facilmente por contato direto, não atravessa a placenta; entretanto, ocasiona uma infecção aguda, assintomática e enzoótica. O vírus infecta camundongos, ratos e hamsters. Anteriormente, seu monitoramento em hamsters, cobaias e

coelhos foi recomendado, mas o vírus não têm sido isolado de nenhuma dessas espécies (MARQUES, 2006).

.Reovírus tipo 3: Além de camundongos e ratos, os anticorpos têm sido encontrados também em hamsters assintomáticos, cobaias (para qual o monitoramento foi recomendado anteriormente) e em coelhos, mas o vírus não foi isolado a partir de nenhuma dessas espécies.

.Vírus Sendai: Vírus da família Paramyxoviridae, também conhecido como o vírus da Parainfluenza tipo 1 FAISCA & DESMECHT, 2006). Roedores, como camundongos e ratos são os hospedeiros naturais para este vírus. Soropositivos entre outras espécies (incluindo o homem) são prováveis que estejam intimamente relacionados.

A transmissão se dá pelo contato direto e por aerossóis, é possível a transmissão via cama contaminada. O uso de gaiolas com sentinelas é recomendado. Provoca lesões no aparelho respiratório, geralmente associada à inflamação bacteriana da traqueia e do pulmão. No entanto, as lesões são limitadas e não são apenas indicativos da infecção pelo vírus.

Segundo Eaton et al. (1982), para se controlar um surto de Sendai, deve-se executar a desinfecção do ambiente do biotério, bem como eliminar os animais infectados e implantar a rastreabilidade para receber novos animais. Com a adoção destes procedimentos resolve-se o problema de forma muito rápida. Animais importados devem ser colocados em quarentena.

.Vírus da Coriomeningite Linfocítica: “Lymphocytic Choriomeningitis (LCM) Virus” é um vírus RNA, gênero *Arenavirus*, família *Arenaviridae*, zoonótico, transmitido por camundongos e hamsters, mas outras espécies, como por exemplo, coelhos, cobaias e ratos também parecem ser suscetíveis à infecção experimental.

Os camundongos eliminam o vírus por secreções nasais, urina, sêmen, leite e fezes. A infecção congênita neonatal é muito importante para essa espécie. O vírus se transmite tanto vertical como horizontalmente. Os camundongos infectados naturalmente, raramente apresentam sintomas clínicos. A doença apresenta baixa mortalidade. Os animais que se

contaminaram por via uterina mantêm o vírus durante toda a vida (KIMURA, 2006). Detecção de infecção enzoótica em camundongos por sorologia pode ser difícil, devido à imunotolerância. Os animais contaminados raramente apresentam sintomas clínicos.

.Poliomavírus do camundongo: Vírus DNA, família *Poliomaviridae*, gênero *Poliomavirus*, potencialmente oncogênicos em roedores e em algumas espécies de primatas não-humanos (FERNÁNDEZ MUÑOZ, 2007).

Provoca rara manifestação de infecção cerebral que com frequência evolui rapidamente uma vez iniciados os sintomas. A doença afeta o cérebro e a medula espinhal.

.Vírus Ectromelia: “Mousepox” pertencem à família Poxviridae, gênero *Orthopoxvirus*. São os únicos vírus DNA de fita dupla que se replicam no citoplasma da célula, apresentam envelope (MARQUES, 2006). É um patógeno altamente virulento, natural de camundongos, que provoca “Mousepox”, uma doença grave com alta taxa de mortalidade, que provoca lesões cutâneas (FENNER et al., 1993). Tem sido isolado de surtos em colônias de animais de laboratório e causou graves perturbações na investigação biomédica. *Mousepox* foi utilizada no passado como um modelo para estudos sobre a patogênese das infecções generalizadas, a resposta imune celular a infecções virais e os determinantes genéticos de susceptibilidade e resistência à doença. Já foi proposto como um modelo para o estudo da varíola.

Infecções recentes vieram principalmente a partir de materiais biológicos contaminados, como soros e células e também pelo contato com camundongos silvestres e animais de estimação. A suscetibilidade e resposta de anticorpos diferem muito entre as linhagens de camundongos (MARQUES, 2006).

.Vírus da Encefalomielite Murina de Theiler (TMEV): “Mouse poliovirus” (“Theiler's meningoencephalitis vírus”) são vírus RNA, patógeno entérico de camundongos, pertencente ao gênero *Cardiovirus* da família *Picornaviridae*. Os TMEV têm sido classificados em dois subgrupos, de acordo com sua atividade biológica após inoculação intracerebral. Cepas neurovirulentas (GDVII e FA)

induzem uma encefalite aguda e fatal, enquanto aquelas de baixa virulência (TO, WW, DA e BeAn) persistem no sistema nervoso central, induzindo doença crônica, caracterizada por desmielinização. A enfermidade recebeu considerável atenção devido a sua semelhança com a poliomielite humana (MARQUES, 2006).

A infecção natural por TMEV tem sido demonstrada em colônias convencionais de camundongos e, em sua maioria, a infecção é assintomática. Embora o TMEV seja descrito como um patógeno de camundongos, anticorpos para TMEV-GDVII têm sido detectados em soros de ratos provenientes de biotérios que mantêm colônias convencionais (RODRIGUES, 2004).

3.4.3.3 Parasitos

ENDOPARASITOS

.NEMATODEOS: Várias espécies foram relatadas na maioria das espécies de animais de laboratório. Eles podem colonizar diferentes partes do trato intestinal, como estômago, fígado, ceco, cólon e até mesmo a vesícula urinária de ratos, como ocorre para *Trichosomoides crassicauda*. Devido às diferenças em seus ciclos de vida e diferentes predileções por sítios em seus hospedeiros, diversas técnicas de detecção (por exemplo, exame perianal com fita de celofane, flotação, conteúdo cecal úmido) podem ser necessárias para detectar ou excluir estágios parasitários de nematóides em camundongos e ratos (*Syphacia sp*, *Aspiculuris sp*) com suficiente segurança.

.*Syphacia obvelata*: Endoparasito pertencente à família Oxyuridae, presente em quase todas as criações convencionais de camundongos, ratos e hamsters. Este nematodo habita o ceco, apresentando ciclo biológico completo que se completa a cada 15 dias. Os machos morrem após o acasalamento. Fêmeas grávidas migram para o ânus, à noite, e ejetam os ovos. Doze horas após ser ejetado, o ovo com a larva infectante é ingerido pelo roedor, como um contaminante na ração ou durante a limpeza das gaiolas.

Uma característica incomum sobre o ciclo de vida desta espécie é a possibilidade de retroinfecção. Se isso ocorrer, eles podem fazer seu caminho

para o ceco na forma madura. Há também evidências de que podem eclodir larvas na região perianal e penetrarem no ânus e migram para o ceco (ROBERTS & JANOVY. JR, 2002). A infecção é subclínica, mas quando é maciça, há um aumento do número de animais que apresentam prolapso de reto (MARQUES, 2006).

.*Aspiculurus tetraptera*: Endoparasito pertencente à ordem Ascarida, família Oxyuridae, amplamente distribuído em colônias de roedores convencionais, parasitando o ceco de camundongos. É considerado um parasito não patogênico. Transmitido pela ingestão de ovos embrionados (MARQUES, 2006).

.*CESTODEOS*: A maioria das espécies requer um hospedeiro intermediário e são, portanto, improváveis de serem encontrados em instalações de animais bem geridas. Alguns, no entanto, podem ter um ciclo de vida direto, como, por exemplo, pela ingestão de ovos, como o *Vampirolepis nana*, que já foram detectados em colônias de roedores convencionais.

.*Rodentolepis nana*: É a tenia anã, de parasitismo raro, pode ser transmitida de modo indireto através de insetos, como baratas e besouros ou pulgas, como hospedeiros intermediários. Também pode ser transmitida através da ingestão direta ou por auto-infecção, na qual todo o ciclo de vida ocorre no intestino delgado do hospedeiro. Seu ciclo de vida completo é de 14 a 16 dias. Normalmente não há sinais exteriores de infecção. Entretanto, enterite catarral, diarreia, emagrecimento e perda de peso podem ocorrer com grandes infecções (ROBERTS & JANOVY JR, 2002).

.*TRICOMONÍDEOS*:

.*Tritrichomonas muris*: Protozoário flagelado, não patogênico, pertencente à classe Mastigophora, habitante comum do ceco e colo de camundongos, ratos e hamsters. Seu ciclo biológico é simples e direto. O trofozoíto é eliminado com as fezes, praticamente não produzindo cistos. Quando em grande quantidade pode ocasionar diarreia no hospedeiro (MARQUES, 2006). A principal via de infecção é a ingestão feco-oral.

Atualmente, não existem evidências de que estes flagelados possivelmente apatogênicos tenha qualquer impacto sobre os parâmetros fisiológicos de seu hospedeiro. São, contudo, provavelmente espécie-específicos e, portanto, podem ser um indicador de uma fuga no sistema de barreira ou do contato direto ou indireto com roedores silvestres.

.Spiroucleus muris (Hexamita muris): Protozoário flagelado, pertencente à família Hexamitidae que vive na mucosa intestinal, principalmente no duodeno. O principal modo de transmissão é através da ingestão de cistos infectantes. A incidência de infecção é baixa em colônias de camundongos convencionais. Camundongos com 3 a 6 semanas de idade parecem ser mais suscetíveis, quando infectados são geralmente menores em tamanho e têm distensão abdominal. Podem apresentar desidratação e anorexia, a massa fecal pode ser visto na área perianal (ROBERTS & JANOVY JR, 2002). Camundongos derivados por cesariana e mantidos em um biotério com barreiras, são geralmente livres deste protozoário. Eles podem induzir a sinais clínicos e ter impacto em vários tipos de experimentos.

.Giardia muris: Protozoário flagelado, pertencente à família Hexamitidae, subfamília Giardinae e colonizam a parte superior do intestino delgado de animais convencionais (ROBERTS & JANOVY JR, 2002), causando, geralmente, infecções subclínicas em roedores de laboratório; entretanto, podemos observar que os animais apresentam perda de peso, piloereção e distensão abdominal com intensa produção de gases. A ingestão de cistos infectantes é o principal modo de transmissão, e a dose mínima infectante para um camundongo é de aproximadamente dez cistos (MARQUES, 2006).

.Entamoeba muris: Protozoário pertencente à classe Sarcodina, família Entamoebidae. Reproduzem-se por divisão binária, sendo os cistos a forma infectante do parasito. São comensais e colonizam o ceco e o colo (MARQUES, 2006). Infecções são subclínicas e nenhum exemplo de interferência com pesquisa foi relatado. Eles podem, contudo, ser um indicador de falhas nas barreiras sanitárias.

.ECTOPARASITOS: Colônias de animais de laboratório podem sofrer severamente com ectoparasitas (ácaros, pulgas, piolhos, malófagos), o que não deve ocorrer em biotérios controlados.

3.5 Microbiota do animal e contaminação ambiental

O conhecimento do padrão microbiológico dos animais de laboratório é de fundamental importância não só porque pode afetar os animais e as pessoas, mas porque pode também influenciar severamente os resultados dos estudos experimentais. O primeiro simpósio que tratou da influência dos microrganismos nos resultados experimentais ocorreu em 1971 (PAKES & BENIRSCHKE, 1971) e desde então a importância dos microrganismos como fatores que podem influenciar os experimentos em animais tem sido descrita por vários autores (BAKER, 1998; NICKLAS et al., 1999, PETERSON, 2008; CLIFFORD & WATSON, 2008).

Os agentes infecciosos podem afetar os animais de diferentes formas. Alguns vão ocasionar doenças, induzindo sinais clínicos com variável morbidade e mortalidade. Outros, porém, podem causar infecções silenciosas que só vão aparecer com os procedimentos experimentais (estresse, imunossupressão, tumores, substâncias tóxicas) ou com influências ambientais (transporte, temperatura, umidade). Um outro aspecto importante é que, independente de seu potencial patogênico, alguns microrganismos podem alterar alguns parâmetros fisiológicos e com isso aumentar a variabilidade entre os indivíduos em um experimento. Conseqüentemente, isso pode acarretar uma necessidade de maior número de animais para se obter um estudo significativo.

O fator predisponente mais importante em animais de laboratório, capaz de ocasionar a imunossupressão e o subsequente desenvolvimento da doença é o estresse. Sabe-se atualmente que o estresse pode estar presente mesmo nos considerados “simples” procedimentos de rotina. Balcombe e colaboradores (2004) investigaram, em cerca de 80 trabalhos publicados, o estresse associado a três procedimentos de rotina em biotérios de experimentação: manejo (qualquer tipo de manipulação não invasiva ao animal,

como pegar no animal, trocá-lo de gaiola), coleta de sangue e o procedimento de administração forçada de líquidos ou alimento por sonda esofágica (gavagem). Os resultados demonstraram que os animais reagem a cada um desses procedimentos com respostas fisiológicas relacionadas ao estresse. Há modificações significativas nos parâmetros que são considerados indicadores de estresse, tais como: concentração de cortisol no sangue, prolactina ou hormônio do crescimento, glicose, epinefrina, pressão arterial, frequência cardíaca e comportamento. As diferenças observadas variaram de 20 a 100%, podendo mesmo ser ainda maiores, em relação aos valores basais ou ao grupo controle e duram no mínimo trinta minutos. Observaram também que a resposta imune dos animais se alterava, quando eram manipulados pelo pessoal do laboratório. A conclusão desse estudo (BALCOMBE et al., 2004) indica que há quase que uma situação “permanente” de estresse na vida dos animais de laboratório que pode influenciar a resposta imune de forma constante.

É importante reconhecer que o perfil das infecções em biotérios vem se modificando ao longo dos tempos. Vários agentes infecciosos, os quais eram presentes em biotérios, agora estão ficando mais raros, tais como vírus Sendai, *Mycoplasma pulmonis* e cestódeos, embora continuem presentes em populações silvestres, assim como possivelmente em amostras armazenadas (CLIFFORD & WATSON, 2008). No entanto vários outros agentes biológicos continuam presentes, assim como o vírus da hepatite do camundongo (MHV) (CLIFFORD & WATSON, 2008).

O problema da contaminação microbiológica dos biotérios tem sido amplamente abordado na literatura científica (BAKER, 1998; REGH & TOTH, 1998; CARTY, 2008; PETERSON, 2008), embora existam poucos estudos publicados comparando os biotérios quanto ao seu "status microbiológico.

O estudo de SEOK e colaboradores (2005) realizado na Coreia avaliou 122 camundongos e 90 ratos de cinco grandes biotérios de criação, sendo três SPF e dois convencionais, durante o período de 2000-2003. Nos camundongos foram detectados vírus da hepatite do camundongo (MHV), Sendai vírus e *Mycoplasma*, todos oriundos de biotérios convencionais. *Helicobacter sp.* foi identificado por PCR em uma de 24 amostras dos camundongos. Oocistos de criptosporídios foram observados apenas em camundongos convencionais

(4%). Os exames histopatológicos revelaram espessamento da parede alveolar e infiltração linfocítica ao redor dos bronquíolos dos camundongos oriundos de biotérios contaminados.

Outro estudo comparativo é o de WON e colaboradores (2006) que compararam os animais (ratos e camundongos) mantidos em biotérios convencionais e com barreiras na Coreia, durante um período de cinco anos a fim de observarem a contaminação microbiológica. Nesse estudo, foram testados 670 camundongos de 51 biotérios (38 com barreira e 13 convencionais) e 265 ratos de 34 biotérios (18 com barreira e 16 convencionais). Dentre os camundongos de biotérios com barreiras foram detectados hantavírus, vírus da hepatite do camundongo (MHV), *Mycoplasma pulmonis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella pneumotropica*, pulgas e protozoários e nos camundongos de biotérios convencionais foram encontrados hantavírus, vírus da hepatite do camundongo (MHV), Sendai vírus, *Mycoplasma pulmonis*, *Pasteurella pneumotropica*, pulgas e protozoários. No entanto, de acordo com o esperado pelos autores, a prevalência dos microrganismos foi bem maior nos biotérios convencionais quando comparados aos com barreiras. Mais de 40% dos biotérios convencionais apresentaram vírus da hepatite do camundongo (MHV), Sendai vírus e *Mycoplasma pulmonis*, sendo que dentre os biotérios infectados a prevalência mais alta foi do vírus da hepatite do camundongo (MHV) com 84,6%. Os autores concluíram destacando a relevância desse patógeno em camundongos e também do hantavírus, que foi encontrado em ambos os tipos de biotérios e que, portanto, deve passar a ser investigado rotineiramente na Coreia, segundo sugestão dos autores (WON et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Com o propósito de avaliar a utilização de protocolo de descontaminação com formol a 37% em biotérios bioprotetidos e não-bioprotetidos, foram analisadas microbiologicamente amostras oriundas do ambiente e dos animais de ambos os biotérios. As amostras ambientais de cada biotério foram coletadas antes e depois dos procedimentos de descontaminação, e repetidas a cada 90 dias. Já as amostras dos animais foram coletadas no momento de sua introdução no biotério bioprotetido e repetidas a cada 90 dias, entre Abril de 2007 e Outubro de 2008.

4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

Foram utilizados nesse estudo dois biotérios de experimentação, localizados no Campus da Fundação Oswaldo Cruz, pertencentes ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ), sendo um deles considerado bioprotetido (biotério A) e outro não (biotério B).

4.3 ANIMAIS UTILIZADOS

Cada um dos biotérios estudados tem uma população de cerca de 3.000 camundongos, machos e fêmeas, e de diferentes linhagens e idades. Desta forma, 222 animais (7,44%) do biotério A e 316 (10,54%) do biotério B foram randomicamente selecionados para o estudo, totalizando 538 animais. Tomou-se o cuidado de incluir animais de todos os “racks” e estantes ventiladas de cada biotério.

Para os testes bacteriológicos, utilizou-se amostras de 222 animais do biotério A e 236 do biotério B; para os testes virológicos, 119 do biotério A e 236 do biotério B; já para os exames parasitológicos, utilizou-se 158 do biotério A e 316 do biotério B. A escolha de animais para cada bateria de testes se deu também de forma randômica.

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Caracterização, descontaminação e controle dos biotérios.

Para fins deste estudo o biotério A, bioprottegido, apresentava um rigoroso controle de acesso de pessoal possuindo câmeras que fazem a filmagem de tudo o que ocorre em seu interior. Já o biotério B, embora teoricamente deveria ter controle de acesso, não possuía tais câmeras. Em ambos os biotérios foram realizados os mesmos procedimentos de higienização e descontaminação e foram sempre utilizados equipamentos de proteção individual pelas pessoas que manipulam os animais. Dessa forma, a grande diferença entre os biotérios refere-se à obediência rigorosa às regulamentações/boas práticas em todos os níveis nas dependências dos biotérios.

Ambos os biotérios, sem a presença de animais, foram submetidos à descontaminação por solução de formol a 37%, (dia 0), um gás encontrado disponível na forma líquida em soluções de contendo metanol para retardar a

polimerização (formalina). Os técnicos que participaram dos procedimentos de descontaminação fizeram uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI) apropriado. Após 10 dias, sem a ocorrência de entrada de pessoal e animais, foi realizada a colheita de material do ambiente em cada um dos biotérios para fins de investigação de presença de bactérias (Tabela 3).

4.4.2 Bioproteção dos biotérios

Para o procedimento básico de bioproteção em um ambiente, iniciou-se com a higienização e após sua conclusão, prosseguiu-se com a etapa de desinfecção ambiental. A higienização e a desinfecção foram realizadas na sequência teto, parede e piso, respectivamente. Equipamentos e materiais das salas de animais que são sensíveis à ação de produtos químicos e à umidade foram transferidos de ambiente. Em caso em que não foi possível o deslocamento, a superfície destes foi protegida com plástico esterilizado, principalmente em pontos eletro–eletrônicos.

A primeira ação tomada em cada ambiente foi a varredura de piso e recolhimento do lixo, despejado em caixa destinada a higienização. O tempo de ação adotado para cada produto foi de 15 a 20 minutos.

A sanitização dos ambientes obedeceu a uma sequência de produtos, sendo primeiro utilizado um desinfetante e por último um sanitizante. Durante a realização da atividade, atentou-se para os sistemas de vedação de portas, visores e pias. Os materiais de desinfecção foram lavados com água e desinfetados com álcool 70%, para então serem transportados para a área bioprotetida. Os materiais foram transportados através de autoclave de barreira ou porto de passagem, dependendo de suas características físico–químicas, como tamanho, resistência a ácido peracético e possibilidade de autoclavação.

O desinfetante utilizado foi o Cloreto de Benzalcônio a 50% e o sanitizante utilizado foi monopersulfato de potássio em solução de 1%. A avaliação da qualidade do status sanitário de cada ambiente foi obtida através de exame laboratorial realizado com auxílio de *swabs*, passados em pontos pré-determinados após os procedimentos de desinfecção, semeados em

placas contendo Agar-sangue e processadas de acordo com as técnicas bacteriológicas correntes.

Após a coleta das amostras ambientais e verificação de resultados negativos para bactérias patogênicas, realizou-se nova higienização do ambiente e então liberou-se a entrada de animais. A partir de então, após 90 dias, regularmente foram colhidas amostras dos animais para investigação microbiológica e parasitária durante o período de abril de 2007 a outubro de 2008 em ambos os biotérios.

4.4.3 Coleta de Amostras

- Amostras do ambiente: de cada um dos dois biotérios foram coletadas com auxílio de “swabs” estéreis amostras das portas, teto, saídas de ar condicionado, chão, paredes, “racks” e estantes ventiladas para fins de investigação bacteriológica (Tabela 3).

- Amostras dos animais: de cada um dos animais selecionados para cada bateria de testes coletou-se amostras de fezes e sangue para obtenção do soro e fragmentos de traquéia durante a necropsia.

4.4.4 Análises microbiológicas e parasitológicas

O monitoramento sanitário foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Animal do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL-FIOCRUZ).

O isolamento bacteriano foi realizado pela cultura em placas com meios específicos para o crescimento de bactérias patogênicas e a identificação realizada no equipamento VITEK- Biomeriux. O sistema automatizado permite a agilidade no processo de identificação e na validação dos resultados, minimizando possíveis erros operacionais.

O diagnóstico das viroses foi realizado pela técnica de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), com “kits” comerciais produzidos para cada

enfermidade, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Com o auxílio de uma leitora de ELISA as microplacas foram submetidas à leitura por espectometria. Amostras positivas e próximas e próximas ao ponto de corte foram obrigatoriamente repetidas para confirmação.

Os exames parasitológicos foram divididos em duas etapas: O ectoparasitológico que consistiu na inspeção do pelo do animal à microscopia estereoscópica, quando foram pesquisados ácaros e piolhos. Já o endoparasitológico foi feito pela técnica da fita adesiva de celofane e técnicas coproparasitológicas. Os testes qualitativos são complementados com análises quantitativas, onde a carga parasitária encontrada foi simbolizada com a referência cruces (+, ++, +++ e ++++).

As amostras foram submetidas às análises para investigação de bactérias, vírus e parasitos de acordo com as recomendações da FELASA (2002), conforme Tabela 2. Para a investigação de agentes bacterianos, procedeu-se á cultura bacteriológica específica para *Bordetella bronchiseptica*, *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella sp*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus* β -hemolítico. A presença de anticorpos anti-Cillia-associated respiratory *Bacillus* e anti-*Mycoplasma pulmonis* foi avaliada por ELISA.

Para a investigação de anticorpos direcionados aos principais vírus dos camundongos, testou-se por ELISA anticorpos anti-MVM, MHV, PVM, Reovirus tipo 3, Sendai Vírus, LCMV, Poliomavirus, Ectromelia vírus e TMEV. Já para as investigações parasitológicas, investigou-se a presença de pulgas, ácaros e piolhos por microscopia direta, e de *Syphacia sp.*, *Aspiculuris tetraptera*, *Rodentolepis nana*, Tricomonídeos, *Spironucleus muris*, *Giarida muris* e *Entamoeba sp.* por Exame direto da mucosa intestinal (EDMI).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi montado um banco de dados utilizando-se o programa Excel, no qual constam os resultados obtidos. Os dados foram submetidos à análise descritiva e teste não-paramétrico do Qui-quadrado (χ^2). Considerou-se estatisticamente significativas associações com valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

As bactérias foram os únicos patógenos cuja presença foi observada também no biotério bioprottegido (A). De todos os patógenos bacterianos observados, verificou-se que no biotério não-bioprottegido (B) foi detectada a presença de *C. rodentium*, *K. pneumoniae*, *Pasteurella sp.*, *Pseudomonas sp.*, além de anticorpos anti-*Mycoplasma*. Já no biotério A evidenciou-se apenas a presença de *K. pneumoniae*, *Pseudomonas sp.* e *Pasteurella sp.*, conforme Tabela 4.

No que se refere aos anticorpos específicos para as principais viroses de camundongos, verificou-se no biotério B a presença de anticorpos anti-MVM, MHV, PVM, Reovirs tipo 3, LCM e TMEV. Já no biotério A, não se evidenciou a presença de anticorpos específicos para nenhuma das viroses testadas (Tabela 4).

Quanto á presença de parasitos, verificou-se no biotério B a ocorrência de *Syphacia sp.*, *Aspiculuris tetraptera*, Tricomonídeos, *Spironucleus muris* e *Giarida muris*, enquanto no biotério A nenhum dos parasitos pesquisados foi evidenciado (Tabela 4).

No que se refere ao número de amostras positivas, verifica-se, no caso das bacterioses, que *Pasteurella sp.* foi o agente mais frequentemente encontrado no biotério A, verificado em oito das 222 amostras tesadas, seguido de *Klebsiella pneumoniae* (5/222) e *Pseudomonas sp.* (2/222). No biotério B, *Pasteurella sp.* foi também o agente mais frequentemente encontrado (8/296), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (7/296), *Pseudomonas sp.* e *Mycoplasma pulmonis* (3/296 cada), *Staphylococcus haemolyticus* (2/296) e *Citrobacter rodentium* (1/296). A comparação estatística do número de amostras positivas dos dois biotérios, em função de sua baixa freqüência, não se mostrou estatisticamente significativa (Tabela 5).

No que se refere ao número de amostras positivas, no caso das viroses, verificou-se que nenhum dos agentes pesquisados foi evidenciado no biotério

A. No biotério B, o vírus da Hepatite de Camundongos (MHV) foi significativamente o agente mais encontrado (146/236), seguido do Virus da Encefalomielite Murina - TMEV (85/236), Vírus Diminuto do Camundongo - MVM (65/236) e, em menores proporções, o Vírus da Coriomeningite Linfocítica - LCMV (15/236), Pneumovirus (7/236) e Reovirus tipo 3 (5/236). Os demais vírus não foram evidenciados. A comparação estatística do número de amostras positivas dos dois biotérios mostrou-se estatisticamente significativa no caso do MHV, TMEV e MVM (Tabela 6).

Quanto á presença de parasitos verificou-se que, assim como no caso das viroses, nenhum dos parasitos estudados foi evidenciado no biotério A. No biotério B, *Syphacia sp.* foi significativamente o agente mais encontrado (161/316), seguido em menores proporções por *Spironucleus muris* (13/316), Tricomonídeos (7/316) e *Giarida muris* (1/316). Os demais parasitos não foram evidenciados. A comparação estatística do número de amostras positivas dos dois biotérios mostrou-se estatisticamente significativa somente no caso de *Syphacia sp.* (Tabela 7). Não foram evidenciados ectoparasitos em nenhum dos animais testados.

Tabela 3: Pontos de ambiente biotério A e do Biotério B submetidos à coleta de material para fins de investigação de presença de bactérias.

Local Principal	Local Secundário	Biotério A Contaminação	Biotério B Contaminação
Sala	Parede	SIM	SIM
Sala	Chão	SIM	SIM
Sala	Porta	SIM	SIM
Sala	Ar condicionado	SIM	SIM
Sala	Estante ventilada	SIM	SIM
Sala	"Rack" ventilado	SIM	SIM
Corredor descontaminado	Autoclave	SIM	SIM
Corredor descontaminado	Parede	SIM	SIM
Corredor descontaminado	Chão	SIM	SIM
Corredor descontaminado	Porta	SIM	SIM
Corredor descontaminado	Ar condicionado	SIM	SIM
Corredor não descontaminado	Autoclave	SIM	SIM
Corredor não descontaminado	Parede	SIM	SIM
Corredor não descontaminado	Chão	SIM	SIM
Corredor não descontaminado	Porta	SIM	SIM
Corredor não descontaminado	Ar condicionado	SIM	SIM

Obs.: Após 72 horas de incubação a 37°C as culturas de swabs ambientais relacionados acima, foram todas positivas para *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* e *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Tabela 4. Presença de Bactérias, Vírus e Parasitos em Biotérios de Camundongos Bioprottegido (A) e Não-Bioprottegido (B).

Patógeno	Camundongos	
	Biotério A	Biotério B
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	-
Cillia-assoc resp. <i>Bacillus</i>	-	-
<i>Citrobacter rodentium</i>	-	X
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X	X
Bactérias <i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	X
<i>Pasteurella spp</i>	X	X
<i>Pseudomonas spp</i>	X	X
<i>Salmonella spp</i>	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-
<i>Streptococcus</i> β -hemolítico (grupo D)	-	-
Vírus Diminuto do Camundongo (MVM)	-	X
Vírus Hepatite de Camundongos (MHV)	-	X
Pneumovírus (PVM)	-	X
Reovírus tipo 3	-	X
Vírus Sendai Vírus	-	-
Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCM)	-	X
Poliomavírus	-	-
Ectromelia vírus	-	-
Vírus da Encefalomielite Murina (TMEV)	-	X
Pulgas, ácaros e piolhos	-	-
<i>Syphacia spp.</i>	-	X
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	-	X
Parasitos <i>Rodentolepis nana</i>	-	-
Tricomonídeos	-	X
<i>Spiroucleus muris</i>	-	X
<i>Giardia muris</i>	-	X
<i>Entamoeba sp.</i>	-	-

Tabela 5 – Número de amostras positivas para a pesquisa de bactérias em Biotérios de camundongos Bioprotetido (A) e Não-Bioprotetido (B).

Bactérias	Biotério A	Biotério B	p-valor χ^2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0/222	0/296	-
Cillia-assoc resp. <i>Bacillus</i>	0/222	0/296	-
<i>Citrobacter rodentium</i>	0/222	1/296	0,386
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5/222	7/296	0,933
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	0/222	3/296	0,132
<i>Pasteurella sp.</i>	8/222	8/296	0,552
<i>Pseudomonas sp.</i>	2/222	3/296	0,897
<i>Salmonella sp.</i>	0/222	0/296	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0/222	2/296	0,259
<i>Staphylococcus aureus</i>	0/222	0/296	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0/222	0/296	-
<i>Streptococcus</i> β -hemolítico (grupo D)	0/222	0/296	-

Tabela 6 – Número de amostras positivas para a pesquisa de anticorpos antivirais em Biotérios de camundongos Bioprotégido (A) e Não-Bioprotégido (B).

Vírus	Biotério A	Biotério B	p-valor χ^2
Vírus Diminuto do Camundongo (MVM)	0/119	65/236	<0,0005
Vírus Hepatite de Camundongos (MHV)	0/119	146/236	<0,005
Pneumovírus (PVM)	0/119	7/236	0,058
Reovírus tipo 3	0/119	5/236	0,110
Sendai Vírus	0/119	0/236	-
Vírus Coriomeningite Linfocítica (LCM)	0/119	15/236	0,005
Poliomavírus	0/119	0/236	-
Ectromelia vírus	0/119	0/236	-
Vírus Encefalomielite Murina (TMEV)	0/119	85/236	<0,0005

Tabela 7 – Número de amostras positivas para a pesquisa de parasitos em Biotérios de camundongos Bioprotégido (A) e Não-Bioprotégido (B).

Parasitos	Biotério A	Biotério B	p-valor χ^2
Pulgas, ácaros e piolhos	0/158	0/316	-
<i>Syphacia spp.</i>	0/158	161/316	<0,0005
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	0/158	2/316	0,316
<i>Rodentolepis nana</i>	0/158	0/316	-
Tricomonídeos	0/158	7/316	0,059
<i>Spironucleus muris</i>	0/158	13/316	0,010
<i>Giardia muris</i>	0/158	1/316	0,475
<i>Entamoeba spp.</i>	0/158	0/316	-

6 DISCUSSÃO

Comparando-se os resultados deste estudo com a literatura especializada em animais de laboratório, observou-se que, embora tenha ocorrido uma modificação na prevalência das infecções, algumas destas são persistentes, enquanto outras despontam como emergentes, determinando um importante desafio no campo da qualidade microbiológica em animais de laboratório. Apesar da importância do controle microbiológico, destacado na literatura, observou-se que existem poucos estudos com a finalidade de dar visibilidade aos problemas das infecções nos diversos biotérios em que os animais se encontram em diferentes países. Destacam-se os estudos de JACOBY & LINDSEY (1997), nos EUA, e SEOK e colaboradores (2005) e WON e colaboradores (2006), ambos na Coreia, os quais mais se assemelham a proposta do nosso estudo.

Para fins deste estudo optou-se por fazer a testagem das amostras para os microrganismos de acordo com a rotina da instituição em que se encontram os biotérios estudados. A rotina institucional segue as recomendações da FELASA (2002) em linhas gerais. A proposta da FELASA representa um consenso de várias associações de animais de laboratório em toda a Europa, que visam à padronização de tais procedimentos e por isso tem sido a referência para os biotérios também em diversos países, como no Brasil.

Os resultados indicaram que a maior contaminação e concentração de agentes ocorreu no Biotério B, isto é no biotério não-bioprotetido, o que já era esperado neste estudo. Nos poucos estudos encontrados na literatura científica que compararam animais oriundos de biotérios com barreiras com animais oriundos de biotérios convencionais (SEOK et al., 2005; WON et al., 2006), os resultados também indicaram maior contaminação dos animais nos ambientes convencionais, o que equivale a dizer não-bioprotetido neste estudo.

O tipo de estratégia adotada neste estudo visando diminuir a contaminação ambiental do biotério A – bioprotégido - acabou por realçar a importância da conscientização e treinamento do pessoal que manipula os animais, sejam eles os técnicos que cuidam dos animais e/ou pesquisadores. O fato do biotério A ter uma câmera filmando as atividades diárias funcionou como uma permanente vigilância para que todos os procedimentos ocorridos em seu interior estivessem de acordo com as regulamentações e recomendações. Tal fato reforça a abordagem de Pritt e colaboradores (2007) que destacaram a importância do treinamento do pessoal quando se objetiva trabalhar com biossegurança. Os autores citados destacaram a “cultura de biossegurança” como um componente crítico para que qualquer instituição seja bem sucedida, sendo que tal cultura depende basicamente de um efetivo programa de treinamento de pessoal em todos os níveis. Embora no presente estudo não tenha sido realizado um treinamento específico e diferenciado do pessoal que frequentava o biotério A (bioprotégido), acredita-se que a constante filmagem das áreas de manipulação dos animais assegurou a perfeita implementação do que Pritt e colaboradores (2007) chamaram de “cultura da biossegurança”.

Bactérias foram encontradas em ambos os biotérios, enquanto vírus e parasitas somente foram detectados no biotério não-bioprotégido.

As bactérias encontradas no presente estudo em ambos os biotérios, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella sp* e *Pseudomonas sp* não representam achados incomuns. Na investigação de Won e colaboradores (2006) *Pasteurella pneumotropica* e *Pseudomonas aeruginosa* também estavam presentes nos biotérios com barreiras e nos convencionais, o que coincide com os achados do presente estudo, sendo que *Klebsiella pneumoniae* não foi investigada por eles, o que não permite a comparação com nosso estudo. *Pasteurella pneumotropica* foi relatada em 50% dos biotérios com barreiras e em 54% dos convencionais no estudo de Won e colaboradores (2006), o que revela ser um achado freqüente em biotérios na Coréia. *Pseudomonas aeruginosa*, embora em menor percentual, também apareceu em 5% dos biotérios com barreiras e em 15% dos biotérios convencionais. Tais resultados, assim como a literatura pertinente, sugerem a dificuldade de se impedir a presença dessas bactérias, mesmo em biotérios com maior controle que os

convencionais. Com isso, pode-se dizer que esse resultado era esperado também em nossos biotérios. Segundo Barthold (2008), *Pasteurella pneumotropica* é um patógeno oportunista que pode ser considerado normal na microflora intestinal de camundongos silvestres e também de muitos animais convencionais, porém quando ela é eliminada, o seu nicho entérico é ocupado por *Klebsiella*, *Proteus* ou outras enterobactérias. Nesse sentido o que Barthold (2008) questiona é o significado desses achados frequentes dessa bactéria, isto é, até que ponto se deve pensar em eliminá-las. Esse questionamento também permite ver a importância desse tipo de monitoramento dos animais, até mesmo para se rediscutir a busca por certos microrganismos.

Já *Mycoplasma pulmonis*, que foi detectado somente no biotério não bioprotetido nesse estudo, pode ser identificado como a bactéria responsável pela maioria das infecções pulmonares em camundongos (SIROIS, 2007) sendo reconhecido como associado à enfermidades em camundongos desde 1937 (BARTHOLD, 2008). Na Coreia, *Mycoplasma pulmonis* apareceu em 2,6% (1 em 38) dos biotérios de camundongos com barreiras e em 69% dos biotérios convencionais (WON et al., 2006). Já no estudo de Seok e colaboradores (2005) *Mycoplasma* foi detectado apenas em amostras de camundongos de um biotério convencional, dentre dois e em nenhum dos três biotérios com barreiras investigados. Em inquérito realizado nos EUA em 1996, a ocorrência de *Mycoplasma* ficou abaixo de 5% nas amostras oriundas de animais de biotérios com barreiras e em cerca de 15% em biotérios convencionais (JACOBY & LINDSEY, 1997). Tais achados, assim como o nosso, demonstram que o esforço das barreiras ou bioproteção é capaz de evitar enfermidades nos animais por *Mycoplasma pulmonis*.

De fato, a fim de erradicar este agente foram sugeridos dois métodos, a rederivação por cesareana e o uso e cuidados com os animais em ambientes especificamente designados (SEOK et al., 2005). Em revisão recente sobre o tema de enfermidades persistentes, Clifford e Watson (2008) afirmaram que *Mycoplasma pulmonis*, que era bastante prevalente na América do Norte há cerca de vinte anos, havia praticamente desaparecido em 2007. Os autores atribuem tal fato a razões institucionais e a razões intrínsecas ao agente biológico. Destacamos aqui que essas chamadas razões institucionais estão

diretamente ligadas ao esforço de se garantir barreiras adequadas (JACOBY & LINDSEY, 1997; SEOK et al., 2005; WON et al., 2006)

Dentre todos os microrganismos encontrados o de maior ocorrência foi o Vírus da Hepatite de Camundongos (MHV). Tal achado coincide com dados da literatura, já que Won e colaboradores (2006), em seu estudo na Coreia, encontraram este vírus em mais de 40% dos biotérios convencionais investigados. Em 1996, nos EUA, uma pesquisa nacional indicou que mais de 72% das instituições com biotérios convencionais apresentavam o MHV, que também foi encontrado em 12% das instituições que possuíam biotérios com barreiras (JACOBY & LINDSEY, 1997). Outros autores (CLIFFORD & WATSON, 2008) também relataram a persistência do MHV nas colônias de camundongos. Clifford e Watson (2008) destacaram que, embora o MHV apresente uma relativa fragilidade ambiental quando comparado a outros agentes, sua alta capacidade de persistir em biotérios se deve a sua capacidade de infectar rapidamente vários animais, visto que é altamente contagioso e disseminável. No entanto, os mesmos autores (CLIFFORD & WATSON, 2008) destacam que a eliminação do MHV é mais fácil do que de outros agentes, já que não persistem no ambiente. Como a transmissão se dá por via oronasal, contato direto, fômites e através da placenta, é necessário um controle dos fômites e testagem de animais que chegam a fim de se fazer a eliminação do vírus. De fato, em nosso biotério A (bioprotetido,) o MHV não foi encontrado, embora no Biotério B tenha sido o mais importante agente biológico encontrado, o que demonstra a possibilidade de seu controle pelas boas práticas de biossegurança em biotérios. .

O vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV), detectado no biotério B (não-bioprotetido), também foi detectado em 15% dos biotérios convencionais na Coreia (WON et al., 2006). Devido ao potencial zoonótico desse vírus, que em humanos pode causar sintomas similares aos da gripe, os animais infectados devem ser eliminados da colônia. Este vírus é pouco investigado em diversos biotérios e, nos EUA, Jacoby & Lindsey (1998) revelaram que 20% dos biotérios investigados não faziam testes para monitorização do LCMV.

O vírus diminuto do Camundongo (MVM) detectado somente no Biotério B (não-bioprotetido) no presente estudo também apareceu em 8% dos biotérios convencionais no estudo de Won e colaboradores (2006) e em

nenhum dos com barreiras na Coreia. O MVM era o único parvovírus de camundongo conhecido nos anos 80 e permanece prevalente nos dias atuais (CLIFFORD & WATSON, 2008). As razões pelas quais a infecção por parvovírus continua aparecendo nos biotérios provavelmente se relaciona mais com a dificuldade de erradicação do que a uma possível reintrodução. Isso ocorre porque eles permanecem infectantes por longos períodos no ambiente (YANG et al., 1995) e são difíceis de serem inativados, permanecendo por longos períodos também nos animais infectados (SMITH et al., 1993). São mais difíceis de serem detectados do que muitos outros agentes (BESSELSSEN et al., 2000). Nesses casos, com vistas a uma erradicação do vírus, as recentes propostas de desenvolvimento de uma melhor tecnologia é a implantação de “racks” e gaiolas microisoladoras (SMITH et al., 2007).

O vírus Sendai, que é o principal agente causador de doenças respiratórias em camundongos, foi detectado em 46% dos biotérios convencionais no estudo de WON e colaboradores (2006). Também apareceu em camundongos convencionais no estudo de SEOK e colaboradores (2005) e em mais de 20% das instituições convencionais (e menos de 5% nas SPF) em um estudo americano de 1996 (JACOBY & LINDSEY, 1997). No presente estudo, tal vírus não foi evidenciado em nenhum dos biotérios. De fato, em 2007, de acordo com relato de Clifford e Watson (2008), o vírus Sendai, juntamente com o *Mycoplasma pulmonis*, praticamente desapareceram nos EUA.

O vírus da Encefalomielite Murina Theiler's (TMEV) também só foi evidenciado no presente estudo no biotério B (não-bioprotetido). Em estudo realizado nos EUA em 1996, o TMEV foi detectado em mais de 30% dos camundongos de biotérios convencionais e em quase 5% dos biotérios com barreiras (JACOBY e LINDSEY, 1997). O TMEV permanece moderadamente prevalente em biotérios de camundongos, outrossim, as razões dessa continuação não tem sido facilmente detectadas (CLIFFORD & WATSON, 2008).

O fato de não terem sido encontrados pulgas, ácaros e piolhos em nenhum dos biotérios, especialmente considerando o tempo de duração da pesquisa (colheitas de amostras por mais de um ano), revela que não há persistência ambiental dos ovos desses parasitos nesses ambientes. Tal fato

evidencia que os processos de descontaminação dependentes do uso de biocidas no ambiente, tanto no que se refere à qualidade dos produtos usados quanto à ação mecânica na sua distribuição foram eficientes.

Os protozoários investigados, *Giardia muris* e *Spironucleus muris* foram encontrados no biotério B (não-bioprotetido), devido à resistência dos cistos e o tempo de infectividade, o que coincide com dados da literatura, já que WON e colaboradores (2006) relataram à presença de protozoários em 85% dos biotérios convencionais e mesmo nos biotérios com barreiras (42%).

7 CONCLUSÕES

1- Dentre os biotérios estudados houve diferença quanto à qualidade microbiológica dos animais, sendo o biotério bioprotégido capaz de assegurar um melhor padrão microbiológico dos animais.

2- Dentre todos os microrganismos encontrados a maior ocorrência foi do Vírus da Hepatite de Camundongos (MHV), o que pode ser explicado por sua alta contagiosidade. Tal achado coincide com dados da literatura que indicam esse agente como o vírus mais frequente em biotérios.

3- A diferença entre as ocorrências de anticorpos antivirais entre os dois tipos de biotérios foi estatisticamente significativa para MVM e TMEV.

4- Dentre as bactérias, a mais freqüentemente detectada foi *Pasteurella sp.*; entretanto, a diferença observada na ocorrência de bactérias entre os dois tipos de biotérios não se mostrou significativa.

5- Os processos de descontaminação dependentes do uso de biocidas no ambiente, tanto no que se refere à qualidade dos produtos usados quanto à ação mecânica na sua distribuição, foram eficientes em evitar a presença de parasitos em ambos os biotérios.

8 OBRAS CITADAS

ALDERTON, D. *Rodents of the World*. Facts on File. ISBN: Rodents. Hardback with dustjacket; 1996.

ALEXANDER, A.D. Leptospirosis in Laboratory Mice. *Science* v.224, n.4654, p. 1158; 1984.

ANDRADE, A. O Bioterismo: evolução e importância. In: Andrade A., Pinto S. C., Oliveira R. S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006.

BAKER D.G. Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and their Effects on Research. *Clinical. Microbiology. Reviews.*, v.11, n.2, p.231-266 e p.475; 1998.

BALCOMBE, J.P., BARNARD, N.D., SANDUSKY C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, v.43, n.6, p. 42-51; 2004.

BARTHOLD, S. Microbes and the Evolution of Scientific Fancy Mice. *ILAR Journal*, v.49, n.3, p. 265-271; 2008.

BESSELSSEN, D.G.; WAGNER, A.M.; LOGANBILL, J.K. Effect of mouse strain and age on detection of mouse parvovirus 1 by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis. *Comparative Medicine*, v.50, n.5, p. 498-502; 2000.

BLAAUBOER, B.J.; BARRATT, M.D.; HOUSTON, J.B. The integrated use of alternatives methods in toxicological risk evaluation. ECVAM Integrated Testing Strategies Task Force Report 1. *ATLA*, v.27, p. 229-237; 1999.

BRADFIELD, J.F.; WAGNER, J.E.; BOIVIN, G.P.; STEFFEN, E.K.; RUSSEL, R.J. Epizootic fatal dermatitis in athymic nude mice due to *Staphylococcus xylosum*. *Laboratory Animal science*, v.43, n.2, p.111-113; 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia. *Manuais e Normas Técnicas*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

BRASIL. Estado de São Paulo. Lei Nº 11.977/2005. Código Estadual de Proteção dos Animais; 25/08/2005.

BRASIL. Lei Nº 11.794/2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais; 08/10/2008.

BRUNHAM R.C., SHEN C., GILL S.R., HEIDELBERG J.F., BRANCA O., HICKEY E.K., PETERSON J., UTTERBACK T., BARRY K., BASS S., LINHER K., WEIDMAN J., KOURI H., CRAVEN B., BOWMAN C., DODSON R., GWINN M., NELSON W., DEBOY R., KOLONAY J., MCCLARTY G., SALZBERG S.L., EISEN J., FRAISER G.M., *Chlamydia muridarum* Nigg. *MicrobeWiki, the student-edited microbiology resource*. v.28, n.6, p.1397-406; 2000.

BUCHANAN-SMITH, H.M., RENNIE, A.E., VITALE, A., POLLO, S., PRESCOTT, M.J., MORTON, D.B. Harmonizing the Definition of Refinement. *Animal Welfare*, v.14, n.4, p.379-384; 2005.

CARDOSO, T. A. O & SILVA, I. Biossegurança no manejo de animais. In.: CARDOSO, T.A.O. & NAVARRO, M.B.M.A (eds) *A Ciência entre Bichos e Grilos- Reflexões e Ações da Biossegurança com Animais*. São Paulo: Hucitec, Rio de Janeiro: Faperj, 444 p., cap.10, p.229-257; 2007.

CARDOSO, T. A. O. Considerações Sobre a Biossegurança em Arquitetura de Biotérios. *Bol. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/OMS)*, p.64-67; 2001.

CARTY, A.J. Opportunistic Infections of Mice and Rats: Jacoby and Lindsey Revisited. *ILAR Journal*, v.49, n.3, p.272-276; 2008.

CASSELL G.H. & HILL A. Murine & other small-animal *Mycoplasmas*. In: BARILE M.F., RAZIN S., TULLY J.G. & WHITCOMB R.F. (Eds). *The Mycoplasmas*. New York: Academic Press, p.235-273; 1979.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* v.28, n.1, p.11-23; 2007.

CLIFFORD, C. B. & WATSON, J. Old Enemies, Still with us after All These Years. *ILAR Journal*, v.49, n.3, p.291-302; 2008.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, CEC (2007). Brussels - Fifth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union; 2007.

COOTE, J.G. Environmental sensing mechanisms in *Bordetella*. *Adv. Microb. Physiol.* v.44, p.141-181; 2001.

COUTO. S.E.R. Instalações e Barreiras Sanitárias. In: Andrade A., Pinto S. C., Oliveira R. S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006.

COUTO. S.E.R. Equipamentos, Materiais e Insumos. In: Andrade A., Pinto S. C., Oliveira R. S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro. Fiocruz; 2006.

COUTO. S.E.R. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Sanitário. In: Andrade A., Pinto S. C., Oliveira R. S., org. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro, Fiocruz; 2006.

DUNCAN A.J. *International Journal of Systematic Bacteriology*. V.43, p.314-318, 1993.

EATON, G. J., LERRO, A., CUSTER, R. P., CRANE, A. R. Eradication of Sendai pneumonitis from a conventional mouse colony. *Lab Anim Sci.* v.32, n.4, p. 384-6; 1982.

FAÍSCA, P & DESMECHT, D. Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up to date. *Res Vet Sci.* v.82, p.115-25; 2006.

FELASA - FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS. Recommendations for the Health Monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*, v.36, p. 20-42; 2002.

FENNER, F. J., GIBBS, E. P. J., MURPHY, F. A., ROTT, R., STUDDERT, M. J., WHITE, D.O. *Veterinary Virology*. *Academic Press, Inc*, 2^a ed.; 1993.

FERNÁNDEZ MUÑOZ, R. Taxonomia de los virus: familia Poliomaviridae. *Virologia* – publicación oficial de la sociedad española de Virologia, v.12, n.1; 2007.

FONTES, B. Institutional Responsibilities in Contamination Control in Research Animals and Occupational Health and Safety for Animal Handlers *ILAR Journal*, v. 49, n.3, p.326-337; 2008.

FOX, J.G.; LEE, A. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals *Laboratory animal science.* v.47, n.3, p.222-225; 1997.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Procedimentos para a manipulação de microrganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz. CTBio-Fiocruz; 2005.

GAD, S.C. Model Selection in toxicology: principles and practice. *J. Am. Coll. Toxicology*. v.9, p. 291-302, 1990.

GAMBLE M.R. & CLOUGH G. Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. *Lab Anim*. v.10, p.93-104; 1976.

GANAWAY, J.R. "Isolation of a newly recognized respiratory pathogen of laboratory rats: The CAR *bacillus*. In: *Mycoplasmal Infections of Laboratory Rodents*. BHATT, P.N. et al.. (eds). Academic Press, Inc. pp. 131- 136; 1986.

GÓRSKA P. Principles in Laboratory Animal Research for Experimental Purposes. *Med. Sci. Monit*. V.6, n.1, p.171-180; 2000.

HEYWOOD, R. The Use of Animals in Testing. *ATLA*,v.14,n.4,p.329-333; 1987.

INTERNATIONAL VETERINARY INFORMATION SERVICE (IVIS). Quality Assurance/ surveillance monitoring programs for rodent colonies. In: REUTER JD and SUCKOW MA, eds. *Laboratory Animal Medicine and Management*. New York; 2003.

JACOBY, R. O.; LINDSEY, J.R. Health Care for research animals is essential and affordable. *FASEB Journal*, v.11, n.8, p.609-6; 1997.

KIMURA, L.M.S. Principais Zoonoses. In: Andrade A., Pinto S. C., Oliveira R. S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro, Fiocruz; 2006.

KLUYTMANS J., VAN BELKUM A., VERBRUGH H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev*. v.10, n.3, p.505–20; 1997.

KOSZDIN, K.L.; DIGIACOMO, R.F. Outbreak: Detection and Investigation. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, v.41, n. 3, p.18-27; 2002.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.*, v.14, p.296–326; 2001.

LIMA E SILVA F.H.A. Barreiras de contenção. In: ODA L.M., ÁVILA S.M., orgs. *Biossegurança em laboratórios de saúde pública*. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ; 1998.

LIVINGSTON, R.S.); FRANKLIN, C.L.; BESCH-WILLIFORD, C.L.; HOOK, R.R. JR.; RILEY, L.K. A novel presentation of *Clostridium piliforme* infection (Tyzzer's disease) in nude mice. *Laboratory animal science*. v.46 n.1. p.21-25; 1996.

MACDONALD, T. T., FRANKEL, G., DOUGAN, G. GONCALVES, N. S. &SIMMONS, C. Host defences to *Citrobacter rodentium*. *International Journal of Medical Microbiology*. v.293, n.1, p.87-93, 2003.

MACKERN-OBERTI, J.P., MACCIONI, M., CUFFINI, C., GATTI, G., RIVERO, V.E. Susceptibility of Prostate Epithelial Cells to *Chlamydia muridarum* Infection and Their Role in Innate Immunity by Recruitment of Intracellular Toll-Like

Receptors 4 and 2 and MyD88 to the Inclusion. *Infection and Immunity*. V.74, n.12, p.6973-81; 2006.

MAJEROWICZ, J. *Boas Práticas em Biotérios – Biossegurança*. Rio de Janeiro, Ed. Interciência; 2008.

MARQUES, M.A.P. Controle Sorológico de viroses murinas. In: Andrade A., Pinto S. C., Oliveira R. S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro, Fiocruz; 2006.

MCGRAW, H. *Bordetella*. In. *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed. RYAN K.J. & RAY C.G. (eds); 2004.

MCGRAW, H. *Staphylococcus*. In. *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed. RYAN K.J. & RAY C.G. (eds); 2004.

MCGRAW, H. *Streptococcus*. In. *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed. RYAN K.J. & RAY C.G. (eds); 2004.

MIYAZAKI, N.H.T. & BÔAS, M.H.S.V. Medidas Sanitárias empregadas na criação de animais. In: CARDOSO, T.A.O. & NAVARRO, M.B.M.A (eds) *A Ciência entre Bichos e Grilos- Reflexões e Ações da Biossegurança com Animais*. São Paulo: Hucitec, Rio de Janeiro: Faperj, 444p., cap.6, p. 165-185; 2007.

MÜLLER, C.A. Desafios nas pesquisas em animais silvestres. *Revista CFMV*, v.11; n.34; p.77-82; 2005.

MÜLLER, C.A. Cuidados para a prevenção de Zoonoses. In.: MOLINARO, E.M., MAJEROWICZ, J. VALLE, S. (Eds) *Biossegurança em Biotérios*. Rio de Janeiro: Interciência, 226 p. cap.8, p. 119-128; 2008.

MÜLLER, C.A. Biossegurança na Experimentação Animal. In.: Anais do I Congresso Brasileiro de Bioética e Bem-Estar Animal e I Seminário Nacional de Biossegurança e Biotecnologia Animal. Recife: CFMV, p.154-157; 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). *Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório*. Goiânia. National Academy Press; 2003.

NICKLAS W. Possible routes of contamination of laboratory rodents kept in research facilities. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, v.20, p. 53-60, 1993.

NICKLAS W.; KRAFT, V.; MEYER, B. Contamination of transplantable tumors, cell lines and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Laboratory Animal Science*, v.43, p.296-300; 1993.

NICKLAS W. Microbiological Standardization of Laboratory Animals. *Berl Munch Tieraztl Wochenschr*. v.112, n.6, p.201-10; 1999.

NICKLAS, W.; HOMBERGER, F.R.; ILLGEN-WILCKE, B.; JACOBI, K.; KRAFT, V.; KUNSTYR, I.; MÄHLER, M.; MEYER, H. & POHLMAYER-ESCH, G. Implications of infectious agents on results of animal experiments – Report of the Working group on hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde Society for *Laboratory animal science* (GV-SOLAS). *Laboratory Animals*, v.33, suppl.1, p. S1:39-S1:87; 1999.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Principles of Good Laboratory Practice. *Environment Monograph n° 45*. Paris, p.29; 1992.

OLFER ED, CROSS BM, MCWILLIAM A.A. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guide to the Care and Use of Animal Experimental. Ottawa: 2^aed, v.1; 1993.

ORGANICK A.B, SIEGESMUND K.A & LUTSKY I.I. Pneumonia due to mycoplasma in gnotobiotic mice. II. Localization of *Mycoplasma pulmonis* in the lungs of infected gnotobiotic mice by electron microscopy. *Journal of Bacteriology*. V.92, p.1164-1176; 1966.

PAIXÃO, R.L. A Regulamentação da Experimentação Animal: uma breve revisão. *Revista CFMV*, v.13, n.42, p.66-75, 2007.

PAIXÃO, R.L. Bioética, Bem-estar animal e Biotérios. In.: MOLINARO, E.M., MAJEROWICZ, J. VALLE, S. (Eds) *Biossegurança em Biotérios*. Rio de Janeiro: Interciência, 226 p. cap.14, p. 205-217; 2008.

PAKES, S.P.; BENIRSCHKE, K. Diseases of Laboratory animals complicating biomedical research. *American journal of Pathology*, v.64, p. 624-769; 1971.

PETERSON, N. C. From Bench to Cageside: Risk Assessment for Rodent Pathogen Contamination of Cells and Biologics. *ILAR Journal*, v.49, n.3, p.310-315; 2008.

POLITI, F. A. S.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* v.29, n.1, p.17-28; 2008.

PRITT, S.; HANKENSON, F.C.; WAGNER, T.; TATE, M. The basics of animal biosafety and biocontainment training. *Lab Animal*, v. 36, n. 6, p. 31-38, 2007.

REHG J.E, TOTH L.A. Rodent Quarantine Programs: Purpose, Principles, And Praticce. *Lab. Anim. Sci.* v.48, n.5, p.438-447; 1998.

RIBEIRO, S.M.L.; CAMPOS, P.; TIRAPEGUI, J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo* vol.31, n.1, p.21-28; 1995.

ROBERTS, L. S. & JANOVY JR, J. *Foundations of Parasitology*, 6th. Edition. Wm. C. Brown Publishers. *Comparative Medicine Program. MU. College of Veterinary Medicine*; 2002.

RODRIGUES, D.M. Infecção por *Cardiovirus* (virus da encefalomielite murina de Theiler - TMEV) em colônias convencionais de ratos. *Tese de mestrado*. Unicamp; 2004.

RODRIGUES, D.T. *O Direito e os Animais. Uma abordagem Ética, Filosófica e Normativa*. Curitiba. Juruá Editora; 2006.

ROLLIN, B. E., The moral status of animals and their use as experimental subjects. In: *A Companion to Bioethics* (H. Kuhse & P. Singer, eds.), pp.411-422, Oxford: Blackwell Publishers Ltd.; 1998.

ROSENBERG, F.J. Sistemas de Gestão de Qualidade em Biotérios de Criação e Experimentação. In.: CARDOSO, T.A.O. & NAVARRO, M.B.M.A (eds). *A Ciência entre Bichos e Grilos - Reflexões e Ações da Biossegurança com Animais*. São Paulo: Hucitec, Rio de Janeiro: Faperj, 444p., cap.4, p.105-129; 2007.

RUSSEL W.M.S & BURCH R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. England: Universities Federation for Animal Welfare; 1992.

SANTOS, B. F. Camundongos mutantes mais utilizados. In: Andrade A., Pinto S. C., Oliveira R. S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro, Fiocruz; 2006.

SANTOS, B. F. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Genético. In: Andrade A., Pinto S. C., Oliveira R. S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro, Fiocruz; 2006.

SCHATZMAYR, H. G. & MÜLLER, C. A. As interfaces da bioética nas pesquisas com seres humanos e animais com a biossegurança. In.: Anais do I Congresso Brasileiro de Bioética e Bem-Estar Animal e I Seminário Nacional de Biossegurança e Biotecnologia Animal. Recife: CFMV, p.126-129; 2008.

SCHAUER DB, ZABEL BA, PEDRAZA IF, O'HARA CM, STEIGERWALT AG AND BRENNER DJ. Genetic and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. Nov. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.8, p.2064-68; 1995.

SEOK, S.; PARK, J.; CHO, S.; BAEK, M.; LEE, H.; KIM, D.; YANG, K.; JANG, D.; HAN, B.; NAM, K.; PARK, J. Health Surveillance of Specific Pathogen-Free and Conventionally- Housed Mice and rats in Korea. *Exp. Anim*, v.54, n.1, p.85-92; 2005.

SHEK, W. R. Role of Housing Modalities on Management and Surveillance Strategies for Adventitious Agents of Rodents. *ILAR Journal*, v.49, n.3, p.316-325; 2008.

SHOPE, R.E. The epidemiology of the origin and perpetuation of a new disease. *Perspect. Biol. Med.* v.7, p.263-278; 1964.

See also PubMed

SIMAS C. Biossegurança e arquitetura. In: *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Org. Pedro Teixeira & Silvio Valle. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ; 1996.

SIROIS, M. *Medicina de Animais de Laboratório – Princípios e Procedimentos*. São Paulo: Rocca; 2007.

SMITH, A.L.; JACOBY, R.O; JOHNSON E.A.; PATURZO, F.; BHATT, P.N. In vivo studies with an “orphan” parvovirus of mice. *Laboratory Animal Science*, v. 43, n.2; p.175-182; 1993.

SMITH, P.C.; NUCIFORA, M.; REUTER, J.D.; COMPTON, S.R. Reliability of soiled bedding transfer for detection of mouse parvovirus and mouse hepatitis virus. *Comparative Medicine*, v.57, n.1, p.90-96; 2007.

THIEL, V. *Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology*. 1 st ed. Caister Academic Press; 2007.

TRABULSI, L.R. & MARTINEZ, M.B. Micoplasmas. In. Trabulsi L.R. & ALTERTHUM, F. (eds). *Microbiologia*, São Paulo: Atheneu. Cap. 58, p.427-429; 2005.

TIMENETSKY, J; SUMMA, M.E.L.; LUCCA, R.R. *Mycoplasma pulmonis* e/ou *Mycoplasma arthritidis* em animais de laboratório (ratos e camundongos) de diferentes biotérios / *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis* in rodents from animal houses. *Braz. j. vet. res. anim. sci*; 29(1):45-50; 1992.

VAN DER LOGT, J.T. Microbiological effects and quality control in laboratory rodents. FRAR course on laboratory approaches to aging. *Aging*, v.5, n.4, p.317-327; 1993.

WAGGIE, K.S., HANSEN, C.T. GANAWAY, J.R. & SPENCER, T.S. A study of mouse strains susceptibility to *Bacillus piliformis* (Tyzzer's disease): the association of B-cell function and resistance. *Lab. Anim. Sci.* v.31, p.139-142; 1981.

WOLFENSOHN, S. & LLOYD, M., *Handbook of laboratory Animal Management and Welfare*. Oxford: Oxford University Press; 1995.

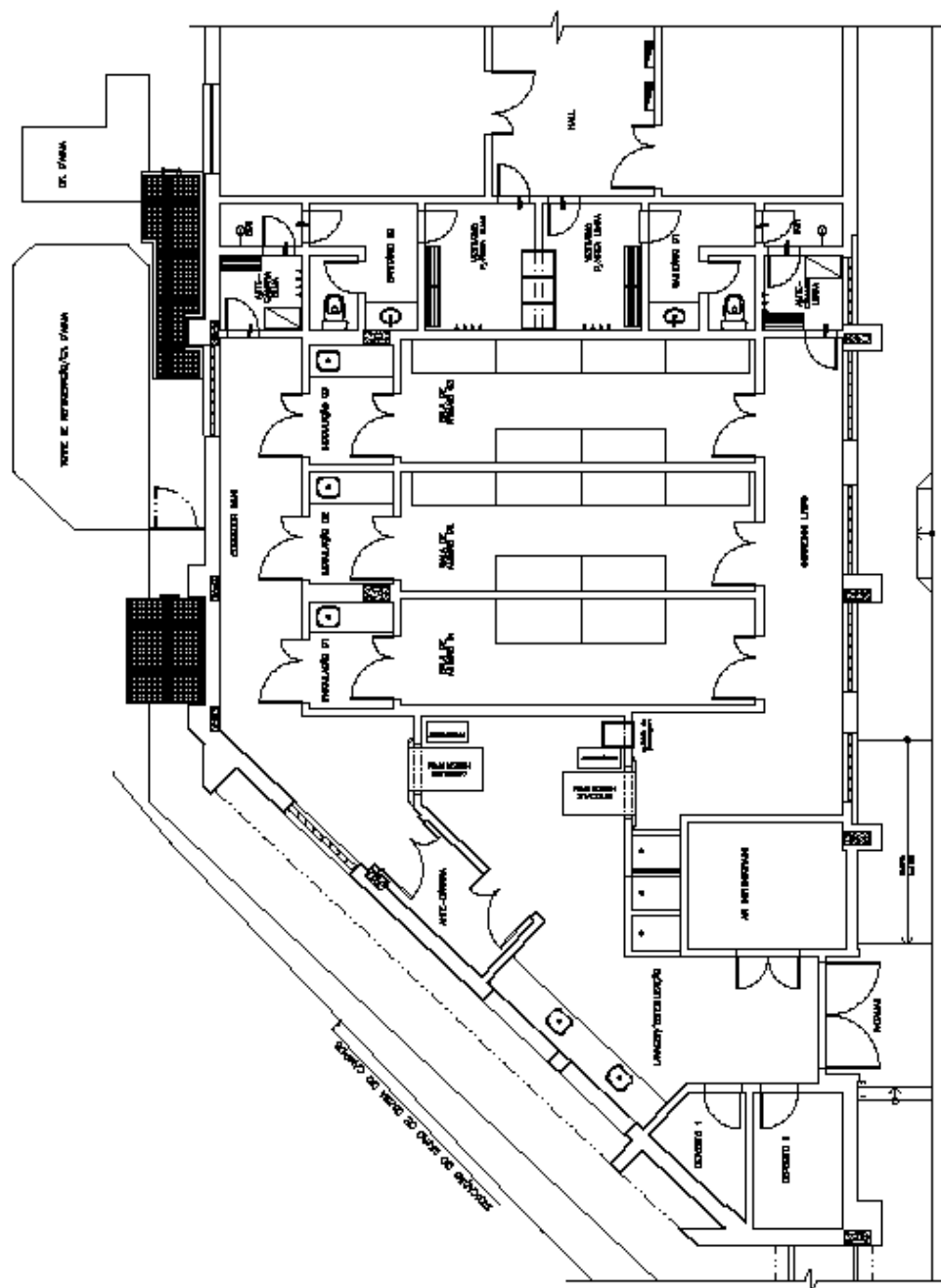
WON, Y.; JEONG, E.; PARK, H.; LEE, C.; NAM, K.; KIM, H.;HYUN, B.; LEE, S.; CHOI, Y. Microbiological Contamination of Laboratory Mice and Rats in Korea from 1999 to 2003. *Exp. Anim*, v.55, n.1, p.11-16; 2006.

YANG, F.C.; PATURZO, F.X.; JACOBY, R.O. Environmental stability and transmission of rat virus. *Laboratory Animal Science*, v.45, n.2; p.140-144; 1995.

9 ANEXOS

“LAY-OUT” DO BIOTÉRIO DE EXPERIMENTAÇÃO

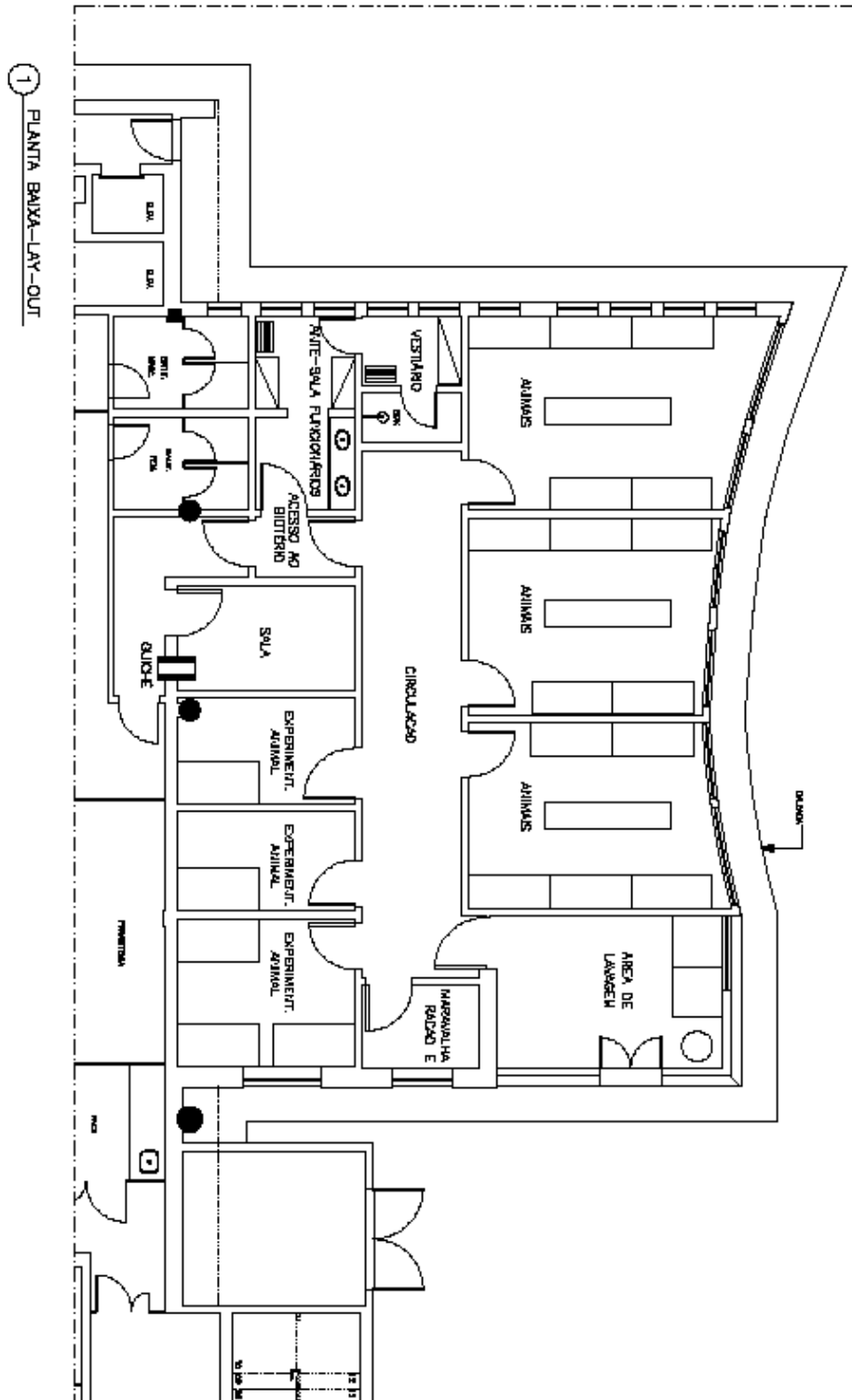
BIOTÉRIO A



1 PLANTA LAYOUT PAVIMENTO TERREO

“LAY-OUT” DO BIOTÉRIO DE EXPERIMENTAÇÃO

BIOTÉRIO B



Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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