



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Cleide Cristina Apolinário Borges

**ESTUDO RETROSPECTIVO DO MONITORAMENTO SANITÁRIO
PARASITOLÓGICO DOS CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, BALB/c An E
C57BL/6 CRIADOS E MANTIDOS EM INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DO
CECAL-FIOCRUZ - RIO DE JANEIRO**

RIO DE JANEIRO

2018

CLEIDE CRISTINA APOLINÁRIO BORGES

**ESTUDO RETROSPECTIVO DO MONITORAMENTO SANITÁRIO
PARASITOLÓGICO DOS CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, BALB/c An E
C57BL/6 CRIADOS E MANTIDOS EM INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DO
CECAL-FIOCRUZ NO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

Orientadores: Dr^a Maria Inês Doria Rossi
Dr Jairo Dias Barreira

RIO DE JANEIRO

2018

Apolinário Borges, Cleide Cristina

Estudo retrospectivo do monitoramento sanitário parasitológico dos camundongos SWISS WEBSTER, BALB/c An e C57BL/6 criados e mantidos em instalação de produção do CECAL-FIOCRUZ - Rio de Janeiro / Cleide Cristina Apolinário Borges. - Rio de Janeiro, 2018.

101 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2018.

Orientadora: Maria Inês Doria Rossi.

Co-orientador: Jairo Dias Barreira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Ectoparasitos. 2. Endoparasitos. 3. Instalações animais. 4. Animais de laboratório. 5. Colônias convencionais . I. Título.

Cleide Cristina Apolinário Borges

**ESTUDO RETROSPECTIVO DO MONITORAMENTO SANITÁRIO
PARASITOLÓGICO DOS CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, BALB/c AN E
C57BL/6 CRIADOS E MANTIDOS EM INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DO
CECAL-FIOCRUZ NO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

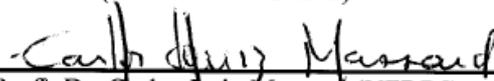
Aprovada em 24 de abril de 2018

Banca Examinadora:

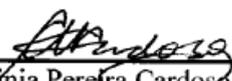


Prof.^ª. Dr.^ª. Klena Sarges Maruaz da Silva (ICTB-FIOCRUZ)

(Presidente da Banca)



Prof.^ª. Dr. Carlos Luiz Massard (UFRRJ)



Prof.^ª. Dr.^ª. Célia Virginia Pereira Cardoso (ICTB-FIOCRUZ)

Dedico este trabalho a minha incrível família,
que no dia a dia deram-me amor, incentivo e
confiança.
Amo vocês.

“Mas aqueles que contam com o Senhor renovam suas forças, ele dá-lhes asas de águia. Correm sem se cansar, vão para frente sem se fatigar.” (Isaías:40, 3)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela luz nas dificuldades e por permitir-me chegar até aqui, obrigada por mais esta vitória.

À professora Dra. Maria Inês Doria Rossi, orientadora, pelo carinho desde o primeiro encontro, pela sua credibilidade, por seu apoio incondicional durante o percurso da elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Jairo Dias Barreira, orientador, pela leitura crítica e cuidadosa.

Aos professores do mestrado de Ciência em Animais de Laboratório, pelos ensinamentos.

À amiga e professora Dra. Célia Cardoso, pelo carinho, estímulo, pelos valiosos ensinamentos desde minha chegada ainda muito jovem a Fiocruz e por ter expandido a minha visão sobre ciência em animais de laboratório.

À primeira equipe do Serviço de Controle de Qualidade Animal, que me acolheram com carinho e pela amizade a mim dada nestes anos de trabalho Alexandre Saisse, Wilson Ventura, Alex Almeida e Marcos Marques (*in memoriam*).

À professora Dra. Klena Sarges, pelas sugestões e correções que sem dúvida enriqueceram o trabalho.

À professora Dra. Joseli Nogueira, pelo carinho e incentivo à realização deste trabalho.

À professora Dra. Rosany Bochner, pela sugestão para trabalhar os dados com intervalo de confiança, por sua paciência me ajudando a lidar com estatística de forma mais prazerosa e harmoniosa.

Aos colegas de curso, pela partilha de ideias, alegrias e dificuldades.

À Paula em especial, que se tornou grande companheira e amiga. Agradeço pelo apoio e cumplicidade.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação de Ciências em Animais de Laboratório Fátima Fernandes, Raquel Argento e Maria Carolina pelo carinho, presteza e simpatia.

À Dra. Carla Campos, diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, pelas facilidades concedidas para realização deste trabalho.

À Simone Ramos, responsável pelo Serviço de Controle de Qualidade Animal do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos pelo fornecimento de dados do monitoramento sanitário.

Ao biólogo Incerlande Soares, do Serviço de Controle de Qualidade Animal/ ICTB, meu inseparável amigo de longos anos, pela ajuda no levantamento de dados e informações

necessárias para desenvolver este trabalho, pelo apoio, incentivo em todos os momentos e disponibilidade nunca negada.

A todos que trabalham no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos pelo apoio e contribuição.

Aos médicos veterinários Belmira Santos e Wildeberg Moreira, que trabalharam no Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos / ICTB, pelo carinho, apoio e informações de dados importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

As amigas da Fiocruz Ednéia Santos, Josilene de Oliveira, Renata Calil e Viviane Arruda que sempre atenciosas perguntavam como eu estava, pelo carinho e preocupação.

À amiga Janine Xerez por sua disponibilidade e suporte com os gráficos.

À direção da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, pela oportunidade, me liberando para que eu pudesse estudar.

À toda equipe do Laboratório de Educação Profissional em Técnicas Laboratoriais em Saúde (LATEC da EPSJV / Fiocruz), agradeço em especial Leandro Medrado e Etélcia Molinaro, coordenadores do LATEC, no período do meu estudo, por possibilitarem minha dedicação a este trabalho. E as amigas Aline, Eliza e Mônica, pelo carinho e por estarem sempre prontas a me ajudar.

À amiga Virgínia do LATEC / EPSJV, pelas dicas, pela ajuda com os gráficos de colunas, pelo carinho e incentivo.

Aos meus queridos pais Claudio e Marli (*in memoriam*), por todos os ensinamentos de vida, dedicação a minha criação, incentivo aos estudos, grande amor e por toda segurança que me deram.

Ao meu filho Pedro Lucas, amor da minha vida, pelo seu carinho, paciência, entendimento pela ausência em alguns dias em sua vida, pelas palavras de estímulo ao dizer “mãe você vai conseguir” quando percebia meu desgaste.

Ao meu marido Luciano, meu eterno namorado, companheiro e amigo em todos os momentos. Sou grata por ter permanecido ao meu lado durante as madrugadas de estudo, pelo seu amor, paciência, ternura, por toda ajuda, incentivo e compreensão, juntos vamos construindo uma bela história de amor.

Agradeço de modo especial, a todos aqueles que participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os animais de laboratório criados e mantidos nas colônias convencionais de muitas instalações de produção são comumente afetados por uma grande variedade de ectoparasitos e endoparasitos. No mundo inteiro estudos parasitológicos são realizados, em colônias de animais de laboratório, a fim de identificar o *status* sanitário animal, já que a prevalência de parasitos está diretamente relacionada com instalações adequadas e rigorosas, manutenção das barreiras sanitárias, treinamento especializado e envolvimento de todo o corpo técnico. A avaliação da condição sanitária parasitológica de camundongos das linhagens SWISS WEBSTER, BALB/c AN e C57BL/6 criados em colônias convencionais do Centro de Criação de Animais de Laboratório - CECAL/FIOCRUZ, foi realizado através da compilação de dados laboratoriais retrospectivos, referente ao período de 1999 a 2015. Os registros obtidos demonstraram que foram avaliados neste período 4.707 camundongos, de ambos os sexos, sendo 3.410 camundongos SWISS WEBSTER, 777 BALB/c AN e 520 animais da colônia de C57BL/6. Após a análise dos dados, constatou-se que entre os helmintos a maior prevalência foi de *Syphacia obvelata* 34,61% (1.629/4.707), seguida de *Aspiculuris tetraptera* 4,19% (197/4.707) e *Hymenolepis nana* 3% (141/4.707). Com relação aos protozoários intestinais a maior frequência foi de *Spironucleus muris* 7,14% (336/4.707), *Tritrichomonas muris* 5,91% (278/4.707), *Entamoeba muris* 3,19% (150/4.707) e *Giardia muris* 0,38% (18/4.707). Em relação aos ectoparasitos a maior prevalência foi de *Myocoptes musculus* 0,83% (39/4.707) seguida de *Myobia musculi* 0,15% (7/4.707). Com relação ao corte temporal, foi observada a maior frequência dos ecto e endoparasitos nos anos de 1999 e 2000, sendo que a partir de 2013 não foram mais evidenciadas parasitoses.

Palavras-chave: Ectoparasitos; Endoparasitos; Instalações animais; Animais de laboratório.

ABSTRACT

Laboratory animals bred and kept in the conventional colonies of many breeding facilities are commonly affected by a wide variety of ectoparasites and endoparasites. Many parasitological studies have been conducted worldwide in laboratory animal colonies in order to identify the animal health situation, since the prevalence of parasites is directly related to adequate and stringent facilities, maintenance of sanitary barriers, specialized training and involvement of all technical staff. The evaluation of the parasitological sanitary condition of SWISS WEBSTER, BALB/c AN and C57BL/6 mice, created and maintained in conventional colonies of the Laboratory Animal Breeding Center - CECAL / FIOCRUZ, was carried out through the compilation of retrospective laboratory data, for the period of 1999 to 2015. The records obtained showed that 4,707 mice of both sexes were evaluated in this period, being 3,410 SWISS WEBSTER mice, 777 BALB / c AN and 520 animals from the C57BL / 6 colony. After the analysis of the data, it was found that among the helminths the highest prevalence was of *Syphacia obvelata* 34,61% (1,629/4.707), followed by *Aspiculuris tetraptera* 4,19% (197/4.707) and *Hymenolepis nana* 3% (141/4.707). In relation to intestinal protozoa, the highest frequency was *Spironucleus muris*, 7.14% (336 / 4.707), *Tritrichomonas muris* 5.91% (278/4.707), *Entamoeba muris* 3,19% (150/4.707) and *Giardia muris* 0, 38% (18/4.707). Regarding ectoparasites, the highest prevalence was *Myocoptes musculus* 0.83% (39 / 4.707) followed by *Myobia musculi* 0.15% (7/4.707). Regarding the temporal cut, the highest frequency of ecto and endoparasites was observed in 1999 and 2000, and after 2013 no more parasitoses were detected.

Key words: Ectoparasites; Endoparasites; Laboratory animals Units; Laboratory animals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fachada do Pavilhão Mourisco (conhecido como Castelo da Fiocruz).....	21
Figura 2: Pavilhão da Peste ou do Relógio.....	22
Figura 3: Prédio do pombal.....	22
Figura 4: Prédio do ICTB (antigo CECAL).....	23
Figura 5: Estantes e gaiolas para criação de camundongos em sistema convencional.....	29
Figura 6: Camundongo da linhagem SWISS WEBSTER.....	31
Figura 7: Camundongo da linhagem BALB/c An.....	32
Figura 8: Camundongo da linhagem C57 BL/6.....	33
Figura 9: Ácaro fêmea ectoparasito do camundongo <i>Myocoptes musculinus</i> , após clarificação com o líquido Hoyer. Microscopia óptica, Aumento 100x.....	37
Figura10: Ácaro ectoparasito <i>Myocoptes musculinus</i> , fixado aopelo do camundongo Microscopia óptica, Aumento 100x	37
Figura 11: Ovo de endoparasito oxiurídeo <i>Syphacia obvelata</i> . Microscopia Óptica. Aumento 400x	41
Figura 12: Macho de endoparasito oxiurídeo <i>Syphacia obvelata</i> Microscopia óptica. Aumento 100x.....	42
Figura 13: Ovo de endoparasito oxiurídeo <i>Aspicularis tetraptera</i> . Microscopia óptica. Aumento 400x.....	43
Figura 14: Verme adulto macho de endoparasito oxiurídeo <i>Aspicularis tetraptera</i> Microscopia óptica. Aumento de 100x.....	43
Figura15: Ovo de endoparasito cestoda <i>Hymenolepis nana</i> . Microscopia óptica. Aumento 400x	45
Figura 16: Útero gravídico de endoparasito cestoda <i>Hymenolepis nana</i> . Microscopia óptica. Aumento 100x	45
Figura 17: Cisto de protozoário endoparasito <i>Giardia muris</i> . Microscopia óptica. Aumento 400x.....	46
Figura 18: Trofozoito de protozoário endoparasito <i>Tritrichomonas muris</i> . Microscopia óptica comum. Aumento 400x	48
Figura 19: Prevalência de Ectoparasitos em colônias SWISS WEBSTER (1999-2015).....	62
Figura 20: Prevalência de Ectoparasitos em colônias BALB/c An (1999-2015).....	63

Figura 21 (A e B): (A) Camundongo da linhagem C57 BL/6 infectado por ácaro <i>Myocoptes musculus</i> . (B) corresponde a mesma região em maior aumento.....	63
Figura 22: Prevalência de Ectoparasitos em colônias C57BL/6 (1999-2015).....	64
Figura 23: Prevalência de Endoparasitos em colônias SWISS WEBSTER (1999-2015).....	67
Figura 24: Prevalência de Endoparasitos em colônias BALB/c An (1999-2015).....	68
Figura 25: Prevalência de Endoparasitos em colônias C57BL/6 (1999-2015).....	69
Figura 26: Prevalência de <i>Syphacia obvelata</i> nas linhagens estudadas (1999-2015).....	70
Figura 27: Intervalo de confiança para a proporção de <i>Syphacia obvelata</i> na colônia de camundongos SWISS WEBSTER do CECAL/FIOCRUZ no período de 1999 - 2015.....	73
Figura 28: Intervalo de confiança para a proporção de <i>Syphacia obvelata</i> na colônia de camundongos . BALB/c An do CECAL/FIOCRUZ no período de 1999 - 2015.....	74
Figura 29: Intervalo de confiança para a proporção de <i>Syphacia obvelata</i> na colônia de camundongos C57BL/6 do CECAL/FIOCRUZ no período de 1999 – 2015.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ocorrência de parasitos em colônias de camundongos SWISS WEBSTER no CECAL/FIOCRUZ período de 1999 -2015.....	56
Tabela 2: Ocorrência de parasitos em colônias de camundongos BALB/c An no CECAL/FIOCRUZ período de 1999 - 2015.....	57
Tabela 3: Ocorrência de parasitos em colônias de camundongos C57BL/6 no CECAL/FIOCRUZ período de 1999 - 2015.....	58
Tabela 4: Valor total das frequências relativas e absolutas de Endoparasitos observados no período 1999-2015, nos camundongos SWISS WEBSTER, BALB/c An e C57BL/6, criadas e mantidas no CECAL/FIOCRUZ.....	59
Tabela 5: Valor total das frequências relativas e absolutas de endoparasitos observados, no período 1999-2003, nos camundongos SWISS WEBSTER, BALB/c An e C57BL/6, criadas e mantidas no CECAL/FIOCRUZ.....	60
Tabela 6: Valor total das frequências relativas e absolutas de endoparasitos observados, no período 2004-2015, nos camundongos SWISS WEBSTER, BALB/c An e C57BL/6, criadas e mantidas no CECAL/FIOCRUZ.....	61
Tabela 7: Prevalência de ectoparasitos por linhagens de camundongos e número total de camundongos positivos no CECAL/FIOCRUZ no período de 1999 a 2015.....	65

LISTA DE SIGLAS

3 Rs - Reduction, Replacement, Refinement

µm - Micrômetro

BIO MANGUINHOS – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

CAL - Ciência em Animais de Laboratório

CAPES - Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior

CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência em Animais de Laboratório

CPqAM - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

CPqGM - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

CPqLMD - Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

CPqRR - Centro de Pesquisa René Rachou

ENSP - Escola Nacional de Saúde Pública

EPI - Equipamento de Proteção Individual

FELASA - Federation of European Laboratory Animal Science Association

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo

ICTB - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

IFF- Instituto Fernandes Figueira

ILAR - Institute of Laboratory Animal Research

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

ISF - Instituto Soroterápico Federal

MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

mm - Milímetros

MPCAL - Mestrado Profissional em Ciência em Animais de Laboratório

NEP - Núcleo de Ensino e Pesquisa

NRC - National Research Council

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SBDA - Serviço de Biotecnologia e Desenvolvimento Animal

SCPrim - Serviço de Criação de Primatas Não Humanos

SCQA - Serviço de Controle de Qualidade Animal

SCRL - Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos

SPF - Specif Pathogen Free

SHDA - Serviço de Hemocomponentes e Derivados Animal

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	18
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 - BIOTÉRIOS DA FIOCRUZ - UM BREVE HISTÓRICO.....	21
2.2 - PRINCIPAIS USUÁRIOS.....	25
2.3 - INTALAÇÕES DE PRODUÇÃO DO CENTRO DE CRIAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	25
2.3.1 - Instalação de produção de Camundongos e a Importância das Barreiras Sanitárias.....	26
2.3.2 - Animais Sentinelas.....	29
2.4 - CARACTERÍSTICAS DAS LINHAGENS ESTUDADAS.....	30
2.4.1 - SWISS WEBSTER.....	30
2.4.2 - BALB/c An.....	31
2.4.3 - C57BL/6.....	33
2.5 - PRINCIPAIS PARASITOS DE CAMUNDONGOS.....	34
2.5.1 - Ectoparasitos.....	35
2.5.1.1 - <i>Myocoptes musculus</i>	36
2.5.1.2 - <i>Myobia musculi</i>	38
2.5.2 - Endoparasitos.....	39
2.5.2.1 - <i>Syphacia obvelata</i>	39
2.5.2.2 - <i>Aspicularis tetraptera</i>	42
2.5.2.3 - <i>Hymenolepis nana</i>	44
2.5.2.4 - <i>Giardia muris</i>	45
2.5.2.5 - <i>Spiroucleus muris</i>	47
2.5.2.6 - <i>Tritrichomonas muris</i>	47
2.5.2.7 - <i>Entamoeba muris</i>	48
3 - OBJETIVOS.....	49
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49

4 - MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 - ASPECTOS ÉTICOS.....	50
4.2 - MONITORAMENTO SANITÁRIO.....	50
4.3 - EXAMES PARASITOLÓGICOS.....	52
4.3.1 - Ectoparasitos.....	52
4.3.2 - Endoparasitos.....	52
4.4 - Análises Estatísticas.....	53
5 - RESULTADOS	54
5.1 - OCORRÊNCIA DE PARASITOS NAS LINHAGENS ESTUDADAS.....	54
5.2 - ECTOPARASITOS IDENTIFICADOS EM CAMUNDONGOS	
SWISS WEBSTER, BALB/c An e C57BL/6.....	62
5.3 - ENDOPARASITOS IDENTIFICADOS EM CAMUNDONGOS	
SWISS WEBSTER, BALB/c An e C57BL/6.....	66
5.3.1 - SWISS WEBSTER.....	70
5.3.2 - BALB/c An.....	71
5.3.3 - C57BL/6.....	71
5.4 - INTERVALO DE CONFIANÇA PARA <i>Syphacia obvelata</i>	71
5.4.1 – SWISS WEBSTER.....	72
5.4.2 - BALB/c An.....	73
5.4.3 - C57BL/6.....	74
6 - DISCUSSÃO	76
7 - CONCLUSÕES	82
8 - REFERÊNCIAS	83
ANEXO A: MANUTENÇÃO E CONSERTO DE AUTOCLAVE	94
ANEXO B: A SITUAÇÃO DO SERVIÇO DE CRIAÇÃO	96

1 - INTRODUÇÃO

A “Ciência em Animais de Laboratório” (CAL) pode ser definida como uma ciência cujo tema principal de estudo é o próprio animal que será empregado na pesquisa e como este deve ser criado e manipulado. Esta ciência vem mudando paradigmas e comportamentos de pesquisadores e profissionais que utilizam animais em pesquisa. Esse reconhecimento foi baseado na importância dessa ciência envolver diferentes áreas que servem de base para todas as outras ciências que empregam animais em suas atividades. As áreas envolvidas são: sanidade, genética, manejo, bem-estar e educação (FRAJBLAT et al., 2008).

Os animais de laboratório são amplamente utilizados em diferentes áreas da pesquisa científica, sendo que os roedores são os mais utilizados e representam modelos adequados pelas características determinantes, tais como: a padronização genética de linhagens isogênicas, que reduz a variabilidade nos resultados experimentais influenciada pelo padrão genético do animal, a adaptação ao cativeiro, a performance reprodutiva, o fácil manejo e a manutenção de baixo custo em relação a outras espécies de grande porte (GILIOLI, 2003). Dentre os roedores, os camundongos se destacam como principais modelos experimentais utilizados em grande parte das investigações científicas (VANDENBERGH, 2000) e, desta maneira contribuem com o propósito de ensino, para o entendimento dos processos fisiológicos e patológicos da medicina humana e veterinária (CASEBOLT et al., 1988; ANDERSEN et al., 2004; BICALHO, 2011; TANIDEH et al., 2010).

Atualmente a reprodutibilidade das pesquisas científicas, bem como a validação dos resultados tem sido objeto de questionamentos e pode ser impactada e comprometida pela qualidade dos biomodelos utilizados nos ensaios experimentais. Desta maneira, para garantir a qualidade das pesquisas científicas, no que tange aos modelos animais, há necessidade de uma avaliação laboratorial periódica, estabelecida através da rotina de monitoramento sanitário e genético. Desta forma, detectar a presença de microrganismos e/ou parasitoses que possam acarretar alterações no comportamento animal, diminuindo as taxas de crescimento e de reprodução, interferindo na resposta imune, hormonal entre outras. Tais alterações podem comprometer os resultados experimentais, e conseqüentemente, aumentar a variabilidade nos resultados e o número de animais utilizados (FELASA, 2014; GILIOLI, 2003).

É sabido que animais de laboratório criados e mantidos em instalações convencionais são frequentemente infectados por helmintos e protozoários, como também infestados por ácaros e piolhos. É importante salientar que existem outros agentes patogênicos murinos que podem também estar presentes em roedores mantidos em instalações convencionais e, desta

maneira, interferir nos resultados experimentais devido às possíveis alterações dos padrões reprodutivos, bioquímicos, hematológicos, histológicos, dentre outros. É importante salientar que o ambiente, onde os animais são alojados deve visar os mais altos padrões de conforto para as diferentes espécies, bem como, um rígido controle das barreiras sanitárias, considerando o *status* sanitário dos animais, visando impedir que mais agentes indesejáveis, presentes no meio ambiente, tenham acesso às áreas de criação e/ou experimentação animal.

Normalmente, há um equilíbrio na relação parasito-hospedeiro, onde os animais não apresentam sinais clínicos aparentes. Muitas vezes, o pesquisador desconhece os agentes infecciosos e parasitários presentes nos animais utilizados. A utilização de animais infectados pode interferir no desenvolvimento de protocolos e alterar a interpretação dos resultados experimentais. Por essa razão, os modelos animais normalmente utilizados em experimentação biológica precisam apresentar excelentes condições higiênicas e sanitárias para um bom desenvolvimento de protocolos experimentais que forneçam resultados confiáveis, com reprodutibilidade e credibilidade (NICKLAS et al., 1999; FELASA, 2014; CARDOSO, 2014). Bem como, uma análise crítica dos resultados do monitoramento sanitário realizados. Assim, um minucioso controle desses biomodelos é necessário, para mantê-los saudáveis, diminuindo as possíveis fontes de variações não inclusas no protocolo e associadas à doenças e infecções inaparentes. Neste contexto, o acompanhamento periódico do monitoramento sanitário dos animais de laboratório é indispensável no sentido de atestar o estado de higidez de colônias de animais utilizados como modelos experimentais.

De acordo com Griffiths (1971), as instalações que criam animais sem controle sanitário e genético, têm como consequência a perda de animais, morbidade bem abrangente, grande perda de dinheiro, tempo e esforço de pesquisa. No Brasil, poucas instituições que criam e mantem animais de laboratório realizam o monitoramento sanitário e genético, tais como o Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/ Unicamp), o Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP) e o Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/FIOCRUZ).

Gilioli (2003) chamou a atenção para a qualidade dos animais de laboratório produzidos no Brasil. O autor afirmou que as condições dos animais produzidos ainda estão distantes do padrão exigido pelas normas internacionais da moderna ciência da experimentação animal e admite que o programa de monitoramento rotineiro ainda não é mantido nos biotérios.

O diagnóstico do parasitismo é fundamental para adoção de medidas eficazes de tratamento, controle e para a manutenção da qualidade dos animais gerados, considerando a

necessidade de animais de laboratório certificados, objetivando não comprometer os resultados experimentais, considerando que algumas parasitoses, mesmo sem apresentarem sinais clínicos aparentes, podem causar alterações comportamentais, fisiológicas e comprometer o desenvolvimento dos seus hospedeiros.

Desta forma, a compilação dos dados consolidados sobre frequência de endo e ectoparasitos detectados durante o monitoramento sanitário periódico realizado nas colônias do CECAL / FIOCRUZ, se faz necessária para identificar os vieses atribuídos aos protocolos do monitoramento sanitário e do manejo zootécnico, assim como da eficiência das barreiras sanitárias empregadas na criação dos animais de laboratório e desta maneira contribuir para o fortalecimento da CAL.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOTÉRIOS DA FIOCRUZ - UM BREVE HISTÓRICO

A história da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) tem o seu início com a criação do Instituto Soroterápico Federal (ISF) em 25 de maio de 1900, pelo médico sanitário Oswaldo Cruz. O ISF foi idealizado em resposta à demanda sanitária e as epidemias da peste bubônica, da febre amarela e da varíola que atingiam a cidade do Rio de Janeiro (MANGUINHOS, 2005).



Figura 1- Fachada do Pavilhão Mourisco – (Conhecido como Castelo da Fiocruz).

Fonte: Acervo FIOCRUZ-imagem 2017.

O primeiro pequeno biotério do ISF foi construído a partir de 1903. Neste período, o biotério se limitava a criar pequena quantidade de coelhos, cobaias e animais de médio e grande porte. No ano de 1904 foi iniciada a construção do conjunto arquitetônico histórico de Manguinhos, incluindo o Pavilhão Mourisco ou Castelo de Manguinhos (Figura 1); a Cavalaria; o Quinino; o Pavilhão do Relógio ou Pavilhão da Peste (Figura 2); o Aquário de Água Salgada; o Hospital Oswaldo Cruz e o Pombal ou Biotério para Pequenos Animais (MANGUINHOS, 2005). A edificação conhecida como Pombal (Figura 3) foi o primeiro biotério construído para abrigar pequenos animais como aves, ratos e coelhos.

Em 1930, com a epidemia da febre amarela e interessado no estudo da doença, o cientista Carlos Chagas importou da Índia no ano 1932, com exemplares de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) e estabeleceu a primeira colônia de primatas não humanos no Brasil (CASTRO, 2008; FIOCRUZ, 2018).



Figura 2 – Pavilhão da peste ou do relógio. Fonte: Acervo FIOCRUZ-imagem 2017.



Figura 3 – Prédio do pombal. Fonte: Acervo FIOCRUZ-imagem 2017.

Com a ampliação das pesquisas e o aumento da produção de vacina e de soro, a necessidade de animais para estudos cresceu, ganhando assim novo e importante impulso no período de 1930 até 1960. Em 1936, houve a necessidade da construção de um novo prédio com condições melhores, para a criação de roedores utilizados pelo Instituto. Assim, o Pombal passou a abrigar apenas os coelhos e os pombos (CASTRO, 2008).

Em 1967, com a diversificação das linhas de pesquisas do Instituto, foi inaugurado outro espaço para atender à demanda, ocupando uma área superior a 4000 metros quadrados, o prédio

abrigaria camundongos, ratos, cobaias, hamsters, coelhos, ovinos e equinos. Com essa nova sede o Pombal foi desativado junto com a criação de pombos (CECAL, 2018).

A partir dos anos 80, com o fortalecimento e desenvolvimento científico, houve uma demanda, por parte dos pesquisadores, de animais com qualidade genética e sanitária satisfatórias para o desenvolvimento das pesquisas. Assim, foi providenciado, com o apoio da Fiocruz, uma reforma de modernização nas instalações para criação e manutenção dos animais.

No período de 1986 a 1998, por questões políticas e orçamentárias o Serviço de Biotérios foi designado Departamento de Biotérios e ficou diretamente subordinado ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Unidade Técnico-científica da Fiocruz. Em 1998, o Departamento de Biotérios foi transformado em Unidade Técnica de Apoio da Fiocruz e ganhou o *status* de Centro de Criação de Animais de Laboratório/CECAL.

Foi nesse contexto que começou a ser incutida ao biotério uma nova feição, com mais atenção ao aperfeiçoamento dos profissionais que acompanham a equipe e o aumento da força de trabalho.



Figura 4 – Prédio do ICTB (antigo CECAL). Fonte: Acervo FIOCRUZ-imagem 2017.

A partir de 2000, o CECAL implantou a colônia de animais *Specific Pathogen Free* (SPF) e, em 2002, a obtenção de animais transgênicos (CASTR0, 2008).

Em 2013, foi criado no CECAL o Núcleo de Ensino e Pesquisa (NEP) no intuito de formalizar as atividades já em curso na Unidade, visando o desenvolvimento científico e a formação profissional de sua equipe. Em novembro de 2014, a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) aprovou o curso de Mestrado Profissional de Ciência em Animais de Laboratório (MPCAL), contribuindo para que em 2016 o CECAL fosse alçado à condição de Unidade Técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz e denominada Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB).

Atualmente o ICTB, é a unidade responsável pela criação, produção e fornecimento de animais de laboratório, sangue e hemoderivados; realização de controle da qualidade animal e seus derivados; prestação de serviços em biotecnologia; geração de conhecimento em Ciência em Animais de Laboratório, bem como assessoria técnica aos usuários da FIOCRUZ e outras instituições afins, o que lhe confere um papel estratégico e relevante na área de Ciência e Tecnologia Animal em nível nacional (FIOCRUZ, 2017).

O CECAL, atual ICTB, possui cinco áreas de serviços finalísticos, o Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos (SCRL); Serviço de Hemocomponentes e Derivados (SHDA); Serviço de Criação de Primatas Não Humanos (SCPrim); Serviço de Biotecnologia e Desenvolvimento Animal (SBDA) e Serviço de Controle de Qualidade Animal (SCQA).

O SCRL é responsável pela criação, manutenção e fornecimento de roedores e lagomorfos (camundongos, ratos, coelhos, cobaias e hamsters), cujos *status* sanitário e genético são controlados por exames periódicos laboratoriais de qualidade.

O SHDA é responsável pela criação e manutenção de ovinos, caprinos e equinos para fornecimento de sangue e de hemoderivados, visando a atender aos diversos experimentos e procedimentos, no âmbito da Fiocruz.

O SCPrim é responsável pela criação de macacos rhesus (*Macaca mulatta*), macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e micos de cheiro (*Saimiri sciureus* e *S. ustus*). As espécies criadas são fornecidas para pesquisas realizadas na Fiocruz, tais como malária, dengue, febre amarela, hepatites virais, tuberculose, leishmaniose e doença de Chagas.

O SBDA é responsável por desenvolver atividades na área de biotecnologia animal, criação de um banco de embriões/gametas e o desenvolvimento de novos modelos animais (FIOCRUZ, 2017).

Nos laboratórios do SCQA foi estabelecido um programa de acompanhamento constante, com o objetivo de monitorar sanitária e geneticamente os animais criados e mantidos em biotérios de criação e de experimentação animal. Os procedimentos analíticos (exames de imunologia, microbiologia, bioquímica, hematologia, anatomopatologia e parasitologia) aplicados neste processo seguem as recomendações da Federação das Associações Europeias de Ciência em Animal de Laboratório (FELASA), com o intuito de certificar as colônias criadas e mantidas na FIOCRUZ e em outras instituições.

O planejamento do monitoramento sanitário animal, assim como a sua frequência, foi estipulado de acordo com o índice de ocorrência de determinados agentes patogênicos (FELASA, 2014), objetivando a aplicação de um controle adequado com total sustentabilidade

estatística e garantindo a redução gradativa de possíveis pontos de interferências em pesquisas ou em planos de estudos da FIOCRUZ.

2.2 PRINCIPAIS USUÁRIOS

O CECAL sempre teve importante papel nas atividades de pesquisa da FIOCRUZ, tendo como principal objetivo a contribuição com programas e projetos de pesquisas biomédicas mediante a produção e controle da qualidade de insumos estratégicos. Além de apoiar o desenvolvimento tecnológico e o ensino da Fiocruz, bem como das demais instituições de pesquisa e ensino nacionais (ICTB, 2017).

As Unidades da Fiocruz, como: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz); Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (BIO-MANGUINHOS/Fiocruz); Instituto de Tecnologia em Fármacos (FARMANGUINHOS/Fiocruz); Instituto Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz); Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz); Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP/Fiocruz); o Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz); o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), no Recife; o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), em Salvador; o Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), em Belo Horizonte; o Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane (CPqLMD) em Manaus, sempre utilizaram os animais e produtos do CECAL no desenvolvimento de pesquisas biológicas, biomédicas e biotecnológicas; para o controle da qualidade de imunobiológicos e medicamentos e para o desenvolvimento de ensino em saúde.

2.3 INSTALAÇÕES DE PRODUÇÃO DO CENTRO DE CRIAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORTÓRIO

A importância dos animais de laboratório está diretamente relacionada à necessidade da utilização de modelos adequados e necessários aos estudos de diferentes modalidades da biologia e medicina experimentais. Atualmente, o termo “biotério” está em desuso e sendo substituído por “instalação”(BRASIL, 2016). Esta instalação deve ser dotada de características próprias que satisfaçam as exigências dos animais, proporcionando bem-estar e saúde para que possam se desenvolver e reproduzir de maneira adequada. Desta forma, conservam suas características biológicas de modo que respondam satisfatoriamente aos testes neles realizados (ANDRADE, 2006).

O projeto arquitetônico do CECAL foi concebido para criar, manter e fornecer animais de laboratório em condições de qualidade genética e sanitária satisfatórias, visando para atender à demanda das atribuições da Instituição (FIOCRUZ, 2017).

A unidade possui um prédio principal com cerca de 4200 m², onde funcionam os serviços administrativos, o laboratório de controle da qualidade, o laboratório de biotecnologia, serviço de produção de roedores e lagomorfos e equipe administrativa da primatologia (VIANA, 2011).

O Serviço de Primatologia (SCPrim) funciona em uma área anexa, com aproximadamente 20.000 m², onde são mantidas e criadas as colônias de macacos Rhesus, *Cynomolgus* e de micos-de-cheiro (VIANA, 2011).

2.3.1 Instalação de Produção de Camundongos e a Importância das Barreiras Sanitárias

A qualidade dos animais de laboratório é estabelecida pela condição sanitária e também pela padronização do ambiente. Instalações onde há inexistência de controle das condições relacionadas ao ambiente como variação de temperatura, iluminação, umidade relativa do ar, troca do volume de ar e a intensidade dos ruídos podem interferir na criação e na experimentação dos animais. Outros fatores, como a presença de animais de espécies diferentes, a circulação de pessoas dentro das salas de criação, a carência de sistema de barreira de proteção contra a entrada de agentes infecciosos e acesso de animais externos, prejudicam a saúde dos animais (CLOUHG, 1982; GILIOLI, 2003; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009; SILVA, 2013).

Lapchik; Mattaraia; Ko (2009) afirmam que as barreiras sanitárias são compostas por uma combinação de fatores relativos à construção, equipamentos e métodos operacionais que visam estabilizar as condições ambientais das áreas restritas, impedindo ou minimizando a probabilidade de contaminação da área limpa por patógenos ou microrganismos indesejáveis.

Ainda de acordo com Couto (2006), as barreiras sanitárias abrangem um complexo de elementos físicos e químicos. Os elementos físicos, tais como autoclave, estufa de esterilização, radiação e filtros para ar possuem como finalidade a esterilização de materiais (água, ração, maravalha, gaiolas, uniformes e calçados) e retenção de materiais e/ou substâncias indesejáveis. Dentre os elementos químicos estão a estufa de óxido de etileno, tanque de imersão e os agentes desinfetantes, que possuem como finalidade esterilizar e/ou desinfetar os materiais e ambiente.

Quanto mais eficientes forem as barreiras sanitárias das instalações, menores as chances de contaminação dos animais (DE LUCA et al., 1996; COUTO, 2006). Os tipos de instalação

são classificados quanto aos objetivos a que se destinam. A criação, manutenção e preservação das matrizes reprodutoras das diferentes espécies animais que originam a expansão da colônia, assim como o acompanhamento da saúde e do desenvolvimento da mesma são realizados na instalação de produção (CARDOSO, 2006).

De Luca et al., (1996), em consonância com a definição de barreira sanitária proposta pelo ILAR (1976), ressaltam que se trata de um sistema complexo que combina aspectos estruturais, qualidade e utilização de equipamentos com métodos operacionais que buscam estabilizar as condições ambientais das áreas restritas, minimizando a probabilidade de agentes patogênicos e outros organismos indesejáveis contaminem ou colonizem a população animal de áreas limpas.

A implantação de sistema de barreiras está diretamente relacionada à quantidade e qualidade dos animais, pelos materiais e equipamentos utilizados, bem como manejo animal e fluxos de processos. O custo operacional com as barreiras sanitárias é diretamente proporcional às exigências quanto ao padrão sanitário animal, ou seja, quanto mais rigorosa a barreira sanitária maior o custo operacional (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Molinario; Caputo; Amendoeira (2009, p.183), ao falar sobre a importância do manejo para os animais, explica:

[...] “As barreiras sanitárias e o acasalamento controlado têm sido as medidas utilizadas pelos bioteristas para obter as linhagens da espécie animal com padrão sanitário e genético recomendado para pesquisa. O padrão sanitário dos animais se classifica em três grupos distintos: animais gnotobióticos, que possuem microbiota associada definida e devem ser criados em ambiente com barreiras sanitárias absolutas; animais livres de germes patogênicos específicos (*specific pathogen free -SPF*), que não apresentam microbiota capaz de determinar doença, ou seja, albergam somente microrganismos não patogênicos; e animais denominados de convencionais, que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.”

Os animais classificados como convencionais ou haloxênicos recebem esta denominação de acordo com o padrão sanitário como são criados, isto é, aqueles que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas. Para este tipo de criação são aplicados os princípios básicos de higiene onde se procede somente a limpeza e desinfecção do ambiente e material utilizado. Quanto ao pessoal

técnico, em geral, realiza-se apenas troca de avental para o trabalho com os animais (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Por outro lado, no CECAL foi desenvolvido um sistema de produção que instituiu barreiras sanitárias ao sistema de criação convencional. Assim, este novo sistema de criação foi denominado como um sistema de criação convencional controlado. Este sistema foi utilizado para a criação e manutenção das colônias de camundongos Swiss Webster e Balb/c An que eram submetidos ao sistema de barreiras sanitárias para impedir contaminações, incluindo a higienização da equipe técnica, através do banho antes de ingressarem nas salas, utilização de uniformes esterilizados, além da esterilização por autoclavagem de todo o material de uso diário nas salas. Este sistema demandava o acompanhamento sanitário das colônias de roedores.

Os camundongos eram mantidos em gaiolas de plástico, em polipropileno ou policarbonato de alta densidade, resistente ao impacto e aos métodos de esterilização. O piso era coberto por uma cama de maravalha (raspa de madeira picada). As gaiolas eram trocadas duas vezes por semana, de acordo com as rotinas básicas da Unidade. As tampas das gaiolas, em aço inox, apresentavam um rebaixamento com áreas próprias e separadas por chapas para ração e frasco de água. Os animais recebiam água potável e ração peletizada (industrializada) *ad libitum*, esterilizadas, visando impedir a veiculação de agentes e substâncias nocivas que pudessem comprometer a qualidade sanitária das colônias (COUTO, 2006).

A água potável era oferecida aos animais em frasco plástico de policarbonato, com rolha de borracha (usadas como tampa dos frascos) e encaixadas a um bico de aço inox.

A temperatura da sala de criação era mantida em $21,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com dezessete ciclos de renovação de ar por hora e umidade relativa $55\% \pm 10\%$.

O acesso às salas de criação só era permitido à equipe de corpo técnico responsável pela colônia, após completa higienização pessoal, utilização de uniforme e equipamentos de uso individual (EPI)



Figura 5 - Estantes e gaiolas para criação de camundongos em Sistema Convencional. Fonte: Arquivo pessoal, 2001.

2.3.2 Animais Sentinelas

Animais sentinelas são aqueles que são expostos em um determinado ambiente e, em seguida, monitorado para descobrir se uma doença infecciosa ou outro agente nocivo está presente nesse ambiente. De acordo com Cardoso (2006), a utilização de animais sentinelas é muito eficaz e traz excelentes resultados, principalmente quando utilizado nas salas de animais em experimentação. Torna-se recomendável a utilização de animais sentinelas, que são imunocompetentes, preferencialmente da mesma espécie e/ou linhagem, que são criados com a população de animais a ser monitorada. Este sistema de sentinelas pode ser disposto de forma direta ou indireta. A forma direta ocorre quando da introdução dos sentinelas na mesma gaiola da população residente e a forma indireta, que é a mais utilizada, determina que os animais fiquem em gaiolas separadas, porém são expostos aos materiais (cama, ração e água) já utilizados pela população de interesse (FELASA, 2014).

Este sistema de sentinelas é muito utilizado em colônias de linhagens que não possuem número de animais suficientes para serem incluídos no programa de monitoramento sanitário. Assim, no Cecal, os animais Swiss Webster ou C57BL/6 utilizados como sentinela para o monitoramento eram criados em gaiolas previamente utilizadas pelos animais que deveriam ser monitorados, de modo que ao trocar as gaiolas dos animais, a gaiola era repassada para a sentinela que nela vivia durante algumas semanas. Os resultados do processo de monitoramento sanitário refletiam a realidade microbiológica da colônia.

2.4 CARACTERÍSTICAS DAS LINHAGENS ESTUDADAS

Os animais de laboratório são classificados quanto ao padrão genético em dois grandes grupos, não consanguíneos ou *outbred* e consanguíneos ou *inbred*. Os animais *outbred* são aqueles que apresentam uma alta heterozigose (99%) na constituição genética, permitindo a manutenção de uma grande diversidade genética (vários alelos), possibilitando a reprodução de populações naturais. Em contrapartida, os animais consanguíneos são obtidos pelo acasalamento entre irmãos durante vinte gerações consecutivas para a obtenção de uma homozigose de 99 % (SANTOS, 2006).

As Unidades da Fiocruz sempre utilizaram as linhagens Swiss Webster (a mais demandada nas pesquisas), BALB/c An e C57BL/6 gerando uma demanda maior da criação destas linhagens para utilização nas pesquisas, principalmente pertinentes às áreas de imunologia, virologia, parasitologia, entre outras. Com base neste entendimento, os camundongos de ambos os sexos destas três linhagens foram incluídos no estudo retrospectivo do monitoramento sanitário, com foco na perspectiva parasitológica.

2.4.1 SWISS WEBSTER

O camundongo *outbred* nomeado Swiss (Swiss Webster) originou-se nos Estados Unidos da América em 1926. A linhagem derivou de um grupo de nove camundongos (dois machos e sete fêmeas) importados da Suíça, por Clara J. Lynch pesquisadora do Instituto de Pesquisa Médica Rockefeller, em Nova York. Posteriormente, foi comercializado pelo pesquisador Leslie Webster dando seu nome aos camundongos (FMUSP, 2018).

Na década de 1930, o Instituto Oswaldo Cruz, recebeu da colônia matriz do Instituto Rockefeller, casais de camundongos (Informação verbal*).

Uma epizootia acometeu esta colônia em 1955 e foi necessário importar outros casais de camundongos, supostamente originados da colônia de camundongos Swiss Webster mantidos pelo Dr. Leslie Webster, no Instituto Rockefeller (informação verbal*).

* Informação obtida por meio de contato com a Médica Veterinária Belmira Santos, responsável pelo setor de criação do SCRL/CECAL/FIOCRUZ no período incluído no estudo.

A partir desta data, todos os trabalhos de pesquisa, ensino, produção e controle de produtos biológicos, farmacológicos e toxicológicos realizados na Fundação Oswaldo Cruz foram desenvolvidos nesses animais.

Desta colônia foram fornecidas matrizes para outras Instituições, como o Instituto Vital Brazil, Instituto de Biologia do Exército, Centro Pan-Americano de Febre Aftosa dentre outros, que a partir daí estabeleceram suas próprias colônias (informação verbal*).

Esses camundongos albinos, são dóceis, apresentam excelente desempenho reprodutivo, com alta fertilidade, prolificidade e produtividade.

Vêm sendo utilizado há décadas, como modelo para teste de drogas, estudo de comportamento e estudos de obesidade. A fêmea pode ser utilizada como receptora de embriões de linhagens não albinas (TACONIC, 2017).

Chia et al. (2005) afirmam que os animais *outbred* são camundongos geneticamente mal definidos e que ainda não existe uma forma de avaliação ou controle genético eficiente para estes animais, além de pouca informação sobre sua genética ou características fenotípicas.



Figura 6 – Camundongo da linhagem SWISS WEBSTER. Fonte: Arquivo pessoal, 2001.

2.4.2 BALB/c An

O camundongo BALB/c An de linhagem consanguínea foi desenvolvido por D.W. Bailey em 1952, proveniente de uma cepa de camundongos não consanguíneos “Bagg albino”. Esta nomenclatura foi atribuída em homenagem ao pesquisador do NIH, Howard B. Andervont, de onde derivou-se o “AN”, sendo o “A” de Andervont e o “N” do NIH (TACONIC, 2018a) .

As matrizes para fundação da colônia de camundongos da linhagem BALB/c An do Departamento de Biotérios, foram provenientes do Centro Multidisciplinar de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP), composta por três casais na oitava geração, doadas pelo Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos, (Informação verbal*).

Os camundongos BALB/c An são albinos, com aparência e características semelhantes à linhagem padrão BALB/c. São sociáveis, pouco agressivos, apresentam boa performance de acasalamento, quando comparado com outras linhagens animais. Apresentam alta taxa de reprodução com elaborado instinto maternal (FMUSP, 2018).

Esta linhagem possui amplo campo de aplicação, sendo utilizada para produção de anticorpos monoclonais e imunizações, sendo amplamente utilizada em estudos de imunologia e em cancerologia. Porém, estudos realizados por Michels et al.(2006) demonstraram que a resposta imune de linfócitos Th2 os camundongos da linhagem BALB/c induzida pelo endoparasitismo por *Syphacia obvelata* foi capaz de exacerbar a reação alérgica induzida pela ovoalbumina.



Figura 7 – Camundongo da linhagem BALB/c An. Fonte: Arquivo pessoal, 2001.

* Informação obtida por meio de contato com a Médica Veterinária Belmira Santos, responsável pelo setor de criação do SCRL/CECAL/FIOCRUZ no período incluído no estudo.

2.4.3 C57 BL/6

O camundongo C57BL/6 é uma sublinhagem da linhagem C57BL que foi desenvolvida pelo Dr. Little em 1921 (TACONIC, 2018b).

As matrizes para fundação da colônia de camundongos da linhagem C57BL/6 do CECAL / FIOCRUZ foram obtidas do Departamento de Imunobiologia da Universidade Federal Fluminense, por doação de três casais na centésima quinquagésima quinta geração (informação verbal*).

Os camundongos C57BL/6 apresentam pelagem e olhos pretos; a cauda apresenta uma despigmentação de 82% nos machos e 78% nas fêmeas. Apresentam limitado crescimento, são vigorosos e bons reprodutores. São audaciosos e agitados. Parcial alopecia com característica circular pode ser encontrada em alguns camundongos (informação verbal).

Esta linhagem é amplamente utilizada como modelo para manutenção de numerosas mutações, afetando em particular a fisiologia e o comportamento. É também o modelo preferido para os estudos cardiovasculares em arteriosclerose induzida por dieta, obesidade, genética, oncologia, imunologia, doença metabólica e toxicologia (TACONIC, 2018b).



Figura 8 – Camundongo da linhagem C57BL/6. Fonte: Arquivo pessoal, 2001.

* Informação obtida por meio de contato com a Médica Veterinária Belmira Santos, responsável pelo setor de criação do SCRL/CECAL/FIOCRUZ no período incluído no estudo.

2.5 PRINCIPAIS PARASITOS DE CAMUNDONGOS

Muitos têm sido os estudos inerentes à infecção por helmintos e protozoários e infestações por ácaros em animais de laboratório no Brasil, principalmente os trabalhos relacionados ao estudo dos parasitos, à prevalência, infecção, condições de saúde e tratamentos dos parasitos (FLECHTMANN; ZAMITH, 1974; SANTOS et al., 1988; PINTO et al., 1994; BRESSAN et al., 1997; GONÇALVES et al., 1998; GONÇALVES, 2000; GILIOLI et al., 2000; BAZZANO et al., 2002; ALVES et al., 2004; DA SILVA et al., 2007; BICALHO, 2011; DA COSTA et al., 2008; MOREIRA et al., 2013).

A ocorrência dos ácaros *Chirodiscodes caviae*, *Myocptes musculinus* e *Myobia musculi* parasitando cobaias e camundongos, como também o tratamento realizado para eliminar os mesmos das colônias de roedores, já foram descritos (FLECHTMANN; ZAMITH, 1974). A notificação do *M. musculinus* como agente de sarna, a descrição dos sintomas que o parasitismo determina e o tratamento foi descrito por Da Costa (2008).

Em 1994, Pinto et al. publicaram o primeiro trabalho no Brasil sobre a helmintofauna de camundongos convencionalmente mantidos em biotérios do Rio de Janeiro e Belo Horizonte. Neste trabalho, os autores apresentaram os dados relativos à prevalência, distribuição e estudos morfológicos dos helmintos dos roedores.

O crescimento em pesquisas nesta área é particularmente evidente em relação à qualidade do modelo animal tendo como finalidade procedimentos para resultados mais precisos.

Diante deste quadro, diversos autores, como Bressan et al., (1997), investigaram a prevalência de ecto e endoparasitos em camundongos e ratos criados em colônias convencionais e uma colônia com barreira em diferentes biotérios na cidade de São Paulo. Os autores observaram em algumas colônias de camundongos infestações múltiplas por *M. musculinus* e *M. musculi*, porém, quase todas as colônias avaliadas apresentavam infecções por helmintos como *Hymenolepis nana*, *Syphacia sp* e *Aspicularis tetraptera*.

Em estudos semelhantes com camundongos e ratos e hamsters oriundos de biotérios brasileiros, Gilioli et al., (2000), Gonçalves (2000), Bazzano et al., (2002) e Bicalho (2011) concluíram que a maioria das colônias estava infectada por diversos agentes infecciosos helmintos, protozoários, ácaros e piolhos.

Sabendo da prevalência de helmintos nos animais de laboratório e o comprometimento que estes podem ocasionar nas colônias, muitos tratamentos terapêuticos foram testados nos

animais para erradicar a parasitose (ALVES et al., 2004; DA SILVA et al., 2007; MOREIRA et al., 2013).

O tratamento de ácaros *M. musculus* e *M. muscoli* com a droga Tetmosol® nas linhagens CBA, BALB/c e Swiss Webster já foi realizado no Biotério Central da Unicamp visando à obtenção de matrizes livres de ectoparasitos (SANTOS, 1988).

Zenner e Regnault (2000) documentaram a higidez de camundongos e ratos mantidos em diferentes Institutos de pesquisa na França, durante 10 anos. Os autores monitoraram a colônia de roedores e elaboraram um relatório sobre o resultado do inquérito microbiológico e parasitológico. Estes autores verificaram altas taxas de positividade para bactérias e a prevalência de infecções pelos parasitos *Entamoeba muris*, *Spironucleus muris*, *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera* nas colônias em diferentes períodos do ano. Com base nestes dados, concluíram que houve um controle muito limitado na prevenção de doenças microbianas e infecções parasitárias em colônias de ratos e camundongos.

Dentre os principais parasitos que afetam com frequência o camundongo de laboratório criado e mantido em condições convencionais, destacam-se os ectoparasitos, *M. musculus*, *M. muscoli* e *Radfordia ensifera*, bem como os endoparasitos, *S. obvelata*, *A. tetraptera*, *H. nana*, *S. muris*, *Giardia muris*, *E. muris*, *Tritrichomonas muris*, *Eimeria* sp. (GRIFFITHS, 1971; ZENNER; REGNAULT, 2000).

2.5.1 Ectoparasitos

Os ácaros constituem um dos poucos grupos de ectoparasitos que mostram enorme diversidade de forma, habitats, nicho e comportamento, sendo encontrados em quase todos os locais acessíveis à vida animal e afetam as cinco maiores áreas de interesse humano, como saúde, produção, agropecuária armazenamento e controle biológico. Estas áreas estão diretamente intercomunicadas com a medicina veterinária.

De acordo com Flechtmann; Zamith (1974) e Weisbroth (1982), as infestações por ácaros nas colônias de *Mus musculus* podem gerar vários problemas, principalmente devido ao comprometimento da saúde dos animais que podem interferir em dados experimentais (GRIFFITHS, 1971; SANTOS, 1988; GAERTNER, 2004; CARTY, 2008). Os ácaros *Myocoptes musculus* e *Myobia muscoli*, pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordens Astigmata e Prostigmata, respectivamente (FLYNN, 1973).

2.5.1.1 *Myocoptes musculus*

O ácaro *Myocoptes musculus* (KOCH,1844), da subordem Astigmata, que inclui numerosas espécies de vida livre e outras que parasitam animais de laboratório, é considerado uma das espécies de ectoparasito mais comumente observadas na pelagem dos camundongos de laboratório. *M. Musculus* são ácaros, causadores de sarna (FLYNN, 1973).

Os ácaros reunidos na subordem Astigmata não possuem estigmas, sendo o *M. musculus* representante da família Listrophoridae, que coloniza a pelagem dos animais, o causador da sarna miocóptica em camundongos de laboratório (COL, 2003).

A fêmea apresenta o corpo com o formato oval e alongado, medindo cerca de 300 µm de comprimento por 130 µm de largura, corpo estriado e ventralmente possui projeções em forma de espinho entre as estriações. Têm o terceiro ou quarto par de patas modificado, para prender-se aos pelos dos hospedeiros, por meio de um dispositivo especializado em órgão de fixação (WATSON, 1960). O macho é bem diferente em aparência, menor, medindo cerca de 190 µm de comprimento por 135 µm largura e mais robusto. Só tem o terceiro par de patas modificado, em órgão de fixação. O quarto par é muito forte (GAMBLES, 1952). O ânus é terminal: macho possui três cerdas e a fêmea uma de cada lado do ânus (DA COSTA, 2008).

O ciclo de vida direto, se completa em aproximadamente 14 dias. Compreende todas as etapas de estágio (ovo, larva, ninfa e adulto). Os ovos são ovais, com 200 µm de comprimento, ficam aderidos ao pelo.

M. musculus em infestações maciças pode distribuir por todo o corpo, localiza-se preferencialmente na região superior da cabeça, do pescoço e da nuca (BAKER, 1998). Sinais clínicos quando aparecem podem ser observados alopecia, eritema, prurido, dermatite (MORITA et al., 1999; JOHNSTON et al., 2009).

A transmissão é feita por contato direto entre os animais ou mesmo pela mão e vestuário do manipulador (COL, 2003).

Animais de laboratório infestados por *M. musculus* são mais susceptíveis ao estresse experimental, não são recomendados para estudos comportamentais, podendo comprometer os resultados experimentais (COL, 2003).



Figura 9 – Ácaro fêmea ectoparasito do camundongo *Myocoptes musculus*, após clarificação com o líquido Hoyer. Microscopia óptica. Aumento 100x Fonte: Arquivo pessoal,2004.



Figura 10 – Ácaro ectoparasito *Myocoptes musculus*, fixado ao pelo do camundongo. Microscopia óptica. Aumento 100x Fonte: Arquivo pessoal,2004.

2.5.1.2 *Myobia musculi*

Myobia musculi (SCHRANCK, 1781) é uma espécie de ácaro relatada como parasito de animais de laboratório (FLECHTMANN; ZAMITH, 1974). Pertence a subordem Prostigmata e a família Myobiidae. É um ácaro que vive na superfície cutânea e nos pelos (DE LUCA et al., 1996).

O ácaro é pequeno, tanto a fêmea quanto o macho. O corpo não é esclerotizado, é alongado e com estrias transversais (FLYNN, 1973).

A fêmea mede aproximadamente entre 400 a 500 µm de comprimento, apresenta abertura genital localizada na parte posterior da região dorsal e o macho mede de 285 a 320 µm de comprimento, o pênis é interno. A diferença entre os sexos está baseada no tamanho, cerdas e genitália (BAKER, 2008).

O primeiro par de patas da fêmea e do macho é curto, achatado e altamente adaptado para agarrar ao pelo do animal. Os outros três pares são modificados, mas terminam em uma estrutura parecida com uma garra empodial, apesar da ausência de garras verdadeiras. O dorso do adulto possui uma série de cerdas grandes e desenvolvidas (FLYNN, 1973).

Os ovos são ovais, medem aproximadamente 200 µm de comprimento e ficam aderidos na base dos pelos dos animais (GAMBLES, 1952; FLYNN, 1973).

O ácaro apresenta ciclo de vida de aproximadamente 23 dias que compreende o ovo, o primeiro e segundo estágio larval, a protoninfa, a deutoninfa e a forma adulta. Os ácaros se localizam na região da cabeça, pescoço e nuca do animal.

O grau de patogenicidade causado por *M. musculi* em seu hospedeiro são variáveis até mesmo dentro de uma mesma colônia. O ácaro pode causar no hospedeiro infestações leves a severas. As infestações leves não possuem sinais clínicos aparentes, porém as infestações severas causam alopecia, prurido, dermatite, perda de peso e lesões ulcerativas que podem fornecer um ambiente propício para infecções bacterianas secundárias (FLYNN, 1973; GALTON, 1963; WEISBROTH; FRIEDMAN; SCHER, 1976; COL, 2003).

A transmissão do ácaro acontece por contato direto, crostas de descamação ou material de cama contaminado (HARKNNES; WAGNER, 1993). Os hospedeiros infectados podem apresentar lesões cutâneas causando prurido e com isso o estresse do animal pode alterar as pesquisas desenvolvidas nestes camundongos.

2.5.2 Endoparasitos

As endoparasitoses figuram entre as doenças infecciosas mais comumente detectadas em diferentes colônias de animais de laboratório por todo o mundo. Embora representem um agravo à saúde animal, ainda são frequentes em muitas instalações, pois consistem em doenças associadas às precárias condições sanitárias, prevalentes em ambientes sem controle e barreiras, sendo um dos principais fatores debilitantes dos animais de laboratório.

As endoparasitoses que afetam os animais de laboratório criados em instalações no mundo todo tem como agentes etiológicos algumas espécies de helmintos e protozoários intestinais. Dentre os helmintos que acometem esses animais, destacam-se *Syphacia obvelata*, *Aspiculuris tetraptera*, *Hymenolepis nana*. No que se refere aos protozoários, *Spironucleus muris*, *Giardia muris*, *Entamoeba muris*, *Tritrichomonas muris* (GRIFFITHS, 1971; ZENNER; REGNAULT, 2000).

2.5.2.1 *Syphacia obvelata*

Dentre os principais parasitos que infectam os camundongos, o helminto *Syphacia obvelata* (RUDOLPHI, 1802), destaca-se como um dos mais frequentemente observados nos inquéritos parasitológicos (PEREC–MATYSIAK et al., 2006). São vermes nematoídes da família Oxyuridae. A espécie *S. obvelata* acomete camundongos, ratos, hamsters e outros roedores (TAFFS, 1976; DE LUCA et al., 1996; CHEN et al., 2011), que habitam o trato intestinal de seus hospedeiros mantidos nas instalações de produção em condições convencionais (HUSSEY, 1957; ZENNER, 1998). *S. obvelata* é um pequeno verme filiforme, esbranquiçado que se alimenta de bactérias muitas vezes presentes no trato intestinal de animais clinicamente saudáveis (HARKNNES; WAGNER, 1993).

A fêmea mede entre 3.4 a 5.8 mm de comprimento por 120 a 140 µm de largura sendo muito maior que o macho, medindo entre 1.1 a 1.5 mm de comprimento por 120 a 140 µm de largura (FLYNN, 1973). Como característica do verme adulto apresenta um par de asas cefálicas na região anterior. As fêmeas com cauda longa, afilada e não recurvada. Enquanto macho apresenta três projeções cuticulares ou mamelões, próximo região central do corpo, sua cauda é recurvada ventralmente com comprimento aproximado da largura do corpo (FLYNN, 1973; COL, 2003).

O ciclo de vida é direto, com um período pré-patente de 11 a 15 dias (FLYNN, 1973). O macho morre após fertilizar a fêmea, sendo eliminado com as fezes (OWEN, 1992). As

fêmeas grávidas migram do ceco para o ânus e depositam seus ovos embrionados na pele. Os ovos rapidamente amadurecem, tornam-se infectantes entre 5 a 20 h (CHAN, 1952; TAFFS, 1976). As fêmeas grávidas migram apenas uma única vez até o ânus, lá se rompem liberando ovos, numa média de 350 ovos por fêmea (LEWIS; D'SILVA, 1986). Os ovos são elipsoidais, alongados de parede fina e achatados em um dos lados. Medem cerca 118 a 153 μm de comprimento por 33 a 55 μm de largura (WHARTON, 1979).

No ciclo biológico da *S. obvelata* há três possíveis rotas de infecção: infecção direta, infecção indireta e retroinfecção. A infecção pode iniciar pela ingestão de ovos embrionados diretamente da região perianal do hospedeiro infectado, indiretamente pela ingestão de materiais contaminados no ambiente, como alimento e água, e também por retroinfecção, quando os ovos eclodem na região perianal e as larvas migram de volta do ânus para o reto (CHAN, 1952; TAFFS, 1976; COL, 2003). Os ovos são leves e resultam em uma ampla contaminação no ambiente por aerossóis, podendo contaminar os equipamentos e os ductos de ventilação. Possibilitando a disseminação desse parasito na colônia, prejudicando o controle (BAKER, 1998; KLEMENT, 1996; DIX ; ASTILL; WHELAN,2004; MOREIRA et al., 2013).

Normalmente a infecção é assintomática e muitos animais servem apenas como portadores. Porém, em alguns casos, pode se manifestar com extrema gravidade podendo ocorrer prolapso retal, intussuscepção intestinal, impactação fecal, irritação perianal, enterite catarral e granuloma hepático (TANAKA; OSHIMA; FUJINAMI 1974; SCOTT; GIBBS 1986; GILIOLI, 2003). Há relatos que evidenciam que a infecção pode afetar o pelo do animal, o ganho de peso, o crescimento e a saúde em geral, interferindo na reprodução da colônia (FLYNN, 1973).

O índice de mortalidade em uma infecção na colônia de roedores e o grau de infestação, ocorre em função da idade, sexo, susceptibilidade da linhagem e estado imunológico do hospedeiro. (SCOTT; GIBBS, 1986; WAGNER, 1988; BAKER, 1998).

O controle parasitológico da *S. obvelata* apresenta grande dificuldade devido às características do seu ciclo biológico (SCOTT e GIBBS, 1986; BAKER, 1998; MOREIRA et al., 2013). Entre as várias drogas utilizadas a ivermectina oral é a mais recomendada (BATTLES et al., 1987; SUETA et al., 2002). A cesariana e histerectomia são técnicas eficazes na erradicação desse parasito nas colônias de roedores, porém sem o uso de barreiras sanitárias eficientes a transmissão é inevitável (COL, 2003).

Animais de laboratório parasitados não são adequados em estudos imunológicos, pois a infecção causada por *S.obvelata* além de induzir a resposta imune Th2, que desenvolve a

produção de imunoglobulinas (IgE e IgG1), mastócitos e eosinófilos. Ela também pode exacerbar a reação alérgica (MICHELS et al., 2006; ABBA; LICHTMAN, 2013). Os hospedeiros portadores desses nematodas apresentam alterações nos parâmetros fisiológicos e não são adequados nos estudos nutricionais, imunológicos e hematológicos podendo interferir nos resultados (WAGNER, 1988; BAKER,1998). Em 2014, Jesús e Pavón demonstraram que há sinergismo da resposta imune de camundongos BALB/c Bioula, quando ocorre a infecção por *Leishmania mexicana* associada à parasitose por *S. obvelata*. Os estudos comportamentais também são prejudicados devido a irritação do animal (TAFFS, 1976; COL, 2003).



Figura 11 – Ovo de endoparasito oxiurídeo *Syphacia obvelata*.
Microscopia óptica. Aumento de 400x Fonte: CECAL,2003.



Figura 12 – Macho de endoparasito oxiurídeo *Syphacia obvelata*.
Microscopia óptica. Aumento de 100x Fonte: CECAL,2003.

2.5.2.2 *Aspiculuris tetraptera*

O nematóide *Aspiculuris tetraptera* (NITZSCH,1821), pertence à família Oxyuridae, habita o ceco de camundongos, podendo parasitar ratos e hamsters mantidos em colônias convencionais por todo o mundo (OWEN, 1992; FLYNN, 1973; WESCOTT, 1982; MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009). Apresenta ciclo de vida direto de 23 dias e pode ser encontrado em associação com *Syphacia obvelata* parasitando camundongos (GRIFFTS, 1971).

As fêmeas medem entre 3.0 a 4.0 mm de comprimento e os machos de 2.0 a 4.0 mm de comprimento (FLYNN, 1973). Os vermes adultos apresentam asa cuticular. As fêmeas adultas se movem até parte inferior do cólon para colocar seus ovos que são eliminados com as fezes (TAFFS, 1976). Após a infecção, os machos amadurecem no período médio de 20 dias enquanto nas fêmeas este período se estende pouco mais, em média 24 dias, podendo então encontrar ovos viáveis no primeiro estágio de segmentação (ANDERSON, 2000).

Os ovos são simétricos, elipsoides e possuem casca fina, medindo entre 89 a 93 por 36 a 42 μm , apresentando uma massa de blastômeros visíveis (FLYNN, 1973).

Os hospedeiros se infectam com *A.tetraptera* pela ingestão de ovos na comida contaminada e pela coprofagia (ANDERSON, 2000). Quando ocorre a re-exposição frequente

do animal ao parasito, a erradicação na colônia de roedores se torna difícil (SCOTT; GIBBS 1986).

Os sintomas desenvolvidos pelos animais e o comprometimento desse oxyurídeo nas pesquisas são semelhantes aos descritos para *Syphacia obvelata*.



Figura 13 – Ovo de endoparasito oxyurídeo *Aspiculuris tetraptera*.
Microscopia óptica. Aumento de 400x Fonte: CECAL,2003.



Figura 14 – Verme adulto macho de endoparasito oxyurídeo *Aspiculuris tetraptera*.
Microscopia óptica. Aumento de 100x Fonte: CECAL,2003.

2.5.2.3 *Hymenolepis nana*

O cestóide *Hymenolepis nana* (SPASSKII,1954), sinonimia *Vampirolepis nana* (SIEBOLD, 1852) pertence a Família Hymenolepididae, infecta colônias convencionais de camundongos, ratos e hamsters. O parasito encontra-se no intestino delgado, geralmente é benigno, mas às vezes é patogênico (DE LUCA et al., 1996).

Possui o *Rattus spp* e o *Mus musculus* como hospedeiros definitivos e os insetos (pulga, barata, besouro) como hospedeiros intermediários (SOUSA, 1996).

O verme adulto mede entre 25 a 40 mm de comprimento por 1mm de largura, apresenta pequeno escólex com vários acúleos dispostos em torno do rostro.

Os ovos são encontrados nas fezes, são ovais, medindo entre 44 a 62 µm por 30 a 55 µm de diâmetro e apresentam um embrião com três pares de pequenos ganchos (FLYNN, 1973).

Esse cestóide possui duas formas de apresentação em seu ciclo reprodutivo. A infecção por *H. nana* no ciclo indireto que é chamado de heteroxeno. Esta forma de infecção ocorre quando os insetos contaminam a comida dos roedores (FLYNN, 1973; PINTO et al., 1994). Enquanto que no direto (monoxeno), os ovos eliminados juntamente com as fezes, podem ser ingeridos pelos roedores. Após a ingestão, os ovos do cestóide se alojam na mucosa intestinal dos roedores, onde ocorre a evolução. (ITO, 1982). Os roedores podem ser hospedeiros para o estágio larval ou adulto do parasito (FLYNN, 1973).

As manifestações clínicas dependem do número de parasitos presentes, sexo, idade e linhagem do animal (HARKNNES; WAGNER, 1993). As infecções leves podem não apresentar sintomas enquanto nas infecções maciças o hospedeiro parasitado pode apresentar retardo no crescimento, perda de peso, diarreia catarral, constipação intestinal e até morte (FLYNN, 1973; HARKNNES; WAGNER, 1993).

Os animais infectados apresentam potencial zoonótico e podem interferir em estudos de hematologia, nutrição, imunologia e do trato digestório (WAGGIE, 1994; GILIOLI, 2003; TANIDEH et al, 2010). Embora as transmissões de animais para os homens não sejam relatadas, o *H. nana* é patogênica para o homem (FLYNN, 1973), sendo conhecida como "tênia anã". (HARKNNES; WAGNER, 1993).



Figura 15 – Ovo de endoparasito cestoda *Hymenolepis nana*.
Microscopia óptica. Aumento de 400x. Fonte: CECAL,2003.

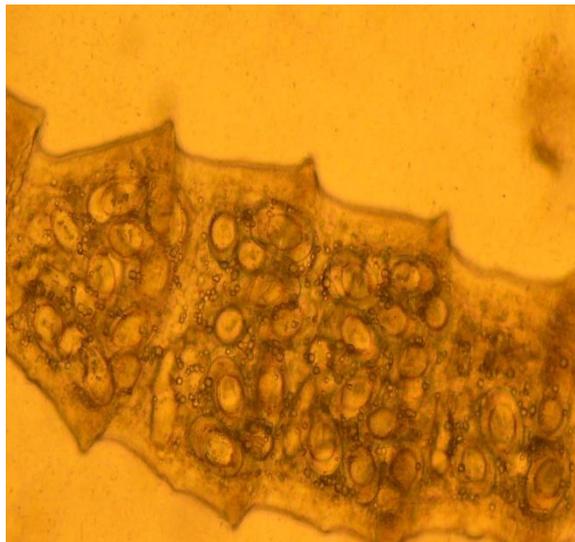


Figura 16 – Útero gravídico de endoparasito cestoda *Hymenolepis nana*.
Microscopia óptica. Aumento de 100x. Fonte: CECAL, 2003.

2.5.2.4 *Giardia muris*

Os protozoários do gênero *Giardia* são parasitas de distribuição cosmopolita e podem infectar vários hospedeiros entre os quais mamíferos domésticos e silvestres. *G. muris* (GRASSI, 1879), é um protozoário extracelular que possui flagelos, pertence ao Filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora. Colonizam o intestino delgado de animais de laboratório convencionais (DE LUCA et al., 1996), podendo ser encontrado parasitando camundongos, ratos e hamsters (BARTHOLD et al., 1997).

A infecção por *G. muris* ocorre através da ingestão do cisto, que é a forma infectante. Estes cistos elipsoides que medem 15 a 17 µm aparecem nas fezes dentro de 3 a 5 dias, após a ingestão. Os trofozoítos apresentam simetria bilateral, medem entre 7 e 13 µm de largura (COL, 2003).

O período pré-patente é de 4-12 dias após ingestão e a excreção máxima de cisto ocorre de 5-14 dias após ingestão (HEYWORTH, 1988).

A giardíase é adquirida através da via oral-fecal, isto é, ocorre através da ingestão de água contaminada e também por alimentos contaminados, sendo que este acontece com frequência menor. Os fatores de risco associados às infecções por *G. muris* incluem manipulação por mãos contaminadas (COL, 2003).

O hospedeiro parasitado pela *G. muris* pode apresentar tanto quadro assintomático quanto diarreia intermitente, perda de peso, pelo eriçado, movimento lento ou distensão abdominal. As infecções em ratos e hamsters geralmente são assintomáticas, mas sinais clínicos podem acontecer. Hamsters envelhecidos podem apresentar diarreia crônica e perda de peso, com espessamento da parede do intestino (BARTHOLD et al., 1997). Animais de laboratório com protozoário não devem ser utilizados em pesquisa, na área de imunologia, nutrição, farmacologia pois podem influenciar diretamente no resultado, pode apresentar alterações imunológicas, em estudos de toxinas e em estudos com o sistema gastrintestinal (COL, 2003).



Figura 17 – Cisto de protozoário endoparasito *Giardia muris*.
Microscopia óptica. Aumento 400x. Fonte: CECAL,2004.

2.5.2.5 *Spironucleus muris*

Spiroucleus muris (LAVIER, 1936), também denominado *Hexamita muris*, pertence ao Filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora. É um protozoário flagelado, o qual parasita o intestino delgado e ceco de camundongos, ratos e hamsters (FLYNN, 1973; WHITEHOUSE et al., 1993).

Esse parasito pode ser encontrado na forma de trofozoíto medindo 12 a 25 μm de comprimento por 2.5 μm de largura. O trofozoíto possui simetria bilateral, alongado em forma de torpedo (BARTHOLD, 1997; COL, 2003). Na forma de cisto é elipsoidal mede 4 μm de largura por 7 μm de comprimento.

O ciclo de vida do *S. muris* é direto, consistindo na ingestão de cistos infecciosos, desencistamento e penetração dos trofozoítas no epitélio.

Animais infectados podem desenvolver diarreia, desidratação, perda de peso, desatenção, distensão abdominal e óbito (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1991; WHITEHOUSE et al., 1993).

Pode interferir em estudos de imunologia, devido as respostas imunológicas dos hospedeiros que ficam comprometidas (COL, 2003).

2.5.2.6 *Tritrichomonas muris*

Tritrichomonas muris (GRASSÉ, 1926) não é um protozoário patogênico, mas é encontrado com frequência parasitando camundongos, ratos e hamster de laboratório mantidos em colônias convencionais. É um parasito flagelado comum do ceco e cólon (DE LUCCA et al., 1996). Pertence a classe Trichomonadea, ordem Trichomonadida.

O trofozoíto mede 16 a 26 μm de comprimento e 10 a 14 μm de largura. A forma é alongada ou piriforme (DANIEL et al., 1971). O *T.muris* pode ser encontrado na forma infectante como pseudocisto, apresentando formato oval ou arredondado, imóvel e medindo entre 8 a 13 μm de diâmetro (MATERN; DANIEL, 1980).

Esse parasito é eliminado nas fezes do hospedeiro infectado na forma de pseudocisto (infectante), quando ingerido por um novo hospedeiro se desenvolve e origina trofozoíto (COL, 2003).

Apesar de ser descrito como não patogênico e não interferir em pesquisas, porém pode estar associado a quadros diarreico nos animais infectados.

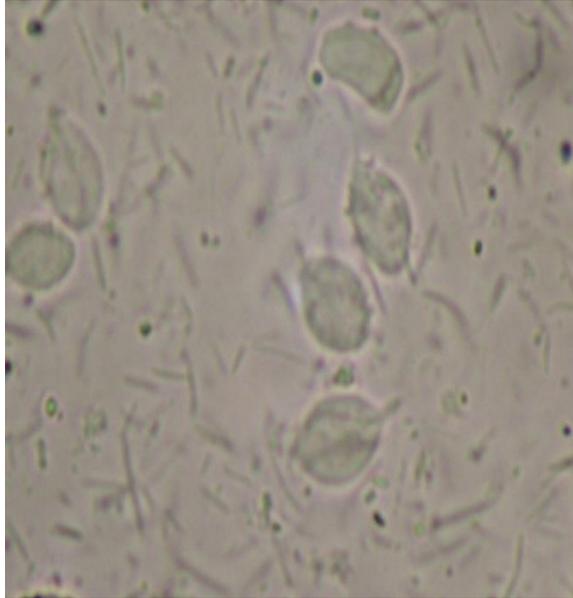


Figura 18 – Trofozoíto de protozoário endoparasito *Tritrichomonas muris*.
Microscopia óptica. Aumento de 400x Fonte: CECAL,2004.

2.5.2.7 *Entamoeba muris*

A *E. muris* (GRASSI, 1879) é um parasito não patogênico, que se localiza no ceco e colon de camundongos, ratos e hamsters, cujo ciclo é direto (DE LUCA et al., 1996).

Apresenta tamanho de 8 a 30 μm de comprimento na forma de trofozoíta e quando cisto tamanho médio de 9 a 20 μm de diâmetro, contem oito núcleos quando maduros (FLYNN, 1973).

A transmissão é pela via fecal-oral através da ingestão de cistos que são eliminados nas fezes de animais portadores de infecção. A maioria das infecções por *E. muris* é assintomática. Não há evidência de alterações em pesquisas utilizando hospedeiros infectados com este parasito (FLYNN, 1973).

3 - OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o mapeamento retrospectivo da prevalência dos ectoparasitos e endoparasitos, referentes ao período de 1999 a 2015, observados nas linhagens de camundongos mais utilizadas como modelos experimentais, Swiss Webster, BALB/c An e C57BL/6, que foram mantidos em um sistema de criação convencional controlado no CECAL / FIOCRUZ.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a prevalência de ácaros em camundongos (*Mus musculus*) das linhagens *outbred* (Swiss Webster) e *inbred* (BALB/ c An e C57BL/6);
- ✓ Verificar a prevalência de helmintos e protozoários em camundongos (*Mus musculus*) das linhagens *outbred* (Swiss Webster) e *inbred* (BALB/c An e C57BL/6);
- ✓ Correlacionar os dados parasitológicos analisados com as condições sanitárias das instalações convencionais controladas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ), criada em 06/04/1999, elaborou em 19/11/1999 o regulamento que envolvia qualquer atividade com o uso de animais de laboratório no âmbito da Fiocruz e, a partir desta data, todos os animais que eram enviados para o monitoramento sanitário passaram a ser licenciados por essa comissão. Durante o monitoramento sanitário os protocolos técnicos eram realizados de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (CCAC, 1993) adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), atual Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Para a confecção da planilha contendo as informações básicas para a pesquisa, a Direção da Unidade e a Chefia imediata do Serviço de Controle de Qualidade Animal (SCQA/CECAL/FIOCRUZ) autorizaram o acesso e uso dos dados do livro de registro do monitoramento sanitário, referente ao período estabelecido, e planificação dos dados. Esta pesquisa se configura como um estudo epidemiológico retrospectivo, realizado por meio da coleta de dados, obtidos nos arquivos do SCQA/CECAL/FIOCRUZ, referentes ao período de 1999 a 2015. Os dados sobre idade, sexo e ocorrência de parasitos nas colônias de camundongos, bem como as informações disponíveis pertinentes ao sistema de barreiras dos animais mantidos e criados em um sistema convencional controlado foram coletados, compilados e posteriormente analisados.

4.2 - MONITORAMENTO SANITÁRIO

O Protocolo dos exames realizados pelo SCQA durante o monitoramento sanitário preconizava a avaliação parasitológica, bacteriológica e sorológica dos animais dos diversos sistemas de criação. Foram considerados os registros do monitoramento sanitário parasitológico nos camundongos *M. musculus*, mais utilizado em pesquisas, provenientes das colônias convencionais de criação de camundongos de linhagens isogênicas BALB/c An e C57BL/6 e de camundongos heterogênicos Swiss Webster. Durante o ano de 1999, os animais, objeto deste estudo, eram provenientes da sala caracterizada como convencional controlado. Entretanto, por uma questão de espaço físico, a partir de 2000 apenas as linhagens Swiss Webster e BALB/c

An foram mantidas na área do convencional controlado enquanto os camundongos C57BL/6 estavam sendo criados e mantidos na área denominada de SPF.

O controle sanitário era realizado através do envio de uma amostragem de animais ao SCQA, de acordo com a linhagem ou sala de criação. Na prática, era o técnico responsável pela criação que acabava determinando a quantidade de animais enviada. Geralmente, o técnico remetia uma quantidade maior de animais quando havia um número grande de gaiolas na criação ou grandes estoques.

A partir de 2004, considerando as recomendações da FELASA, no que tange controle da qualidade microbiológica dos animais, houve o início de uma organização para a remessa dos animais ao SCQA. Assim, foi sistematizado um cronograma previamente acordado entre o SCQA e o SCRL, com pelo menos 3 (três) meses de antecedência, para que houvesse uma programação com todos os envolvidos e, assim, qualquer intercorrência, as partes eram avisadas e novo cronograma instituído.

Neste período, iniciou-se o sistema de “sentinelas”, recurso utilizado principalmente em linhagens com pouca produção e, conseqüentemente um número reduzido de animais, restringindo a utilização destes para o controle sanitário. Desta forma, o emprego de “animais-sentinela”, que são de linhagens diferentes da estudada, porém abundantes na criação, eram incluídos nas salas de criação, sendo estes animais enviados ao SCQA, em substituição aos animais de linhagens com número reduzido. Desta maneira, os animais-sentinelas eram incluídos na criação e acondicionados nas gaiolas, que foram previamente utilizadas pelos animais que deveriam ser monitorados. Assim, após a troca das gaiolas dos animais, esta era repassada para sentinela, que nela vivia durante a semana seguinte.

Porém, somente a partir de 2006 que o SCQA implantou todas as recomendações da FELASA, seguindo a rotina de monitoramento de saúde animal, incluindo o uso preconizado de animais-sentinela, bem como a frequência mínima de monitoramento e tamanho da amostra, métodos de ensaio, agentes infecciosos a serem monitorados e divulgação dos resultados.

4.3 EXAMES PARASITOLÓGICOS

Para a execução dos protocolos e diagnósticos parasitológicos, os animais eram eutanasiados utilizando-se procedimentos que induziam rápida inconsciência e morte sem dor ou estresse, conforme o “Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación” (OLFERT; WILLIAN, 1988).

Para a realização da investigação parasitológica, os animais eram previamente identificados e submetidos a exame geral no laboratório. A observação macroscópica do animal era realizada visando à detecção de alguma evidência relacionada à presença de ectoparasitos ou endoparasitos, ao final da verificação, as observações eram registradas em planilhas de acompanhamento individual dos animais.

4.3.1 Ectoparasitos

Após a eutanásia, a pele e a base dos pelos dos animais eram inspecionadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio para a detecção dos ectoparasitos e, posterior, identificação dos ácaros. O procedimento seguiu o método descrito por (GALTON, 1963; WEISBROTH et al., 1976; WEISBROTH, 1982) e montagem dos espécimes em decúbito dorsal e ventral utilizando-se dois espécimes na mesma lâmina conforme recomenda Fleschtmann (1975). Posteriormente, clarificados em solução de Hoyer e para identificação dos espécimes foi utilizado microscópio de luz, utilizando como referência os trabalhos de Krantz (1978) e Wooley (1988).

4.3.2 Endoparasitos

Os animais eram necropsiados e os segmentos dos intestinos retirados e colocados em placas de Petri, contendo solução fisiológica a 0,85%. A mucosa intestinal era examinada, através de exame direto, em microscópio estereoscópio para detecção de possíveis endoparasitos. Em seguida, o conteúdo intestinal diluído em salina (0,85%) era observado em microscópio óptico com aumento 100x e 400x. Para confirmar os achados parasitológicos, também eram realizados exames coproparasitológicos utilizando técnicas de Willis (1921) e de Hoffman et al., (1934) (De CARLI, 2007). Para a detecção de ovos de *Syphacia obvelata* foi utilizada a técnica da fita de celofane Graham (1941).

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos, as informações sobre prevalência de infestações por ectoparasitos e infecções por endoparasitos detectados nas linhagens de camundongos investigados foram representadas em gráficos de barra vertical.

Foram determinados os intervalos de confiança para as proporções de parasitos verificadas para cada ano, utilizando o programa Software Microsoft Excel para elaborar os gráficos. O critério de escolha desta metodologia foi devido à variação no tamanho das amostras analisadas em todo período estudado, permitindo assim uma análise comparativa temporal, no período 1999-2015. As diferenças foram consideradas significativas nos casos do valor de $p < 0,05$, considerando um intervalo de confiança de 95%, permitindo verificar o comportamento das espécies de parasitos nas linhagens ao longo do tempo. Os intervalos de confiança foram realizados com cálculos específicos, utilizando os valores:

p = proporção de positivos

n = tamanho da amostras

LI = cálculo limite inferior

LS = cálculo limite superior.

$$Li - p + z$$

$$LS = p + z \alpha/2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

$$LI = p - z \alpha/2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

5 - RESULTADOS

5.1 OCORRÊNCIAS DE PARASITOS NAS LINHAGENS ESTUDADAS

Dos resultados obtidos a partir dos registros do monitoramento sanitário realizado pelo SCQA, no período compreendido entre 1999 e 2015, obteve-se o número total de camundongos examinados e número de positividade de parasito ao longo do período. No total foram contabilizados 4.707 camundongos, de ambos os sexos, jovens com idades variando entre 3 a 4 semanas e adultos com 3 a 6 meses, sendo 3.410 Swiss Webster, 777 BALB/c An e 520 C57BL/6. A avaliação dos parasitos identificados por linhagens, que foram incluídas no estudo, está representada nas Tabelas 1, 2 e 3.

Após a totalização de parasitos evidenciados, considerando o número total de camundongos das três linhagens avaliados no período de 1999 a 2015, pôde-se constatar que entre os helmintos a maior prevalência foi de *S.obvelata* 34,61% (1.629/4.707), seguida, de *A. tetraptera* 4,19% (197/4.707) e *H. nana* 3% (141/4.707). Com relação aos protozoários intestinais a maior frequência foi de *S. muris* 7,14% (336/4.707), *T. muris* 5,91% (278/4.707), *E. muris* 3,19% (150/4.707) e *G. muris* 0,38% (18/4.707), conforme Tabela 4.

Neste estudo observou-se que houve alteração da metodologia aplicada ao monitoramento sanitário, no que se refere ao tamanho amostral, o que ocorreu após a implantação das diretrizes preconizadas pela FELASA. Desta forma, para uma avaliação mais abalizada, foram realizados cortes temporais compreendendo os períodos antes (1999-2003) e depois (2004-2015) da implantação destes protocolos. Assim, além da tabela contendo o período 1999-2015 (Tabela 4), foram estruturadas duas tabelas com os valores totais relativos e absolutos da frequência dos endoparasitos identificados por número de animais avaliados por linhagem estudada, sendo uma com os valores obtidos nos anos 1999 a 2003 e outra compreendida entre o período 2004 a 2015 (Tabelas 5 e 6).

Com base neste entendimento, considerando o número total de camundongos das três linhagens avaliados, no período 1999-2003, pôde-se constatar que entre os helmintos a maior prevalência foi de *S.obvelata* 40,17% (730/1.817), seguida, de *A. tetraptera* 9,85% (179/1.817) e *H. nana* 6,71% (122/1.817). Com relação aos protozoários intestinais a maior frequência foi de *S. muris* 16,78% (305/1.817), *T. muris* 8,97% (163/1.817), *E. muris* 7,7% (140/1.817) e *G. muris* 0,71% (13/1.817), conforme Tabela 5.

Considerando o número total de camundongos avaliados nas três linhagens, no período 2004-2015, observou-se que a prevalência entre os helmintos também foi maior para *S.obvelata*

31,11% (899/2.890), seguida, *H. nana* 0,66% (19/2.890) e *A. tetraptera* 0,62% (18/2.890). Com relação aos protozoários intestinais a maior frequência foi de *T. muris* 3,98% (115/2.890), *S. muris* 1,07% (31/2.890), *E. muris* 0,35% (10/2.890) e *G. muris* 0,17% (5/2.890), conforme Tabela 6.

Tabela 1 – Ocorrência de parasitos em colônias de camundongos SWISS WEBSTER no CECAL/FIOCRUZ, período 1999 -2015.

SWISS WEBSTER	Ano															Total			
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Nº	%
<i>Agobias muscui</i>	2/111	0/47	0/65	0/47	0/943	0/1165	0/330	0/71	0/99	0/110	0/42	0/29	0/116	0/94	0/113	0/8	0/20	2/3410	0,06
<i>Myoocptes musculinus</i>	8/111	5/47	2/65	0/47	0/943	0/1165	0/330	0/71	0/99	0/110	0/42	0/29	0/116	0/94	0/113	0/8	0/20	15/3410	0,44
Endoparasitos	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Nº	%
<i>Aspicularis tetraoptera</i>	36/111	9/47	14/65	0/47	6/943	9/1165	0/330	0/71	0/99	0/110	0/42	0/29	0/116	0/94	0/113	0/8	0/20	74/3410	2,17
<i>Symphysia obvelata</i>	100/111	38/47	12/65	13/47	263/943	403/1165	178/330	35/71	13/99	40/110	18/42	1/29	16/116	10/94	8/113	0/8	0/20	1148/3410	33,67
<i>Hymenolepis nana</i>	27/111	10/47	4/65	0/47	0/943	0/1165	4/330	0/71	0/99	0/110	0/42	0/29	0/116	0/94	0/113	0/8	0/20	45/3410	1,32
<i>Spirornicleus muris</i>	76/111	13/47	2/65	0/47	6/943	4/1165	0/330	0/71	0/99	0/110	0/42	0/29	0/116	0/94	0/113	0/8	0/20	101/3410	2,96
<i>Giardia muris</i>	0/111	3/47	0/65	0/47	0/943	3/1165	0/330	0/71	0/99	0/110	0/42	0/29	2/116	0/94	0/113	0/8	0/20	8/3410	0,23
<i>Entamoeba muris</i>	31/111	4/47	4/65	0/47	0/943	0/1165	0/330	0/71	0/99	0/110	0/42	0/29	0/116	9/94	0/113	0/8	0/20	48/3410	1,41
<i>Trichostrongylus muris</i>	2/111	5/47	13/65	0/47	0/943	2/1165	0/330	2/71	0/99	0/110	0/42	0/29	3/116	0/94	0/113	0/8	0/20	27/3410	0,79

Número de animais positivos / Número de animais estudados por ano

Nº = número de animais positivos / número total de animais estudados no período

(%): Prevalência de parasitos observados no período estudado.

Tabela 2 – Ocorrência de parasitos em colônias de camundongos BALB/c An no CECAL/FIOCRUZ, período 1999-2015.

BALB/c An	Ano															Total			
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		2014	2015	Nº
Ectoparasitos	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Nº	%
<i>Leishmania muscivora</i>	2/80	0/50	0/31	0/42	0/168	0/135	0/110	0/10	0/11	0/16	0/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	2/777	0,26
<i>Lycooepes musculinus</i>	4/80	0/50	0/31	0/42	0/168	0/135	0/110	0/10	0/11	0/16	0/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	4/777	0,52
Endoparasitos	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Nº	%
<i>Aspicularis tetraptera</i>	4/80	4/50	4/31	3/42	22/168	6/135	0/110	0/10	0/11	0/16	0/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	43/777	5,53
<i>Symphysa obvelata</i>	60/80	26/50	20/31	21/42	58/168	63/135	59/110	0/10	0/11	3/16	25/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	335/777	43,11
<i>Hymenolepis nana</i>	0/80	2/50	3/31	1/42	31/168	12/135	0/110	0/10	0/11	0/16	0/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	49/777	6,30
<i>Spirornucleus muris</i>	69/80	8/50	10/31	0/42	51/168	19/135	6/110	0/10	0/11	0/16	0/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	163/777	21
<i>Giardia muris</i>	4/80	0/50	0/31	0/42	0/168	0/135	0/110	0/10	0/11	0/16	0/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	4/777	0,51
<i>Entamoeba muris</i>	28/80	12/50	0/31	0/42	0/168	0/135	0/110	0/10	0/11	0/16	0/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	40/777	5,15
<i>Tritrichomonas muris</i>	0/80	7/50	8/31	26/42	31/168	92/135	8/110	0/10	0/11	0/16	0/47	0/7	0/16	0/3	0/10	0/25	0/16	172/777	22,14

Número de animais positivos / Número de animais estudados por ano

Nº = número de animais positivos / número total de animais estudados no período

(%): Prevalência de parasitos observados no período estudado

Tabela 3 – Ocorrência de parasitos em colônias de camundongos C57BL/6 no CECAL/FIOCRUZ, período 1999 -2015.

C57BL/6	Ano															Total			
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Nº	%
<i>Móbia muscui</i>	3/61	0/41	0/31	0/68	0/32	0/64	0/62	0/25	NE	0/5	0/4	0/15	0/34	0/18	0/27	0/18	0/15	3/520	0,58
<i>Mycopias musculinus</i>	3/61	2/41	0/31	0/68	0/32	15/64	0/62	0/25	NE	0/5	0/4	0/15	0/34	0/18	0/27	0/18	0/15	20/520	3,85
Endoparasitos	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Nº	%
<i>Aspicularis tetragera</i>	21/61	14/41	15/31	23/68	4/32	3/64	0/62	0/25	NE	0/5	0/4	0/15	0/34	0/18	0/27	0/18	0/15	80/520	15,38
<i>Synhacia obvelata</i>	53/61	22/41	10/31	24/68	10/32	8/64	11/62	7/25	NE	0/5	1/4	0/15	0/34	0/18	0/27	0/18	0/15	146/520	28,08
<i>Hymenolepis nana</i>	0/61	12/41	7/31	19/68	6/32	3/64	0/62	0/25	NE	0/5	0/4	0/15	0/34	0/18	0/27	0/18	0/15	47/520	9,04
<i>Spironucleus muris</i>	47/61	2/41	21/31	0/68	0/32	2/64	0/62	0/25	NE	0/5	0/4	0/15	0/34	0/18	0/27	0/18	0/15	72/520	13,85
<i>Giardia muris</i>	2/61	4/41	0/31	0/68	0/32	0/64	0/62	0/25	NE	0/5	0/4	0/15	0/34	0/18	0/27	0/18	0/15	6/520	1,15
<i>Entamoeba muris</i>	38/61	23/41	0/31	0/68	0/32	0/64	0/62	0/25	NE	0/5	0/4	0/15	0/34	1/18	0/27	0/18	0/15	62/520	11,92
<i>Trichostrongylus muris</i>	0/61	9/41	5/31	57/68	0/32	3/64	0/62	0/25	NE	5/5	0/4	0/15	0/34	0/18	0/27	0/18	0/15	79/520	15,19

Número de animais positivos / Número de animais estudados por ano

Nº = número de animais positivos / número total de animais estudados no período

(%): Prevalência de parasitos observados no período estudado.

NE = não ensaiado

Tabela 4 – Valor total das frequências relativas e absolutas de endoparasitos observado, no período 1999-2015, nos camundongos SWISS WEBSTER, BALB/C An e C57BL/6, criadas e mantidas no CECAL/FIOCRUZ.

Endoparasitos	SWISS WEBSTER (n= 3410)		BALB/C An (n= 777)		C57BL/6 (n= 520)		TOTAL DAS LINHAGENS (n= 4707)*	
	POSITIVO	%	POSITIVO	%	POSITIVO	%	POSITIVO**	%***
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	74	2,17	43	5,53	80	15,38	197	4,19
<i>Syphacia obvelata</i>	1148	33,67	335	43,11	146	28,08	1629	34,61
<i>Hymenolepis nana</i>	45	1,32	49	6,30	47	9,04	141	3
<i>Spirornucleus muris</i>	101	2,96	163	21	72	13,85	336	7,14
<i>Giardia muris</i>	8	0,23	4	0,51	6	1,15	18	0,38
<i>Entamoeba muris</i>	48	1,41	40	5,14	62	11,92	150	3,19
<i>Tritrichomonas muris</i>	27	0,79	172	22,14	79	15,19	278	5,91

n = total de animais das linhagens estudadas no período

Positivo = animais positivos para endoparasitos

% = percentual de ectoparasitos observados

* = total de animais estudados nas três linhagens

** = total de animais positivos observados nas três linhagens no período estudado.

*** = percentual de ectoparasitos observados nas três linhagens no período estudado.

Tabela 5 – Valor total das frequências relativas e absolutas de endoparasitos observado, no período 1999-2003, nos camundongos SWISS WEBSTER, BALB/C An e C57BL/6, criadas e mantidas no CECAL/FIOCRUZ.

Endoparasitos	SWISS WEBSTER		BALB/C An		C57BL/6		TOTAL DAS LINHAGENS					
	TOTAL POSITIVO	%	TOTAL POSITIVO	%	TOTAL POSITIVO	%	TOTAL* POSITIVO**	%***				
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	1213	65	5,35	371	37	9,97	233	77	33,05	1817	179	9,85
<i>Syphacia obvelata</i>	1213	426	35,12	371	185	49,87	233	119	51,07	1817	730	40,17
<i>Hymenolepis nana</i>	1213	41	3,38	371	37	9,97	233	44	18,88	1817	122	6,71
<i>Spirornucleus muris</i>	1213	97	8	371	138	37,20	233	70	30,04	1817	305	16,78
<i>Giardia muris</i>	1213	3	0,25	371	4	1,08	233	6	2,58	1817	13	0,71
<i>Entamoeba muris</i>	1213	39	3,22	371	40	10,78	233	61	26,18	1817	140	7,7
<i>Tritrichomonas muris</i>	1213	20	1,65	371	72	19,41	233	71	30,47	1817	163	8,97

Número de animais positivos / Número de animais estudados por ano

Total = número de animais positivos / número total de animais estudados no período

(%) Prevalência de parasitos observados no período estudado.

Tabela 6 – Valor total das frequências relativas e absolutas de endoparasitos observado, no período 2004-2015, nos camundongos SWISS WEBSTER, BALB/C An e C57BL/6, criadas e mantidas no CECAL/FIOCRUZ.

Endoparasitos	SWISS WEBSTER		BALB/C An		C57BL/6		TOTAL DAS LINHAGENS		
	TOTAL POSITIVO	%	TOTAL POSITIVO	%	TOTAL POSITIVO	%	TOTAL* POSITIVO**	%****	
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	2197	9	406	6	287	3	2890	18	0,62
<i>Syphacia obvelata</i>	2197	722	406	150	287	27	2890	899	31,11
<i>Hymenolepis nana</i>	2197	4	406	12	287	3	2890	19	0,66
<i>Spirornucleus muris</i>	2197	4	406	25	287	2	2890	31	1,07
<i>Giardia muris</i>	2197	5	406	0	287	0	2890	5	0,17
<i>Entamoeba muris</i>	2197	9	406	0	287	1	2890	10	0,35
<i>Tritrichomonas muris</i>	2197	7	406	100	287	8	2890	115	3,98

Número de animais positivos / Número de animais estudados por ano

Total* = número de animais positivos / número total de animais estudados no período

(%) Prevalência de parasitos observados no período estudado

5.2 ECTOPARASITOS IDENTIFICADOS EM CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, BALB/c An e C57 BL/6

Os exames parasitológicos registrados no SCQA evidenciaram a presença de ácaros das espécies *M. musculi* e *M. musculinus* nas linhagens incluídas no estudo.

As análises dos gráficos para cada uma das linhagens estudadas evidenciaram a diferença na distribuição e no grau de infestação dos ectoparasitos avaliados no período de 1999 a 2004. Observou-se que os camundongos Swiss Webster estavam infestados pelos ácaros *M. musculi* e *M. musculinus* no ano 1999. Entretanto, nos anos de 2000 e 2001 somente ocorreu infestação pelo ácaro *M. musculinus*, como apresentados na Figura 19.

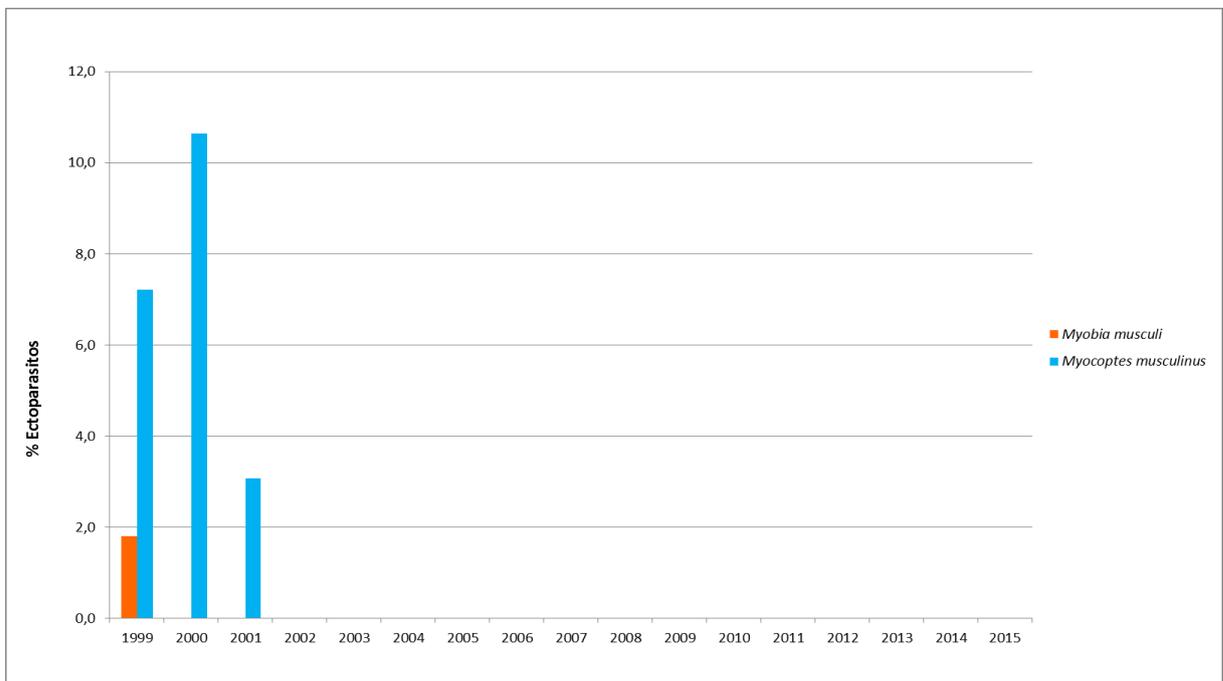


Figura 19: Prevalência de Ectoparasitos em colônias SWISS WEBSTER no CECAL/FIOCRUZ (1999-2015)

Os animais da linhagem BALB/c An estava infestada também pelos ácaros *M. musculi* e *M. musculinus* no ano 1999, porém nos anos seguintes não foram identificados ectoparasitos como demonstrado na Figura 20.

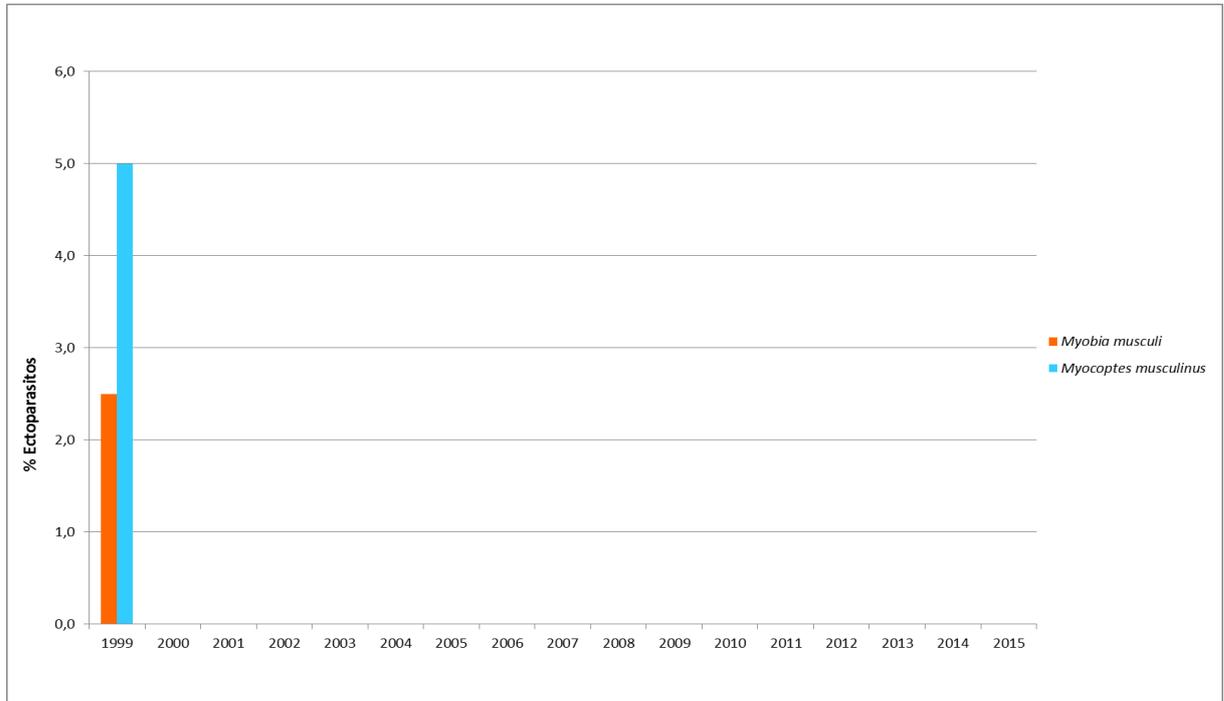


Figura 20: Prevalência de Ectoparasitos em colônias BALB/c An no CECAL/FIOCRUZ (1999-2015)

Com relação aos camundongos da linhagem C57BL/6, foram identificados os ácaros *M. musculi* e *M. musculinus* apenas em 1999, enquanto em 2000 só foi observada a infestação por *M. musculinus*, conforme Figuras 21 A e 21 B.

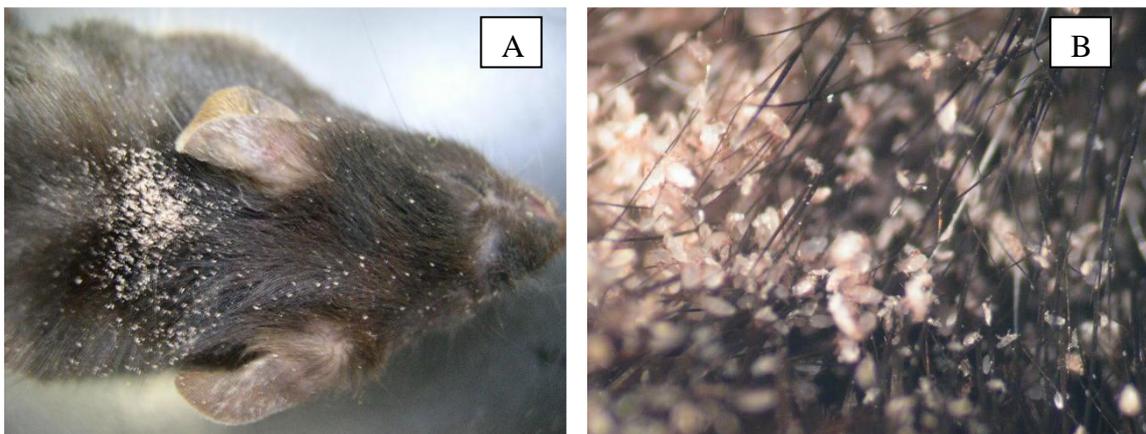


Figura 21 (A e B) Camundongo da linhagem C57 BL/6 infectado por ácaro *Myocoptes musculinus*;

Foto

B corresponde a mesma região em maior aumento. Fonte: Arquivo pessoal, 2004.

É importante observar que no período compreendido entre 2001 e 2003 não foram detectados ectoparasitos nos animais que foram examinados pelos técnicos do SCQA. Embora não tenham sido identificados ectoparasitos por três anos consecutivos, posteriormente, no ano de 2004 os animais da linhagem C57BL/6 apresentaram reinfestação pelo ácaro *M. musculinus*. Contudo, a partir de 2005 não foram mais evidenciados ectoparasitos nas linhagens incluídas no estudo, conforme evidenciado na Figura 22.

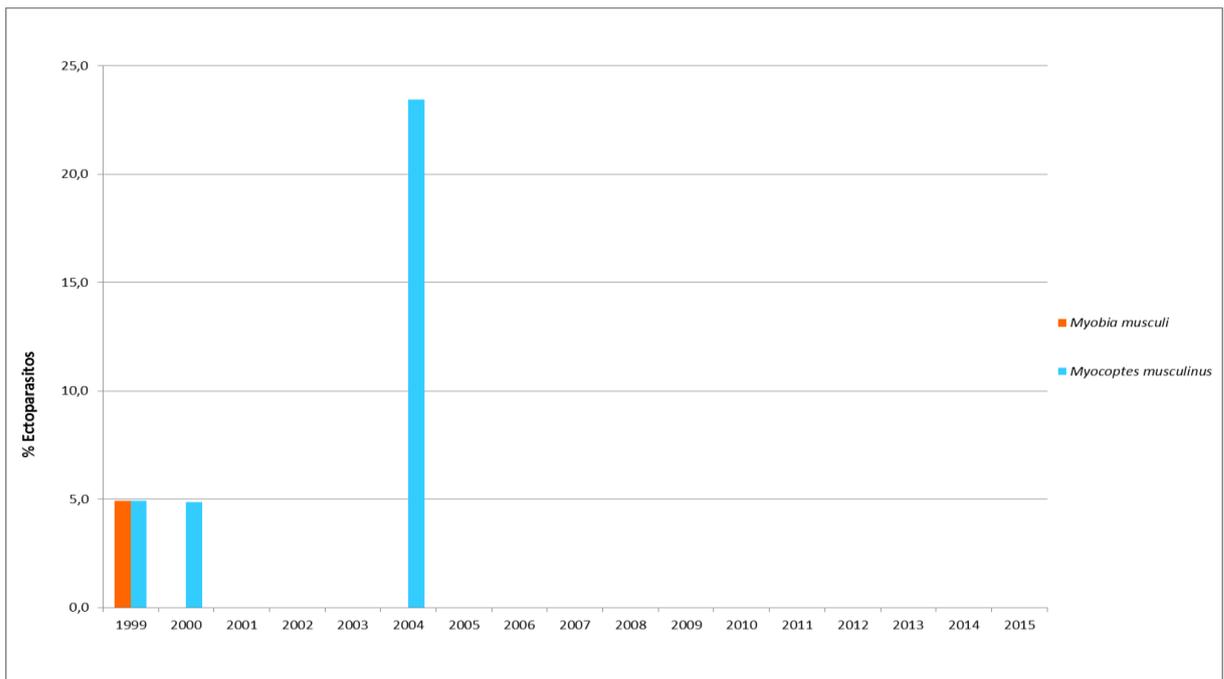


Figura 22: Prevalência de Ectoparasitos em colônias C57BL/6 no CECAL/FIOCRUZ (1999-2015)

O percentual de ácaro *M. musculi* identificados no total de camundongos estudados foi de 0,15% (7/4.707), sendo 0,06% (2/3.410); 0,26% (2/777) e 0,58% (3/520) para as linhagens Swiss Webster, BALB/c An e C57BL/6, respectivamente. Com relação à espécie *M. musculinus*, o número total de animais parasitados foi de 0,83% (39/4.707), enquanto para as linhagens Swiss Webster, BALB/c An e C57BL/6, foi de 0,44% (15/3.410); 0,51% (4/777) e 3,85% (20/520), respectivamente, como apresentado na tabela 7.

Tabela 7 – Prevalência de ectoparasitos por linhagens de camundongos e número total de camundongos positivos no CECAL/FIOCRUZ no período de 1999 a 2015.

LINHAGENS		<i>Myobia musculi</i>	<i>Myocoptes musculus</i>
SWISS WEBSTER	TOTAL	3410	3410
	POSITIVO	2	15
	%	0,06	0,44
BALB/c An	TOTAL	777	777
	POSITIVO	2	4
	%	0,26	0,52
C57BL/6	TOTAL	520	520
	POSITIVO	3	20
	%	0,58	3,85
TOTAL DAS LINHAGENS	GERAL *	4707	4707
	POSITIVO**	7	39
	% ***	0,15	0,83

Total = total de animais das linhagens estudadas no período

Positivo = animais positivos para ectoparasitos

% = percentual de ectoparasitos observados

* = total de animais estudados nas três linhagens

** = total de animais positivos observados nas três linhagens no período estudado.

*** = percentual de ectoparasitos observados nas três linhagens no período estudado.

É interessante observar que houve uma redução progressiva na detecção de ácaros presentes na pelagem dos animais e, a partir de 2005, não foram mais evidenciados estes ectoparasitos nos camundongos das linhagens incluídas no estudo.

5.3 ENDOPARASITOS IDENTIFICADOS EM CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, BALB/c An E C57 BL/6

Existem muitas espécies de helmintos que podem parasitar os camundongos. Neste estudo retrospectivo, foi evidenciado que os animais das três linhagens apresentaram positividade ao parasitismo para nematodas, cestodas e protozoários, sendo a maior frequência observada para as duas espécies de nematodas, *S. obvelata* e *A. tetraptera* e de uma espécie de cestoda, *H. nana*. Entre os protozoários foram encontrados *S. muris*, *G. muris*, *E. muris* e *T. muris*.

Analisando a ocorrência de endoparasitos nos camundongos de cada linhagem, observou-se que os anos de 1999 a 2001 foram os mais críticos, com ocorrência de alta carga de infecções por múltiplos parasitos em um mesmo animal, em todas as linhagens estudadas. A ocorrência de endoparasitos encontra-se apresentados nas Figuras 23, 24 e 25.

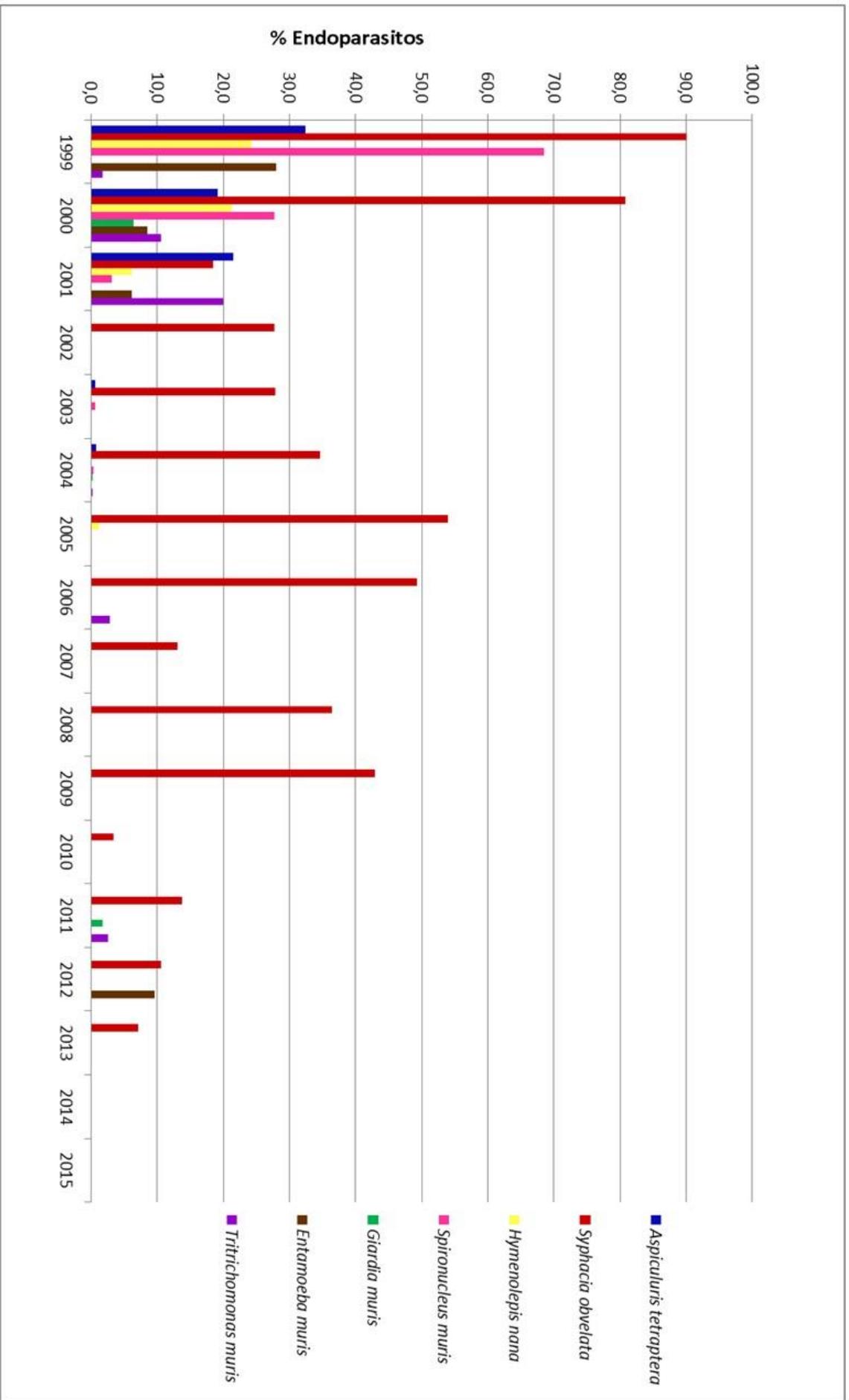


Figura 23: Prevalência de Endoparasitos em colônias Swiss Webster no CECAL/FIOCRUZ (1999-2015)

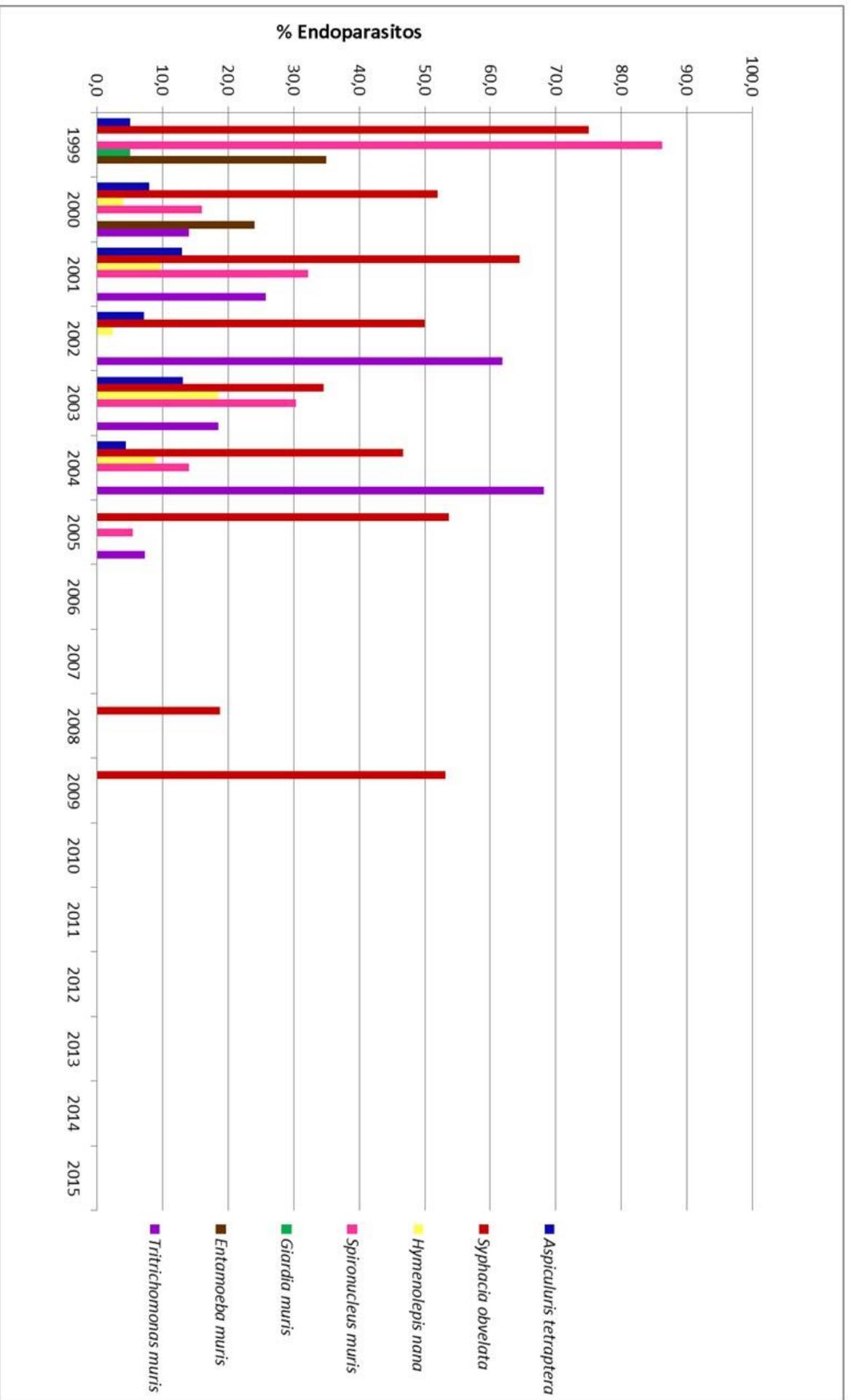


Figura 24: Prevalência de Endoparasitos em colônias BALB/c An no CECAL/FIOCRUZ (1999-2015)

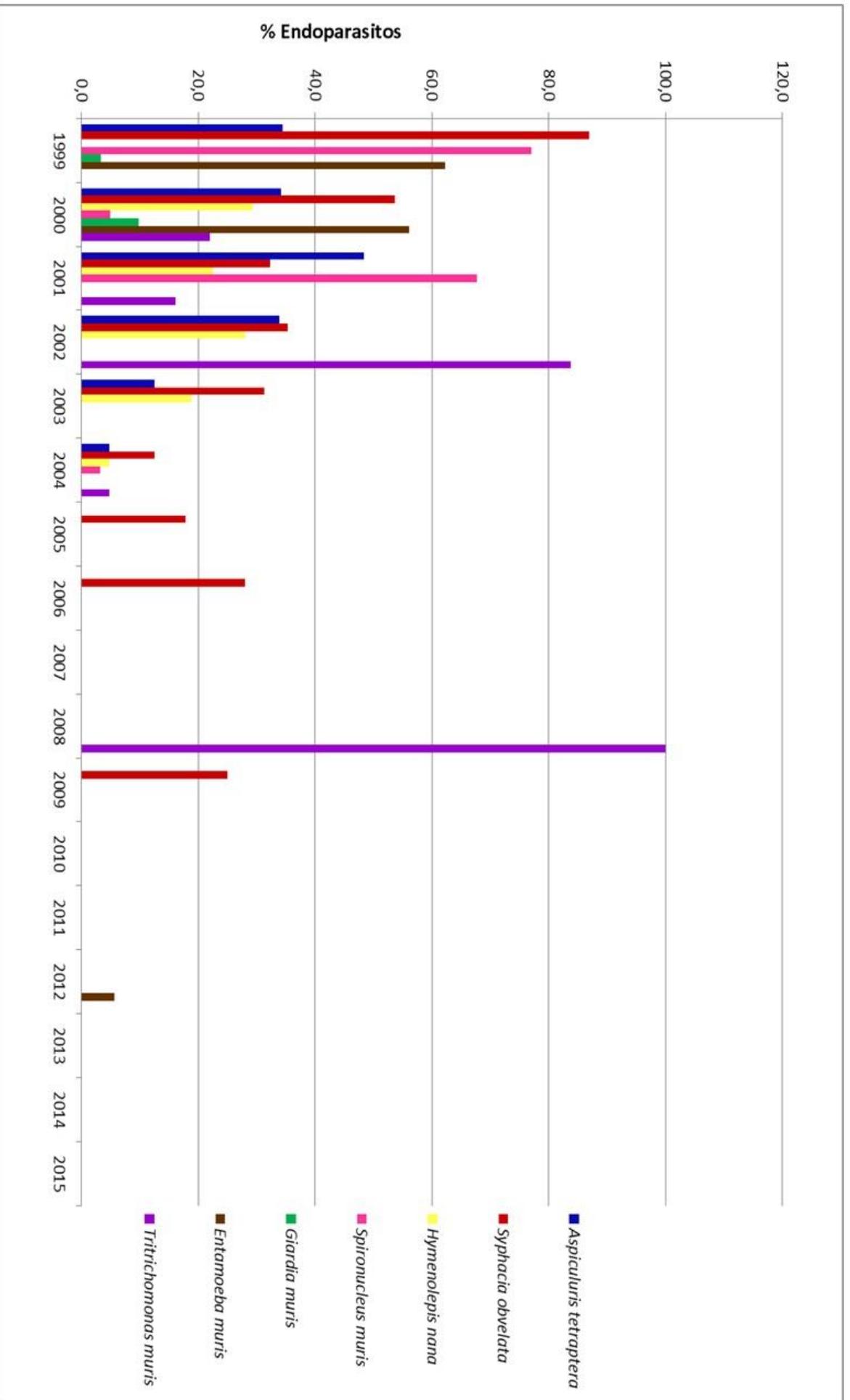


Figura 25: Prevalência de Endoparasitos em colônias C57BL/6 no CECAL/FIOCRUZ 1999-2015.

Como já mencionado, os anos mais críticos foram 1999-2001, entretanto, pode-se observar uma gradativa redução de coinfeções múltiplas nas linhagens. É importante ressaltar que a partir do ano de 2005 houve uma redução na ocorrência de endoparasitos. Porém, é notória a presença de *S. obvelata* nos animais da linhagem Swiss Webster, persistente até o ano de 2013, e nas linhagens BALB/c An e C57BL/6 presente até 2009, conforme apresentado na Figura 26.

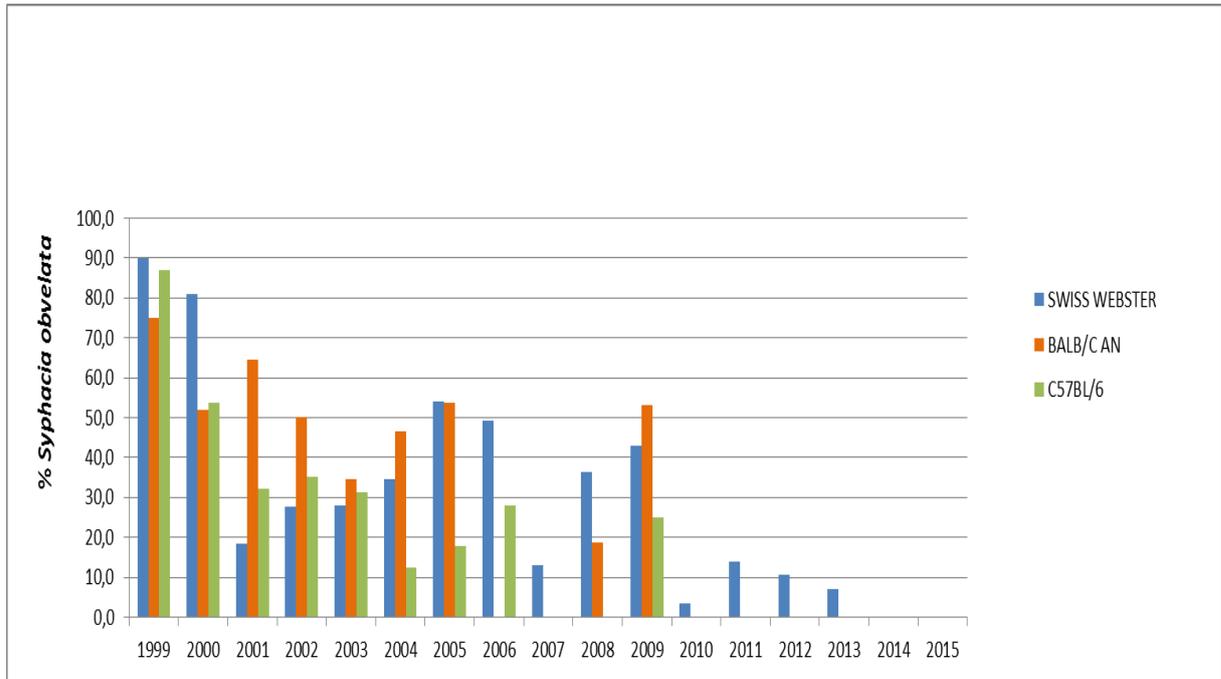


Figura 26: Prevalência de *Syphacia obvelata* nas linhagens estudadas (1999-2015)

5.3.1 SWISS WEBSTER

Os camundongos apresentavam associação de helmintos *S. obvelata*, *A. tetraptera* e *H. nana*. Presença dos protozoários *S. muris*, *E. muris*, *G. muris* e *T. muris* no período de 1999 - 2001. Em 2000 somente o parasito *S. obvelata* foi observado.

Analisando o gráfico entre 2006 a 2012 observou-se que *S. obvelata* foi rotineiramente identificada, acompanhada pelos protozoários *E. muris*, *G. muris* e *T. muris* encontrados em diferentes anos. O corte temporal considerando o intervalo 2013 - 2015 apenas evidenciou a presença de *S. obvelata*, somente em 2013. Constatou-se que houve maior frequência de *S. obvelata* e *T. muris* nesta linhagem de camundongos, conforme observado na Figura 23.

5.3.2 BALB/c An

Assim como os camundongos Swiss Webster, os animais desta linhagem também apresentaram associação de helmintos *S. obvelata*, *A. tetraptera* e *H.nana*, bem como a presença dos protozoários das espécies *S. muris*, *E. muris*, *G. muris* e *T. muris* no período de 1999 - 2004.

Em 2005 somente foram encontrados *S. obvelata*, *S. muris* e *T. muris*. Considerando o período entre 2006 e 2012, o parasito *S. obvelata* só foi observado nos anos 2008 e 2009 e, a partir de então, não foi mais diagnosticado nos animais desta linhagem. Observamos que nestes camundongos *S. obvelata* e *T. muris* foram encontrados com maior frequência, conforme observado nas Figuras 24, 30 e 31

5.3.3 C57BL/6

Os camundongos da linhagem C57BL6 também apresentavam associação de helmintos *S. obvelata*, *A. tetraptera* e *H. nana*, bem como presença dos protozoários das espécies *S. muris*, *E. muris*, *G. muris* e *T. muris* no período de 1999 - 2001. Em 2002 observou-se ainda a presença de *S. obvelata*, *A. tetraptera* e *H. nana* e do protozoário *T. muris*. Entretanto, em 2003, apenas presença dos três helmintos *S. obvelata*, *A. tetraptera* e *H. nana*. Enquanto que em 2004, novamente, observou a associação dos três helmintos com os protozoários *S. muris* e *T. muris*. Em 2005 houve ausência da intercorrência destes parasitos, sendo observada apenas a presença de *S. obvelata*. Considerando o período 2006 - 2012, também não houve mais associação parasitária, com identificação da presença isolada de *S.obvelata* em 2006 e 2009 e dos protozoários *E. muris*, em 2008, e de *G. muris*, em 2012. A partir de então, não foram identificadas parasitoses nos camundongos desta linhagem (Figura 25).

5.4 INTERVALOS DE CONFIANÇA PARA *Syphacia obvelata*

Após as análises dos registros, foi observado que entre os helmintos a maior prevalência foi de *S.obvelata*, considerando todas as linhagens estudadas no período 1999- 2015. Esta alta prevalência do helminto foi relevante, sendo observada em alguns camundongos por um longo período. Com base neste entendimento, foram realizadas as análises dos gráficos de intervalos de confiança para a frequência de *S. obvelata* nos camundongos das diferentes linhagens.

Para as análises dos gráficos, é importante observar que o intervalo de confiança é muito favorável para inferir a dispersão ou variabilidade das estimativas de uma amostra. Nas Figuras

27, 28 e 29 pode-se observar as barras verticais que retratam o tamanho da amostra analisada anualmente, assim um intervalo muito grande indica que a estimativa calculada não é tão acurada quanto outra com intervalo menor, ou seja, quanto maior a amplitude do intervalo menor a confiabilidade da estimativa.

5.4.1 SWISS WEBSTER

As análises das proporções e intervalos de confiança para o parasito *S. obvelata*, identificados nos camundongos Swiss Webster (Figura 27), demonstraram que houve diferença significativa na proporção de parasitos observada nos anos de 1999 e 2000, quando comparados aos outros anos (2001-2013). Através da análise do gráfico observou-se que houve uma interseção entre os intervalos de confiança para os anos 1999-2000, que foi diferente das interseções observadas para os demais períodos. No intervalo de 2001 a 2004 houve uma redução da proporção de parasitos identificados, porém não houve diferença entre estes dados. Os resultados obtidos em 2005 e 2006 foram diferentes e mais elevados daqueles observados entre 2001-2004, porém não significativos. Em 2007 o parasitismo diminuiu e, novamente em 2008 e 2009 houve recrudescimento significativo, quando comparado ao ano de 2007. Nos anos seguintes, 2010-2013, houve uma redução do parasitismo e, a partir de 2013 não houve identificação desse parasito (Figura 27).

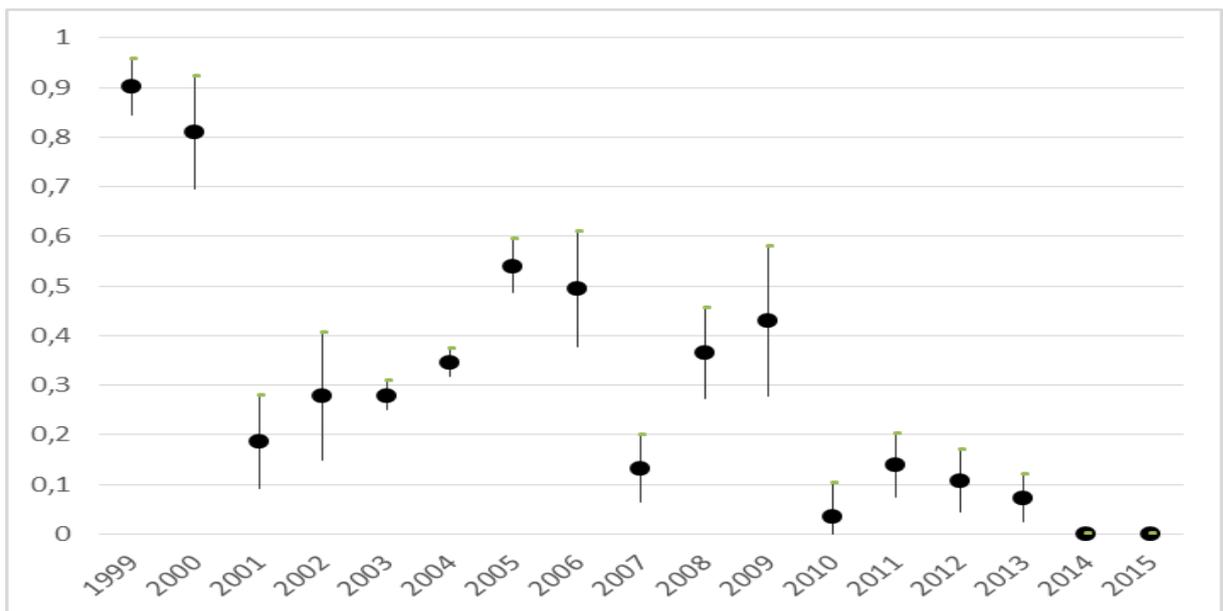


FIGURA 27 – Intervalo de confiança para a proporção de *S. obvelata* na colônia de camundongos Swiss Webster do CECAL/FIOCRUZ no período de 1999 - 2015.

- Proporção de parasitos
- | Intervalo de confiança

5.4.2 BALB/c An

Nos animais desta linhagem a presença da *S. obvelata* se restringiu a um período mais curto, quando comparado ao camundongo SWISS WEBSTER. Entre os anos 1999-2006 o parasitismo oscilou entre elevação e diminuição da identificação do nematoda. Em 2000, 2002, 2004 e 2005 esse bloco estava no mesmo patamar. A partir de 2006 houve redução do parasitismo, sendo novamente identificado em 2008 e, em 2009 retornaram ao patamar observado para o ano 2000. Entretanto, a partir desse período (2009) não foram mais evidenciados *S. obvelata* (Figura 28).

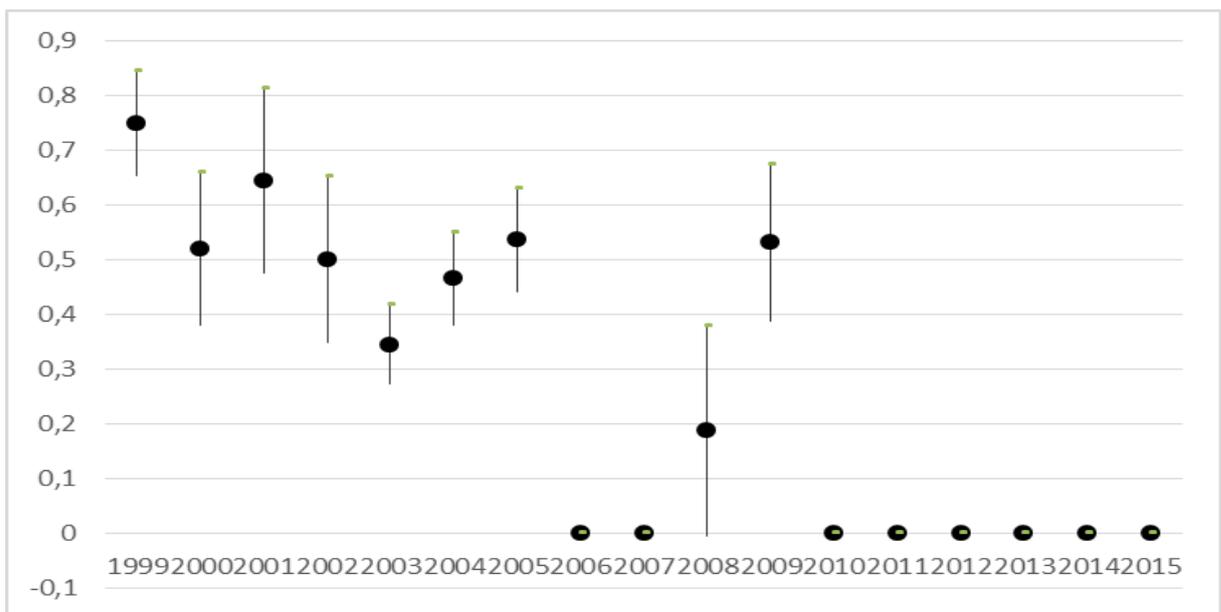


FIGURA 28 – Intervalo de confiança para a proporção de *S. obvelata* na colônia de camundongos BALB/c An do CECAL/FIOCRUZ no período de 1999 - 2015.

- Proporção de parasitos
- | Intervalo de confiança

5.4.3 C57BL/6

Assim como para os camundongos Swiss Webster e BALB/c An, o ano de 1999 foi bem crítico, porém nos animais destas linhagens não foram observadas diferenças significativas em

relação aos anos de 2000 a 2002, que se mantiveram no mesmo bloco, apesar da redução do parasitismo observada em 2000. A partir de 2003, os números recrudesceram até o ano de 2006. Em 2009 houve um dado prejudicado pelo tamanho da amostra que foi muito reduzida, sendo um positivo de quatro animais enviados. A partir desta data não foram mais identificados *S. obvelata* (Figura 29).

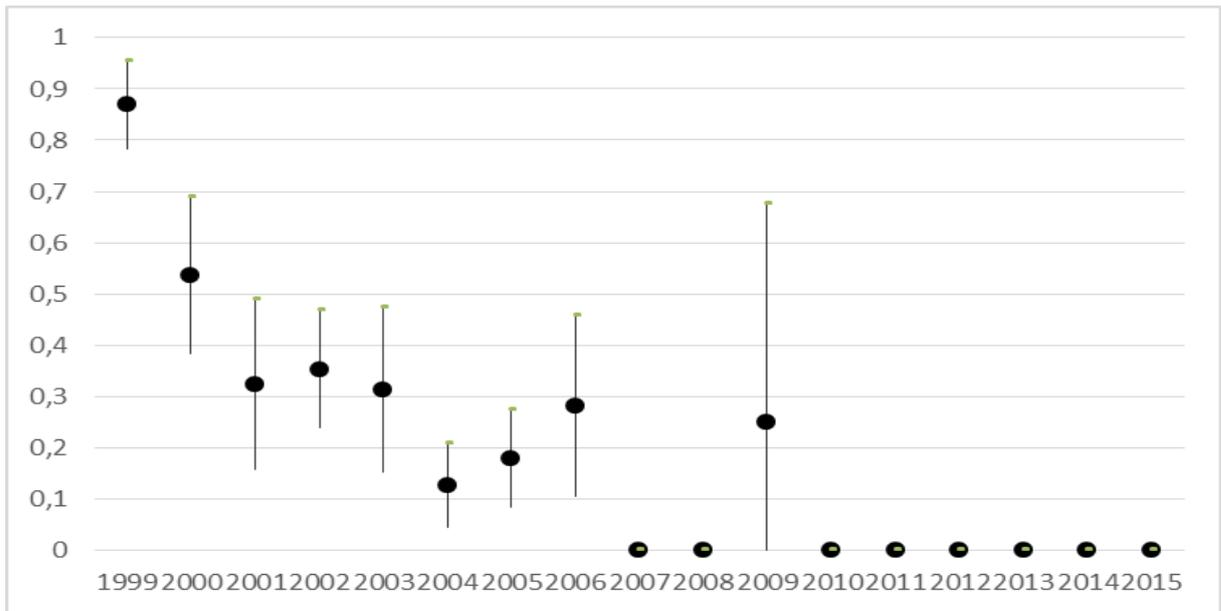


Figura 29 - Intervalo de confiança para a proporção de *S. obvelata* na colônia de camundongos C57BL/6 do CECAL/FIOCRUZ no período de 1999 - 2015.

● Proporção de parasitos

| Intervalo de confiança

6 - DISCUSSÃO

O monitoramento sanitário deverá obedecer a critérios técnicos rigorosos que atendam as normas vigentes de entidades reguladoras e/ou normalizadoras, como a FELASA (FELASA, 2014). É importante salientar que dentre os poucos institutos ou universidades, considerando território nacional, sabe-se que o CEMIB/ Unicamp, o Biotério Central da USP e o ICTB/FIOCRUZ possuem laboratórios que realizam o controle sanitário dos animais.

O SCQA/FIOCRUZ, no intuito de minimizar qualquer tipo de discrepância nos resultados, sempre procurou utilizar protocolos técnicos preconizados pelos biotérios nacionais, bem como estabeleceu parcerias com os profissionais de área afins. Assim, com a finalidade de diagnosticar endo e ectoparasitos, foram utilizadas as técnicas parasitológicas consagradas, como o método de Willis e Hoffman para o exame de fezes, além da técnica de Graham (Técnicas da fita celofane). O diagnóstico definitivo e comprobatório, era realizado através da visualização do pelo do animal e necropsia. Nesta perspectiva, os nossos resultados foram satisfatórios e respaldados pela literatura (GONÇALVES, 2000; ZENNER; REGNAULT, 2000; GILIOLI, 2003).

Várias investigações relativas ao *status* sanitário, incluindo o presente estudo, vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de nortear os pesquisadores sobre as principais parasitoses que possam acometer os animais de laboratório em instalações de produção. Em nosso estudo, considerando apenas o ano de 1999, foram encontrados e identificados os ácaros *M. musculi* e *M. musculinus* infestando os camundongos nas três linhagens investigadas, com as prevalências de 2,78% e 5,95%, respectivamente. Estes resultados assemelham-se aqueles obtidos nos trabalhos desenvolvidos por Bressan et al., (1997), Gilioli et al. (2000) e Bicalho et al., (2007) em biotérios nacionais com sistema convencionais controlados. Já no ano 2000, apenas o ácaro *M. musculinus* foi detectado nas três linhagens incluídas no estudo, o que foi um resultado semelhante ao descrito por Griffiths (1971), que identificou apenas uma única espécie de ácaro parasitando camundongos. Ainda de acordo com este autor, este achado não deve ser encarado como um casuísmo, pois, embora seja muito comum o parasitismo simultâneo por *M. musculi*

e *M. musculus* como assinalaram Flechmann et al. (1974), Bressan et al. (1997), Carty (2008), não é incomum a infestação por um único agente. Esta observação é corroborada por Fox et al. (2002) e Sahinduran et al., (2010) que relataram o *M. musculus* como o ácaro mais identificado entre estes hospedeiros.

Após um período sem detecção de ectoparasitos nas colônias de camundongos C57BL/6, no ano de 2004 ocorreu uma considerável infestação desta colônia, com o comprometimento de 15 animais em universo de 64 analisados (aproximadamente 25% dos animais analisados). É importante salientar que as autoclaves da Unidade, além de não estarem validadas, no ano de 2004 sofreram problemas relacionados ao funcionamento dos equipamentos (Memorando n° 19/2004 – DPA**). Este fator pode ter sido determinante para a reintrodução dos ácaros *M. musculus* nas colônias de C57BL/6, apesar de estarem alojadas na mesma área do SPF. Após o ano de 2004 foi possível constatar que os animais não mais apresentavam infestações por ácaros, provavelmente a eliminação destes ectoparasitos tenha ocorrido em função do tratamento por drogas acaricidas e reparo e manutenção das autoclaves.

Muitos estudos relatam que os camundongos podem apresentar patologia dermatológica e outros sinais clínicos quando infestados por ectoparasitos (MORITA et al., 1999; JOHNSTON et al, 2009). Os ácaros *M. musculi* e *M. musculus* podem provocar sintomas de sarna, tais como alopecia, eritema, prurido e dermatite como descrito por Baker (2008). Esta sintomatologia não foi constatada no presente estudo. Os camundongos infestados por esses ácaros apresentaram pele íntegra e aparentemente tão saudáveis quanto os não parasitados, o que tem identidade com o que descreveram Baker (2008) e Johnston et al., (2009). A ausência de sinais clínicos nos animais investigados é uma informação extremamente relevante, principalmente porque pode comprometer os resultados dos experimentos, devido ao desconhecimento pelo pesquisador da parasitose em curso, quando apenas os aspectos clínicos dos animais forem considerados sem efetivo diagnóstico laboratorial.

As endoparasitoses são de grande importância devido ao comprometimento da saúde animal e possível impacto nos resultados das pesquisas. Neste estudo, foi possível observar elevada prevalência do helminto *S. obvelata* nas três linhagens analisadas, além da frequência dos helmintos e protozoários como *A. tetraptera*, *H. nana*, *S. muris*, *G. muris*, *E. muris* e *T. muris*. As ocorrências de infecções por múltiplos parasitos também já foram observadas pelos pesquisadores Zenner e Regnault (2000), em um estudo retrospectivo do status parasitológico de roedores mantidos em um biotério na França, bem como por Gilioli (2003) em seu trabalho

** Documento Anexo A

de avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e ratos em biotérios brasileiros. Os nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Gonçalves (2000), que estudando a fauna helmintológica em camundongos *Outbred* e *Inbred* de biotérios institucionais brasileiros, verificou a ocorrência dos endoparasitos *S. obvelata*, *A. tetraptera* e *H. nana*. As observações quanto às associações de helmintos parasitando camundongos *Inbred* foram também relatadas por Gonçalves (1996), que observou *S.obvelata* associada à *A.tetraptera*, bem como à *H.nana*, podendo ainda haver a intercorrência de *S. obvelata*, *A.tetraptera* e *H.nana*.

No presente estudo, considerando todos os endoparasitos identificados em todos os camundongos avaliados, pôde-se constatar que as infecções causadas por helmintos foram mais prevalentes do que as infecções causadas pelos protozoários, sendo a prevalência para *S.obvelata* (34,61%), *A.tetraptera* (4,19%), *H.nana* (3%) e *S.muris* (7,14%), *T.muris* (5,91%), *E.muris* (3,19%) e *G. muris* (0,38%), respectivamente.

Como já citado anteriormente, neste estudo foi analisada a prevalência dos endoparasitos, sendo *S. obvelata* o mais prevalente nas três linhagens estudadas. Este evento não é incomum, como evidenciado no trabalho de Bicalho et al. (2007) e pode ser explicado em razão da grande dificuldade de controle deste parasito, que pode ser atribuída às características do seu ciclo biológico. É sabido que as fêmeas deste helminto realizam a oviposição na região perianal dos hospedeiros infectados, estes ovos permanecem aderidos na pele do animal, mas com frequência, podem se desprender e contaminar o microambiente das colônias. Estes ovos elípticos e muito leves possuem a peculiaridade de contaminar o ambiente por aerossóis que podem se disseminar na poeira, contaminando os equipamentos e os ductos de ventilação (BAKER, 1998). Assim, a higienização e o manejo dos animais infectados são determinantes para evitar ou controlar a parasitose por *S. obvelata* em colônias de roedores. É importante lembrar que a não autoclavação dos materiais, como gaiolas, bebedouros, tampas, maravalhas e outros pode ser uma fonte de infecção para os animais (TAFFS, 1976; MICHELS et al., 2006; MOREIRA et al., 2013), porém como mencionado anteriormente, a falta da validação e manutenção dos autoclaves até o ano 2004 (Memorando nº 19/2004 – DPA**), provavelmente corroborou para a maior frequência das endoparasitoses neste período.

Com o objetivo de controlar as infecções por parasitos, principalmente *S. obvelata*, vários protocolos de vermifugação já foram testados e, atualmente, a droga mais utilizada é a ivermectina (BATTLES et al., 1987; SUETA et al., 2002). Com base neste entendimento, desde a implantação do monitoramento sanitário, os técnicos do CECAL/FIOCRUZ realizavam o

** Documento Anexo A

tratamento antiparasitário em todas as colônias da criação. Entretanto, observou-se que o tratamento não foi eficiente no período de 1999 a 2013, já que os resultados demonstraram a presença de endoparasitos. Pode-se atribuir esta falha na vermifugação dos animais aos inúmeros problemas relacionados à infraestrutura e equipamentos, além do número insuficiente de profissionais nas áreas de criação (informação verbal*). Estas dificuldades no controle parasitário das colônias, incluindo as três linhagens avaliadas, foi demonstrada através dos resultados obtidos neste estudo, principalmente quando se considera a alta prevalência de *S. obvelata*. Por outro lado, a partir de 2013, constatou-se que o tratamento realizado por Moreira et al; (2013), utilizando ivermectina oral combinada ao sistema de barreira sanitária, higienização ambiental, incluindo a manutenção predial e o despovoamento das salas que precisavam de intervenção, foram eficientes para promover a erradicação da *S.obvelata*, bem como de outros parasitos, como demonstrado neste estudo.

O controle da *S. obvelata* é extremamente relevante quando se considera o impacto na reprodutibilidade das pesquisas científicas. Muitos autores já relataram alterações da resposta imune de camundongos infectados com helmintos. Em 2014, Jesús e Pavón demonstraram o sinergismo da resposta imune de camundongos BALB/c Bioula, quando houve intercorrência da infecção por *Leishmania mexicana* associada à parasitose por *S. obvelata*. Em nosso estudo observamos que os camundongos BALB/c An apresentaram maior frequência relativa para *S. obvelata* quando comparado às outras linhagens incluídas no estudo. É sabido que a resposta imune característica induzida por helmintos intestinais é dependente da resposta de linfócitos Th2. Esta, resposta envolve a produção de interleucinas, IL-4, IL-5 e IL-13, assim como a produção de imonoglobulina IgE e ativação, mobilização e expansão de células efetoras específicas, como mastócitos e eosinófilos. O desenvolvimento da resposta imune para o eixo tipo Th2 influencia negativamente a resposta do tipo Th1, e conseqüentemente, inibe a proteção imunológica do hospedeiro frente a patógenos, cuja resposta protetora é Th1 dependente, bem como pode estimular a resposta do eixo Th2 para outros patógenos ou alérgenos (ABBAS e LICHTMAN, 2013). Neste contexto, Michels et al. (2006) observaram que a resposta imune Th2 de camundongos BALB/c induzida pela infecção por *S. obvelata* foi capaz de exacerbar a reação alérgica induzida pela ovoalbumina. Os mesmos autores afirmaram que o grau de infecção com *S. obvelata* parece ser dependente da linhagem de camundongo envolvida, sendo

*Informação obtida por meio de contato com a Médica Veterinária Belmira Santos, responsável pelo setor de criação do SCRL/CECAL/FIOCRUZ no período incluído no estudo.

os animais *inbreed* (BALB/c, C57BL/6 e 129/Sv) e os camundongos com deficiência em citosinas tipo 1 (IFN γ R) são capazes de eliminar com facilidade pequenas infecções com o helminto.

É importante observar que os protozoários *S. muris* (7,14%), *T. muris* (5,91%), e *E. muris* (3,19%), que foram os mais frequentemente identificados nos camundongos das três linhagens estudadas são considerados pouco ou não patogênicos para os hospedeiros (GILIOLI, 2000; ANDRADE et al., 2006; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009). Foi observada também uma baixa frequência de *G. muris* (0,38%) em alguns animais, sem associação com quadro clínico. Estes resultados divergem dos observados por Bicalho et al., (2007), que obteve uma prevalência maior de *E. muris* (84,6%) e *G. muris* (46,2%) enquanto os trabalhos de Zenner e Regnault (2000) revelaram que os protozoários mais frequentes foram *Tritrichomonas* sp. (73,9%) e *E. muris* (60,9%). Assim, pode-se inferir que os animais das linhagens Swiss Webster, C57BL/6 e BALB/c An criados e mantidos no CECAL, no período avaliado, apresentaram índices de parasitismo inferiores aos descritos na literatura.

Alguns fatores como idade, sexo, tamanho amostral e susceptibilidade das linhagens aos parasitos podem interferir nos resultados parasitológicos (SCOTT; GIBBS, 1986; WAGNER, 1988). No nosso estudo observou-se que as diferenças no tamanho amostral foram relevantes e determinaram as alterações verificadas nas análises estatísticas, e demonstradas através dos gráficos de intervalo de confiança. Esta amplitude no tamanho das amostras também determinou os cortes temporais 1999-2003 e 2004-2015, para uma melhor avaliação dos resultados.

Considerando o corte temporal, observou-se uma semelhança na distribuição das frequências relativas e absolutas para os períodos 1999-2003, 2004-2015, bem como o período total do estudo de 1999 a 2015. Estas alterações observadas são muito importantes principalmente no que tange a metodologia empregada para o monitoramento sanitário, onde se observou variação no número de animais analisados durante todo período. Esta variação pode ser compreendida como uma busca na melhoria dos processos e procedimentos técnicos após a implementação das recomendações da FELASA. Porém, há que se avaliar a pertinência dos protocolos de remessa das amostras desenvolvidas pelos setores, bem como a inclusão de animais-sentinelas. Todavia, outros fatores de suma importância também devem ser considerados nesta análise dos dados do período 1999-2004, onde foi verificada a maior frequência dos parasitos. Não é viável atribuir apenas a diferença do tamanho das amostras como fator determinante das variações observadas durante a compilação dos dados. Há que se considerar a faixa etária e sexo dos animais, a infraestrutura predial, ausência de racks

ventilados, protocolos de manejo não validados e ao comportamento dos técnicos ou insuficiência de novos funcionários, bem como estagiários ou bolsistas.

Por outro lado, o corte temporal 2004-2015, sem desconsiderar o tamanho amostral, que pode ser determinante, é possível inferir que a menor frequência das parasitoses ocorreu em função da implantação e melhoria das barreiras sanitária, incluindo a aquisição de materiais, insumos e implantação de racks ventilados na criação, a partir do ano de 2005 (informação verbal*). Neste período também houve incentivo a capacitação e treinamento de técnicos, estagiário e bolsistas. Porém, a partir do ano de 2008 houve o recrudescimento das parasitoses, principalmente nas linhagens BALB/c An e C57BL/6, que pode ter sido decorrente da quebra das barreiras sanitária em função da degradação da infraestrutura e ambientes insalubres conforme relatado no (Memorando 19-2009 do SCRL***). Posteriormente, além de todas estas medidas necessárias para o controle das parasitoses, a partir de 2010 foi realizado por Moreira et al.(2013) o tratamento antiparasitário em toda criação da unidade. Tais ações podem ter refletido na diminuição da frequência dos parasitos, uma vez que não foram mais evidenciados a partir do ano de 2013.

Assim, é importante salientar que nestes estudos foi possível verificar que ao longo do período de 1999 a 2015 houve uma redução das infecções parasitárias nos camundongos das linhagens estudadas. Esta redução progressiva de ecto e endoparasitos nas colônias provavelmente foi decorrente da implantação de barreiras sanitárias adequadas, que apesar da degradação da infraestrutura do CECAL, contou com grandes esforços, para sustentar uma instalação onde se deseja a formação de profissionais, bem como atender e criar animais de laboratório com qualidade genética e sanitária que satisfaçam às exigências das pesquisas. Com base neste entendimento, pode-se afirmar que é um grande desafio dos Centros Institucionais criar e manter biomodelos que contemplem os anseios da comunidade científica e que desejem efetivamente seguir os procedimentos e fortalecer a Ciência em Animais de Laboratório.

7 - CONCLUSÕES

* Informação obtida por meio de contato com a Médica Veterinária Belmira Santos, responsável pelo setor de criação do SCRL/CECAL/FIOCRUZ no período incluído no estudo.

***Documento Anexo B

Com base nos resultados obtidos durante este estudo concluiu-se que:

- ✓ O ectoparasito *Myocoptes musculus* foi o mais prevalente nas colônias de Swiss Webster, BALB/c An e C57BL/6
- ✓ O endoparasito *Syphacia obvelata* foi o mais prevalente nos camundongos de Swiss Webster, BALB/c An e C57BL/6
- ✓ Os camundongos da linhagem BALB/c An apresentaram maior frequência relativa para *Syphacia obvelata* quando comparado às linhagens incluídas no estudo. O protozoário *Spiroucleus muris* foi o mais prevalente nas linhagens de Swiss Webster, BALB/c An e C57BL/6
- ✓ A insuficiência de barreiras sanitárias supostamente foi fator determinante para os achados de ectoparasitos e endoparasitos nas colônias, principalmente no período 1999-2004
- ✓ A redução progressiva de ectoparasitos nas colônias estudadas foi decorrente da implantação de barreiras e manejos sanitários adequados
- ✓ A presença de ácaros *Myocoptes musculus* na colônia C57BL/6, após três anos controlados, denota uma reinfestação da colônia por quebra de barreira sanitária
- ✓ O tamanho amostral durante o monitoramento sanitário é determinante para expressar a representatividade do *status* sanitário da população estudada
- ✓ As informações a respeito da saúde do animal, presença de agentes infecciosos e os tratamentos realizados para o controle das parasitoses precisam ser de fornecimento compulsório pelas instituições que possuem instalações de produção animal
- ✓ O monitoramento sanitário periódico, as medidas de tratamento intermitente, associada à melhoria do manejo e estabelecimento de barreiras sanitárias corroboram para o controle de ectoparasitos e endoparasitos dos animais estudados.

8 - REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica**. Elsevier Brasil - 4ª Ed. 2013

ALVES, L.C.; SOBRINHO, A.P.; BORGES, C.C. **Estudo comparativo da eficácia de sulfóxido de Albendazol e Ivermectina contra oxiurídeos e cestóides de camundongos naturalmente infectados**. Revis, p. 424, 2004.

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, 2004

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. Cabi, 2000.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SCIELO-Editora 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, 1998.

BAKER, D. G. (Ed.). **Flynn's parasites of laboratory animals**. John Wiley & Sons, 2008.

BARTHOLD, S. W.; FENG, S.; BOCKENSTEDT, L. K.; FIKRIG, E.; FEEN, K. **Protective and arthritis-resolving activity in sera of mice infected with *Borrelia burgdorferi***. Clinical infectious diseases, v. 25, n. Supplement_1, p. S9-S17, 1997.

BATTLES, A. H.; ADAMS, S. W.; COURTNEY, C. H.; MLADINICH, C. R. **Efficacy of ivermectin against natural infection of *Syphacia muris* in rats**. Laboratory animal science, v. 37, n. 6, p. 791, 1987.

BAZZANO, T.; RESTEL, T.I.; PINTO, R.M.; GOMES, D.C. **Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 6, p. 847-853, 2002.

BICALHO, K.A; ARAÚJO, F.T.M.; ROCHA, R.S.; CARVALHO, R.S. **Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I-Endo and ectoparasites.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n. 6, p. 1478-1484, 2007.

BICALHO, K.A. **Condições higiênico-sanitárias, ocorrência de parvovírus e de parasitos de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou.

BRASIL, C. M. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica-DBCA.** Resolução Normativa MCTI, 2016.

BRESSAN, C.R.V.; CALGARO, G.A.; ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T. **Prevalence of ecto and endoparasites in mice and rats reared in animal houses.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 34: 142-146, 1997.

CARTY, A.J. **Opportunistic infections of mice and rats: Jacoby and Lindsey revisited.** ILAR journal, v. 49, n. 3, p. 272-276, 2008.

CARDOSO, C. V. P. Animais de Laboratório-criação e experimentação, **Classificação de biotérios quanto à finalidade.** 2 Ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. Pág. 29-31.

CARDOSO C. V. P. **Avaliação dos processos de criação e manutenção de animais de laboratório: uma ação contínua para a qualidade no sistema nacional de vigilância sanitária.** 2014. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle em Saúde Animal-INCQS.

CASEBOLT, D. B.; LINDSEY, J. R.; CASSELL, G. H. **Prevalence rates of infectious agents among commercial breeding populations of rats and mice.** Laboratory animal science, v. 38, n. 3, p. 327, 1988.

CASTRO, L. G. (edição, finalização, autorização) (2008). **Criando Vida - 2ª edição [DVD],** Rio de Janeiro; Ilha MP2 Produções, versão em Português. 2008

CCAC (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE). **Guide to the care and use of experimental animal**. 2. ed. Ottawa: CCAC; 1993. 1 v.

CECAL [CENTRO DE CRIAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO]. **Cecal notícias e Informações**. Site Institucional. Fiocruz. Rio de Janeiro. 2018. Disponível em: www.cecal.fiocruz.br. Acessado em: 26 de jan. 2018.

CHAN, K.F. **Life cycle studies on the nematode *Syphacia obvelata***. American Journal of Hygiene, v. 56, n. 1, p. 14-21, 1952.

CHEN, X. M.; LI, X.; LIN, R. Q.; DENG, J. Y.; FAN, W. Y.; YUAN, Z. G.; ZHU, X. Q. **Pinworm infection in laboratory mice in southern China**. Laboratory animals, v. 45, n. 1, p. 58-60, 2011.

CHIA, R.; ACHILLI, F.; FESTING, M. F.; FISHER, E. M. **The origins and uses of mouse outbred stocks**. Nature genetics, v. 37, n. 11, p. 1181, 2005.

CLOUGH, G. **Environmental effects on animals used in biomedical research**. Biological Reviews, v. 57, n. 3, p. 487-523, 1982.

COL, E. B. **Parasitas de camundongos de laboratório: uma abordagem informatizada com animações gráficas**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

COUTO, S. E. R. **Instalações e barreiras sanitárias**. Animais de laboratório. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 33-44, 2006.

DA COSTA, Ubiratã Cereser; SARAIVA, Danilo. **Parasitismo de camundongos brancos por *Myocoptes musculus***. Revista do Centro de Ciências Rurais, v. 7, n. 4, 2008.

“Da revolta da vacina à reforma sanitária, uma história de saúde pública no Brasil”. (Manguinhos, Rio de Janeiro. Pag. 56-73, mai., 2005).

DA SILVA, A.S.; ZANETTI, R.A.; MONTEIRO, S.G.; NOAL, S.A. **Efeito da piperazina e ivermectina no tratamento de camundongos *Mus musculus* naturalmente infectados com *Aspiculuris tetraptera* e *Syphacia obvelata***. Revista da FZVA, v. 14, n. 2. 2007.

DANIEL, WENDELL A.; MATTERN, CARL FT; HONIGBERG, B. M. **Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas muris* (Grassi)**. Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 18, n. 4, p. 575-586, 1971.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica–Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico de Parasitoses Humanas**”–Rio de Janeiro. RJ-Livraria Editora Atheneu, Rio de Janeiro, RJ–2007.

DE LUCA, R.R.; ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B.; NEVES, S.P. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2ª edição. São Paulo: Cobeia. Finep., 1996, 260 p.

DIX, J.; ASTILL, J.; WHELAN, G. **Assessment of methods of destruction of *syphacia muris* eggs**. American association for labotatory animal science, V. 38, p. 11-16, 2004.

FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS. (Working Group on Revision of Guidelines For Health Monitoring of Rodents and Rabbits) **Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units**. Laboratory animals, London. v. 48, n. 3, p. 178-192, 2014.

FIOCRUZ [FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ]. **Linha do Tempo**. Site Institucional. Fiocruz. Rio de Janeiro. 2018. Disponível em: www.fiocruz.br. Acessado em: 3 de jan. 2018.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L.; RIVERA, E. A. B. **Ciência em animais de laboratório**. Ciência e Cultura, v. 60, n. 2, p. 44-46, 2008.

FLECHTMANN, C. H. W.; ZAMITH, A. P. L. **Sobre três ácaros parasitos de animais de laboratório**. Arquivos da UFRRJ, 4: 29-34, 1974.

FLYNN, R. **Parasites of Laboratory Animals**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 155-202. 1973.

FMUSP [FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO]. Site Institucional. USP. São Paulo. 2017. Disponível em: www.biot.fm.usp.br. Acessado em: 05 de fev. 2018.

FOX, J.G.; ANDERSEN, L.C; LOEW, F.M.; QUIMBY, F.W. **Laboratory Animal Medicine**. New York: academic Press; 2002.

GAERTNER, Diane J. **Speculations on why some lab rodent pathogens continue to be prevalent**. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, v. 43, n. 3, p. 8-8, 2004.

GAMBLES, R. Moylan. **Myocoptes Musculus (KOCH) and Myobia Musculi (SCHRANCK), Two Species of Mite Commonly Parasitising the Laboratory Mouse**. British Veterinary Journal, v. 108, n. 6, p. 194-203, 1952.

GALTON, M. **Myobic Mange of the Mouse Leading to Skin Ulceration and Amyloidosis**. The American Journal of Pathology, v. 43, n. 5, p. 855, 1963.

GILIOLI, R.; ANDRADE, L.A.G.; PASSOS, L.A.C.; SILVA, F.A.; RODRIGUES, D.M.; GUARALDO, A.M.A. **Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52(1): 33-37, 2000.

GILIOLI, R. **Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos**. 138f. 2003. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

GONÇALVES, L; PINTO, R.M.; VICENTE, J.J.; NORONHA, D.; GOMES, D.C. **Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice: II-Inbred strains with an**

adaptation of the anal swab technique. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 93, n. 1, p. 121-126, 1998.

GONÇALVES, L. **Estudo da helmintofauna (*Syphacia*, *Aspiculuris* e *Rodentolepis*) de animais de laboratório (camundongos, ratos e hamster).** 2000. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000.

GRAHAM, C. F. **A device for the diagnosis of *Enterobius* infection.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 1, n. 1, p. 159-161, 1941.

GRIFFITHS, Henry J. **Some common parasites of small laboratory animals.** Laboratory animals. V. 5, n. 1, p.123-135, 1971.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores.** Editora Roca, São Paulo, 1993.

HEYWORTH, M. F. **Time-course of *Giardia muris* infection in male and female immunocompetent mice.** The Journal of Parasitology, p. 491-493, 1988.

HUSSEY, Kathleen L. ***Syphacia muris* vs. *S. obvelata* in laboratory rats and mice.** The Journal of parasitology, v. 43, n. 5, p. 555-559, 1957.

ICTB [INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS]. Site Institucional. Fiocruz. Rio de Janeiro. 2017. Disponível em: www.ictb.fiocruz.br. Acessado em: 18 de fev. 2018.

ILAR [INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES]. Committee on care; use of spontaneously hypertensive (shr) rats. **Spontaneously hypertensive (SHR) rats: Guide lines for breeding, care, and use.** National Academies, 1976.

ITO, A. *Hymenolepis nana*: **Immunogenicity of a lumen phase of the direct cycle and failure of autoinfection in BALBc mice.** Experimental parasitology, v. 54, n. 1, p. 113-120, 1982.

JESÚS, R.; PAVON, W. **Sinergismo en la respuesta inmune en ratones BALB/c BIOULA con parasitosis combinadas: Syphacia obvelata y Leishmania mexicana.** Spei Domus, v. 10, n. 21, p. 29-39, 2014.

JOHNSTON, N. A; TRAMMELL, R. A; BALL-KELL, S; VERHULST, S; TOTH, L. A. **Assessment of immune activation in mice before and after eradication of mite infestation.** Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, v. 48, n. 4, p. 371-377, 2009.

KLEMENT, Petr et al. **An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (Syphacia spp.) in laboratory rats and mice.** Laboratory animal science, v. 46, n. 3, p. 286-290, 1996.

KRANTZ, G. W. **A manual of acarology.** Oregon State University Book Store. Inc. Corvallis, v. 509, 1978.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M.. Cuidados e manejo de animais de laboratório. In: **Cuidados e manejo de animais de laboratório.** 2009.

LEWIS, J. W.; D'SILVA, J. **The life-cycle of Syphacia muris Yamaguti (Nematoda: Oxyuroidea) in the laboratory rat.** Journal of Helminthology, v. 60, n. 1, p. 39-46, 1986.

MATTERN, C. F. T.; DANIEL, W. A. **Tritrichomonas muris in the hamster: pseudocysts and the infection of newborn.** Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 27, n. 4, p. 435-439, 1980.

MICHELS, C.; GOYAL, P.; NIEUWENHUIZEN, N.; BROMBACHER, F. **Infection with Syphacia obvelata (pinworm) induces protective Th2 immune responses and influences ovalbumin-induced allergic reactions.** Infection and Immunity, v. 74, n. 10, p. 5926-5932, 2006.

MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G; AMENDOEIRA, M.R.R. (Org). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde .** v. 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009.

MOREIRA, W.C.; SANTOS, B.F.; SANTOS, S.I.; CARDOSO, A.; COUTO, S.E.R. **Erradicação de *Syphacia spp.* de uma grande colônia de criação de roedores combinando ivermectina oral, sistema de barreira sanitária e higienização ambiental.** Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, v. 2, n. 2, p. 111-123. 2013.

MORITA, E; KANEKO, S; HIRAGUN, T; SHINDO, H; TANAKA, T; FURUKAWA, T; YAMAMOTO, S. **Fur mites induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mice, NC/Kuj.** Journal of dermatological science, v. 19, n. 1, p. 37-43, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Infectious diseases of mice and rats.** National Academies Press, 1991.

NICKLAS, W; HORNBERGER, F.R.; BRUNHILDE, I-W.; JACOBI, K.; KRAFT, V.; KUNSTYR, I; MAHLER, M.; MEYER, H.; POHLMAYER-ESCH, G. **Implications of infectious agents on resultants of animals experiments.** Lab. Anim., London, n. 33, Suppl.1, p.39-87, 1999.

OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; WILLIAM, A. **Manual sobre al cuidado y uso de los animals de experimentación.** Consejo Canadiense de Protección de los Animales. 322 pp, 1988.

OWEN, D. G. **Parasites of laboratory animals.** Royal Society of Medicine Services Limited, 1992.

PEREC-MATYSIAK, A.; OKULEWICZ, A.; HILDEBRAND, J.; ZALEŚNY, G. **Helminth parasites of laboratory mice and rats.** Wiadomosci Parazytologiczne, v. 52, n. 2, p. 99-102, 2006.

PINTO, R.M.; VICENTE, J.J.; NORONHA, D.; GONÇALVES, L.; GOMES, D.C. **Helminth parasites of convettionally maint ined laboratory mice.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 89: 33-46, 1994.

SAHINDURAN, S.; OZMEN, O.; HALIGUR, M.; YUKARI, B.A. **Severe *Myocoptes musculinus* infestation and treatment in laboratory mice.** Veterinary Journal of Ankara University, v. 57, n. 1, 2010.

SANTOS, R. O.; GUARALDO, A. M. A.; PASSOS, L. C.; GILIOLI, R.; RANGEL, H. A. **Uso do monossulfeto de tetraetiluram no tratamento de ectoparasitas em camundongos.** Revista de Saúde Pública, 22: 41-45, 1988.

SANTOS, B. F. Animais de Laboratório-criação e experimentação, **Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético.** 2 ed.. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006, 65-70.

SCOTT, M. E.; GIBBS, H. C. **Long-term population dynamics of pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) in mice.** The Journal of Parasitology, p. 652-662, 1986.

SILVA, J. F. R. **Avaliação sanitária do biotério de criação: uma contribuição para melhoria da qualidade dos animais de laboratório produzidos no CPqAM.** 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-CPqAM.

SOUSA, L. G. **helmintofauna de camundongos singênicos e introdução da técnica modificada do swab anal para o diagnóstico de oxiurídeos.** Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária), Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, RJ. 1996.

SUETA, T.; MIYOSHI, I.; OKAMURA, T.; KASAI, N. **Experimental eradication of pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) from mice colonies using ivermectin.** Experimental animals, v. 51, n. 4, p. 367-373, 2002.

TACONIC. **Mouse Model Swiss Webster.** (2017) – Disponível em: www.taconic.com, Acessado em: 13 nov. 2017.

TACONIC. **BALB/c INBRED MODEL DESCRIPTION** (2018) – Disponível em: www.taconic.com, Acessado em: 02 jan. 2018a.

TACONIC. **Black 6 (B6Ntac) INBRED.** (2018) – Disponível em: www.taconic.com, Acessado em: 10 fev. 2018b.

TAFFS, L. F. **Pinworm infections in laboratory rodents: a review**. *Laboratory animals*, v. 10, n. 1, p. 1-13, 1976.

TANAKA, H.; OSHIMA, S.; FUJINAMI, F. **A survey of parasites in commercially available small laboratory mammals (author's transl)**. *Jikken dobutsu. Experimental animals*, v. 23, n. 1, p. 15, 1974.

TANAKA, H.; OSHIMA, S.; FUJINAMI, F. **Syphacia obvelata: A New Hope to Induction of Intestinal Immunological Tolerance in C57BL/6 Mice**. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 55, n. 4, p. 439, 2017.

TANIDEH, N.; SADJADI, S. M.; MOHAMMADZADEH, T.; MEHRABANI, D. **Helminthic infections of laboratory animals in animal house of Shiraz University of Medical Sciences and the potential risks of zoonotic infections for researchers**. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, v. 12, n. 2, p. 151, 2010.

VANDENBERGH, J.G. **Introduction: use of house mice in biomedical research. In: Mouse behavioral models in biomedical research**. *ILAR J.* 41(3) : 3 – 7, 2000.

VIANA, I. D. **Mapeamento de processos geradores de resíduos em um biotério de criação. 2011**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia). Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca – CEFET/RJ.

WAGGIE, K. **Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals**. DIANE Publishing, 1994.

WAGNER, M. **The effect of infection with the pinworm (Syphacia muris) on rat growth**. *Laboratory animal science*, v. 38, n. 4, p. 476-478, 1988.

WATSON, Doreen P. **On the adult and immature stages of Myocoptes musculus (Koch) with notes on its biology and classification**. *Acarologia*, v. 2, n. 3, p. 335-44, 1960.

WESCOTT, R.B. **Helminths, The mouse in biomedical research**, v. 2, p. 373-384, 1982.

WEISBROTH, S. H.; FRIEDMAN, S.; SCHER, S. **The parasitic ecology of the rodent mite, Myobia musculi. III. Lesions in certain host strains**. *Laboratory animal science*, v. 26, n. 5, p. 725-735, 1976.

WEISBROTH, S. H. Artropods 1982. In: FOSTER, HL., SAMLL, JD. & FOX, JG., **The mouse biomedical research**. New York, Academic Press, 2: 449. 1982.

WHARTON, D. A. **The structure of the egg-shell of *Aspicularis tetrapteray* Schulz (Nematoda: Oxyuroidea)**. Parasitology, v. 78, n. 02, p. 145-154, 1979.

WHITEHOUSE, A.; FRANCE, M. P.; POPE, S. E.; LLOYD, J. E.; & Ratcliffe, R. C. **Spironucleus muris in laboratory mice**. Australian Veterinary Journal, v. 70, n. 5, p. 193-193, 1993.

WOOLLEY, T. A. **Acarology: mites and human welfare**. John Wiley & Sons, Inc., 1988.

ZENNER, L. **Effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*, *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera*) from a rodent breeding colony by oral anthelmintic therapy**. Laboratory animals, v. 32, n. 3, p. 337-342, 1998.

ZENNER, L.; REGNAULT, J.P. **A retrospective study of the microbiological and parasitological status of laboratory rodents in France**. Journal of experimental animal science, v. 40, n. 4, p. 211-222, 2000.

ANEXO A

Em 12 de Abril de 2004.

Memo n° 19/2004 – DPA

De: Departamento de Produção Animal

Sebastião Enes Reis Couto

Para: Departamento de Planejamento e Administração/CECAL

Zilah Mello

Assunto: Manutenção e Conserto de Autoclave

Sra. Chefe,

Como é de conhecimento de V.Sa., estamos sem contrato de uma empresa especializada para manutenção preventiva e corretiva de autoclave, a mais de 1(um) ano. Em consequência é necessário à utilização de serviço emergencial, que muitas das vezes, de elevado custo para Unidade. Além disso, coloca em risco o desenvolvimento das atividades com segurança e qualidade, devido a mudança da rotina de trabalho sem planejamento prévio.

O conserto emergencial dos equipamentos não nos garante o bom funcionamento do mesmo, visto que, é necessário um acompanhamento periódico para limpeza dos purgadores, drenos, filtros, etc.

Relaciono abaixo, que vem ocorrendo no funcionamento das autoclaves deste Departamento.

- ✓ Autoclave 2.500 litros – SPF
- ✓ Problema na autoclavação com vapor fluente;
- ✓ Falta de gráfico para registro de temperatura e pressão;
- ✓ Entrada de vapor na câmara externa da autoclave mesmo estando desligada.

- ✓ Autoclave 4.500 litros - SPF
 - Não está funcionando a mais de 10 dias devido à retirada do painel para conserto, dificultando a realização das atividades diária daquele Setor;
 - Necessita de limpeza de purgadores;
 - Falta gráfico para registro de temperatura e leva muito tempo completar um ciclo de autoclavação.
- ✓ Autoclave 4.500 litros – Setor Convencional/Lagomorfos
 - Necessita de rampa adequada para entrada e saída de material;
 - Problema na autoclavação – provocando pressão negativa;
 - Falta gráfico para registro de temperatura e pressão;
 - Não está realizando a fase de resfriamento.

- ✓ Autoclave 4.500 litros – Setor Convencional / Roedores
 - Falta gráfico para registro de temperatura e pressão;
 - Não está entrando a fase de esterilização automaticamente;
 - Problema na autoclavação com vapor fluente;
 - Retenção de água no interior do equipamento;
 - Muito tempo para completar um ciclo de autoclavação;

- Problema na entrada de vapor no equipamento.

- ✓ Autoclave 2.500 litros – Setor Convencional/Roedores
 - Falta de gráfico para registro de temperatura e pressão;
 - Dificuldade para abrir a porta do lado sujo, devido instalação elétrica existente na parede lateral do equipamento;
 - Conserto dos rodízios dos carrinhos;
 - Peça solta da porta do lado limpo.

- ✓ Autoclave 4.500 – Setor Convencional/Roedores Marca SERCOM
 - Equipamento não se encontra em funcionamento a mais de 3 anos. Como motivo principal, está relacionado ao painel de comando.

Considerando que uma das metas do CECAL, é produzir animais com padrão de qualidade sanitário definido, solicito V.Sa., providências em caráter emergencial, para solucionar tais problemas, e coloco-me a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

ANEXO B

Rio de Janeiro, 03 de abril de 2009.

Memo: 19-2009- SCRL

Do: Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos

Para: Vice-Diretoria de Criação Animal

Assunto: A situação do Serviço de Criação

Prezada Vice- Diretora,

O Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos-SCRL, Serviço de Manutenção e a Assistência Técnica da Gestão da Qualidade e Tecnologias, em reunião em 23/03/2009, em função das informações sobre a não aceitação das providências relativas ao Plano Diretor do Cecal e das necessidades emergenciais da área de criação animal para o ano de 2009, elaborou um documento, a fim de informar sobre a situação do SCRL, conforme anexo.

Atenciosamente,

Sebastião Enes Reis Couto

Chefe do Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos.

Situação atual do Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos

Senhora Vice-Diretora,

Como é de conhecimento de V.Sa., o Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos – SCRL, nos últimos anos, vem aumentando em muito sua criação de animais em função da demanda da Instituição, principalmente das linhagens de camundongos Transgênicos e Knockouts. Atualmente já contamos com 56 linhagens de camundongos, uma de rato, hamster, cobaia e uma colônia de coelhos totalizando uma produção de aproximadamente 200 mil animais/ano. Para o ano de 2009, é prevista a importação de 30 novas linhagens de camundongos e a solicitação de outras 16, e um aumento considerável de produção de coelhos. É importante salientar que a qualidade sanitária e genética desses animais é da maior importância tanto para a criação quanto para o desenvolvimento das pesquisas. São animais geneticamente modificados, alguns imunodeficiente e com período de vida curto, ou são modelos para doenças humanas crônicas e degenerativas. São animais que necessitam de cuidados especiais para sua sobrevivência, tais como alimentação, reprodução, desmame ambiente adequado quanto à temperatura e umidade, além de pessoal treinado e em número suficiente para atender as suas necessidades diferenciadas.

Os profissionais do SCRL nunca mediram esforços para atender a demanda da Instituição e sempre foram motivados pelas diversas ações e propostas realizadas para a melhoria das instalações, dos equipamentos e do ambiente de trabalho a fim de estabelecer um melhor padrão de qualidade sanitária dos animais. Consideramos para isso, a resolução do Congresso Interno com a proposta do Plano Diretor; a iniciativa do próprio Cecal para a acreditação através da AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International); o Comitê de Usuários de Animais de Laboratório (CUAL) por iniciativa da Vice-presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (VPPDT), nomeando uma comissão interna e pela consultoria do Dr. Jean-Louis Guenét, do Instituto Pasteur/Paris.

Houve ainda a proposta de Cooperação Técnica para o Melhoramento de Biotérios no Brasil e em Cuba por iniciativa conjunta de Bio-manguinhos e Cecal com apoio da VPPDT, incluindo a realização de consultoria dos técnicos do Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB); a constituição de uma comissão para atuar no processo de formulação de uma proposta para o desenvolvimento estratégico do Cecal pela portaria da Presidência número 403/2007-PR; e pela comissão de Bio-manguinhos realizando auditorias sobre a Qualidade de Fornecedor. Consideramos ainda, a demanda institucional,

avaliada pelo Cecal e as Unidades usuárias de animais de laboratório e a implementação da nova Estrutura Organizacional, aprovada pelo CD/Fiocruz. Além disso, da proposta de melhoria desta Unidade pela presidência em campanha eleitoral.

Ainda nos lembramos que em reunião do Conselho Deliberativo do Cecal, do dia 26 de julho de 2007, entendemos que somente através da adequação da infra-estrutura poderíamos continuar a atender de forma eficiente a necessidade da Instituição.

Através de um entendimento com a Vice-presidência de Desenvolvimento Institucional e Gestão do Trabalho foi encaminhado o memo nº 207/2007- Diretoria /Cecal, de 14/09/2007 e o memorando nº 131/2008 – Diretoria/Cecal de 11/06/2008, que acreditamos terem contribuído para o início dos trabalhos do Plano Diretor do Cecal.

Este trabalho foi iniciado em setembro de 2008, para que em março de 2009 fosse submetido à avaliação da presidência. Porém, no dia 20 de março de 2009, em reunião com os técnicos da Dirac que estão elaborando o projeto, recebemos a notícia que o Plano Diretor do Cecal não mais seria incluído no ano de 2009 para sua efetivação. É lamentável e preocupante que diante de tantas intervenções, nesses últimos três anos, este Serviço, responsável por aproximadamente 90% do fornecimento de animais utilizados na Fiocruz, tenha recebido para o desenvolvimento de suas atividades, apenas duas máquinas de lavar gaiolas. Para o ano de 2009, aguardamos a chegada de seis estantes ventiladas para gaiolas microisoladoras e uma máquina de lavar gaiolas.

De todas as ações referidas acima, em relação à estrutura física e adequação de ambientes propostas pelos consultores e pelo próprio Cecal, somente uma se encontra em fase de instalação, que é a Central de Água Gelada (CAG) e que, pelo andamento de suas obras, não acreditamos que tenha pleno funcionamento ainda no ano de 2009. Nós preocupamos por não podermos descartar a possibilidade de uma parada da atual CAG, já que hoje estamos trabalhando com 50% de sua capacidade. Os 45 *fancoils* necessitam de uma intervenção de recuperação urgente devido ao tempo de vida útil dos equipamentos.

O SCRL em reunião com o Serviço de Manutenção e Assistência Técnica da Gestão da Qualidade e Tecnologias em 23/03/2009, em função das informações sobre a não inclusão do Plano Diretor do Cecal, das necessidades emergenciais da área de criação animal para 2009 e com o intuito de evitar que perdas irreparáveis possam vir a ocorrer em relação às colônias de animais, priorizou algumas intervenções que devam ser realizadas imediatamente, conforme abaixo:

✓ Central de Água Gelada (CAG) – Constituir uma comissão juntamente com a fiscalização da Dirac, para avaliar o andamento da construção visando o término o mais rápido

possível, bem como acompanhar e planejar junto com a empreiteira as interferências com as instalações existentes e não incluída nesta etapa da obra. Hoje estamos com temperaturas e umidades relativas elevadíssimas nas salas dos animais, proporcionando ambientes insalubres que provocam não somente a contaminação como a morte de animais, baixa produtividade e desgaste do corpo técnico, já que as condições ambientais estão totalmente desfavoráveis à suas atividades rotineiras, devido ao atraso no cronograma da obra.

✓ Piso técnico - Com as instalações hidráulicas com tubos de ferro galvanizado, apresentando corrosão devido à agressividade do ambiente e os *fancoils* com drenos localizados sobre a laje não impermeabilizada, vem ocorrendo constantemente vazamentos de água sobre o piso, que infiltra através do teto das salas de criação de animais com alto risco de contaminação para os animais. No levantamento dos exames laboratoriais realizados no primeiro trimestre de 2009 pelo Serviço de Controle da Qualidade Animal, foi diagnosticada a presença de microorganismos patogênicos em diversas colônias de animais, o que pode comprometer a manutenção das mesmas na área bioprotégida e nos resultados das pesquisas que são utilizados.

Quanto à intervenção da manutenção, esta tem sido localizada, considerando que os serviços são de grande porte e a mesma não possui pessoal suficiente e qualificado para sua realização. Como exemplo, a instalação hidráulica, é desprovida de registro nos ramais, que implica interromper o fornecimento de água para todo prédio, por longo período. O mesmo ocorre com as outras instalações no piso técnico, como elétrica e gás.

✓ Limpeza do piso técnico – O piso técnico precisa de um programa de higienização constante, além de barreiras contra vetores. A falta destes provoca mais intervenções para substituição dos filtros do sistema de ar condicionado central, correndo o risco de contaminação das salas de criação e maior custo.

✓ Tubulação da linha de vapor – com o isolamento danificado e em diversos pontos, em processo de corrosão, principalmente nos pontos de soldas e de dentro para fora da tubulação, muitas das vezes é necessário interromper a esterilização dos materiais e insumos utilizados nas colônias de animais para conserto dos mesmos.

✓ Autoclaves - Não dispõem de um programa de certificação e calibração, conseqüentemente não estamos garantidos pela sua eficiência e biossegurança, apesar das manutenções corretivas e ajustes realizados pela unidade. Não dispomos de peças e ferramentas para realizar o *retrofit* necessário devido ao desgaste do equipamento. Por ser um projeto específico desenvolvido para o CECAL ainda temos dificuldade de aquisição de peças de reposição.

- ✓ Balanças de precisão não calibradas - Predispõem os nossos profissionais a erros constantes no fornecimento dos animais. A Unidade não dispõe de número suficiente de equipamentos e nem de pessoal qualificado para manutenção. Neste caso temos o apoio do DEMAQ/ DIRAC para realização do serviço.
- ✓ Estrutura Física - Paredes com rachaduras e portas sem vedação adequada, impedem a eficiência das barreiras sanitárias para com as colônias de animais. Constantemente são encontrados moscas, lagartixas, baratas e outros insetos nas salas dos animais que representam grande risco para a manutenção de animais livres de germes patogênicos específicos.
- ✓ Pessoal - É grave esta situação em função de proibição de novas contratações, do cancelamento dos concursos públicos, dos afastamentos por indicação médica de profissionais por motivo de doenças que são na maioria das vezes provocadas pelo local inadequado para realização de suas atividades (Setor de Higienização e Esterilização), dos movimentos repetidos e do número insuficiente de profissionais para desenvolvimento de determinadas atividades.

Diante de tantas não conformidades ficamos preocupados e nos perguntamos: Como poderemos atender as necessidades dessa Instituição e alcançar um padrão de qualidade e de satisfação pessoal?

Para isso estamos propondo algumas soluções, conforme abaixo:

- 1- A construção imediata de um prédio (sala de animais) com capacidade para 80 isoladores com fechamento rápido, para abrigar as colônias de fundação de camundongos dotado de climatização e com equipamentos que garantam eficiência de suas barreiras sanitárias. Caso não seja possível a construção desta área, em caráter emergencial, a sugestão alternativa seria realizar uma reforma em toda área do SPF, desde a sua estrutura física e de substituição de equipamentos para tornar a área qualificada ao desenvolvimento das atividades.
- 2- Criar um cronograma para adequação de todo o restante da área de criação animal para garantir o bem-estar, a biossegurança e proporcionar a Instituição uma produção de animais com a qualidade que ela necessita.

Lembramos ainda que com uma equipe de profissionais com vários anos de conhecimento na criação e manutenção de animais de laboratório, com experiência na gestão de biotério, estando envolvidos em diversas consultorias nacionais e internacionais, consideramos nossa preocupação legítima e digna, pois, não podemos negligenciar a atual situação e colocar em risco um patrimônio genético de mais de setenta diferentes linhagens de animais pelo alto custo que isso representa.

Finalizando, solicitamos que V. Sa dê conhecimento aos interessados sobre os problemas que estamos enfrentando. Considerando que caso não ocorra nenhuma intervenção

imediate no sentido melhorar as condições das instalações físicas e dos equipamentos deste Serviço, estaremos correndo sérios riscos de perdemos às colônias de animais já existentes e consideramos que será inviável a introdução de novas colônias, o que pode trazer como consequência à interrupção de programas e projetos de pesquisa desta Instituição.

Certo que compreenda a nossa preocupação com esta Unidade, a fim tornar-referência para a Fiocruz, esperamos de V.Sa um posicionamento, a fim de definirmos os procedimentos que serão adotados em relação à criação de animais, juntamente com a garantia da qualidade no atendimento as não conformidades levantadas nas auditorias e ao planejamento do serviço de manutenção da Unidade.

Atenciosamente,

Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos.

Serviço de Manutenção

Assistência Técnica da Gestão da Qualidade e Tecnologias