

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou  
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

*Condições higiênico-sanitárias, ocorrência de parvovírus e de parasitos de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros*

por

**Kelly Alves Bicalho**

Belo Horizonte

Março / 2011

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou  
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

*Condições higiênico-sanitárias, ocorrência de parvovírus e de parasitos de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros*

por

**Kelly Alves Bicalho**

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de concentração de Biologia Celular e Molecular

**Orientação:** Dr. Alvaro José Romanha

**Co-orientação:** Dr. Flávio Guimarães Fonseca

**Colaboração:** Dr. Rovilson Gilioli

Belo Horizonte

Março / 2011

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

B583c Bicalho, Kelly Alves.  
2011

Condições higiênico-sanitárias, ocorrência de parvovírus e de parasitos de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros / Kelly Alves Bicalho. – Belo Horizonte, 2011.

xx, 161 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 169 - 181

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Camundongos/parasitologia 2. Ratos/parasitologia 3. Parvovírus/patogenicidade 4. Perfis Sanitários/prevenção & controle I. Título. II. Romanha, Alvaro José (Orientação). III. Fonseca, Flávio Guimarães (Co-orientação). IV. Gilioli, Rovilson (Colaboração)

CDD – 22. ed. – 616.027 333

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

“Condições higiênico-sanitárias, ocorrência de parvovírus e de parasitos de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros”

por

Kelly Alves Bicalho

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alvaro José Romanha (Presidente)  
Prof. Dr. Jaqueline Germano de Oliveira  
Prof. Dr. Marco Antônio Silva Campos  
Prof. Dr. Giliane de Souza Trindade  
Prof. Dr. Zélia Inês Portela Lobato  
Suplente: Flávio Marcos Gomes de Araújo

Tese defendida e aprovada em: 15/03/2011

Dedicatórias

*Aos meus pais  
Altair e Elizabeth*

*Ao meu marido e à minha filha  
Magela e Gabriela*

## Agradecimentos

Aos orientadores e colaboradores.

Ao CPqRR / FIOCRUZ.

Ao CEMIB / Unicamp

À Biblioteca do CPqRR por prover acesso gratuito à informação técnico-científica e pela catalogação e normalização desta tese.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica.

Aos roedores, eutanasiados para este estudo.

## Agradecimento

Ao CPqRR/ FIOCRUZ, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro recebido para execução deste projeto.

## Sumário

	<i>Lista de figuras.....</i>	<i>xi</i>
	<i>Lista de tabelas.....</i>	<i>xv</i>
	<i>Lista de abreviaturas.....</i>	<i>xvi</i>
	<i>Resumo.....</i>	<i>xix</i>
	<i>Abstract.....</i>	<i>xx</i>
1	<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>21</i>
2	<i>OBJETIVOS.....</i>	<i>25</i>
2.1	<i>Objetivo Geral .....</i>	<i>25</i>
2.2	<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>25</i>
3	<i>REVISÃO DE LITERATURA.....</i>	<i>26</i>
3.1	<i>Animais de Laboratório em Pesquisa Biomédica.....</i>	<i>26</i>
3.2	<i>Condições Higiênico - Sanitárias em Biotérios.....</i>	<i>33</i>
3.2.1	<i>Fontes de Infecção em Biotérios.....</i>	<i>34</i>
3.2.2	<i>Quarentena.....</i>	<i>36</i>
3.3	<i>Parvovírus de Roedores.....</i>	<i>36</i>
3.3.1	<i>Taxonomia.....</i>	<i>36</i>
3.3.2	<i>Histórico.....</i>	<i>37</i>
3.3.3	<i>Epizootiologia.....</i>	<i>39</i>
3.3.4	<i>Patogênese.....</i>	<i>40</i>
3.3.5	<i>Replicação.....</i>	<i>42</i>
3.3.6	<i>Prevalência .....</i>	<i>43</i>
3.3.7	<i>Diagnóstico Sorológico.....</i>	<i>44</i>
3.3.8	<i>Diagnóstico pela Reação em Cadeia da Polimerase.....</i>	<i>46</i>
3.3.9	<i>Impacto na Pesquisa.....</i>	<i>47</i>
3.3.10	<i>Prevenção e Controle de Parvovírus de Roedores.....</i>	<i>48</i>
3.4	<i>Ecto e Endoparasitas de Roedores de Laboratório .....</i>	<i>49</i>
3.4.1	<i>Ectoparasitas.....</i>	<i>49</i>
3.4.2	<i>Helmintos.....</i>	<i>50</i>
3.4.3	<i>Protozoários.....</i>	<i>52</i>
3.4.4	<i>Prevenção e Controle de Parasitas de Roedores.....</i>	<i>54</i>



4	<i>MÉTODOS.....</i>	55
4.1	<i>Instituições e Obtenção de Informações sobre as Condições Higiênico-Sanitárias.....</i>	57
4.2	<i>Animais.....</i>	58
4.3	<i>Obtenção de Soro, Baço e Linfonodo Mesentérico.....</i>	59
4.4	<i>Vírus.....</i>	60
4.5	<i>Cultivos celulares.....</i>	60
4.5.1	<i>Cultivo Celular da Linhagem Contínua L-929.....</i>	60
4.5.2	<i>Cultivo de Células Primárias de Fibroblastos de Embriões de Ratos.....</i>	61
4.6	<i>Produção de Antígenos Virais.....</i>	61
4.7	<i>Padronização do Antígeno de MVM Utilizado para os Ensaios de IFI.....</i>	62
4.8	<i>Padronização dos Antígenos de MVM, KRV e H-1 Utilizados nos Ensaios de IHA.....</i>	62
4.9	<i>Testes de Imunofluorescência Indireta (IFI).....</i>	63
4.10	<i>Ensaios de Inibição de Hemaglutinação (IHA).....</i>	64
4.11	<i>Obtenção de Controles Positivos para os Ensaios de PCR.....</i>	65
4.11.1	<i>Inoculação Experimental de Ratos com MVM, KRV e H-1.....</i>	67
4.11.2	<i>Ligação e Transformação de Plasmídeos.....</i>	67
4.11.2.1	<i>Preparo de Células Competentes Tratadas com Cloreto de Cálcio.....</i>	68
4.11.2.2	<i>Transformação Química.....</i>	69
4.12	<i>Extração de DNA.....</i>	69
4.13	<i>Reação em Cadeia da Polimerase.....</i>	70
4.14	<i>Sequenciamento de DNA de RPV-1 e RMV-1.....</i>	72
4.15	<i>Diagnóstico de Infestações e Infecções Parasitárias.....</i>	72
4.15.1	<i>Pesquisa de Ectoparasitas.....</i>	72
4.15.2	<i>Pesquisa de Endoparasitas.....</i>	73
4.16	<i>Análises Estatísticas.....</i>	73
5	<i>RESULTADOS .....</i>	74

5.1	<i>Inoculação Experimental de Ratos Wistar com MVM, KRV e H-1.....</i>	74
5.2	<i>Transformação de <u>Escherichia coli</u> por Plasmídeos.....</i>	76
5.3	<i>Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias de Biotérios Brasileiros.....</i>	77
5.4	<i>Ocorrência de Parvovírus de Roedores em Colônias de Camundongos e Ratos de Biotérios Brasileiros.....</i>	80
5.5	<i>Sequenciamento de DNA de RPV-1 e RMV-1.....</i>	96
5.6	<i>Prevalência de Parasitas em Colônias de Camundongos e Ratos de Biotérios Brasileiros.....</i>	99
6	<i>DISCUSSÃO.....</i>	107
7	<i>CONCLUSÕES.....</i>	121
8	<i>ANEXOS.....</i>	122
8.1	<i>Questionário: Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos Biotérios de Produção.....</i>	122
8.2	Bicalho KA, Gilioli R, Martins-Filho OA, Gomes AAA, Volpini AC, Demolin DMR, Da Fonseca FG, Romanha AJ. Sanitary conditions of animal houses and occurrence of rodent parvoviruses in Brazilian mouse and rat colonies. J Am Assoc Lab Anim Sci. Submetido.....	125
8.3	Bicalho KA, Araújo FTM, Rocha RS, Carvalho OS. Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I - endo e ectoparasites. Arq Bras Med Vet Zootec. 2007;59(6):1478-84.....	160
8.4	<i>Certificados CEUA/FIOCRUZ.....</i>	167
9	<i>REFERÊNCIAS.....</i>	169

## Lista de figuras

Figura 1	Esquema representativo do genoma de parvovírus de roedores	42
Figura 2	Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus MVM, segundo Ward e Tattersall, 1982.	43
Figura 3	Fluxograma de atividades desenvolvidas para avaliação das condições higiênico- sanitárias e detecção de infecção por parvovírus de roedores e de ecto e endoparasitos em biotérios brasileiros. Os ensaios sorológicos foram realizados no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) Unicamp, Campinas. Os ensaios moleculares e de pesquisa de ecto e endoparasitas foram realizados no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ, Belo Horizonte.	56
Figura 4	Fluxograma de atividades desenvolvidas para produção de controles positivos para os ensaios de PCR para diagnóstico de parvovírus de camundongos e ratos. Os ensaios de inoculação experimental foram realizados no Centro Multidisciplinar par Investigação Biológica (CEMIB) Unicamp, Campinas. Os ensaios de ligação e transformação de plasmídeos foram realizados no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ, Belo Horizonte.	66
Figura 5	Géis de poliacrilamida 8% corados pela prata, representativos de MVM (A), KRV (B) e H-1 (C) através dos fragmentos de 71pb, 281 pb e 254pb, obtidos pela PCR, em amostras de tecidos de ratos Wistar SPF inoculados por via intraperitoneal .MM: Marcador de peso molecular de 25 pb (A) e de 100 pb (B e C). Canaleta 1: controle positivo; canaletas 2 a 8: tecidos testados: 2-fígado, 3-rim, 4-ovário, 5-timo, 6-placas de Payer, 7-baço, 8-linfonodos mesentéricos; canaleta 9: controle negativo.	76
Figura 6	Géis de poliacrilamida 8% demonstrando insertos de parvovírus: A) PAR-NS1 com fragmento de 154pb; B) inserto MVM-VP2 com fragmento de 71pb;C) inserto MPV-VP2 com fragmento de 118pb; D) insertos RPV-1-NS1 e RMV-1-VP com fragmentos de 487pb e 843pb, respectivamente. MM: Marcador de peso molecular de 25 pb (A-C) e de 100pb (D). Controles positivos e negativos foram incluídos nas reações.	77
Figura 7	Número de biotérios investigados nas regiões geográficas do Brasil: N = Norte, NE = Nordeste; SE = Sudeste, CO=Centro-Oeste; S = sul. (n=17).	78
Figura 8	Barreiras sanitárias de proteção avaliadas em biotérios de diferentes regiões do Brasil. Os biotérios foram identificados através de algarismos romanos, de acordo com distribuição nas regiões: Norte (N), Nordeste (NE), Sudeste (SE), Centro Oeste (CO) e Sul (S). Os quadrados pretos indicam a presença da barreira sanitária avaliada.	79

Figura 9	a) Frequência de biotérios brasileiros investigados distribuídos nas categorias A (09-12 barreiras sanitárias), B (05-08 barreiras sanitárias) e C (01-04 barreiras sanitárias). (b) Frequência relativa dos biotérios das categorias A (■), B (■) e C (□) distribuídos nas diferentes regiões do Brasil.	80
Figura 10	Ocorrência de infecção por parvovírus murinos em biotérios de diferentes regiões do Brasil: a) PAR= Parvovírus de roedores; b) MVM= <i>Minute virus of mice</i> ; c) MPV = <i>Mouse parvovirus</i> .	82
Figura 11	Ocorrência de infecção por parvovírus de ratos em biotérios de diferentes regiões do Brasil: a) PAR= Parvovírus de roedores; b) KRV= <i>Kilhan rat virus</i> ; c) H-1 = <i>H-1 parvovirus</i> ; d) RPV-1= <i>Rat parvovirus - 1</i> ; e) RMV-1= <i>Rat minute virus - 1</i> . NT = Não testado.	84
Figura 12	Ocorrência de infecção por parvovírus de roedores versus sistemas de barreiras sanitárias em biotérios brasileiros: a) Biotério categoria A; b) Biotério categoria B; c) Biotério categoria C. mPAR= Parvovírus de camundongo; MVM= <i>Minute virus of mice</i> ; MPV= <i>Mouse parvovirus</i> ; rPAR= Parvovírus de rato; KRV= <i>Kilhan rat virus</i> ; H-1= <i>H-1. parvovirus</i> ; RPV-1= <i>Rat parvovirus - 1</i> ; RMV-1= <i>Rat minute virus - 1</i> .	86
Figura 13	Géis de poliacrilamida 8% corados pela prata, representativos de DNA de parvovírus obtido por PCR em amostras de baço e de linfonodos mesentéricos de camundongos naturalmente infectados: A) PAR = Parvovírus de roedores, identificado pelo fragmento de 154pb, B) MPV= <i>Mouse parvovirus</i> , identificado pelo fragmento de 118pb. Marcador molecular de 25 pb.	87
Figura 14	Géis de poliacrilamida 8% corados pela prata, representativos de DNA de parvovírus obtido por PCR em amostras de baço e de linfonodos mesentéricos de camundongos (A) e de ratos (B) naturalmente infectados: A) MVM = <i>Minute virus of mice</i> , identificado pelo fragmento de 71pb. Marcador molecular de 25 pb; B) KRV= <i>Kilhan rat virus</i> , identificado pelo fragmento de 281pb. Marcador molecular de 100 pb.	87
Figura 15	Géis de poliacrilamida 8% corados pela prata, representativos de DNA de parvovírus obtido por PCR em amostras de baço e de linfonodos mesentéricos de ratos naturalmente infectados: A) RMV-1 = <i>Rat minute virus - 1</i> , identificado pelo fragmento de 843pb; B) RPV-1= <i>Rat parvovirus - 1</i> , identificado pelo fragmento de 487pb. Marcador molecular de 100 pb.	88
Figura 16	Reação de Imunofluorescência Indireta em células L-929 infectadas com vírus MVM, após 24 horas de infecção. a) Controle positivo - soro de camundongo infectado com MVM. b) Controle negativo - soro de camundongo SPF. Aumento 400 X.	88
Figura 17	Análise comparativa de métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico de infecção por parvovírus murinos: a) Parvovírus de roedores (PAR); b) MVM= <i>Minute virus of mice</i> ; c) MPV= <i>Mouse parvovirus</i> . Os gráficos ao lado de cada tabela de contingência ilustram a frequência de animais com sorologia positiva e negativa	

	para cada parvovírus estudado e a proporção de animais com PCR + ou - dentro do grupo de animais com sorologia positiva e negativa.	89
Figura 18	Análise comparativa de métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico de infecção por parvovírus de ratos: a) Parvovírus de roedores (PAR); b) KRV= <i>Kilhan rat virus</i> ; c) H-1 = <i>H-1 Parvovirus</i> . Os gráficos ao lado de cada tabela de contingência ilustram a frequência de animais com sorologia positiva e negativa para cada parvovírus estudado e a proporção de animais com PCR + ou - dentro do grupo de animais com sorologia positiva e negativa.	91
Figura 19	Ocorrência de infecção por parvovírus de roedores em biotérios da região sudeste do Brasil. a) Parvovírus murinos: PAR= Parvovírus de roedores; MVM= <i>Minute virus of mice</i> ; MPV= <i>Mouse parvovirus</i> . b) Parvovírus de ratos: PAR = Parvovírus de roedores; KRV= <i>Kilhan rat virus</i> ; H-1= <i>H-1 parvovirus</i> ; RPV-1= <i>Rat parvovirus - 1</i> ; RMV-1= <i>Rat minute virus - 1</i> .	93
Figura 20	Ocorrência de infecção por parvovírus de roedores e co-infecção em biotérios do Estado de Minas Gerais, Brasil. a) Parvovírus murinos: PAR= Parvovírus de roedores; b) MVM= <i>Minute virus of mice</i> ; MPV= <i>Mouse Parvovirus</i> . b) Parvovírus de ratos: PAR = Parvovírus de roedores; KRV= <i>Kilhan rat virus</i> ; H-1= <i>H-1 parvovirus</i> ; RPV-1= <i>Rat parvovirus -1</i> ; RMV-1= <i>Rat minute virus - 1</i> .	95
Figura 21	Alinhamento de sequências (B01_F; RPV-1_R_G06; C01_Rc; D01_Rc e RPV-1_F_G05) de DNA de parovírus de rato naturalmente infectado com RPV-1 AF036710. Os alinhamentos das sequências foram gerados através do programa Clustal X2.	97
Figura 22	Alinhamento de sequências (RMV-1_F_07 e RMV-1_F_G08) de DNA de parovírus de rato naturalmente infectado com RMV-1 AF332882. Os alinhamentos das sequências foram gerados através do programa Clustal X2.	98
Figura 23	Ácaro ectoparasita do camundongo <i>Myocoptes musculinus</i> coletado de pelos da região cervical posterior de camundongo infestado. a) larva; b) ninfa; c) adulto. Microscopia óptica comum. Aumento 100 X.	104
Figura 24	Ácaros ectoparasitas do camundongo coletados de pelos da região cervical posterior de camundongos infestados. Microscopia óptica comum. a) <i>Radfordia affinis</i> (Aumento 40 X); b) <i>Radfordia affinis</i> (Aumento 100 X); c) <i>Myobia musculi</i> (Aumento 100 X )	104
Figura 25	a) Piolho fêmea ectoparasita do rato <i>Poliplax spinulosa</i> coletado de pelos da região cervical posterior de rato infestado. Microscopia óptica comum. Aumento 100 x. b) Seguimento de fêmea do helminto endoparasita <i>Trichosomoides crassicauda</i> , coletados de bexiga urinária de rato Wistar. Microscopia óptica comum. Aumento 100 X. c) Ovos de coloração acastanhada do helminto endoparasita <i>Trichosomoides crassicauda</i> . Aumento 400 X	104
Figura 26	Ovos de endoparasitas oxiurídeos: a) <i>Syphacia obvelata</i> , ovos	

	coletados da região peri-anal de camundongo infectado com fita gomada; b) <i>Syphacia muris</i> , ovos coletados da região peri-anal de rato infectado com fita gomada . Microscopia óptica comum. Aumento 100 X. c) <i>Aspicularis tetraptera</i> , ovos obtidos de amostra de fezes de camundongo infectado. Coloração com solução de iodo forte. Microscopia óptica comum. Aumento 400 X.	105
Figura 27	a) Escólex de cestódeo adulto endoparasita <i>Hymenolepis nana</i> coletado de intestino delgado de camundongo infectado. Coloração com solução de iodo forte. Microscopia óptica comum. Aumento 100 x. b) Ovos de cestódeo endoparasita <i>Hymenolepis nana</i> obtido de camundongo infectado. Aumento 100 x	105
Figura 28	Trofozoítos de protozoário endoparasita <i>Tritrichomonas muris</i> obtidos de conteúdo fecal do intestino grosso (ceco) de camundongo infectado. a) Material a fresco. Microscopia óptica comum. Aumento 100 X. b) Coloração pela Hematoxilina férrica. Microscopia óptica comum. Aumento 400 X.	105
Figura 29	Trofozoítos de protozoário endoparasita <i>Giardia muris</i> obtidos de conteúdo duodenal de camundongo infectado: a) material a fresco (indicação pelas setas). Microscopia óptica comum. Aumento 100 X. b) Coloração pelo método de Giemsa. Microscopia óptica comum. Aumento 400 X.	106

## Lista de tabelas

Tabela 1	Ensaio de PCR para Parvovirus de roedores, MVM, MPV, KRV, H-1. RPV-1-1 e RMV-1-1.....	71
Tabela 2	Detecção de MVM, KRV e H-1 em tecidos de ratos <b>Wistar</b> inoculados pela <b>via oral</b> .....	74
Tabela 3	Detecção de MVM, KRV e H-1 em tecidos de ratos <b>Wistar</b> inoculados pela <b>via intraperitoneal</b> .....	75
Tabela 4	Detecção de MVM, KRV e H-1 em tecidos de ratos <b>Wistar</b> inoculados pela <b>via endovenosa</b> .....	75
Tabela 5	Prevalência de parasitas em colônias de camundongos em 13 biotérios investigados no Estado de Minas Gerais.....	100
Tabela 6	Prevalência de parasitas em colônias de ratos em sete biotérios investigados no Estado de Minas Gerais.....	101
Tabela 7	Prevalência de parasitas em colônias de camundongos em oito biotérios investigados em diferentes regiões do Brasil.....	102
Tabela 8	Prevalência de parasitas em colônias de ratos em seis biotérios investigados em diferentes regiões do Brasil.....	103

## Lista de abreviaturas

BSA	Bovine serum albumin
CA	Canada
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciências de Animais de Laboratório
CEMIBs	Centros Multidisciplinares de Bioterismo
CEUAs	Comissões de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
D.O.U.	Diário Oficial da União
DNA	Deoxyribonucleic acid
Eagle-MEM	Eagle's Minimal Essential Medium
ECTV	<i>Ectromelia virus</i>
ELISA	EnzymeLinked Immunosorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Fapesp	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FESBE	Federação de Sociedades de Biologia Experimental
Finep	Agência Financiadora de Estudos e Projetos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITIC	Isotiocianato de Fluoresceína
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GTA	Guia de Trânsito Animal
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
ICLAS	International Council for Laboratory Animal Science
IFI	Imunofluorescência Indireta



IHA	Inibição de Hemaglutinação
ILAR	Institute for Laboratory Animal Research
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NS	Nonstructural Protein
NS1	Nonstructural Protein 1
p/v	Peso por volume
PAR	Parvovírus de roedores
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
PVC	Polyvinylchlorine
RADIL	Research Animal Diagnostic Laboratory
RMB	Rede Mineira de Biotérios
rNS1	Recombinant Nonstructural Protein 1
rpm	Rotação por minuto
rVP2	Recombinant Major Capsid Protein 2
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SBPC	Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência
SPF	Specified Pathogen Free
TCID <sub>50</sub>	Median Tissue Culture Infections Dose
THA	Tampão de Hemaglutinação
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFSJ	Universidade Federal de São João del Rei
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UHA	Unidade Hemaglutinante

Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
USA	United States of America
v/v	Volume/volume
VAF	Virus Antibody Free
VP	Major Capsid Protein
VP2	Major Capsid Protein 2
µg	Micrograma
µl	Microlitro

#### Lista de abreviaturas dos vírus

H-1	<i>H-1 parvovirus</i>
HaPV	<i>Hamster parvovirus</i>
KRV ou RV	<i>Rat Virus ou Kilhan rat virus</i>
MOPV	<i>Mouse "Orphan" Parvovirus</i>
MPV	<i>Mouse parvovirus</i>
MVM	<i>Minute virus of mice</i>
MVMp	<i>Minute virus of mice (Prototypic)</i>
MVMi	<i>Minute virus of mice (Immunosuppressive)</i>
MVMc	<i>Minute virus of mice (Cutter)</i>
MVMm	<i>Minute virus of mice (Missouri)</i>
RMV-1	<i>Rat minute virus - 1</i>
ROPV	<i>Rat "Orphan" Parvovirus</i>
RPV-1	<i>Rat parvovirus - 1</i>

## Resumo

As condições sanitárias de 17 biotérios de instituições públicas de ensino e/ou pesquisa, produção de produtos farmacêuticos e controle de qualidade de imunobiológicos de diferentes regiões geográficas do Brasil e a ocorrência de parvovírus e de parasitos de roedores em colônias de camundongos e ratos foram avaliadas. Dados sobre barreiras sanitárias para evitar a transmissão de doenças e de programa de monitoramento de saúde animal foram obtidos através da aplicação de um questionário. Métodos sorológicos (IFI e IHA) e PCR foram utilizados para diagnóstico de parvovírus em 563 camundongos e 167 ratos. Métodos parasitológicos foram utilizados para o diagnóstico de ácaros, piolhos, helmintos e protozoários em 611 camundongos e 183 ratos. A maioria dos biotérios avaliados não possui instalações e barreiras sanitárias de proteção apropriadas para evitar a transmissão de infecções e infestações por patógenos. Maior positividade de infecção por parvovírus foi detectada pela técnica de PCR. Nas 563 amostras de camundongos a ocorrência de parvovírus por métodos sorológicos foi de 18,3% (MVM - 6,2%; MPV - 12,3%) e a positividade variou de 0,0% a 22,5% nas diferentes regiões geográficas; por PCR foi de: 49,2% (MVM - 12,3%; MPV - 43,5%) e a positividade variou de 16,7% a 100%. Nas 167 amostras de rato a ocorrência de parvovírus por métodos sorológicos foi de: 40,7% (H-1 - 1,8%; KRV - 3,0%; RPV-1/RMV-1 - 35,9%) e amostras positivas foram detectadas somente na região SE; por PCR foi de: 73,7% (H-1 - 0%; KRV - 6,0%; RMV-1 - 37,7%; RPV-1 - 54,5%) e a positividade variou de 25,0% a 100,0%. MPV e RPV-1 foram os vírus mais frequentes e detectados em todas as regiões avaliadas. Biotérios com menor número de barreiras sanitárias (Categoria C) apresentaram maior ocorrência de parvovírus. Análises de concordância demonstraram não haver concordância ou concordância fraca ( $K=0,036$  a  $0,514$ ) entre os métodos sorológicos e a PCR para detecção de infecção por parvovírus. Na região SE, parvovírus foram detectados por PCR em biotérios dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Em nove instituições públicas do Estado de Minas Gerais foi observada elevada ocorrência de infecção por parvovírus (35% a 100%), sendo detectadas co-infecções por MVM e MPV em seis biotérios (75%) e por RPV e RMV em cinco biotérios (71,4%). Alta ocorrência de parasitas foi observada nos biotérios avaliados, sendo *Shypacia spp.*, *Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris*, *Trichomonas minuta* e *Entamoeba muris* os mais frequentes nas colônias de camundongos e ratos.

## Abstract

The sanitary conditions of 17 animal facilities in public education / research, pharmaceutical production and quality control of immunobiological from different geographic regions of Brazil and the occurrence of rodent parvoviruses and parasites in mouse and rat colonies were evaluated. Data on sanitary barriers to prevent transmission of diseases and health monitoring program were obtained through the application of a standardized questionnaire. Serological methods (IFA and IHA) and PCR were used for diagnosis of parvoviruses in 563 mice and 167 rats. Parasitological methods were used for diagnosis of mites, lice, helminthes and protozoa in 611 mice and 183 rats. Most of the animal facilities evaluated do not present appropriate protective barriers to prevent transmission of infections and infestations by pathogens. Greater number of positive rodent parvoviruses infection was detected by PCR. Of the 563 mice samples tested, the occurrence of parvoviruses using serology was 18.3% (MVM - 6.2%; MPV - 12.3%) and the positivity ranged from 0.0 to 22.5% in different geographic regions; by PCR was: 49.2% (MVM - 12.3%; MPV - 43.5%) and positivity ranged from 16.7 to 100.0%. Of the 167 rat samples tested, the occurrence of rat parvoviruses by serological methods was: 40.7% (H-1 - 1.8%; KRV - 3.0%; RPV-1/RMV-1 - 35.9%) and positive samples were detected only in the Southeast region (51.5%); by PCR was: 73.7% (H-1 - 0%; KRV - 6.0%; RMV-1 - 37.7%; RPV-1 - 54.5%) and positivity ranged from 25.0 to 100.0%. MPV and RPV-1 viruses were detected more frequently and in all regions evaluated. Animal facilities with fewer sanitary barriers (Category C) had increased occurrence of parvoviruses. Analysis of agreement showed no correlation or weak correlation ( $K = 0.036$  to  $0.514$ ) between PCR and serological methods for detection of rodent parvoviruses infection. In the SE region, parvoviruses were detected by PCR in animal facilities in the State of São Paulo, Rio de Janeiro and Minas Gerais. In nine public institutions of the State of Minas Gerais was observed high occurrence of parvoviruses infection (35% to 100%) being detected co-infections with MVM and MPV in six animal facilities (75 %) and with RPV and RMV in five animal facilities (71.4%). High occurrence of parasites was observed in the animal facilities evaluated, and *Shypacia* spp. *Spironucleus muris*, *Tritrichomonas muris*, *Trichomonas minuta* and *Entamoeba muris* were the most frequent in the mouse and rat colonies.

## 1 INTRODUÇÃO

Animais de laboratório, especialmente camundongos e ratos criados e mantidos em biotérios convencionais, hospedam uma variedade de ectoparasitas, endoparasitas (Flynn, 1973; Owen, 1992; Gilioli et al., 2000; Baker, 2006) e agentes infecciosos patogênicos ou oportunistas como vírus e bactérias que podem inviabilizar experimentos, causar mortes nos animais, alterar parâmetros reprodutivos, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos e induzir alterações em resultados experimentais (Pinto et al., 1994; Mähler e Nicklas, 2004).

Os resultados experimentais podem ser significativamente influenciados pelo estado de saúde e pelas condições ambientais da criação e manutenção dos animais. Como consequência, a sensibilidade e a precisão desses resultados dependem do uso de animais de laboratório padronizados, produzidos em condições de ambiente controlado e submetidos a um programa periódico de monitoração genética, sanitária e ambiental (Weisbroth et al., 1998; Gilioli, 2003).

As condições higiênico-sanitárias de um biotério são influenciadas pela presença de barreiras sanitárias. Por definição, barreira sanitária é um sistema que compreende todo um conjunto de elementos físicos, químicos, de instalações, de procedimentos de pessoal e de uso de equipamentos que buscam estabilizar as condições ambientais das áreas restritas, minimizando a probabilidade de patógenos e outros organismos indesejáveis entrarem em contato com a população animal de áreas limpas (Couto, 2002; Carissimi e Merusse, 2009). Em virtude dessa definição, barreiras sanitárias podem ser operacionalizadas em maior ou menor complexidade dependendo do padrão sanitário definido para o biotério. É importante ressaltar que quanto maior a padronização microbiológica dos animais, maior o custo operacional do biotério (Carissimi e Merusse, 2009).

No que se refere ao padrão sanitário dos animais de laboratório, as diferentes classificações existentes ocorrem em função do tipo da microbiota a eles associada e da complexidade do sistema de barreiras sanitárias de proteção que impedem a entrada de agentes infecciosos nos biotérios, onde os animais são produzidos e mantidos. Sendo assim, animais axênicos ou “germ-free” são aqueles livres de qualquer microbiota associada; animais gnotobióticos são aqueles com microbiota associada definida; animais “specified pathogen free” (SPF) – são aqueles livres de agentes

patogênicos especificados; animais “virus antibody free” (VAF) - são aqueles livres de anticorpos contra vírus detectáveis através de técnicas sorológicas; animais convencionais controlados são aqueles mantidos com algumas barreiras de proteção e onde são realizados programas de monitoramento de parasitas e de agentes patogênicos associados a zoonoses. Por último, animais sanitariamente indefinidos ou convencionais não controlados são aqueles mantidos sem barreiras de proteção contra entrada de agentes infecciosos, podendo albergar vários agentes patogênicos e até mesmo zoonóticos (Medical Research Council, 1974, Trexler, 1987, Andrade et al., 2002; Gilioli, 2003).

Com relação aos patógenos que acometem camundongos e ratos de laboratório, existem cerca de 18 vírus que podem infectar naturalmente camundongos e cerca de 15 vírus que podem infectar naturalmente ratos, sendo que alguns são espécie específica e outros podem infectar as duas espécies (Brayton et al, 2004; Jacoby e Gartner, 2006). A maioria destes vírus causa infecção inaparente nos animais e geralmente são detectáveis por técnicas de monitoramento sorológico. Muitos deles possuem potencial de induzir ativação ou supressão de populações de linfócitos e macrófagos, podendo ocasionar os dois eventos ao mesmo tempo em diferentes locais do sistema imunológico. Porém, todas as infecções, aparentes ou inaparentes são passíveis de aumentar a variabilidade inter-individual e conseqüentemente resulta em aumento do número de animais necessários para obtenção de resultados experimentais confiáveis e reproduzíveis (Brayton et al, 2004).

Os vírus murinos são descritos como os agentes mais frequentemente envolvidos em alterações da imunomodulação de forma temporária e permanente, devido a mecanismos variados de ativação ou supressão de populações de linfócitos e macrófagos (Coutelier et al., 1990; Cray et al., 1993).

Entre os vírus mais freqüentes em colônias de camundongos e ratos de laboratório são descritos os parvovírus. Interessantemente, a prevalência destes vírus é citada tanto em biotérios convencionais, como também em biotérios mantidos sob rígidos sistemas de barreiras de proteção, com extensivos programas de monitoramento de saúde animal (Jacoby et al., 1996; Janus et al 2008; Clifford e Watson, 2008; Besselsen et al., 2008).

Parvovírus de camundongos e ratos causam infecções persistentes nos animais, modulam a resposta imune através da supressão ou ativação de populações de

linfócitos e macrófagos e, além disso, são contaminantes comuns em linhagens de células transplantadas e tumores (revisado por Besselsen et al., 2008; Clifford e Watson, 2008), causando alterações ou invalidação de resultados experimentais. Esses fatores associados à atual prevalência em roedores de laboratório provenientes de biotérios mantidos sob diferentes sistemas de barreiras de proteção oferecem boas razões para detecção e controle destes agentes.

No Brasil, dados de ocorrência de MPV em colônias de camundongos e de RPV e RMV em colônias de ratos necessitam de estudos mais abrangentes. Em um trabalho realizado por Gilioli et al. 1996, os autores relataram apenas a ocorrência de MVM em colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros, utilizando a reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) como técnica de diagnóstico. Provavelmente os dados relatados pelos referidos autores foram superestimados devido à possível ocorrência de reações cruzadas com outros parvovírus de roedores, uma vez que testes sorológicos e moleculares específicos para detecção das demais espécies de parvovírus ainda não eram disponíveis.

Em colônias de animais de laboratório convencionais, a incidência de parasitos é constante, podendo provocar várias alterações nutricionais e conseqüentemente, interferências no desenvolvimento dos animais. Ácaros e piolhos ectoparasitas (*Myobia musculi*, *Myocoptes musculinis*, *Radfordia spp*, *Poliplax spp*), helmintos (*Syphacia spp*, *Aspicularis tetraptera*, *Hymenolepis nana*) e protozoários endoparasitas (*Giardia muris*, *Spironucleus muris*) de roedores de laboratório influenciam na fisiologia e na resposta imune dos animais e, além disso, influenciam na susceptibilidade a infecção por outros agentes infecciosos (Lapchik et al., 2009; Baker, 2006; Buret et al., 1990; Hsu, 1980). Embora a maioria das infecções e infestações parasitárias sejam subclínicas, em alguns casos podem causar doença clínica severa nos animais. Animais parasitados não são recomendados para uso em pesquisa, uma vez que os efeitos adversos que causam nos animais podem influenciar a validade e reprodutibilidade de resultados experimentais em áreas como imunologia, hematologia, radibiologia, toxicologia e oncologia (Baker, 2006).

Considerando que as condições higiênico-sanitárias de biotérios estão diretamente relacionadas com a presença de barreiras sanitárias que visam impedir a entrada de patógenos como parvovírus e parasitos de roedores que podem acarretar interferências em resultados experimentais, torna-se relevante a avaliação das

condições higiênico-sanitárias e o estudo da ocorrência destes agentes no cenário do bioterismo nacional. Cabe ressaltar que a monitoração destes agentes, no contexto sanitário, constitui uma ferramenta adicional de controle de qualidade em pesquisa. Sendo assim, este estudo tem como objetivo final fornecer suporte científico para a implantação de programas de controle de qualidade sanitária em biotérios que produzam camundongos e ratos para experimentação.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar as condições higiênico-sanitárias e a ocorrência de parvovírus e de parasitos de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar um levantamento das condições higiênico-sanitárias de biotérios brasileiros que produzem camundongos e ratos, através da avaliação do uso de sistemas de barreiras de proteção.
2. Realizar o diagnóstico sorológico (IFI e IHA) de parvovirus murinos (MVM e MPV) e de parvovirus de ratos (KRV, H-1, RPV-1 e RMV-1) em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros.
3. Realizar o diagnóstico molecular (PCR) de parvovirus murinos (MVM e MPV) e de parvovirus de ratos (KRV, H-1, RPV-1 e RMV-1) em colônias de de camundongos e ratos de biotérios brasileiros.
4. Produzir controles positivos para detecção de RPV-1 e RMV-1 em colônias de ratos, pela técnica de PCR.
5. Estabelecer relações entre as condições higiênico-sanitárias e a presença dos parvovirus de camundongo e de rato.
6. Avaliar a ocorrência de ecto e endoparasitas em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros por métodos parasitológicos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Animais de Laboratório em Pesquisa Biomédica

A saúde humana e a animal estão indissolúvelmente ligadas. Os seres humanos dependem dos animais para sua nutrição, companhia, desenvolvimento tecnológico, socioeconômico e científico. Os animais de laboratório são essenciais para desenvolvimento e testes de vacinas, controle da qualidade de imunobiológicos, ensino e pesquisas de diferentes enfermidades (Kimura, 2002).

Animais de laboratório são indispensáveis como modelos experimentais para a pesquisa básica em quase todas as áreas das Ciências Biológicas e Ciências da Saúde. A aplicação desses modelos é tão diversa quanto as áreas de investigação existentes (Svendsen e Hau, 1994). Para que os resultados experimentais sejam confiáveis, a escolha do modelo animal deve ser feita em função do protocolo experimental, de modo que as espécies selecionadas tenham qualidade sanitária e genética apropriada e sejam usadas em menor número possível (Mann et al., 1991; Botting e Morrison, 1997; Gilioli, 2003).

Russel e Burck em 1959 definiram os três princípios básicos da experimentação animal ao recomendarem que esforços devem ser feitos, sempre que possível, para substituir animais por modelos não animais (Replace), para reduzir o número de animais usados em pesquisa (Reduce) e para refinar as técnicas de pesquisa de modo a minimizar o sofrimento animal (Refine), constituindo assim, os 3 Rs de Russel e Burck, que resultaram em estrito controle sobre a experimentação animal a partir da década de 1980 (Russel e Burck, 1994; Balls, 1994; 2009).

No início do século XX, camundongos e ratos começaram a ser utilizados de forma considerável como modelos animais na pesquisa biomédica devido à facilidade de acompanhamento das diferentes fases de seu desenvolvimento. Na década de 50 houve um aumento significativo do uso de animais de laboratório devido ao grande avanço da ciência, o que refletiu na melhoria da qualidade de vida da população (Paton, 1984).

O camundongo doméstico (*Mus musculus*) tornou-se o modelo mamífero de escolha em pesquisa biomédica básica e aplicada devido ao seu alto grau de adaptação em cativeiro, ciclo reprodutivo curto, alta prolificidade, manejo relativamente fácil e custo baixo quando comparado a outras espécies de grande porte (Andrade et

al., 2002). Além disso, a padronização genética de linhagens isogênicas reduz a variabilidade nos resultados experimentais influenciada pelo padrão genético (Gilioli, 2003). O consumo de milhões de camundongos por ano em diversas instituições do mundo que realizam pesquisa biomédica comprova a importância deste modelo (Svendsen e Hau, 1994; Brown et al., 2000; Hudson, 2007). A tendência atual é que o consumo seja ainda maior devido à finalização do sequenciamento do genoma do camundongo e ao desenvolvimento exponencial da ciência genômica, pois milhares de camundongos e ratos “knockouts” e transgênicos estão sendo produzidos pela engenharia genética (Knight e Abbot, 2002; Gondo, 2008).

O rato doméstico (*Rattus norvegicus*) é reconhecido como um dos mais populares e úteis animais de laboratório na ciência biomédica contemporânea. Sua utilização como modelo experimental se aplica às mais diversas áreas: gnotobiologia, nutrição, odontologia e patologia de tecidos orais, farmacologia e toxicologia, embriologia e teratologia, gerontologia, oncologia experimental, imunogenética, parasitologia experimental, estudos comportamentais e de aprendizado (Baker et al., 1980).

“O progresso da ciência em animais de laboratório requer parcerias entre os diferentes centros, universidades, faculdades, institutos e empresas privadas envolvidas ou não com ensino e pesquisa. Historicamente, com o aumento da demanda de animais de laboratório utilizados em pesquisas biológicas, surgiu uma ciência pluridisciplinar voltada para o estudo e desenvolvimento de modelos animais” (Gilioli 2003). Vários centros de animais de laboratório surgiram até a década de 50 nos Estados Unidos da América (EUA), como o Wistar Institute (1984); The Jackson Laboratory (1928); National Institutes of Health (1940); Charles River Laboratories; Institute for Laboratory Animal Research – ILAR (1952) e em 1950 foi inaugurado em Carshalton, na Inglaterra o Laboratory Animal Centre (1950) [(Lane-Petter, 1976; Bleby, 1986, Gilioli, 2003)]. Estes centros equiparam seus biotérios, intensificaram seus programas de criação e pesquisa de animais de laboratório, sendo transformados em centros de referência de animais de experimentação. Neles é mantido grande número de linhagens isogênicas e heterogênicas, produzidas sob rígido controle genético, sanitário e de ambiente. Após a década de 60, os países desenvolvidos desenvolveram uma nova mentalidade sobre sistemas de criações e os cuidados com os modelos animais de experimentação. Sendo assim, foram reduzidos os custos de produção por

perdas decorrentes de contaminações das colônias, por elevado número de animais utilizados nos ensaios e por invalidação de resultados experimentais (Beall et al., 1971; Clough e Gamble, 1976; Menendez, 1985; Dillehay et al., 1990, Gilioli, 2003).

No Brasil, Rosenkranz et al. (1978) relataram que os biotérios brasileiros não possuíam isolamento arquitetônico, nem condições higiênico-sanitárias apropriadas para manutenção de animais sanitariamente controlados, sendo considerados impróprios para fornecimento de animais para projetos de pesquisas relacionados às áreas de farmacologia e demais áreas biomédicas que requerem animais com condições de saúde certificada. Conclusões semelhantes foram relatadas por Gilioli et al. (1996; 2000), ao avaliaram através da aplicação de questionário a existência de barreiras sanitárias contra infecções e a ocorrência de parasitos e vírus em colônias de camundongos e ratos de 18 biotérios brasileiros. Os dados do questionário mostraram que a maioria dos biotérios analisados não possui um sistema de barreiras sanitárias eficientes capazes de manter animais sob condições controladas. Infestações e infecções por ecto, endoparasitas e por vírus foram generalizadas nas colônias, sendo co-infecções comuns na maioria dos biotérios analisados. Apenas um dos biotérios avaliados demonstrou possuir um conjunto de sistemas de barreiras sanitárias de proteção eficiente para produção e manutenção de animais com padrão sanitário SPF e gnotobiótico, pois parasitas, vírus e bactérias não foram detectados nas colônias de camundongos e ratos analisadas.

Esforços de membros da comunidade científica brasileira para implantação de centros de referência e adequação de biotérios para produção de animais certificados tiveram início nos anos 80 (Silva, 1994). As agências brasileiras financiadoras de projetos de pesquisas - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - estabeleceram um programa direcionado para melhorar a qualidade dos animais de laboratório produzidos no Brasil. Em 1985, a FAPESP iniciou um programa especial que sustentou a criação de Centros Multidisciplinares de Bioterismo (CEMIBs) para o desenvolvimento de tecnologia em ciência de animais de laboratório no Estado de São Paulo. Apenas o CEMIB, atualmente denominado Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), foi adiante ao projeto inicial, sendo um dos Centros de referência em criação de animais de laboratório no país, na América

Latina (Silva, 1994; Gilioli, 2003) e membro do Internacional Council for Laboratory animal Science (ICLAS) Animal Quality Network Program.

Outro centro de referência no Brasil, localizado no Estado do Rio de Janeiro, pertence à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) que a partir de 1980 iniciou os estudos para modernização das instalações do então Departamento de Biotérios, visando capacitá-lo a produzir animais SPF e convencionais controlados, que atenderia à demanda dos diversos programas e projetos da FIOCRUZ e de outras instituições científicas. Em 1998, o Biotério passou a ser considerado uma Unidade Técnica de Apoio da FIOCRUZ e passou a se chamar Cecal (Centro de Criação de Animais de Laboratório). O projeto "Modernização do Biotério para elevar a sua qualidade e produtividade" adequou às áreas de animais livres de germes patogênicos específicos, de animais convencionais, de ovinos e eqüinos, de manutenção e de utilidades (gerador de vapor) e adquiriu equipamentos indispensáveis à sua operacionalização. Atualmente o Cecal possui instalações para a criação de animais definidos do ponto de vista microbiológico e genético, nos padrões recomendados internacionalmente. Disponível em: ([www.cecal.fiocruz.br](http://www.cecal.fiocruz.br)).

Os dois centros de referência, CEMIB e CECAL, colaboram de forma expressiva para a melhoria de biotérios do Brasil e de algumas instituições internacionais, mediante a capacitação de recursos humanos, através de oferecimento de cursos e treinamento de estagiários. O CEMIB realiza ainda prestação de serviços de monitorização de saúde animal e genética de colônias de roedores e lagomorfos e assessorias para planejamento de construção e adequação de biotérios para produção e experimentação animal com sistemas de barreiras sanitárias.

Em Minas Gerais foi cadastrada em 2005, na Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a Rede Mineira de Bioterismo (RMB), a qual é composta por oito biotérios de instituições públicas do estado: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) e Fundação Ezequiel Dias (FUNED). A maioria das instituições desenvolve atividades de ensino e pesquisa, sendo que uma produz produtos farmacêuticos, soro anti-ofídico e desenvolve controle de qualidade de imunobiológicos. A RMB tem como objetivo modernizar e adequar os biotérios das

instituições participantes para que possam produzir animais de laboratório com qualidade apropriada para pesquisa científica. Além disso, esta parceria prevê troca de conhecimentos em bioterismo, intercâmbio de matrizes de animais e treinamento de recursos humanos. Para alcançar os objetivos propostos, a RMB recebe recursos da FAPEMIG dentro do Programa de Apoio às Redes do Estado. Os projetos são submetidos diretamente à FAPEMIG, como fluxo contínuo.

Um grande marco para a experimentação animal no Brasil ocorreu em 08 de outubro de 2008 quando foi sancionada pelo Presidente da República a Lei nº. 11.794, conhecida como a Lei Arouca e regulamentada em 15 de Julho de 2009 através do Decreto nº 6.899 (publicado no Diário Oficial da União n.º 134, Seção 1, p.2-5, 16/07/2009), legislação que efetivamente passa a regular a criação e o uso de animais para a pesquisa e o ensino em âmbito nacional, norteando as boas práticas do bioterismo nacional segundo recomendações internacionais. Esta lei - que tramitou no Congresso Nacional durante 13 anos - preencheu uma lacuna existente por mais de 30 anos no cenário do bioterismo nacional, pois até então não havia uma legislação específica para o uso animal no Brasil (Cardoso, 2009).

O CONCEA é a instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal, criada pela Lei Arouca, para coordenar os procedimentos de uso de animais em ensino e pesquisa científica. É um órgão integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia, com competências voltadas para a formulação de normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica, bem como estabelecimento de procedimentos para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal. O Conselho é responsável ainda pelo credenciamento das instituições que desenvolvam atividades nesta área, além de administrar o cadastro de protocolos experimentais ou pedagógicos aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados ou em andamento no país (Lapchik et al., 2009).

O CONCEA estabelece normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil é signatário; criar normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de

criação, biotérios e laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho de tais instalações.

Este conselho de caráter democrático possui representantes de sociedades protetoras de animais legalmente constituídas no Brasil e de sociedades e instituições científicas, como a Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), a Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), a Academia Brasileira de Ciências, a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), o CNPq, os ministérios da Ciência e Tecnologia, Saúde, Educação, Meio Ambiente, Agricultura e o Conselho de Reitores. Para que as instituições sejam credenciadas pelo CONCEA e possam desenvolver atividades de ensino e pesquisa, deverão criar Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs, já existentes na maior parte das instituições brasileiras), compostas por veterinários, biólogos, docentes, pesquisadores e representante de sociedade protetora de animais (Lapchik et al., 2009).

No que se refere ao macroambiente de biotérios, a ausência de controle das condições do ambiente como temperatura, umidade relativa do ar, troca do volume total de ar das salas para eliminação de gás amônia e dióxido de carbono, excesso de ruídos, presença de animais de espécies diferentes, trânsito de pessoas dentro das salas de criação e ausência de barreiras de proteção contra entrada de agentes infecciosos, predispõem as colônias de animais a estresse e a doenças. Estes fatores afetam o padrão sanitário e a saúde dos animais. Condições de ambientes e de manejo deficientes acarretam alterações nos parâmetros fisiológicos dos animais como produção de hormônios, metabolismo de drogas, níveis de enzimas plasmáticas e imunossupressão. Estas alterações são causadas pelo estresse dos animais e podem por si só, interferir em resultados experimentais ou desencadear doenças latentes de maneira não intencional (Vessel et al., 1976; Gärtner et al, 1980; Svendsen, 1994). O tamanho pequeno do camundongo o torna extremamente susceptível a mudanças nas condições ambientais. Pequenas flutuações na temperatura (2 a 3°C) podem causar modificações na sua fisiologia (Chorilli et al., 2007).

A partir do momento que se tomou conhecimento dos problemas causados por agentes infecciosos e parasitários presentes em colônias de animais de laboratório e através do início de programas de monitorização da saúde dos animais de laboratório, foi possível conhecer os agentes patogênicos presentes em biotérios existentes no Canadá (Descoteaux et al., 1977), nos EUA (Lindsey et al., 1986; Casebolt et al., 1988;

Weisbroth, 1998, Livingston e Riley, 2003; Clifford e Watson, 2008; Pritchard-Corning et al. 2009 ), no Brasil (Gilioli et al, 1996; 2000; Bicalho et al., 2007), no continente Europeu (Carthew et al., 1978; Ganon e Carthew, 1980; Kraft e Meyer, 1986; 1990; Lindsey et al., 1986; Schoondermark-van de Ven et al., 2006; Mähler e Köhl, 2009); no Japão (Kamya et al., 1979; Nakagawa et al.; 1984; Ueno et al., 1998; Itoh, 1999; Goto et al., 2009), em Taiwan (Liang, et al., 2009), na Argentina (Cagliada et al., 2010) e na Austrália (Filipovska-Naumovska et al., 2010).

As práticas da monitorização da saúde dos animais de laboratório foram especialmente influenciadas pela evolução de métodos de diagnósticos das doenças infecciosas. Com o desenvolvimento de microtécnicas para os testes sorológicos, primeiramente descritos por Takátsy em 1955 (Takátsy, 1955; 2003) e modificados para uso rotineiro por Sever em 1962, foi possível testar uma única amostra de soro de camundongo para múltiplos vírus. Desde então, vários métodos para diagnóstico parasitológico, microbiológico, testes sorológicos e moleculares vêm sendo desenvolvidos e aprimorados para detecção de parasitas, vírus e bactérias patogênicas presentes em colônias de animais de laboratório. Técnicas de estudo das reações antígenos-anticorpos desenvolvidas no passado, como Inibição de Hemaglutinação (IHA), Imunofluorescência Indireta (IFI) e ensaios imunoenzimáticos como “Enzyme - Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) permanecem como metodologias frequentes nos programas de monitorização de saúde animal para pesquisa de anticorpos em colônias de animais imunocompetentes (Hsu, 1980; Kraft e Meyer, 1986; Kraft et al., 1992, Livingston e Riley, 2003; Mähler e Köhl, 2009.)

É importante ressaltar que nenhum ensaio é completamente sensível e específico. No caso de testes sorológicos, por exemplo, a sensibilidade depende de vários fatores como a resposta imunológica do hospedeiro frente ao contato com o agente infeccioso, do perfil genético do animal, das técnicas de diagnósticos empregadas e da escola correta da amostragem dos animais a serem testados (Compton e Riley, 2001; Shek, 2000; Livingston e Riley, 2003).

Infecções virais, bacterianas e parasitárias comumente encontradas em colônias de camundongos e ratos de biotérios convencionais são de difícil prevenção e controle. O tratamento dos animais pode ser ineficiente, dispendioso e mesmo não indicado para eliminação da maioria dos agentes patogênicos que possam estar presentes nas colônias. Na história dos animais de laboratório, surtos de doenças virais causada pelo



*Ectromelia virus* (ECTV) - um poxvírus murino - e a enterite neonatal, causada pelo Vírus da hepatite do camundongo, demonstram a importância do controle de infecções virais, pois estes patógenos acarretam altos índices de mortalidade e queda da taxa de reprodução nas colônias (Rowe et al., 1963; Kraft, 1966).

A implantação de sistemas rígidos de barreiras de proteção e o desenvolvimento de equipamentos como unidades isoladoras de PVC flexível, gaiolas munidas de tampas com filtros, acomodação de animais em sistemas de fluxo de ar laminar filtrado, entre outros procedimentos, podem ser eficientes para impedir a entrada de microrganismos patogênicos nas colônias e sua subsequente disseminação (Orcutt et al., 2001).

### *3.2 Condições Higiênico - Sanitárias em Biotérios*

Conforme relatado anteriormente, condições higiênico-sanitárias de biotérios estão diretamente relacionadas com a presença de barreiras sanitárias - sistema que compreende todo um conjunto de elementos físicos, químicos, de instalações, de procedimentos de pessoal e de uso de equipamentos, visando a prevenir a entrada de organismos indesejáveis em áreas biolimpas.

Higiene é um conjunto de medidas para evitar doenças infecciosas, usando métodos de limpeza, desinfecção e esterilização, com o objetivo de conservar e promover a saúde do homem e do animal. Limpeza é um processo básico de remoção de sujidade de materiais e superfícies inanimadas, incluindo material orgânico, por meio de uma ação mecânica, com o objetivo de garantir a eficácia do processo de desinfecção e esterilização. Uma superfície que esteja aparentemente limpa pode não ser considerada livre de agentes infecciosos. Desinfecção num biotério é realizada por meio de produtos químicos como desinfetantes, ou por meios físicos como calor, ultrassom e ultravioleta. Em biotérios deve-se contar com bons desinfetantes, agente germicida que inativa virtualmente todos os microrganismos patogênicos reconhecidos, mas não necessariamente todas as formas microbianas (esporo bacterianos) em objetos inanimados. Esterilização é o processo que utiliza agentes químicos e/ou físicos para destruir todas as formas de vida microbiana e aplica-se especificamente a objetos inanimados (ko e Damy, 2009). Biotérios de criação e experimentação que requerem boas condições higiênico - sanitárias devem possuir em suas instalações no mínimo

uma autoclave de passagem, isto é, de dupla porta. A esterilização pelo vapor saturado sob pressão utilizando-se autoclave é o processo mais eficiente de destruição de microrganismos e somente não deve ser usado em material que possa ser danificado pelo calor e umidade. É importante ressaltar que a eficiência de qualquer método de esterilização deve ser comprovada periodicamente por meio de indicadores (químicos, físicos e biológicos). Sendo assim, cada ciclo de esterilização deve ser registrado em um protocolo e em frequência a ser determinada para cada biotério (Couto, 2002).

Para se estabelecer procedimentos de higiene em um biotério, visando prevenir contaminação biológica na área de criação, quatro fatores devem ser considerados: a natureza dos agentes infecciosos; as vias prováveis de entrada de tais agentes na área de criação; os meios pelos quais tais agentes podem ser destruídos ou prevenidos nas vias de entrada; e finalmente, a validação dos métodos higiênicos adotados (ko e Damy, 2009). Sendo assim, as principais barreiras sanitárias de biotérios que requerem boas condições higiênicas são: isolamento arquitetônico, ventilação e filtração do ar, desinfecção periódica das áreas, controle de acesso às áreas com fluxo de pessoas unidirecional, uso de duchas sanitizantes, uso de equipamentos de proteção individual (EPI's), esterilização de materiais e insumos por autoclave, uso de equipamentos como isoladores e racks ventiladas, estabelecimento de programas de quarentena e de monitoramento de saúde animal. Além disso, é importante monitorar a temperatura das salas, uma vez que variações bruscas de temperatura acarretam em estresse nos animais e aparecimento de doenças nas colônias (Gilioli, 2003).

### *3.2.1 Fontes de Infecção em Biotérios*

Vários grupos de microrganismos são responsáveis por infecções em animais de laboratório, nos quais na maioria das vezes sinais clínicos não são evidentes. A contaminação biológica indesejável na área de criação e na manutenção de animais pode ocorrer por várias vias e materiais. As fontes mais importantes de contaminação são animais e materiais biológicos provenientes de outros laboratórios; pessoal, insetos e roedores selvagens, materiais, insumos (ração, água, maravalha e feno) e equipamentos. O risco de contaminação nas unidades experimentais é muito maior do que nas unidades de criação, devido à necessidade de acesso de novos animais, materiais e pessoas nas instalações (ko e Damy, 2009).

Com relação aos animais, o risco maior surge quando animais infectados aparentemente saudáveis contaminam a mesma espécie ou espécie próxima (ex: rato e camundongo). Mistura de animais de diferentes procedências nas gaiolas, salas ou áreas contribuirá para a expansão das doenças parasitárias, bacterianas e virais. No que se refere a materiais biológicos como tumores transplantáveis, linhagens celulares e anticorpos monoclonais representam um alto risco de contaminação, caso tenham sido originários de animais infectados. Agentes infecciosos podem sobreviver por anos ou décadas em amostras contaminadas mantidas sob refrigeração (ko e Damy, 2009).

No que diz respeito ao pessoal, o homem pode ser considerado como um vetor mecânico de contaminação de animais de laboratório. Vários microrganismos de origem humana (ex. *Staphylococcus aureus*) podem causar doenças infecciosas ou complicações na pesquisa, particularmente em animais imunodeficientes. Microrganismos podem ser transmitidos dos homens para as colônias durante o manuseio dos animais e ainda podem ser transportados dos animais domésticos para animais de laboratório, utilizando o homem como vetor. Em colônias mantidas sob barreiras de proteção, transmissão do homem para o animal (ou vice-versa) pode ser evitada pelo uso de luvas e máscaras cirúrgicas. Além disso, há necessidade de adoção de medidas de higiene apropriadas como usos de duchas sanitizantes, uso de uniformes higienizados ou autoclavados, e procedimentos apropriados de acesso e comportamento na área de criação de animais (Gilioli, 2003; ko e Damy, 2009).

Os insetos e roedores selvagens são outra fonte de contaminação em potencial em biotérios. Insetos voadores podem ser evitados na entrada do biotério por uso de cortinas de ar, filtros ou aparelhos que os matem por eletrocussão. Porém, insetos como baratas e formigas são mais difíceis de controlar. Roedores selvagens são carregadores de fontes de infecção, e estes animais assim como aqueles que fogem das gaiolas nas salas de criação são atraídos pelas rações, camas e descartes. Esses animais ao terem acesso ao estoque de ração e maravalha, antes ou depois do fornecimento, podem contaminar os insumos principalmente com ovos ou cistos de parasitos (ko e Damy, 2009). Uma instalação adequada deve ser planejada e construída de modo que a entrada de animais indesejáveis no biotério seja evitada.

A qualidade do alimento e da água administrados na dieta dos animais são descritas como essenciais no desenvolvimento das defesas do hospedeiro. Vários componentes nutricionais da dieta influenciam na resistência ou na predisposição ao

desenvolvimento de doenças causadas por parasitas, bactérias e vírus de roedores (Gilioli, 2003). Materiais e insumos utilizados no manuseio dos animais (gaiolas, ração, água, maravalha, etc) podem estar contaminados e agir como vetores em potencial. Maravalha não autoclavada é uma das principais fontes de contaminação em biotérios. A água oferecida aos animais deve ter o mesmo padrão de qualidade de água potável para humanos, porém necessita de tratamentos (Andrade et al., 2002). Entretanto, em biotérios onde se faz esterilização de materiais e insumos com o uso de autoclave de vapor saturado sob pressão e monitoramento dos procedimentos de esterilização a entrada de infecção por essas vias é pouco provável (Ko e Damy, 2009).

### 3.2.2 Quarentena

Programas de quarentena devem ser instituídos para prevenir a introdução de agentes patogênicos dentro de colônias sanitariamente certificadas de biotérios controlados. Além disso, também devem ser aplicados nas seguintes situações: 1. aclimatação de animais a um ambiente novo visando reduzir o efeito do estresse do transporte; 2. Controle de qualidade de materiais biológicos como soros, tumores transplantáveis, linhagens celulares, hibridomas e cepas de outros microrganismos que foram produzidos ou mantidos em animais de laboratório e recebidos de outros biotérios ou laboratórios de pesquisa visando impedir a introdução de microrganismos indesejáveis no novo ambiente (Gilioli, 2003). Esses programas devem ser planejados para isolar os novos animais até que seu estado de saúde possa ser avaliado e que agentes patogênicos de interesse presentes nos mesmos possam ser detectados antes da sua introdução em colônias sanitariamente controladas. Da mesma forma, materiais biológicos devem ser triados e atestados livres de microrganismos patogênicos antes de serem introduzidos em ambiente sanitariamente controlado (Regh e Toth, 1998).

## 3.3 Parvovírus de Roedores

### 3.3.1 Taxonomia

Atualmente são descritas cinco espécies de parvovírus de roedores baseando-se em diferenças de nucleotídeos da região variável do genoma. Duas espécies infectam naturalmente camundongos de laboratório: o Vírus minuto de camundongos (*Minute virus of mice* - MVM) e o Parvovírus do camundongo (*Mouse parvovirus 1* - MPV). Cada

um contém vários isolados e doença clínica nunca foi documentada em infecções naturais (Crawford, 1966; Ball Goodrich e Johnson, 1994; Besselsen et al., 2006). Espécies de parvovírus de ratos incluem Vírus Kilhan do rato (*Kilham rat virus* - KRV ou *Rat virus* - RV); Vírus Toolan H-1 (*H-1 parvovirus* - H-1) e Parvovírus do rato (*Rat parvovirus 1* - RPV-1). O vírus minuto do rato (*Rat minute virus 1* - RMV-1), apesar de relatado em vários artigos científicos, ainda não é considerado como espécie oficial pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), sendo classificado como “espécie tentativa”. Destes, KRV é a única espécie de qual se tem relatos de causar doença clínica em ratos. Os demais são antigenicamente distintos de KRV e até o momento não foram associados com a ocorrência de doença natural em ratos (Kilham e Olivier 1959; Toolan et al., 1960; Ball Goodrich et al., 1998, Wan et al., 2002, 2006). KRV, H-1 e MVM foram isolados nas décadas de 50 e 60 e possuem estudos extensivos na literatura. Já MPV, RPV-1 e RMV-1 foram descritos a partir da década de 90 (Mickisic et al., 1993; Ball-Goodrich et al., 1994; 1998; Besselsen et al., 1996; Wan et al., 2002), e requerem estudos mais abrangentes relacionados à patogênese e epidemiologia destes agentes (Jacoby e Smith, 2003).

### 3.3.2 Histórico

MVM, KRV e Toolan H-1 foram descobertos inicialmente como contaminantes de cultura de células, assim como a maioria das espécies de parvovírus (Toolan, 1960; Kilhan, 1961; Crawford, 1966; Bonnard et al., 1976; Besselsen et al., 1996). Em ensaios de ELISA e IFI que utilizavam como antígeno a partícula viral completa para detectar estas viroses em 1980, os cientistas identificaram soros de algumas colônias de ratos e camundongos que reagiam positivamente nos testes de ELISA e IFI, mas eram uniformemente negativos em ensaios confirmatórios vírus específico, como a inibição de hemaglutinação. Estes achados revelaram que existiam outras espécies de parvovírus de camundongos e ratos, distintas de MVM, KRV e H-1. Colônias de roedores nas quais estes modelos sorológicos foram observados passaram a ser consideradas infectadas com parvovírus “órfãos” de camundongo ou rato (sigla em inglês: MOPV, ROPV), sendo que o uso da palavra coloquial “órfão” indicava ausência de sinais clínicos nos animais e incapacidade de identificar o agente etiológico definitivo (Besselsen et al., 2008). Após várias tentativas de isolamento dos vírus, Mickisic et al. (1993) isolaram MPV do tipo 1 por acaso, após co-cultivarem esplenócitos irradiados e

misturarem sobrenadante de cultura de linfócitos com linhagem celular de linfócito T CD8 citolítico. Os autores observaram efeito citopático e aglutinação de eritrócitos em algumas culturas de células L3, sugestivas de contaminação por vírus. Análises sorológicas e moleculares foram realizadas para confirmar a presença de um parvovírus distinto de MVM, denominado MPV-1. Estas descobertas propiciaram investigações de caracterização molecular, de patogênese de MPV-1 e de desenvolvimento de testes de diagnóstico específicos para este vírus. As investigações demonstraram que a região do genoma que codifica a proteína não estrutural (NS1) era altamente conservada entre todos os parvovírus de roedores (Ball-Goodrich e Johnson, 1994; Besselsen et al., 1996), explicando a reatividade cruzada em testes sorológicos quando preparações de antígeno de vírus eram utilizadas (Besselsen et al., 2008).

Atualmente são descritos quatro isolados de MVM (MVMp, MVMi, MVMc, MVMm) e três isolados de MPV (MPV-1, MPV-2 e MPV-3) circulantes entre as colônias de camundongos nos EUA (Besselsen et al., 2006). MVMp possui tropismo por fibroblastos, enquanto MVMi apresenta tropismo por linfócitos. Acredita-se que diferenças na patogênese de infecções por MVMp e MVMi possam ser devido ao tropismo celular diferente, que está relacionado com alterações nos receptores presentes na superfície do capsídeo viral. A infecção por MVMp é restrita ao trato entérico, não sendo associada a nenhuma patologia. Entretanto, MVMi produz infecção sistêmica com necrose renal papilar e alterações hematopoiéticas. Outras alterações fenotípicas, tais como a da hemaglutinina também são associadas com alterações na superfície do capsídeo. Em infecções crônicas, MPV-1 altera a resposta imune “in vivo” e “in vitro”, embora os efeitos sejam diferentes em várias linhagens de camundongos e tecidos linfóides. Muito pouco se sabe sobre os efeitos de MPV-2 e MPV-3, pois estes isolados foram recentemente descobertos e ainda não foram cultivados em cultura de células (Besselsen et al., 2006).

A descoberta de RPV-1-1 e de RMV-1-1 também foi através de reatividade sorológica cruzada. Este último foi identificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de tecido coletado de ratos ROPV soropositivos antes do seu isolamento em linhagem de células T (Wan et al., 2002; Henderson et al., 2006). RPV-1-1 foi multiplicado *in vivo* através da inoculação de células de “Fischer rat leukemia” em ratos ROPV soropositivos, seguido de isolamento “in vitro” em células 324K (Ball-Goodrich et al., 1998), sendo classificado pelos autores como RPV-1-1a. Em 2002, Wan et al.,

caracterizaram três isolados de RMV-1 (RMV-1-1a, RMV-1-2a e RMV-1-3a) de ratos naturalmente infectados através de técnicas moleculares.

O Parvovírus de Hamster (HaPV) tem sido isolado de hamsters sírios que exibem sinais clínicos similares aos induzidos por infecção experimental destes animais com MVM, KRV, H-1 e parvovírus Lulll. A identificação de MPV-3 em amostras de DNA de camundongos naturalmente infectados provaram que este isolado é geneticamente idêntico ao HaPV (Besselssen et al., 2006). Estes achados sugerem que a síndrome de doença clínica observada em hamsters é devida à transmissão cruzada de MPV-3 de camundongos para hamsters, análoga à transmissão cruzada de parvovírus de felinos para hospedeiros caninos, descrita muitas décadas atrás (revisado por Besselsen, 2008).

### 3.3.3 *Epizootiologia*

Colônias de camundongos naturalmente infectadas com MVM e MPV geralmente não são associadas com doença clínica. Até o momento não há relatos de linhagens de camundongos que sejam mais susceptíveis à infecção por MPV com presença de sinais clínicos. No entanto, a soroconversão parece ser genótipo-dependente. A linhagem C57Bl/6 é relativamente resistente a infecção experimental por MPV, requerendo doses infectivas de 10 a 100 vezes maiores, quando comparadas com camundongos das linhagens BALB/c ou CD1 (Besselsen et al., 2000; Shek et al., 2005). Alguns camundongos heterogênicos e linhagens isogênicas como SW, ICR, BALB/c e C3H são mais susceptíveis à infecção (Jacoby et al., 1995; Jacoby et al., 1996; Riley, comunicação pessoal). Já em ratos, o genótipo do hospedeiro parece não afetar a susceptibilidade à infecção ou à doença (Jacoby e Gaertner, 2006).

MVM causa uma infecção aguda e auto-limitante, ao contrário de MPV que parece causar infecção persistente em camundongos juvenis e adultos, sendo o vírus liberado intermitentemente por no mínimo seis semanas (Smith et al., 1993; Jacoby et al., 1996). A imunidade passiva declina em torno de quatro semanas e camundongos juvenis são mais susceptíveis do que camundongos adultos. Em camundongos imunocomprometidos a replicação viral ocorre no intestino, fígado e órgão linfóides. Entretanto, a proteção cruzada de imunidade humoral não ocorre nem para MVM, nem para MPV. A transmissão de parvovírus ocorre de modo mais eficiente por contato de animal para animal por exposição oronasal ou através de fômites. A rota de entrada

principal de infecções naturais por parvovírus é oral, entretanto a rota parenteral também deve ser considerada pelo fato dos animais se infectarem com materiais biológicos contaminados (Shek, 2003). Os vírus podem infectar o trato gastrointestinal e serem excretados em fezes, urina e ar expirado. Não existem evidências de que a infecção pré-natal possa ocorrer, sendo a transmissão primariamente direta, embora haja necessidade de mais estudos nesta área (Jacoby et al., 1996; Jacoby e Gaertner, 2006).

Animais infectados com parvovírus eliminam vírus por períodos relativamente longos e de forma transitória. Segundo Smith (1983) e Jacoby et al. (1991), MVM pode ser eliminado por até quatro semanas; MPV por pelo menos seis semanas e ratos inoculados com KRV na infância, por mais de 2 meses. O tempo de eliminação de RPV-1 e RMV-1 por ratos ainda não foi estudado (Clifford e Watson, 2008). Bauer e Riley (2006) detectaram eliminação fecal de MVM e MPV através da técnica de PCR, em camundongos *Sencar* obtidos de uma colônia naturalmente infectada. Em 70% dos camundongos testados, MVM foi detectado a partir de seis semanas de idade e diminuiu progressivamente até 13 semanas de idade, período no qual todos os animais foram negativos. Maiores porcentagens de animais positivos para MVM (70% a 60%) foram observadas quando estes estavam com 6 a 9 semanas de idade. Já o vírus MVP foi detectado em uma porcentagem mais elevada de animais e por um período mais longo. A partir de seis semanas de idade até 11 semanas, 50 -100% dos camundongos testados foram positivos para o MPV, sendo que 100% foram positivos com 8 a 9 semanas de idade. Após 11 semanas de idade a detecção de MPV declinou e todos os animais foram negativos com 19 semanas de idade.

KRV é excretado na urina e possivelmente pelo trato respiratório, podendo ser eliminado por três semanas quando inoculado em ratos juvenis e por 10 semanas quando inoculado em ratos com poucos dias de vida. A imunidade passiva declina em torno de quatro meses (Jacoby et al., 1996).

#### *3.3.4 Patogênese*

O fato de infecções naturais por parvovírus de roedores serem predominantemente assintomáticas sugere que as relações entre estes vírus e seus hospedeiros naturais sejam antigas e evoluídas. No entanto, roedores infectados no útero ou quando recém-nascidos são suscetíveis à doença, uma vez que possuem um



grande número de células em divisão para a replicação do vírus. Além disso, os neonatos são incapazes de se recobrem de uma infecção devido à imaturidade do sistema imunológico (Shek, 2003). Em infecções experimentais, a susceptibilidade de infecção por MVMi é camundongo genótipo dependente. Neonatos de C57Bl/6 são altamente resistentes a infecção letal, enquanto neonatos BALB/c, SWR, SJL, CBA e C3H desenvolvem infarto renal com hemorragia papilar. A linhagem C3H também pode apresentar hemorragia intestinal e acelerar involução hepática de hematopoiese (Jacoby et al., 1996). Já MPV, RPV-1 e RMV-1 não são considerados patogênicos, mesmo para neonatos e animais imunodeficientes (Shek, 2003). Lesões características de infecção por parvovírus no período pré-natal para roedores e outras espécies de animais são hipoplasia cerebelar e ataxia devido a um ataque viral seletivo com rápida proliferação da camada germinativa externa do cerebelo. O endotélio vascular e sistemas hematopoiético e linforreticular (que compreendem diversos tipos de células) proliferam e se diferenciam em adultos e em recém-nascidos e, portanto, são alvos comuns de parvovírus. Lesões e sinais clínicos da doença são devido à infecção desses tecidos (Baer e Kilhan, 1974; Tattersall e Cotemore, 1986, Toolan, 1983).

Colônias de ratos infectadas naturalmente com KRV, H-1, RPV-1 e RMV-1 são geralmente assintomáticas. Entretanto KRV ocasionalmente pode causar patogenia severa e infecções fatais em fetos e em ratos juvenis (Kilhan e Margolis 1966; Ball-godrich et al., 1998, Wan et al., 2002). Infecção pré-natal pode causar perda parcial ou completa da ninhada devido a necrose dos tecidos linfo-hematopoético e trombocitopenia, enquanto as matrizes permanecem aparentemente normais. A susceptibilidade a patogenicidade é bastante aumentada em ratos infectados no útero ou durante os primeiros dias de nascimento, podendo ser observadas lesões neurológicas, hepáticas ou vasculares nos animais (ataxia, icterícia, diarreia e morte súbita) (Jacoby et al., 1987; Gaertner et al., 1991; Jacoby et al., 2001).

Assim como MPV, ratos experimentalmente infectados com RPV-1-1a exibem infecção persistente de tecidos linfóides, além de redução de tumor transplantado quando comparados com ratos não infectados (Ball-godrich et al., 1998). Pouco se sabe ainda sobre a patogenicidade de RPV-1-1a e RMV-1-1a, mas acredita-se que estes vírus tenham efeitos imunomodulatórios in “vivo” e “in vitro” (Wan et al., 2006).

### 3.3.5 Replicação

Os parvovírus de roedores são vírus comparativamente pequenos, com cerca de 15 a 28nm. Assim como todos parvovírus, eles requerem fatores celulares expressos durante a divisão e diferenciação celular para replicação produtiva, portanto possuem predileção por células em alta atividade mitótica. São vírus bem caracterizados do ponto de vista molecular, com DNA de fita simples, não envelopados e pertencentes à família *Parvoviridae*. Possuem um genoma de cerca de cinco kilobases que codifica duas proteínas não estruturais: NS1 e NS2 e duas proteínas estruturais ou de capsídeo: VP1 e VP2. Uma terceira proteína estrutural, VP3, é produzida através do processamento proteolítico de VP2 (Fig. 1). A região do genoma que codifica as proteínas NS é bastante conservada entre as espécies, ao contrário da região que codifica proteínas VP, que é bastante variável. Diferenças de nucleotídeos na região do genoma que codifica as proteínas VP permitem a identificação de isolados de cada espécie viral (Tattersall et al., 1976; Cotmore e Tattersall, 1990; Jacoby et al., 1996; Besselsen, 2006).

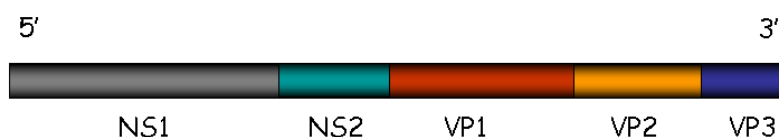


Figura 1: Esquema representativo do genoma de parvovírus de roedores

A estratégia de replicação destes vírus de DNA inicia-se com a ligação do vírus em um receptor ainda não identificado de superfície celular. O vírus é endocitado e transportado ao núcleo. A síntese do novo vírus depende do início da fase S do ciclo celular, quando a fita de DNA celular complementar é formada. Transcrição e tradução viral resultam na formação de proteínas NS, que por sua vez regulam síntese de proteína NS e VP. Uma grande replicação de DNA viral ocorre em pouco tempo. As proteínas VPs estão associadas à formação do capsídeo que empacotarão o DNA viral. Esta replicação geralmente conduz à lise celular para liberação dos novos vírus formados. Esta estratégia foi determinada através de estudos de infecção por MVM *in*

*in vitro*, segundo Ward e Tattersall (1982) e Jacoby (1996). Um esquema representativo de replicação do vírus MVM se encontra na Figura 2.

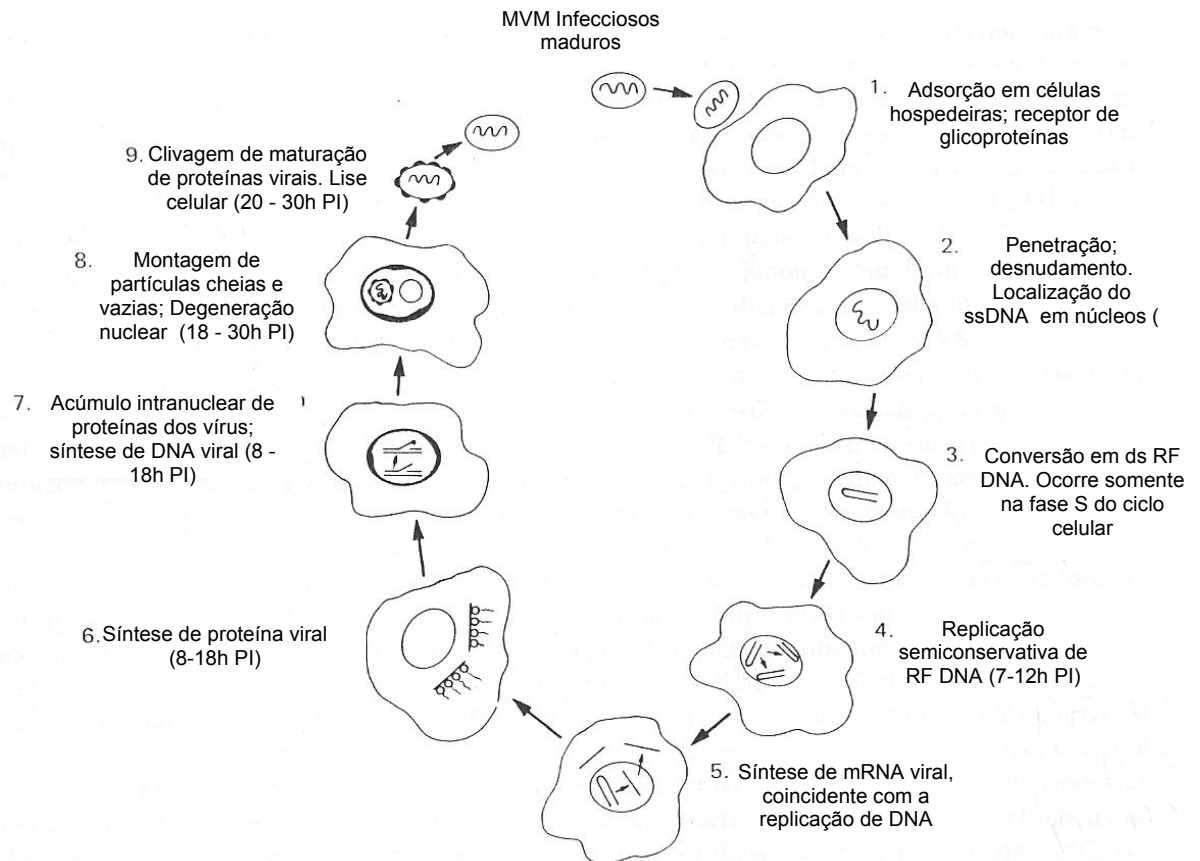


Figura 2: Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus MVM, segundo Ward e Tattersall, 1982.

### 3.3.6 Prevalência

Os parvovírus estão entre os patógenos virais mais frequentes em camundongos e ratos de laboratório. Alta prevalência é descrita tanto em biotérios convencionais, como também em biotérios mantidos sob rígidos sistemas de barreiras de proteção, com extensivos programas de monitoramento de saúde animal (Jacoby et al., 1996; Janus et al., 2008; Clifford e Watson, 2008; Besselsen et al., 2008). Estudos com dados de prevalência de parvovírus de roedores em colônias convencionais e controladas de camundongos e de ratos provenientes de instituições de pesquisa e de fontes comerciais são relatados nos EUA (Casebolt et al., 1988; Jacoby e Lindsey, 1997; Livingston e Riley, 2003; Pritchett-Corning et al., 2009), no Canadá (Descoteaux et al., 1977; Lussier e Descoteaux, 1986), na Europa (Carthew et al., 1978; Carthew e

Verstraete, 1978; Gannon e Carthew, 1980; Zener e Regnault, 2000; Schoondermark-van de Ven e Logt, 2006; Mähler e Köhl, 2009), na Austrália (Filipovska-Naumovskaet et al., 2010) em Taiwan (Liang et al., 2009), no Japão (Ueno et al. 1998; Goto et al., 2009) e na Argentina (Cagliada et al 2010). No Brasil Gilioli et al (1996) e Gilioli (2003) avaliaram colônias de camundongos e ratos de 18 biotérios brasileiros e relataram prevalência de 63,6% de KRV e H-1 e de 36,4% de MVM em colônias de ratos. Em colônias de camundongos os autores relataram prevalência de 47,1%.

É importante ressaltar que a prevalência de algumas espécies de parvovírus de roedores relatada em vários continentes durante as últimas décadas têm sido complicada de se avaliar devido ao uso de antígenos genéricos em testes sorológicos. Existe a possibilidade de que MPV tenha contribuído para seroconversões atribuídas historicamente à MVM e de que RPV-1 e/ou RMV-1 tenham contribuído para seroconversões atribuídas a MVM em ratos (Jacoby e Gaertner, 2006).

Os parvovírus apresentaram alta prevalência em colônias de camundongos enzooticamente infectadas e baixas taxas de prevalência em colônias controladas, indicando persistência e difícil erradicação. Parker et al. (1970) e Nicklas et al. (1993) atribuíram a infectividade persistente dos parvovírus ao uso de material biológico contaminado para inoculação de animais. Clifford e Watson (2008) relatam que as razões primárias para explicar a dificuldade de erradicação destes vírus são várias: eles permanecem infecciosos no ambiente por longo período uma vez que apresentam resistência a dessecação; são difíceis de serem inativados por desinfetantes comumente utilizados; são de fácil transmissão entre biotérios e são excretados por longo período pelos animais infectados. Além disso, estes vírus são difíceis de serem detectados quando comparados com outros agentes, pois camundongos e ratos adultos são menos susceptíveis à infecção e devem ser expostos a altos títulos virais para se soro converterem. Camundongos C57Bl/6 são relativamente mais resistentes a infecção quando comparados a outras linhagens (Besselsen et al., 2000, Shek, 2005).

### 3.3.7 *Diagnóstico Sorológico*

Até a década de 1980, testes sorológicos como o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e a Imunofluorescência Indireta (IFI) que utilizam virions ou células infectadas como antígenos genéricos eram utilizados para detecção de todas as espécies conhecidas naquela ocasião (MVM, KRV e H-1). O teste de Inibição da

Hemaglutinação (IHA) era empregado para distinguir diretamente KRV, H-1 e infecções por MVM (Shek, 2003; Jacoby e Gaertner, 2006). ELISA convencional e IFI, apesar de sensíveis, possuem baixa especificidade devido às reações cruzadas com anticorpos de proteínas não estruturais (NS) que são bastante conservadas entre as espécies de parvovírus. Já IHA, apesar de muito específica por reconhecer anticorpos de proteínas estruturais que são bastante divergentes entre as espécies, é pouco sensível porque detecta somente anticorpos contra a hemaglutinina viral (Kraft e Meyer, 1986; Livingston et al., 2002, Ball – Goodrich et al., 2002).

Após a descoberta dos novos parvovírus: MPV (Mickisic et al., 1993); (Ball-Goodrich e Johnson, 1994); (Besselsen et al., 2006); RPV-1; (Ball-Goodrich et al. 1998) e RMV-1 (Wan et al. 2002), o diagnóstico da infecção por parvovírus de roedores passou a depender da utilização de vários métodos complementares, incluindo métodos sorológicos e moleculares. Sendo assim, diversos testes de diagnóstico foram desenvolvidos baseados em sorologia e PCR (Jacoby e Gaertner, 2006; Brayton et al., 2004; Shek, 2003 ;Besselsen et al. 2008). Os novos parvovírus se multiplicam relativamente pouco em cultura de células ou ainda não foram cultivados “in vitro”, o que inviabiliza a produção de antígenos em larga escala para uso em testes sorológicos em laboratórios de diagnóstico. Esta dificuldade foi contornada através da produção de antígenos virais recombinantes para uso em diagnóstico sorológico (Besselsen et al., 2008). O primeiro foi o RNS-1 ELISA de MVM que pode detectar infecções causadas pelos parvovírus de ratos e de camundongos devido a região NS-1 que é altamente conservada entre as espécies (Riley et al., 1996; Jacoby e Gaertner, 2006). No entanto é possível observar resultados falso-negativos em algumas situações, pois evidências experimentais têm mostrado que a resposta de anticorpos NS1 pode estar ausente ou atrasada “vis-à-vis” à resposta de anticorpos para VP (Shek, 2003). Diante disso, um novo ensaio de ELISA foi desenvolvido para a detecção destes vírus utilizando-se antígenos rVP2 de MPV e de outros parvovírus, os quais foram expressos em *E. coli* ou células de inseto infectadas com baculovírus (Kunita et al., 2006; Dhawan et al 2004;. Ball Goodrich et al., 2002; Livingston et al., 2002). VP2 recombinante produzida por baculovírus em células de inseto infectadas se auto-arranjam em partículas “virus-like” (PVL), que exibem seletividade sorológica equivalente a partículas infecciosas do vírus. O antígeno rVP2 expresso em *E. coli* parece ser menos seletivo, provavelmente porque

parte dele é desnaturado durante o processo de extração e purificação (Shek, 2003; Dhawan et al 2004).

Ainda hoje, alguns laboratórios de diagnóstico que processam amostras de roedores empregam IHA como técnica complementar para distinguir infecção por novos parvovírus. Desta forma, o diagnóstico de infecções por MPV pode ser realizado por exclusão com base em um resultado negativo de IHA que utiliza MVM como antígeno, junto com um resultado positivo de IFI que utiliza MVM como antígeno. Do mesmo modo, soros de ratos positivos por ELISA e / ou IFA que utilizam antígenos genéricos e negativos por IHA, sugerem infecção por RPV-1 ou RMV-1 (Brayton et al., 2004; Jacoby e Gaertner, 2006).

Imunoensaios Fluorescentes Multiplexados (IFM), recentemente implementados em muitos laboratórios de diagnóstico de animais de laboratório, incluem tanto rNS1 quanto o painel de antígenos rVP2, de modo que o antígeno rNS1 é utilizado como indicação “genérica” de infecção por parvovírus de roedores e os antígenos rVP2 são usados para diferenciação viral (Besselsen et al., 2008).

Testes sorológicos são utilizados para detectar infecções endêmicas, mas são incapazes de detectar surtos agudos onde a soroconversão ainda não ocorreu (Taylor e Copley, 1994; Besselsen et al., 1995a). Além disso, não podem ser empregados em amostras de soro de animais imunodeficientes e não possuem aplicabilidade para avaliação de contaminação de material biológico (Wan et al., 2006).

### *3.3.8 Diagnóstico pela Reação em Cadeia da Polimerase*

Embora o teste sorológico indique exposição histórica ou contemporânea ao vírus, o diagnóstico molecular pode ser usado para obter evidências de infecção ativa. Os ensaios de PCR para diagnóstico de parvovírus de roedores é bastante sensível e o uso de iniciadores cada vez mais adequados tem tornado esta técnica bastante específica. A PCR tem abordagem similar à sorológica, uma vez que utiliza sequências de gene alvo NS1, que são conservadas entre todas as espécies de parvovírus de roedores ou sequências de gene VP2 que são conservadas entre os isolados de cada espécie viral, mas heterólogas para outras espécies de parvovírus de roedores. Assim, sequências NS1 são empregadas como uma indicação “genérica” de infecção por parvovírus e sequências VP2 são usadas para diferenciação viral (Besselsen et al., 2008). Esta técnica parece ser a mais apropriada para detectar parvovírus em tecido de

roedores infectados com cerca de oito a 10 semanas de idade (e.g., baço e linfonodos mesentéricos) (Besselsen et al., 1995a; Besselsen, 1998; Redig e Besselsen, 2001; Wan et al., 2006) e em fezes potencialmente infectadas depositadas nas gaiolas dos animais (Ueno et al., 1997; Kunita et al., 2006; Bauer e Riley, 2006).

Além disso, a PCR é recomendada para avaliação de animais imunodeficientes, para identificação de parvovírus em material biológico contaminado, como por exemplo, cultura de células (Chang et al., 1997; Zhan et al., 2002; Bootz et al., 2003; Blank et al., 2004, Bauer et al., 2004); para monitoramento ambiental, para liberação de animais suspeitos de quarentena e para indentificação e caracterização de isolados dos vírus e para confirmação dos resultados sorológicos (Shek, 2003; Besselsen et al., 2006, 2008).

Apesar da disponibilidade de ensaios de diagnósticos altamente sensíveis e específicos, a detecção de MPV ainda é problemática em colônias de camundongos com baixas taxas de prevalência de infecção por este vírus, pois altos títulos virais são requeridos para induzir infecção produtiva e intermitente em camundongos desmamados e adultos. Neste caso, o uso de camundongos sentinelas é recomendado (Besselsen et al., 2008; Clifford e Watson, 2008), devendo ser evitada a linhagem C57Bl/6 que é relativamente resistente a infecção por MPV (Besselsen et al, 2000; Pritchett et al., 2006).

### 3.3.9 *Impacto na Pesquisa*

Os parvovírus de camundongos e de ratos podem ter efeitos deletérios na pesquisa devido aos efeitos imunomodulatórios “in vitro” e “in vivo”, supressão de tumores transplantados, contaminação de culturas de células e de tecidos originários de camundongos e de ratos. Estes vírus podem contaminar cultura de células BHK 21, cultura de linfócitos T citolíticos, cultura de esplenócitos, clones de células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> estimuladas com IL-2, inibindo a proliferação e causando morte celular (McKisic et al., 1993; Wan et al., 2006). MPV-1 ocorre de forma predominante e persistente em órgãos linfóides, células endoteliais e de Kupffer (Smith et al., 1993; Shek et al., 1998). Em infecções crônicas, este vírus altera a resposta imune “in vivo”, porém os efeitos são diferentes em várias linhagens de camundongos e em tecidos linfóides (Besselsen, 2008). KRV pode alterar atividades linfocíticas e produção de citocinas (Wan et al., 2006). Além disso, existe grande potencial dos parvovírus serem transmitidos entre as

instituições de pesquisa devido ao alto grau de estabilidade destes agentes no ambiente (Harris et al., 1974 e Yang et al., 1995) e devido ao seu potencial de induzir infecção persistente em camundongos e ratos e em linhagens celulares (Fikrig e Tattersall, 1992; Jacoby et. al., 1996; Ball-Goodrich, 1998; Wan et al., 2006). Estes fatores associados à dificuldade de erradicação destas viroses em colônias de camundongos e ratos de laboratório tornam os parvovírus de roedores um dos agentes infecciosos mais problemáticos encontrados atualmente em biotérios.

### *3.3.10 Prevenção e Controle de Parvovírus de Roedores*

“A prevenção de contaminação de colônias por parvovírus pode ser realizada por meio do controle dos fatores de risco associados a prováveis fontes de infecção, incluindo roedores selvagens ou importados de outras instituições, materiais e insumos, pessoas e materiais biológicos. As instalações dos animais devem ser construídas e mantidas de modo que seja evitada a entrada de roedores selvagens e um programa de controle de pragas deve ser instituído por meio de contratação de empresa especializada. Considerando que os parvovírus são bastante estáveis no ambiente, a desinfecção de materiais é importante a fim de evitar infecção acidental. Materiais e insumos utilizados na área de criação e manutenção dos animais devem ser esterilizados por autoclave. A esterilização por irradiação gama não é muito eficaz na inativação de parvovírus. Superfícies externas devem ser desinfetadas com produtos químicos oxidantes eficazes contra parvovírus, por exemplo, hipoclorito de sódio (água sanitária), dióxido de cloro e peróxidos. Associação de desinfetantes oxidantes com sujeira e matéria orgânica, ou biofilme protegem os microorganismos da ação dos desinfetantes. Portanto, é fundamental que as superfícies sujas sejam higienizadas antes de serem desinfetadas, a fim de reduzir a demanda química e garantir que os microorganismos sejam adequadamente expostos ao desinfetante” (Shek, 2003).

Parvovírus de roedores são contaminantes relativamente comuns de cultura de células de origem animal, principalmente linfócitos e tumores transplantáveis. Portanto, um risco potencial de infecção acidental é através da inoculação de roedores com materiais biológicos que não foram triados para vírus estranhos. Sendo assim, materiais biológicos devem ser atestados livres de microorganismos patogênicos antes



de serem introduzidos em ambiente sanitariamente controlado (Regh e Toth, 1998; Shek, 2003; Jacob e Gaertner, 2006).

A forma mais eficaz de erradicar parvovírus de biotérios contaminados é através da eliminação de colônias contaminadas e repovoamento com animais SPF ou descendentes de matrizes contaminadas rederivados por cesariana asséptica ou pela técnica de transferência de embriões. Porém, antes do repovoamento, cuidadosa sanitização ambiental deve ser realizada por meio de procedimentos de desinfecção apropriados. Vale ressaltar que é contraproducente despovoar e iniciar uma nova colônia SPF sem antes investigar as fontes de infecção e fazer as modificações necessárias nas instalações e nas rotinas operacionais do biotério para evitar a reincidência (Shek, 2003; Brayton et al., 2004; Jacob e Gaertner, 2006).

### 3.4 *Ecto e Endoparasitas de Roedores de Laboratório*

#### 3.4.1 *Ectoparasitas*

Os ectoparasitas são patógenos frequentemente encontrados em colônias de camundongos e ratos convencionais. Dentre eles de destacam ácaros e piolhos. Os ectoparasitas mais frequentes descritos em colônias de roedores são *Myocoptes musculus*, *Myobia musculi*, *Radfordia spp.* e o piolho *Poliplax spinulosa*, que é freqüente em colônias de ratos convencionais (Owen, 1992; Gilioli, 2000; Baker, 2006; Bicalho, et al., 2007). A transmissão de ectoparasitas ocorre por contato direto e há evidências que filhotes de roedores possam adquirir a infestação pelo “focinho” durante a amamentação. Pesquisadores e técnicos que manipulam a colônia podem veicular o parasitismo através de materiais e vestuário contaminados. O ciclo de vida de ácaros e piolhos inclui os estágios de ovo, larva, ninfa e adulto. Geralmente os ovos se encontram aderidos ao pelo dos animais e eclodem em torno de cinco a seis dias (piolhos) ou cinco a sete dias (ácaros) (Weisbroth, 1982; Owen, 1992; Baker, 2006).

Roedores de laboratório infestados por ácaros desenvolvem infecções subclínicas. Sinais clínicos podem ser evidenciados em infecções maciças como prurido, alopecia e eritema na região cervical e dorsal. Em alguns casos pode ser observado hiperqueratose e dermatite ulcerativa nas regiões do dorso e do pescoço. Roedores infestados com piolhos apresentam como principais características anemia e

prurido. Em infestações maciças, os animais desenvolvem alopecia, perda de peso e lesões cutâneas inflamatórias. O diagnóstico é baseado no exame direto de pelos retirados principalmente da região cervical, através de microscopia ótica comum (Weisbroth, 1982; Owen, 1992; Baker, 2006).

#### 3.4.2 *Helmintos*

Os helmintos que parasitam roedores de laboratório pertencem à classe Nematoda e Cestoda. Com relação aos endoparasitas nematódeos, os mais prevalentes em colônias de roedores convencionais são *Syphacia* spp, *Aspiculuris tetraptera* e *Trichosomoides crassicauda*. Já os cestódeos descritos em colônias de roedores são principalmente *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*, dentre outros. Em geral ocorrem no ceco e colon de roedores e maioria deles induz infecção subclínica, embora alguns sinais clínicos evidentes possam ser observados em alguns animais (Wescott, 1982; Baker, 2006; Gilioli, 2000; Pritchett; 2007)

Com relação à transmissão destes helmintos, no caso do endoparasita oxiurídeo *Syphacia* spp, a autoinfecção de animais ocorre pela ingestão de ovos eliminados na região perianal e nas fezes, através do “grooming”, água e ração contaminados. No caso de *T. crassicauda*, endoparasito que se aloja na bexiga urinária de ratos, a transmissão pode ocorrer através da ingestão de ovos embrionados eliminados na urina. Já os cestódeos, ingestão de artrópodos infectados com larvas cisticercóides é possível entre os animais. No caso do cestódeo *H. nana*, a transmissão pode ser direta ou pela ingestão de ovos das fezes ou por autoinfecção (Wescott, 1982; Baker, 2006; Pritchett, 2007).

Com relação à *Syphacia* spp, o ciclo de vida é direto e completa-se em 11 a 15 dias. Os ovos são depositados na região perianal e tornam-se infectantes em torno de cinco a 24 horas. Quando ingeridos por hospedeiros susceptíveis eclodem e liberam as larvas no intestino delgado, as quais alcançam o ceco em 24 horas e tornam-se maduras em quatro a sete dias. Com relação à *A. tetraptera*, o ciclo de vida difere dos outros oxiurídeos porque os ovos não são encontrados na região perianal e são eliminados diretamente nas fezes. Tornam-se infectantes após seis a sete dias e quando ingeridos por hospedeiros susceptíveis, eclodem as larvas que migram para as criptas de Lieberkühn, tornando-se maduras no 16º dia. As fêmeas maduras habitam o intestino grosso, onde sobrevivem por 45 a 50 dias ovipondo sem abandono do

hospedeiro. A prevalência de oxiurídeos em colônias de roedores ocorre dentre outros aspectos, em função da idade, sexo e estado imunológico do hospedeiro. As infecções são subclínicas, apesar de larvas de *A. tetraptera* penetrarem nas criptas de Lieberkühn durante o estágio de desenvolvimento. Em infecções maciças, estes helmintos podem provocar redução na taxa de crescimento, prolapso retal e diarreia, principalmente em animais imunodeficientes submetidos a condições de estresse e fêmeas prenhas (Wescott, 1982; Owen, 1992; Baker, 2006; Pritchett; 2007).

Com relação ao nematódeo *T. crassicauda*, este não é considerado patogênico e em geral, as infecções são subclínicas. Em infecções experimentais pode-se constatar aumento no número de eosinófilos, formação de cálculo urinário e tumor de bexiga, além de alteração da permeabilidade e integridade do epitélio da bexiga urinária. Parasitas mortos podem ser calcificados, induzindo formação de cálculo renal. A migração de larvas através dos pulmões pode agravar a incidência de doença respiratória crônica, evidenciando granulomas multifocais e eosinofilia. Animais infectados com *T. crassicauda* não são recomendados para pesquisas nas áreas de toxicologia e de estudos histopatológicos e de carcinogênese da bexiga urinária (Zubaidy e Majeed, 1981).

Com relação ao cestódeo *Hymenolepis spp*, o ciclo de vida inclui ovos e estágio larval (cisticercóide). No caso de *H. nana*, o ciclo pode ser direto ou indireto. No ciclo direto, os ovos são eliminados das proglotes grávidas e uma vez ingeridos pelo hospedeiro definitivo, eclodem no intestino delgado. Desenvolvem-se em estágio cisticercóide, emergem para a luz intestinal e atingem o estágio adulto em menos de duas semanas. No ciclo indireto, alguns artrópodos atuam como hospedeiros intermediários, principalmente coleópteros, pulgas e baratas. No artrópodo, os ovos desenvolvem-se em cisticercóides após 10 dias, a infecção do hospedeiro definitivo pode ocorrer por ingestão do hospedeiro infectado. O ciclo de *H. diminuta* é obrigatoriamente indireto, exigindo a presença de um inseto como hospedeiro intermediário. Os ovos são ingeridos por este hospedeiro, eclodem e desenvolvem-se em larvas cisticercóides em aproximadamente uma semana. A larva cisticercóide é liberada, o escólex evagina-e e alcança a mucosa intestinal, onde desenvolve em verme adulto (Wescott, 1982; Baker, 2006; Pritchett; 2007).

*Hymenolepis spp* habitam o intestino delgado e aderem -se à mucosa do jejuno e íleo através do escólex, induzindo aumento na produção de muco. A presença de sinais

clínicos depende do número de parasitas. Em roedores jovens com carga parasitária alta, ocorre atraso no crescimento, perda de peso e oclusão intestinal, podendo induzir os animais à morte. Em infecções moderadas, os animais apresentam enterite catarral com pequena resposta inflamatória. Estágios larvais que alçam o fígado, pulmões e linfonodos mesentéricos, induzem a uma resposta inflamatória granulomatosa. Em animais atímicos, a infecção por *H. nana* pode ser severa, caracterizada por edema duodenal, esplenomegalia e aumento das placas de Payer. Roedores de laboratório infectados com *H. nana* e *H. diminuta* não são recomendados para pesquisas que envolvem avaliações imunológicas, hematologia, nutrição e estudos neuroendocrinológicos. Há relatos que *H. nana* pode desregular funções de células T e suprimir a resposta imune humoral. Além disso, este parasito pode infectar acidentalmente técnicos e pesquisadores que manipulam animais. Portanto, medidas de biossegurança devem ser adotadas (Owen, 1992; Baker, 2006; Pritchett; 2007).

O diagnóstico de nematódeos e cestódeos pode ser realizado por diferentes métodos, os quais são baseados na demonstração de ovos e na identificação de larvas e de vermes adultos, de acordo com cada espécie (Gilioli, 2000, 2003; Baker, 2006; Pritchett; 2007).

### 3.4.3 Protozoários

Os protozoários representam um dos grupos de endoparasitas mais relevantes em colônias de camundongos e ratos de laboratório. Os mais comumente relatados são *Tritrichomonas muris*, *Trichomonas minuta*, *Entamoeba muris*, *Giardia muris* e *Spironucleus muris*, sendo os dois últimos relacionados à interferências em resultados experimentais em diversas áreas da pesquisa biomédica (Hsu, 1982; Gilioli, 2000; Wasson, 2007).

A transmissão em geral ocorre por ingestão de formas infectantes como cistos. *T. muris* caracteriza-se por apresentar formas de resistência denominadas pseudocistos, que se diferenciam durante a passagem pelo cólon. São classificados em quatro diferentes estágios de acordo com a forma, tamanho, infectividade e aparência na microscopia de fase. Pseudocistos frescos representam a forma infectante e são esféricos e brilhantes, enquanto pseudocistos velhos, não infectantes, são escuros e maiores em tamanho. O ciclo de vida dos protozoários em geral é direto. Os trofozoítas multiplicam-se por fissão binária longitudinal e formam cistos ou pseudocistos

resistentes e infectantes, os quais são passados para as fezes. Uma vez ingeridos por um novo hospedeiro, sofrem desencistamento no trato intestinal (Hsu, 1982; Wasson, 2007).

Com relação à patogenia, *T. muris*, *T. minuta* e *E. muris* são comensais, portanto não patogênicos e não há relato de lesões em hospedeiros infectados. *G. muris* pode infectar animais jovens e adultos. Animais atímicos, timectomizados, imunocomprometidos e tratados com dietas hipoproteicas, apresentam altos níveis de mortalidade e morbidade. Em animais imunocomprometidos, a infecção resulta em diarreia e enterite crônica. Já em animais imunocompetentes, a infecção geralmente é assintomática. Porém alguns animais podem apresentar sinais clínicos como perda de peso, retardo no crescimento, pelos ásperos, letargia e abdômen distendido. Não apresentam diarreia, mas na necrópsia demonstram sinais de enterite com muco amarelado no intestino delgado (Owen, 1992). Estudos histopatológicos de animais infectados com *G. muris*, revelam presença de trofozoítas na luz intestinal, redução no tamanho das vilosidades, aumento da população de linfócitos intraepiteliais, mastócitos e células inflamatórias. No que se refere à patogenia relacionada à infecção por *S. muris*, este parasita é responsável por induzir imunodepressão em camundongos e ratos devido à redução da atividade fagocitária (Owen, 1992; Hsu, 1982; Wasson, 2007). Fatores relacionados ao genótipo do hospedeiro e da cepa do parasita induzem doença com diferentes níveis de gravidade. Animais jovens (duas a seis semanas de idade), submetidos a estresse e imunocomprometidos são mais susceptíveis a doença. Animais atímicos, independente da idade, desenvolvem enterite crônica e severa com perda de peso. Já em hospedeiros imunocompetentes geralmente a infecção é subclínica. Porém alguns animais podem apresentar sinais clínicos como diarreia, desidratação, perda de peso, pelos arrepiados, postura arqueada e distensão abdominal. Camundongos imunocompetentes são mais susceptíveis à infecção experimental entre 8 a 10 semanas de idade, enquanto que ratos são mais susceptíveis até 12 semanas de idade (Owen, 1992; Hsu, 1982; Wasson, 2007).

No que se refere ao diagnóstico de protozoários, a demonstração de cistos nas fezes é recomendada no exame a fresco. Durante os procedimentos da necrópsia, os trofozoítas são encontrados na luz do intestino e do duodeno de animais infectados e podem ser evidenciados em microscopia ótica com aumentos de 100 ou 400 vezes. Além da identificação morfológica, as espécies podem ser diferenciadas pelo tipo de

locomoção, uma vez que *T. muris* apresenta membrana ondulante, *S. muris* apresenta movimento rápido e retilíneo e *G. muris* apresenta movimento em rotação. O uso de métodos de coloração como Giemsa, Lugol e Hematoxilina férrica auxiliam na identificação de cistos e trofozoítos (Owen, 1992, Gilioli, 2003).

#### *3.4.4 Prevenção e Controle de Parasitas de Roedores*

Com o avanço em ciência de animais de laboratório, muitas doenças parasitárias em colônias de camundongos e ratos de laboratório diminuíram ou foram erradicadas, principalmente aquelas doenças que requerem artropódes como vetor ou hospedeiro intermediário. Drogas antiparasitárias têm sido utilizadas para controle e erradicação de parasitas e as técnicas de cesariana asséptica e transferência de embriões têm auxiliado na obtenção de animais sanitariamente definidos (Gilioli, 2003, Jacob e Gaertner, 2006).

#### 4 MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA FIOCRUZ, N<sup>os</sup> L-004/06 e L-031/07 (*Anexo 8.4*) e todos os procedimentos que envolveram o uso de animais seguiram os Princípios Éticos no Uso de Animais de Laboratório disponibilizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório – National Research Council (2003). Além disso, houve comprometimento com o Princípio dos 3R's (Replacement, Reduction, Refinement), sendo reduzido o sofrimento e o número de animais no projeto, sempre que possível.

O estudo foi realizado através de uma colaboração interinstitucional entre o Centro de Pesquisas René Rachou/ Fiocruz e a Universidade de Campinas – Unicamp. Desta forma, os experimentos foram conduzidos utilizando-se instalações do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular e do Biotério de Experimentação do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ, em Belo Horizonte e instalações do Laboratório de Controle de Qualidade Animal do Centro Multidisciplinar par Investigação Biológica (CEMIB), Unicamp, em Campinas.

Um fluxograma das atividades desenvolvidas está demonstrado na Figura 3.

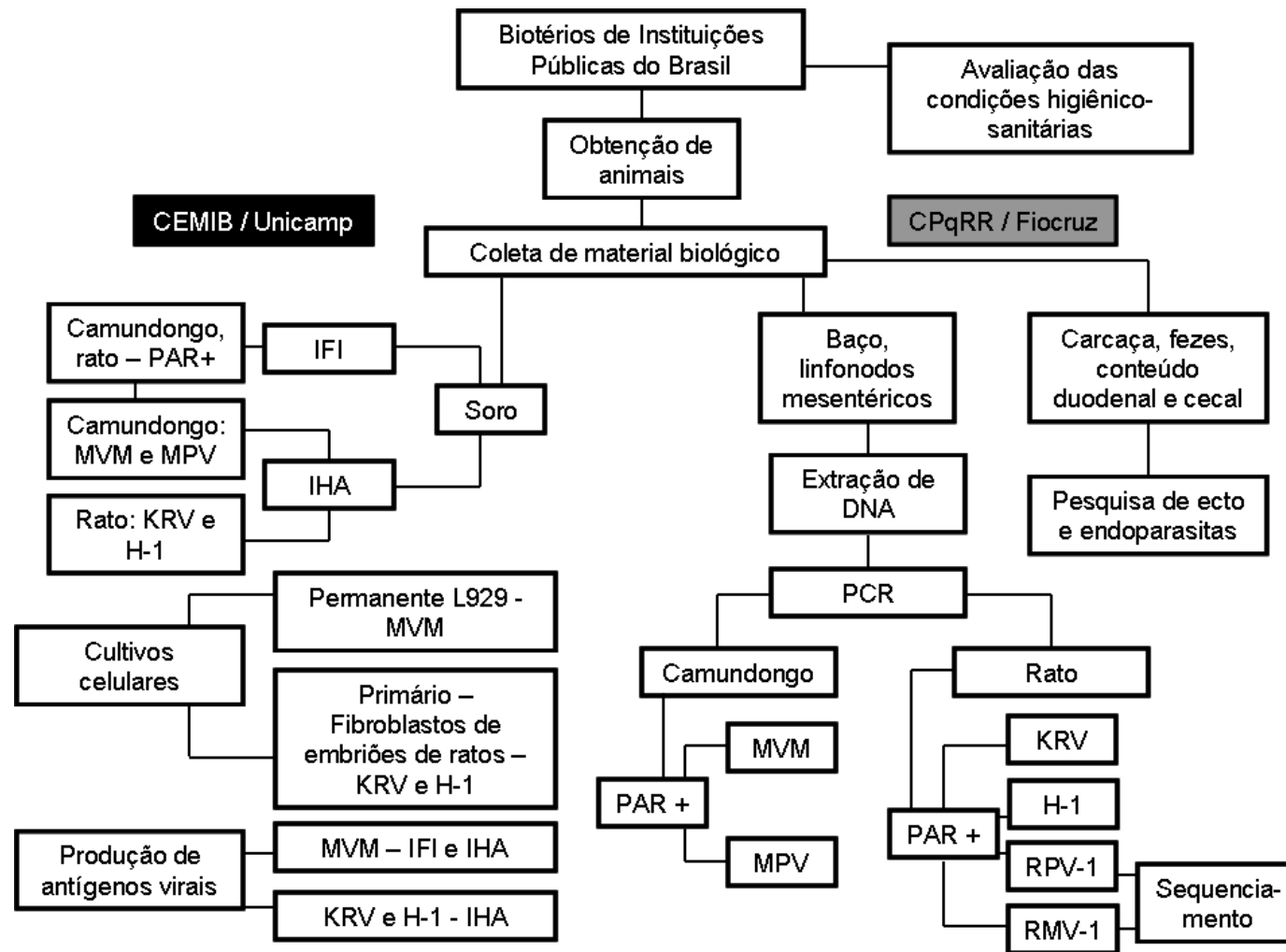


Figura 3: Fluxograma de atividades desenvolvidas para avaliação das condições higiênico- sanitárias e detecção de infecção por parvovírus de roedores e de ecto e endoparasitos em biotérios do brasileiros. Os ensaios sorológicos foram realizados no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) Unicamp, Campinas. Os ensaios moleculares e de pesquisa de ecto e endo parasitas foram realizados no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ, Belo Horizonte.



#### *4.1 Instituições e Obtenção de Informações sobre as Condições Higiênico-Sanitárias*

Para estudo da ocorrência dos parvovírus de roedores foram avaliados 17 biotérios de 17 instituições públicas do Brasil, sendo nove localizadas no Estado de Minas Gerais e oito em diferentes regiões do país. Das instituições de Minas Gerais, oito compõem a Rede Mineira de Bioterismo e os biotérios foram visitados no local. Com relação às demais instituições, elas se localizam nos Estados do Pará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás e Santa Catarina, sendo que no Estado de São Paulo foram avaliados dois biotérios de duas instituições. A maioria das instituições desenvolve atividades de ensino e/ou pesquisa e duas, além disso, produzem produtos farmacêuticos, vacinas e desenvolvem controle de qualidade de imunobiológicos. Uma instituição ainda produz soros antiofídicos. Com relação à Fundação Oswaldo Cruz, quatro biotérios foram avaliados: Biotério do Centro de Pesquisa Ageu Magalhães, situado em Recife, Pernambuco; Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, situado em Salvador, Bahia; Biotério do Centro de Pesquisa René Rachou, situado em Belo Horizonte, Minas Gerais e o Centro de Criação de Animais de Laboratórios/ CECAL, situado no Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. O período do estudo compreendeu outubro de 2008 a maio de 2010 e os biotérios foram identificados através de algarismos romanos.

Para o estudo de ocorrência de ecto e endoparasitas foram avaliados 21 biotérios de 17 instituições públicas do Brasil, sendo nove localizadas no Estado de Minas Gerais e oito nas diferentes regiões do país previamente descritas. Em Minas Gerais duas instituições tiveram mais de um biotério avaliado, sendo quatro biotérios avaliados em uma e dois em outra. Neste estado, o período do estudo compreendeu novembro de 2004 a abril de 2005 e os biotérios foram visitados no local. Nos demais estados o período do estudo compreendeu outubro de 2008 a maio de 2010. Os biotérios deste estudo foram identificados através de letras do alfabeto.

Algumas instituições tinham finalidade de criar camundongos e ratos de laboratório com elevada qualidade sanitária para atender às demandas de pesquisa / ensino e de controle de imunobiológicos, porém grande maioria delas possuía biotérios convencionais.

Um questionário (*Anexo 8.1*) foi entregue aos coordenadores dos biotérios de cada uma das instituições com objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias dos mesmos. O objetivo principal deste questionário foi reunir informações sobre a

existência de sistemas de barreiras de proteção (infra-estrutura, equipamentos e procedimentos padrões) contra a entrada de agentes infecciosos e parasitários. Os principais itens avaliados foram: instalações adequadas com isolamento arquitetônico; fluxo unidirecional; filtragem de ar e sistema de ventilação com climatização central; frequência de desinfecção das áreas de criação dos animais; controle de temperatura; equipamentos como autoclave de dupla porta, estantes, racks ventilados e isoladores; desinfecção e / ou esterilização de materiais e insumos (gaiolas, bebedouros, ração, água, maravalha e uniformes); uso de duchas sanitizantes; uso de vestuário adequado (uniforme, gorro, máscara, luvas e pantufas) para entrada dos técnicos na área limpa; presença de programa de quarentena e de monitorização de saúde animal. Os itens avaliados no questionário foram baseados nos critérios estabelecidos pelo Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (NRC, 2003), exceto o programa de monitorização de saúde animal que foi baseado nas recomendações internacionais do International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) e da Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

#### 4.2 Animais

Com relação ao número de animais avaliados (A), o tamanho da amostra foi determinado pela fórmula estatística:  $A = \alpha \log\text{-}\log / (1-P)$ , sendo: A = tamanho da amostra, P = percentagem de animais infectados na colônia, e  $\alpha$  = limite de confiança. Considerando que  $P = 0,25$  e  $\alpha = 0,05$ :  $A = 12$  animais / criação de sala / colônia, ou seja, 95% de probabilidade de detectar pelo menos um animal positivo na amostra avaliada (ILAR, 1976; Nicklas, 2002). Os coordenadores dos biotérios foram instruídos para que camundongos e ratos de cada linhagem, sendo seis machos e seis fêmeas, fossem escolhidos aleatoriamente de cada sala de criação, de forma a constituírem grupos de 12 animais. Assim, para estudo da prevalência dos parvovírus foram avaliados 730 animais, sendo 563 camundongos (273 machos e 290 fêmeas) e 167 ratos (82 machos e 85 fêmeas), provenientes de 16 colônias de camundongos e de 12 colônias de ratos. A maioria dos camundongos e ratos ( $n = 708$ ) possuía idade entre oito a 10 semanas. Apenas 22 camundongos possuíam idade entre 20 semanas a um ano e foram incluídos no estudo pelo fato de terem sido disponibilizados no momento da coleta. Quanto aos camundongos *Swiss Webster* e linhagens de camundongos, foram analisados 192 *Swiss Webster*, 130 C57BL/6, 170 BALB/c e 71 animais de

diferentes linhagens, incluindo nocautes. Quanto aos ratos foram analisados 131 Wistar, 12 Holtzman, 13 SHR e 11 McCoy.

Para o estudo de prevalência de endo e ectoparasitos foram avaliados 794 animais, sendo 611 camundongos (310 machos e 301 fêmeas) e 183 ratos (92 machos e 91 fêmeas), provenientes de 21 colônias de camundongos e de 13 colônias de ratos de diferentes “stocks” heterogênicos e linhagens isogênicas. A maioria dos camundongos e ratos possuía idade entre 4 a 10 semanas (n=760) e 34 animais possuíam entre 13 semanas a um ano de idade e foram incluídos no estudo pelo fato de terem sido disponibilizados no momento da coleta.

Os animais de cada biotério foram separados por linhagem e sexo e de acordo com este critério foram transportados em caixas de policarbonato contendo top filtros, apropriadas para transporte de roedores de laboratório. Dentro do Estado de Minas Gerais, os animais foram transportados por via terrestre e nos demais estados por via aérea. Guia de Trânsito Animal (GTA) foi providenciada junto ao órgão competente ou médico veterinário licenciado para todos os transportes. No ato de recebimento dos animais no biotério de destino, os roedores foram inspecionados para avaliação do estado geral de saúde e presença de lesões aparentes. Em seguida foram identificados, cadastrados em formulário apropriado, alojados em microisoladores abastecidos com ração padronizada peletizada e água autoclavadas e mantidos na sala de quarentena do Biotério de Experimentação do CPqRR, de ambiente controlado com fotoperíodo de 12:12 h claro / escuro, até o momento da coleta de material biológico, necrópsia e exames parasitológicos, que foram realizados dentro de 48 horas.

#### *4.3 Obtenção de Soro, Baço e Linfonodo Mesentérico*

Os animais recebidos foram submetidos à narcose induzida pela inalação de dióxido de carbono em câmara apropriada, sendo a sangria efetuada através do plexo venoso retro-orbital, com uso de microcapilares de vidro (Drumond, USA) ou por punção cardíaca com seringa e agulha apropriada, sendo coletado cerca de 1,0mL de sangue de camundongos e 5,0mL de ratos. Em seguida, foram eutanasiados por aprofundamento da narcose com gás carbônico para necrópsia e retirada de baço e linfonodos mesentéricos usando técnica estéril em cabine de segurança biológica classe II (Veco, Brasil). Os sangues totais foram coletados em tubos Eppendorf® (Costar, USA) e deixados coagular a 37<sup>0</sup>C. Após a retração dos coágulos, foram

centrifugados a 2.600 rpm (centrífuga Eppendorf, modelo 5415, Alemanha), durante 10 minutos a 4°C para coleta dos soros, que são armazenados a -20°C até o momento do uso. Baço e linfonodos mesentéricos foram coletados em tubos Eppendorf® (Costar, USA), identificados e congelados a -70°C até a sua utilização.

#### 4.4 Vírus

**MVMp, KRV e H-1:** Amostras padrões destas espécies foram disponibilizadas pelo colaborador deste estudo Dr. Rovilson Gilioli, chefe do Laboratório de Controle de Qualidade Animal, CEMIB / Unicamp. As amostras são originárias de Hannover, Alemanha e foram doadas pelo Prof. Dr. Volker Kraft do Laboratório de Virologia do Zentralinstitut für Versuchstierzucht.

**MPV, RPV-1 e RMV-1:** não há relatos de disponibilidade de amostras padrões destes vírus no Brasil, sendo o diagnóstico sorológico e molecular para estes agentes detalhados no decorrer deste estudo.

#### 4.5 Cultivos celulares

Os cultivos celulares da linhagem contínua L-929 e de células primárias de fibroblastos de embriões de ratos foram realizados conforme descrito por Gilioli (2003) com pequenas modificações.

##### 4.5.1 Cultivo Celular da Linhagem Contínua L-929

A linhagem celular permanente L-929, utilizada para produção de antígeno de MVM, foi cultivada em frascos plásticos descartáveis de 75cm<sup>2</sup> (Costar, USA) e nos orifícios das lâminas multitestes teflonadas (Dynatec, USA) em estufa incubadora a 37°C, com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> como descrito por Freshney, 1993 e Gilioli, 2003. Os meios de cultivos celulares utilizados foram Meio Mínimo Essencial (Eagle-MEM), com sais de Earle, L-glutamina e Bicarbonato de Sódio (Nutricell, Brasil), suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (Nutricell, Brasil), 1.000 U.I/L de Penicilina G potássica (Fontoura Wyeth, Brasil), 1.000 µg/L de Sulfato de Estreptomicina (Sigma, USA) e 12,5mM/L de HEPES (Sigma, USA). Para manutenção da monocamada após a confluência das células foi utilizado o mesmo meio de cultivo celular suplementado com 2% de soro fetal bovino (Nutricell, Brasil), solução de

antibióticos Penicilina/Estreptomicina e Heparina nas mesmas concentrações indicadas acima.

#### *4.5.2 Cultivo de Células Primárias de Fibroblastos de Embriões de Ratos*

Estes cultivos celulares foram utilizados para produção dos antígenos virais de KRV e Toolan H-1. Embriões de ratos Wistar SPF foram obtidos de fêmeas de rato Wistar com cerca de 13 dias de prenhez, originárias das colônias gnotobióticas do CEMIB/UNICAMP. Os embriões foram assepticamente retirados em gabinetes de segurança biológica classe IIA, com fluxo de ar laminar vertical (Veco, Brasil). Uma suspensão de células fibroblásticas foi obtida pela dissociação do tecido embrionário muscular do proveniente do dorso do rato com solução de tripsina 0,2% (p/v) – Versene 0,02%(p/v) (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) sob agitação lenta durante 30 minutos em temperatura ambiente como descrito por Freshney, 1993 e Gilioli, 2003. Após a dissociação, as células foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C em rotor JA-13 (Centrífuga Beckman, modelo FR 22) e o sedimento obtido foi ressuspenso em Eagle-MEM, de forma a conter aproximadamente  $1 \times 10^6$  células viáveis/mL. A viabilidade celular foi determinada por contagem de células vivas em câmara de Neubauer após mistura de volume/volume de suspensão de células com solução de PBS-Azul de Trypan (Merk, Brasil) a 0,1% (p/v). Um volume de 20mL da suspensão celular obtida foi acondicionado em frascos plásticos descartáveis de 75cm<sup>2</sup> (Costar, USA) e incubados a 37°C em atmosfera úmida de com 5% de CO<sub>2</sub> para obtenção da monocamada semi-confluyente.

#### *4.6 Produção de Antígenos Virais*

A produção de antígenos virais bem como a padronização dos mesmos para os ensaios de IFI e IHA foram realizados conforme descrito por Gilioli (2003) com pequenas modificações.

Após a remoção asséptica dos meios de cultivo, as monocamadas de células semi-confluentes foram infectadas com uma suspensão viral contendo 1 TCID<sub>50</sub>. Os frascos foram agitados a cada 15 minutos dentro de um período de sessenta minutos para promover uma melhor adsorção viral. Após este período foram adicionados 20 mL de meio de cultivo para manutenção celular. Os frascos foram incubados a 37°C em atmosfera úmida de com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de observado efeito citopático, as culturas

celulares foram congeladas e descongeladas três vezes consecutivamente para lise celular e em seguida, centrifugadas a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C em rotor JA-13 (Centrífuga Beckman, modelo FR 22, CA) para obtenção dos sobrenadantes contendo antígeno viral. Para MVM, o tempo de coleta do sobrenadante ocorreu em torno de seis dias após a infecção, com destruição de 50% a 75% da monocamada celular. Para KRV e H-1, este tempo foi em torno de 5 a 10 dias após a infecção, com 75 a 100% de destruição da monocamada celular. Volumes de 1mL dos sobrenadantes foram aliquotados em criotubos (Nunc, USA) e estocadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

#### *4.7 Padronização do Antígeno de MVM Utilizado para os Ensaios de IFI*

Diluições em série do sobrenadante contendo o antígeno de MVM, a partir de 1:2 e na razão dois, foram testadas em monocamadas semi-confluentes da linhagem celular L-929 cultivada em lâminas multitestes teflonadas de oito orifícios para determinação da maior diluição que apresentou cerca de 50% de infecção na monocamada celular. O meio Eagle-MEM foi utilizado como diluente. Após a determinação da melhor diluição, monocamadas semi-confluentes da linhagem celular L-929 foram infectadas com 20µL do antígeno de MVM. As lâminas foram incubadas por uma hora a 37°C em incubadora, com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> para adsorção viral. Em seguida, foram adicionados 50µL de meio Eagle-MEM de manutenção. Após o período de infecção, que ocorreu em torno de dois a três dias, o meio de cultivo foi assepticamente retirado, as lâminas foram secas a temperatura ambiente e fixadas por imersão em Acetona P.A. (Merck, Germany) a 4°C por 10 minutos. Após a secagem, as lâminas foram identificadas, acondicionadas em caixas plásticas apropriadas (Clay Adams, USA) e congeladas a -80°C até o momento do uso.

#### *4.8 Padronização dos Antígenos de MVM, KRV e H-1 Utilizados nos Ensaios de IHA*

As unidades hemaglutinantes (UHA) dos antígenos virais de *MVM*, *KRV* e *Toolan H-1* utilizados nas reações de IHA foram determinadas por meio da técnica de hemaglutinação passiva conforme descrito por Burleson et al., 1992. Um volume de 50µL de suspensão de hemácias de cobaia a 1% (v/v) em tampão de hemaglutinação (Difco, USA) contendo 0,25% (p/v) de soroalbumina bovina (BSA, fração V, Sigma) foi adicionado a 50 mL de diluições seriadas dos sobrenadantes, a partir de 1:2 na razão

dois em PBS 0,01 M - pH 7,2, em microplacas de 96 orifícios com fundo em U (Costar, USA). A leitura do teste foi realizada após 45 minutos de incubação a temperatura ambiente. O título hemaglutinante da suspensão viral foi considerado a maior diluição capaz de promover 100% de aglutinação das hemácias (1 UHA).

#### *4.9 Testes de Imunofluorescência Indireta (IFI)*

Monocamadas de células L 929 cultivadas em poços de lâminas multitestes teflonadas e infectadas com MVM foram utilizadas como antígeno genérico nos ensaios de IFI para detecção de anticorpos de parvovírus roedores.

O teste de IFI foi realizado conforme descrito por Kraft e Meyer (1986); e Gilioli (2003). Os soros testes foram previamente diluídos 1:5 com PBS 0,01M pH 7,2 e inativados pelo calor a 56 °C por 30 minutos em Banho-Maria para diminuição de reações inespecíficas. Em seguida foram diluídos a 1:20 com PBS e um volume de 25µL de cada diluição foi colocado para reagir nos orifícios das lâminas multitestes teflonadas, contendo monocamadas de células L-929 infectadas com MVM. Após a incubação em câmara úmida por 20 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, durante 10 minutos cada lavagem. Como anticorpos secundários, foram adicionados 25µL dos conjugados anti-IgG-FITC de camundongo diluído a 1:320 ou anti-IgG-FITC de rato diluído a 1:80 (Sigma, USA) com PBS/Azul de Evans (Merk, Alemanha) a 1:300 em cada orifício, sendo realizada nova incubação por 20 minutos nas mesmas condições anteriores. As lâminas foram lavadas novamente com PBS e com água destilada por um minuto. Em seguida foram montadas com lamínulas de vidro 24x60 mm (Glastécnica, Brasil) utilizando solução de glicerina tamponada alcalina (nove partes de Glicerina P.A. (Merk, Brasil) + uma parte de solução tampão Carbonato-Bicarbonato de Sódio 0,5M pH 8,5). As leituras dos testes foram realizadas em microscópio de fluorescência de epi-iluminação da marca Zeiss, modelo Standart 20, dotado de lâmpada de mercúrio HBO 50 W para luz ultravioleta, filtros de excitação BG 38 e barreira 450-490nm, com aumento final de 400x. Soros controle positivo de animais previamente imunizados e soros controle negativo foram incluídos em cada ensaio. Um resultado positivo foi determinado pela comparação da intensidade e distribuição da fluorescência com os dos orifícios do controle positivo e negativo.

#### *4.10 Ensaios de Inibição de Hemaglutinação (IHA)*

Os testes de IHA foram realizados conforme aqueles descritos por Parker et al. (1979) e Gilioli (2003) para detecção de anticorpos séricos para KRV, Toolan H-1 e MVM. Os soros testes foram previamente tratados para remoção de substâncias inespecíficas inibidoras da hemaglutinação como indicado por McLaren (1986). Volumes dos soros foram inativados pelo calor a 56 °C por 30 minutos em Banho-Maria e diluídos 1:5 em PBS 0,01M pH 7,2. Em seguida foram misturados volume/volume com de suspensão de Caolim lavado (Merck, USA) a 25% (p/v) em PBS. Após incubação a temperatura ambiente por 30 minutos com agitação periódica, a mistura soro-Caolim foi centrifugada a 2.500 rpm por 10 minutos a 4°C em rotor JA-13 (Centrífuga Beckman, modelo FR 22, CA). O sobrenadante obtido com concentração final a 1:10 foi coletado e mantido a 4° C até o momento do uso.

Para a realização dos testes de IHA, hemácias de cobaia foram coletadas por punção intracardíaca em solução de Alsever e após três lavagens com PBS, por centrifugação a 2.500 rpm durante 10 minutos cada, em rotor JA-13 (Centrífuga Beckman, modelo FR 22, CA) foram preparadas a 1% (p/v) em tampão de hemaglutinação (Difco, EUA) contendo 0,25 %(p/v) de soroalbumina bovina (BSA, fração V, Sigma). Os antígenos virais de MVM, KRV e H-1 foram previamente titulados através da técnica de hemaglutinação direta e diluídos em PBS/BSA de modo a conter oito unidades hemaglutinantes (UHA). Os soros testes na concentração de 1:10, obtidos após tratamento foram diluídos em série, na razão 2, até 1/320 em microplacas multitestes de 96 orifícios de fundo em U (Costar, USA), utilizando-se como diluente solução PBS 0,01M pH 7,2 contendo 0,25 %(p/v) de soroalbumina bovina. A 50µL de cada diluição dos soros testes foi acrescentado um volume de 50µL da suspensão do antígeno viral, contendo oito UHA e deixados reagir por 45 minutos em temperatura ambiente. Após esse período foi acrescentado um volume de 50µL da suspensão de hemácias de cobaia a 1% (p/v) em PBS/BSA e deixados e repouso em temperatura ambiente por 45 minutos. Cada poço foi examinado para a inibição de hemaglutinação e título  $\geq 1:20$  foi considerado um resultado positivo, o qual foi determinado pela comparação com os controles positivos (soros policlonais mono-específicos contra antígeno viral) e negativos, bem como com o controle de suspensão hemácias incluídos em cada ensaio. As recíprocas da maior diluição dos soros testes capazes de inibir 100% a hemaglutinação foram consideradas como título inibidor da hemaglutinação.



O diagnóstico sorológico de infecção por parvovírus de roedores MPV, RPV-1 e RMV-1 foi realizado por exclusão, baseando-se no resultado negativo da IHA comparado com um resultado positivo na IFI. Soros de ratos positivos na IFI e negativos na IHA para KRV e H-1 foram sugestivos de infecção por RPV-1 ou RMV-1. Soros de camundongos positivos na IFI e negativos na IHA para MVM foram considerados sugestivos de infecção por MPV.

#### *4.11 Obtenção de Controles Positivos para os Ensaios de PCR*

Para realização dos ensaios de PCR para diagnóstico de infecções por parvovírus murinos e de ratos foi necessário a obtenção de controles positivos para parvovírus murinos (MVM e MPV), para parvovírus de ratos (KRV, Toolan H-1, RPV-1 e RMV-1), bem como para paravovírus (PAR) para identificação genérica de parvovírus de roedores.

Um fluxograma das atividades desenvolvidas para obtenção dos controles positivos para os ensaios de PCR foi proposto para melhor visualização e compreensão das etapas (Fig. 4). Em seguida serão descritas as etapas de inoculação experimental de animais e de produção de plasmídeos.

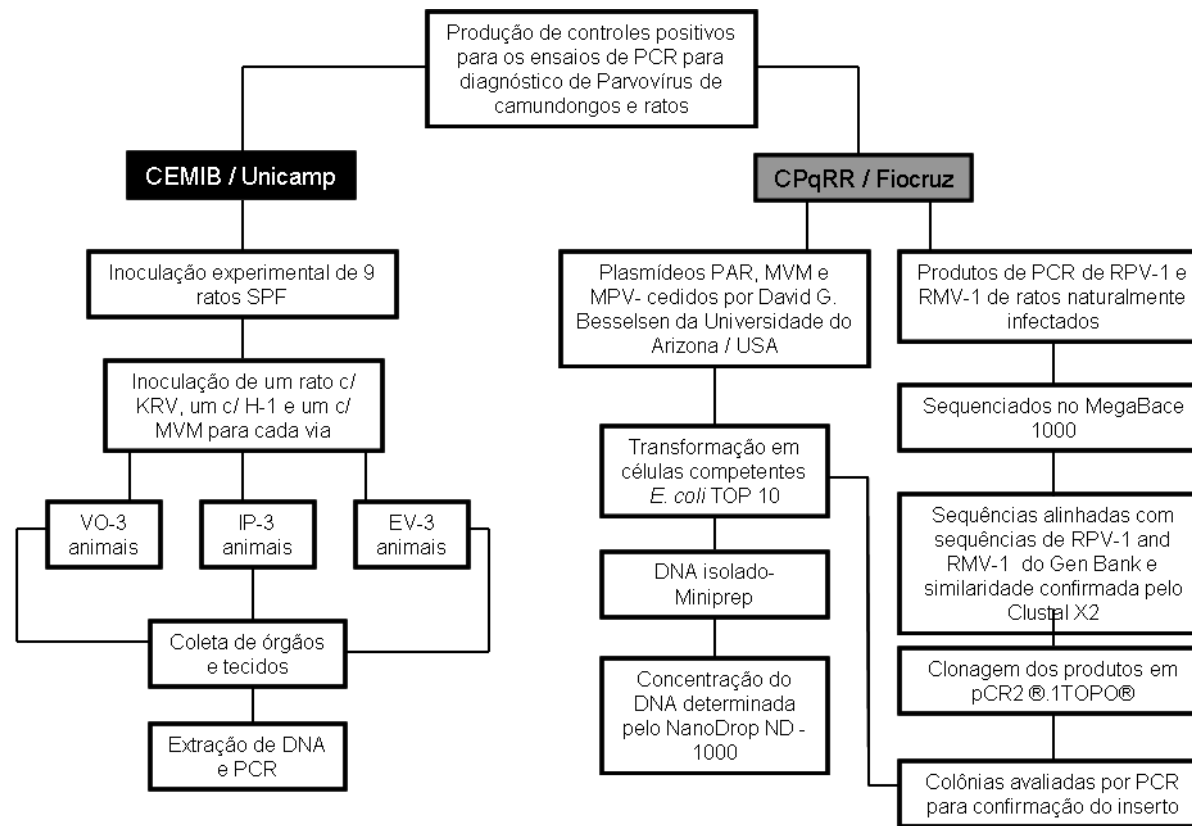


Figura 4: Fluxograma de atividades desenvolvidas para produção de controles positivos para os ensaios de PCR para diagnóstico de parvovírus de camundongos e ratos. Os ensaios de inoculação experimental foram realizados no Centro Multidisciplinar par Investigação Biológica (CEMIB) Unicamp, Campinas. Os ensaios de ligação e transformação de plasmídeos foram realizados no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ, Belo Horizonte.

#### *4.11.1 Inoculação Experimental de Ratos com MVM, KRV e H-1*

Nove ratos Wistar, fêmeas com seis semanas de idade, SPF, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB), Unicamp foram inoculados experimentalmente com MVM, KRV e H-1. O objetivo do ensaio foi obter DNA de órgãos e tecidos infectados com parvovírus para uso como controle positivo nos ensaios de PCR. Para isto, as amostras dos vírus foram diluídas em solução salina 0,9% e cada vírus foi inoculado em três animais, sendo um por via oral (VO), um por via intraperitoneal (IP) e um por via endovenosa (EV), de modo que se formaram três grupos de três animais, os quais foram mantidos em microisoladores, em condições apropriadas para manutenção de roedores de laboratório. Assim, os ratos foram inoculados com 1:16 unidades hemaglutinantes de MVMp, 254 unidades hemaglutinantes de KRV e 254 unidades hemaglutinantes de H-1, sendo administrado 0,2ml por via oral e 0,1 ml pelas vias IP e EV. Considerando que relatos da literatura demonstram que o vírus KRV foi detectado em uma semana em vários órgãos e tecidos de ratos juvenis inoculados experimentalmente (Jacoby et al., 1991), sete dias após a inoculação os animais foram eutanasiados por aprofundamento de narcose com gás carbônico em câmara apropriada e necropsiados para coleta de material biológico (rim, fígado, ovário, placas de Payer, baço e linfonodos mesentéricos). As amostras foram armazenadas em tubos de ensaio cônico do tipo Eppendorf® (Costar, USA), identificadas e congeladas a -70°C, para posterior extração de DNA e uso nos ensaios de PCR.

#### *4.11.2 Ligação e Transformação de Plasmídeos*

Plasmídeos PAR-NS1-pT7Blue-2, contendo fragmento de DNA da região NS1 do genoma, comum a todos os parvovírus de roedores; de MVM-VP2-pT7Blue-2, contendo fragmento de DNA da região VP2 do genoma, específica de MVM e de MPV-VP2-pT7Blue-2, contendo fragmento de DNA da região VP2 do genoma, específica de MPV foram gentilmente cedidos pelo Dr. David G. Besselsen, da University Animal Care, Universidade do Arizona, EUA.

Plasmídeos RPV-1-NS1-PCR ® 2.1-TOPO ®, contendo fragmento de DNA da região NS1 do genoma específica de RPV-1 e clones de plasmídeos RMV-1-VP-PCR ® 2.1-TOPO ®), contendo fragmento de DNA da região VP do genoma específica de RMV-1 foram produzidos no laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do CPqRR,

usando produtos de PCR sequenciados de ratos naturalmente infectados com RPV-1 e RMV-1. O produto de PCR de RPV-1 de 487 pares de bases (pb) e o produto de PCR de RMV-1 de 843 pb foram ligados no PCR ® 2.1-TOPO ® (TOPO TA Cloning ® Kit, Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Colônias de bactérias foram selecionadas e testadas por PCR para confirmação da inserção de fragmentos de RPV-1 e RMV-1.

Os plasmídeos recebidos do Dr. David G Besselsen e os produzidos “in-house” foram transformados em células quimicamente competentes de *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen, EUA) e foram utilizados como controles positivos para detecção de MVM, MPV, RPV-1 e RMV-1 pela PCR . As etapas de preparo das células e de transformação química estão descritas abaixo.

#### *4.11.2.1 Preparo de Células Competentes Tratadas com Cloreto de Cálcio*

Um pré-inóculo contendo 100 µl de colônia de bactéria TOP10 e sete mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) líquido (10 g NaCl, 5 g extrato de levedura, 10 g peptona, H<sub>2</sub>O qsp 1 L, pH=7,0) foi incubado a 37°C em agitador orbital (Forma Scientific, modelo 4520, USA), sob agitação constante de 200 rpm por 16 h. Um volume de um mL do pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio LB líquido e incubado a 37°C sob agitação constante de 200 rpm, até atingir O.D. 600 nm entre 0,4 e 0,6. Em seguida, a cultura bacteriana foi resfriada no gelo por 15 min e então transferida para tubos Falcon (Becton Dickinson, USA) de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 7.100 rpm em rotor JA-10 (centrífuga Beckman, modelo GS-6R, CA) por sete min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Os sedimentos de cada tubo foram ressuspensos em 25 mL de solução de cloreto de cálcio (100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, pH=7,0), gelada e estéril e mantidos no gelo por 20 min. A suspensão foi submetida a nova centrifugação e o sobrenadante foi descartado. Os sedimentos foram ressuspensos em um mL de solução de cloreto de cálcio-glicerina (100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, 10% glicerol, pH=7.0), gelado e estéril. As células foram mantidas por uma hora no gelo antes de serem usadas ou armazenadas a -70°C em alíquotas de 50µl, em tubos de ensaios cônicos do tipo Eppendorf® (Costar, USA).

#### 4.11.2.2 Transformação Química

Volumes de dois µl de cada plasmídeo foram adicionados separadamente a em alíquotas de 50µl de células de *E. coli* cepa TOP 10 quimicamente competentes, descritas no item acima. Os tubos foram mantidos em gelo por 30 minutos e em seguida foram submetidos a choque térmico a 42°C em circulador termostático (LKB Bromma, Modelo 2210 Multitemp II, Alemanha) por 35 s em e imediatamente colocados em gelo. Um volume de 250 µl de meio LB (temperatura ambiente) foi adicionado a cada tubo que foram incubados a 37°C por 1 hora. Os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm (centrífuga Eppendorf, modelo 5415, Alemanha) por 2 minutos e 200 µl do sobrenadante foi descartado. Um volume 100 µl da cultura restante foi plaqueado em meio LB-ágar (10g NaCl, 5g de extrato de levedura, 10g peptona, 1,5% ágar, H<sub>2</sub>O qsp 1 L, pH = 7,0) com ampicilina (100mg/mL) e incubado a 37°C por 12-16 horas. Após o crescimento, as colônias foram selecionadas, novamente semeadas em meio LB-ágar com ampicilina e incubadas a 37°C por 12-16 horas. Após a incubação as colônias de bactérias foram selecionadas e testadas por PCR para confirmação da presença do inseto de interesse. Colônias de bactérias contendo o plasmídeo com o inserto de interesse foram cultivadas em tubos Falcon (Becton Dickinson, USA) de 15 mL contendo 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) em agitador orbital (Forma Scientific, modelo 4520, USA) a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm por 16 h. Após este período, a cultura foi centrifugada a 3.000 rpm em rotor JA-10 (centrífuga Beckman, modelo GS-6R, CA) por 10 minutos e o sobrenadante descartado, sendo realizada em seguida a extração de DNA plasmidial.

#### 4.12. Extração de DNA

O DNA total foi isolado de baço e de linfonodos mesentéricos através do DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA) conforme recomendações do fabricante. A extração de DNA plasmidial foi realizada através do Kit Miniprep QIAprep® (Qiagen, EUA) seguindo as instruções do kit para o protocolo de spin miniprep. As extrações de DNA foram realizadas em gabinete de segurança biológica Classe II A (VECO, Barsil). Álcool 70% e luz ultravioleta foram utilizados para descontaminação da superfície de trabalho e do material antes do início das atividades. Durante os procedimentos de extração de DNA, a possibilidade de ter havido contaminação cruzada foi avaliada

através da inclusão de uma amostra controle negativo conhecida junto com as amostras testes, com posterior amplificação da mesma por PCR junto com as demais.

A concentração de DNA nas amostras eluídas foi determinada por absorvância a 260nm através do Nanodrop ND -1000 (Nanodrop Technologies, EUA), sendo as amostras armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### *4.13 Reação em Cadeia da Polimerase*

Os ensaios de PCR foram realizados baseados nos métodos descritos na literatura com algumas modificações. Os iniciadores utilizados neste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich™(USA) e foram previamente publicados: Parvovírus de roedores e MVM-específico (Redig e Besselsen, 2001); MPV-específico (Besselsen et al., 2006); RPV-1-específico e RMV-1-específico (Wan et al., 2006); KRV-específico e H-1 específico (Besselsen, 1998). Os autores relatam alta especificidade e sensibilidade dos iniciadores e a maioria deles está localizada na região VP2 não conservada do exon que confere divergência entre as espécies. Exceto os iniciadores desenhados para RPV-1 que estão localizados na região NS do exon, que apesar de ser uma região do genoma mais conservada entre as espécies, a região destes iniciadores é distintamente diferente de outros parvovírus de roedores. A seqüência dos iniciadores, o tamanho do produto amplificado e o perfil das reações no termociclador estão demonstrados na tabela 1. Todas as reações foram realizadas em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA) com um volume final de 20,0µl contendo 0,6 U de Taq polymerase para os ensaios de PCR PAR, MVM e MPV e 1,0 U para os ensaios de PCR KRV, H-1, RPV-1 e RMV-1; 2,0µl de tampão fornecido (Invitrogen do Brasil, Ltda); 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5µM de cada iniciador e 200µM de cada dNTP (BioLabs, New England, USA). Uma extensão final foi realizada a  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 minutos. Volumes de 2,0 ou 3,0µl de DNA total extraído de baço e de linfonodos mesentéricos das amostras testes, contendo concentrações que variaram entre 0,06 µg e 0,5 µg foram adicionados nos ensaios de PCR. Estas concentrações foram determinadas através da capacidade da técnica de PCR detectar parvovírus de roedores em animais naturalmente infectados, frente a concentrações de 500, 200, 100, 50 e cinco ng de DNA total extraído de baço e linfonodos mesentéricos.

Para verificar a presença de DNA de parvovírus nas amostras testes foi realizada uma triagem utilizando-se o ensaio de PCR - PAR, que detecta DNA de todas as

espécies de roedores parvovírus (o DNA alvo é uma região conservada do exon NS1). Após a detecção de amostras positivas, estas foram avaliadas através de ensaios de PCR específicos para detecção de DNA de MVM e MPV em camundongos e ensaios de PCR específicos para detecção de DNA de KRV, H-1, RPV-1 e RMV-1 em ratos.

Tabela 1: Ensaios de PCR para Parvovírus de roedores, MVM, MPV, KRV, H-1, RPV-1-1 e RMV-1-1

Teste de PCR	Seqüência do iniciador (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)	Perfil dos ciclos
Parvovírus de roedores (PAR) 1181 f 1335r	GATGATGATGCAGCCAGACAGT TAGTTTGCTGGTTTCAGCTTTTTC	154	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 40 ciclos
MVM 3410f 3481r	GCCATACACACCTGCAGCAAA TGGCGATGCTATGGTTGGT	71	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 40 ciclos
MPV f r	CTGCGCCAATTTATCCACAA AGAAGTTGACCTGGAGCATTGTT	118	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 40 ciclos
KRV 3691f 3971r	GCACAGACAACCAAACAGGAACTC TCC AGTCTCACTTTGAGCGGCTG	281	94°C por 4 min (94°C por 30 s, 60°C por 30s, 72°C por 30s) x 35 ciclos
H-1 3479f 3732r	CTAGCAACTCTGCTGAAGGAACTC TAGTGATGCTGTTGCTGTATCTGAT G	254	94°C por 4 min (94°C por 30 s, 60°C por 30s, 72°C por 30s) x 35 ciclos
RPV-1 1337f 1823r	CGCACATGTAGAATTTTGGCTG CAAAGTCACCAGGCAATGTGTT	487	94°C por 1 min (94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s) x 35 ciclos
RMV-1 3582f 4427r	ACTGAGAACTGGAGACGAATTC GGTCTCAGTTTGGCTTTAAGTG	843	95°C por 1 min (94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 1min) x 40 ciclos

PCR= Reação em cadeia da polimerase; MVM= *Minute virus of mice*; KRV= *Kilhan rat virus*; H-1= *H-1 Parvovirus*; MPV= *Mouse Parvovirus*; RPV-1= *Rat Parvovirus-1*; RMV-1= *Rat minute virus-1*

Marcadores de peso molecular de 25pb e de 100pb foram utilizados para confirmar o tamanho dos produtos amplificados. Em cada ensaio foram incluídos controles positivo e negativo. Os controles positivos utilizados nas reações de PCR de KRV e H-1 foram DNA extraído de baço de animais inoculados experimentalmente com KRV e H-1 e nas demais reações foram plasmídeos recombinantes. Os controles negativos incluídos nos ensaios foram DNA extraído de baço de camundongos ou de ratos isentos de parvovírus de roedores e amostras sem DNA.

Um volume de 3,0 mL dos produtos obtidos a partir de reações de PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, os quais foram corados pelo método de prata rápida (Sanguinet et al., 1994). Em seguida foram visualizados em transiluminador e fotografados com máquina fotográfica digital.

#### *4.14 Sequenciamento de DNA de RPV-1 e RMV-1*

Fragmentos de 487pb de RPV-1 e de 843pb de RMV-1 foram amplificados por PCR de amostras de ratos naturalmente infectados. Os produtos de PCR foram purificados em gel de agarose a 2% pelo QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, USA), de acordo com instruções do fabricante. As sequências de nucleotídeos foram determinadas pela utilização de um sequenciador automático de DNA (MegaBace 1000, USA) através do método de terminação em cadeia de ou dideoxi com um kit Taq Dye Deoxy Terminatory Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Pelo menos dois produtos diferentes de amplificação inicial foram purificados em gel para cada vírus e cada produto purificado em gel foi seqüenciado em triplicata em cada sentido. Alinhamento das seqüências obtidas e comparação de similaridade com seqüências de RPV-1 e de RMV-1 provenientes do GenBank foram realizadas através do ClustalX2 (Larkin et al., 2007).

#### *4.15 Diagnóstico de Infestações e Infecções Parasitárias*

##### *4.15.1 Pesquisa de Ectoparasitas*

Ácaros e piolhos foram diagnosticados através do exame direto das carcaças sob microscópio estereoscópico e exame microscópico de pêlos coletados das regiões cervical e dorsal, clarificados com líquido de Hoyer, como descrito por Weisbroth (1982)



e Gilioli (2000). A identificação específica foi baseada em análise morfológica microscópica, com aumentos de 100 e 400 vezes (Krantz, 1978; Owen, 1992).

#### 4.15.2 Pesquisa de Endoparasitas

Ovos, larvas e adultos de helmintos foram identificados por análise morfológica microscópica através do exame do lúmen de segmentos do intestino delgado e grosso dos animais e de swab anal realizado com fita adesiva (Wescott, 1982; Owen, 1992). Oocistos de coccídeos foram pesquisados de acordo com o método Sheater (Sheater, 1923). Cistos e trofozoítos de protozoários foram examinados em pequenas amostras coletadas a fresco do conteúdo do duodeno e do ceco, que foram colocadas em lâminas. Uma gota de solução salina 0,09% foi adicionada ao material que foi recoberto com lamínula de vidro 22 x 22 mm (Glastécnica, Brasil) como descrito por Gilioli (2003). Sempre que necessário, cistos de protozoários foram corados com solução aquosa de iodo a 10% (Lugol) ou pelos métodos de Giemsa ou Hematoxilina férrica para facilitar a identificação (Owen, 1992, Gilioli, 2003). Ovos e formas adultas de *Trichosomoides crassicauda*, endoparasita que se aloja na bexiga urinária de ratos, também foram investigados. A identificação específica de endoparasitas foi feita através da avaliação morfológica microscópica com aumentos de 40, 100 e 400 vezes, como descrito por Hsu (1982), Cornish et al. (1988), Owen (1992) e Gilioli (2003).

#### 4.16 Análises Estatísticas

Qui-quadrado e Teste Exato deFischer foram usados para comparar proporções. Comparações foram consideradas estatisticamente significantes com  $P < 0,05$ . Kappa foi utilizado para verificar o grau de concordância entre testes sorológicos e moleculares. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Inoculação Experimental de Ratos Wistar com MVM, KRV e H-1

Os três vírus inoculados nos nove ratos Wistar foram detectados em tecidos dos animais através de ensaios de PCR nas três vias de administração: oral, intraperitoneal e endovenosa, conforme demonstrado nas tabelas 2 a 4. Porém, na via intraperitoneal foi observado maior número de amostras de tecidos positivas para os vírus MVM, KRV e H-1, quando comparada com as demais (Tab. 3).

Tabela 2: Detecção por PCR de MVM, KRV e H-1 em tecidos de ratos **Wistar** inoculados pela **via oral**.

Tecido	Parvovírus		
	MVM	KRV	H-1
Fígado	-	+	-
Rim	-	-	-
Gônada	-	+	+
Timo	-	-	-
Placa de Payer	+	-	+
Baço	-	+	-
Linfonodo mesentérico	-	-	-

Tabela 3: Detecção por PCR de MVM, KRV e H-1 em tecidos de ratos **Wistar** inoculados pela **via intraperitoneal**.

Tecido	Parvovírus		
	MVM	KRV	H-1
	(Amostra positiva/testada)		
Fígado	+	+	+
Rim	+	-	+
Gônada	+	+	-
Timo	-	-	+
Placa de Payer	+	+	+
Baço	+	+	+
Linfonodo mesentérico	+	+	+

Tabela 4: Detecção por PCR de MVM, KRV e H-1 em tecidos de ratos **Wistar** inoculados pela **via endovenosa**

Tecido	Parvovírus		
	MVM	KRV	H-1
	(Amostra positiva/testada)		
Fígado	+	+	+
Rim	-	-	-
Gônada	+	-	-
Timo	-	-	+
Placa de Payer	-	-	-
Baço	+	+	-
Linfonodo mesentérico	+	+	-

Fotos de géis de poliacrilamida ilustram fragmentos de DNA de MVM, KRV e H-1 obtidos através da PCR, em amostras de ratos inoculados pela via intraperitoneal (Fig. 5). O DNA total foi extraído das amostras de tecidos infectados com os vírus MVM, KRV ou H-1, sendo armazenado a -20°C para posterior uso como controle positivo nos ensaios de PCR.

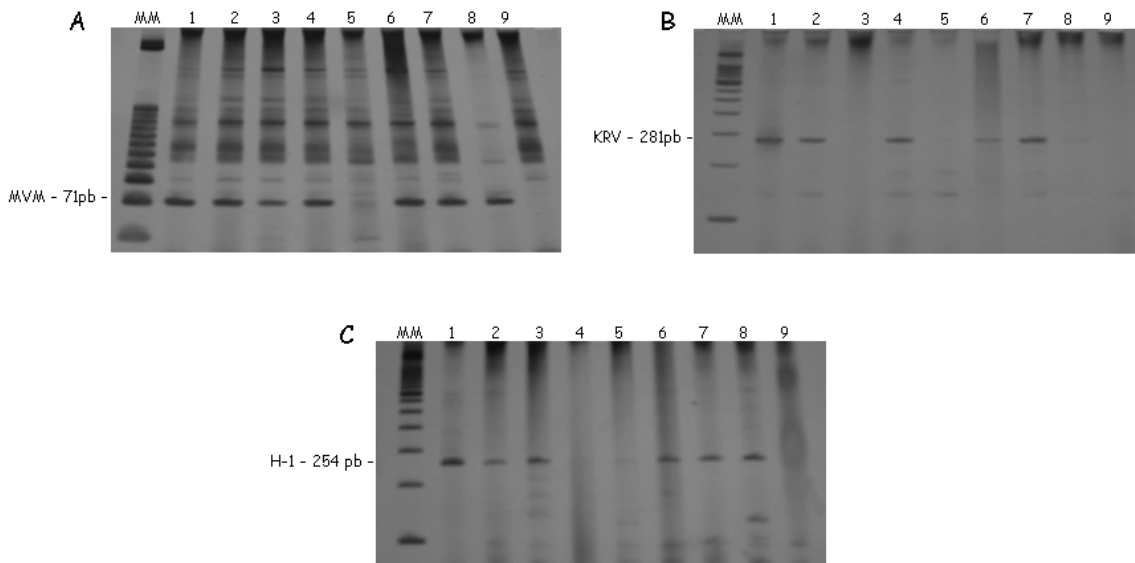


Figura 5: Géis de poliacrilamida 8% corados pela prata, representativos de MVM (A), KRV (B) e H-1 (C) através dos fragmentos de 71pb, 281 pb e 254pb, obtidos pela PCR, em amostras de tecidos de ratos Wistar SPF inoculados por via intraperitoneal .MM: Marcador de peso molecular de 25 pb (A) e de 100 pb (B e C). Canaleta 1: controle positivo; canaletas 2 a 8: tecidos testados: 2-fígado, 3-rim, 4-ovário, 5-timo, 6-placas de Payer, 7-baço, 8-linfonodos mesentéricos; canaleta 9: controle negativo.

### 5.2 Transformação de *Escherichia coli* por Plasmídeos

Os três plasmídeos PAR-NS1-pT7Blue-2; MVM-VP2-pT7Blue-2; MPV-VP2-pT7Blue-2 recebidos da Universidade do Arizona e os dois plasmídeos RPV-1-NS1-PCR ® 2.1-TOPO ® e RMV-1-VP-PCR ® 2.1-TOPO ® produzidos no laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do CPqRR foram amplificados com sucesso em células quimicamente competentes de *E. coli* cepa TOP 10. Os insertos PAR-NS1, MVM-VP2 e MPV-VP2 foram detectados em todas as colônias bacterianas selecionadas e incubadas em meio LB-ágar com ampicilina (Fig. 6 a-c). Da mesma forma, os insertos RPV-1-NS1 e RMV-1-VP também foram detectados nas colônias selecionadas e incubadas em meio LB-ágar com ampicilina (Fig. 6 d). Estes plasmídeos foram utilizados como controles positivos nas reações de PCR.

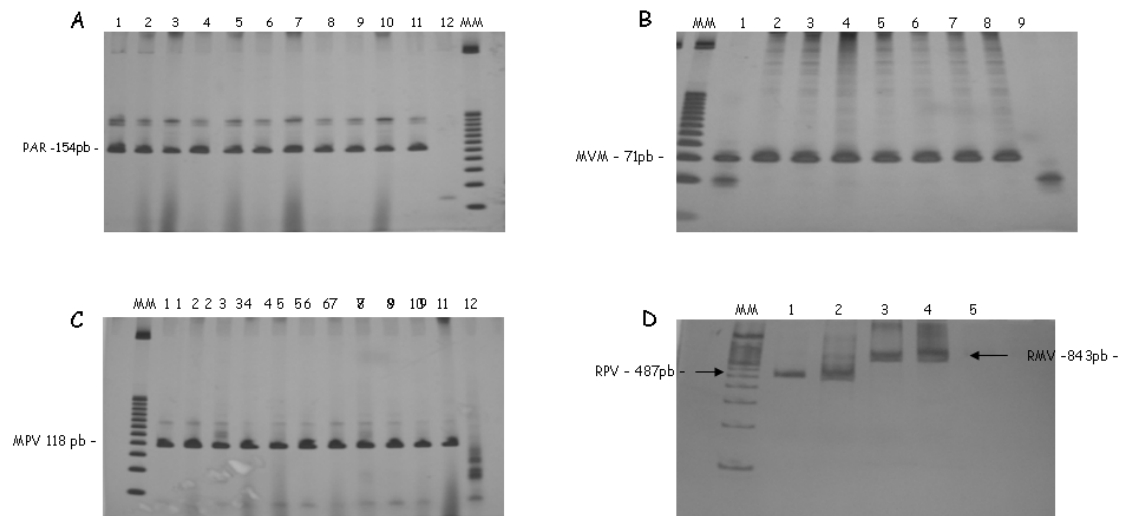


Figura 6: Géis de poliacrilamida 8% demonstrando insertos de parvovírus: A) PAR-NS1 com fragmento de 154pb; B) inserto MVM-VP2 com fragmento de 71pb; C) inserto MPV-VP2 com fragmento de 118pb; D) insertos RPV-1-NS1 e RMV-1-VP com fragmentos de 487pb e 843pb, respectivamente. MM: Marcador de peso molecular de 25 pb (A-C) e de 100pb (D). Controles positivos e negativos foram incluídos nas reações.

### 5.3 Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias de Biotérios Brasileiros

As informações sobre a localização, o número e as condições higiênico sanitárias dos biotérios do Brasil investigados através da aplicação do questionário se encontram nas Figuras 7 e 8 e em:

Kelly A Bicalho, Rovilson Gilioli, Olindo A Martins-Filho, Aretta AA Gomes, Ângela C Volpini, Daniele MR Demolin, Flávio G da Fonseca Alvaro J. Romanha. **Sanitary conditions of animal houses and occurrence of rodent parvoviruses in Brazilian mouse and rat colonies.** J Am Assoc Lab Anim Sci. Submetido. (Anexo 8.2).

Os números de biotérios avaliados nas diferentes regiões do Brasil estão demonstrados na Figura 7. A maioria deles está localizada na região sudeste, sendo nove pertencentes ao Estado de Minas Gerais e destes, oito compõem a Rede Mineira de Bioterismo.

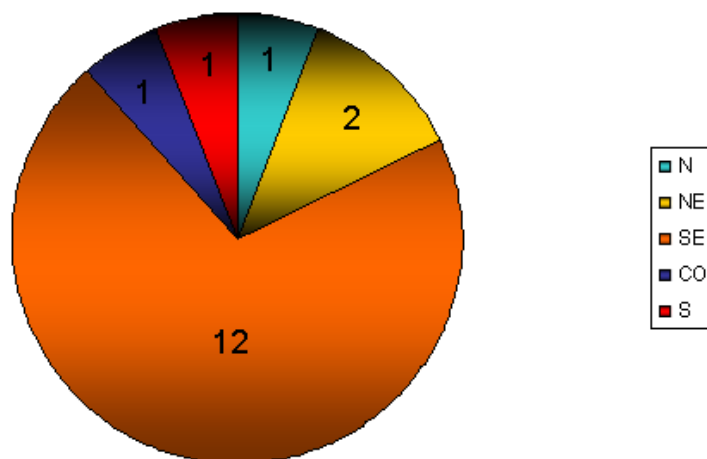


Figura 7: Número de biotérios investigados nas regiões geográficas do Brasil: N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; CO=Centro-Oeste; S = sul. (n=17).

Os dados sobre as condições higiênico-sanitárias dos biotérios brasileiros investigados relativos a sistemas de barreiras de proteção obtidos através da aplicação do questionário estão demonstrados no diagrama (Fig. 8). A presença das doze barreiras avaliadas foi relatada em apenas dois biotérios, sendo que desinfecção periódica das áreas, uso de EPI's e isolamento arquitetônico foram as barreiras mais observadas. Presença de autoclave foi relatada em doze biotérios (70,6%). Esterilização de materiais e insumos foi descrita em nove (53%) e em oito (47,0%) foi relatado o uso de racks ventiladas para criação dos animais. Ventilação e filtração do ar foram descritas em sete biotérios (41,2%). Uso de duchas sanitizantes, fluxo unidirecional e programa de quarentena são barreiras ausentes em vários biotérios e estes três itens associados foram observados em apenas três biotérios.

Sistemas de Barreiras Sanitárias	N		NE			SE							CO		S		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII
Desinfecção Periódica																	
Uso de EPI's																	
Isolamento Arquitetônico																	
Controle Diário da Temperatura																	
Presença de Autoclave																	
Esterilização de Materiais e Insumos																	
Monitoramento de Saúde Animal																	
Presença de Racks Ventiladas																	
Ventilação e Filtração do Ar																	
Uso de Duchas Sanitizantes																	
Fluxo Unidirecional																	
Programa de Quarentena																	
Total	4	12	8	12	11	10	11	10	6	4	4	4	3	3	2	6	5

Figura 8: Barreiras sanitárias de proteção avaliadas em biotérios de diferentes regiões do Brasil. Os biotérios foram identificados através de algarismos romanos, de acordo com distribuição nas regiões: Norte (N), Nordeste (NE), Sudeste (SE), Centro Oeste (CO) e Sul (S). Os quadrados pretos indicam a presença da barreira sanitária avaliada.

De acordo com o número de barreiras sanitárias, os biotérios foram agrupados em três categorias A, B e C (Fig. 9 a). Este agrupamento demonstrou que 35,3% dos biotérios pertencem à categoria A (09-12 barreiras), 23,5% à categoria B (05-08 barreiras) e a maioria deles (41,2%) à categoria C (01 a 04 barreiras). A Figura 9 b demonstra a frequência relativa dos biotérios das categorias A, B e C distribuídos nas diferentes regiões do Brasil. Dos biotérios da categoria A, cinco pertencem à região SE e um à região NE. Interessantemente, a maioria dos biotérios da categoria A, bem como da C estão localizados na região sudeste. Já os biotérios da categoria B estão distribuídos de forma homogênea em quase todas as regiões, exceto Norte.

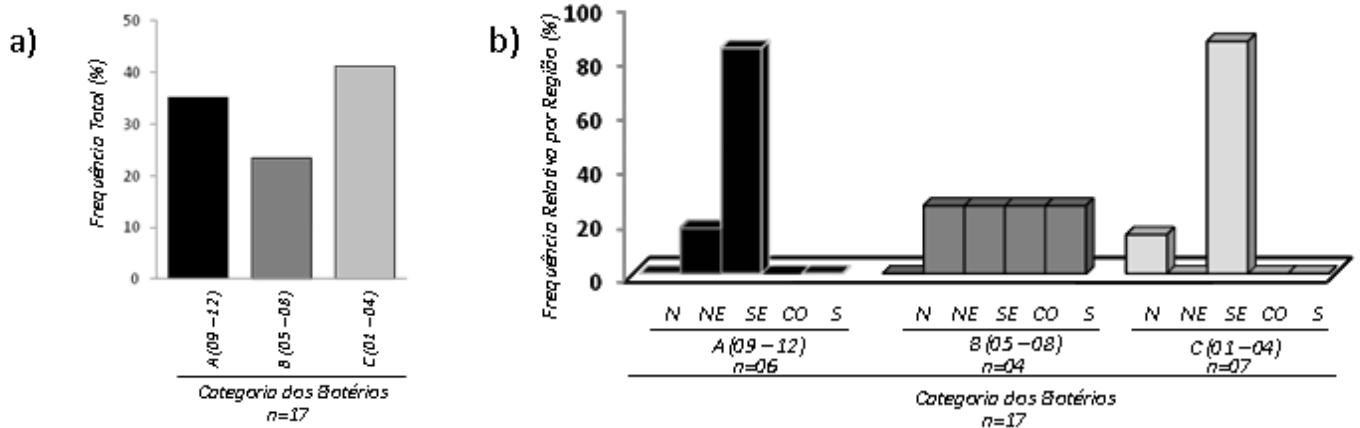


Figura 9: a) Freqüência de biotérios brasileiros investigados distribuídos nas categorias A (09-12 barreiras sanitárias), B (05-08 barreiras sanitárias) e C (01-04 barreiras sanitárias). b) Freqüência relativa dos biotérios das categorias A (■), B (■) e C (□) distribuídos nas diferentes regiões do Brasil.

#### 5.4 Ocorrência de Parvovírus de Roedores em Colônias de Camundongos e Ratos de Biotérios Brasileiros

As informações sobre a ocorrência de parvovírus de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios do Brasil investigados se encontram nas Figuras 10 a 11 e em:

Kelly A Bicalho, Rovilson Gilioli, Olindo A Martins-Filho, Aretta AA Gomes, Ângela C Volpini, Daniele MR Demolin, Flávio G da Fonseca; Alvaro J. Romanha. **Sanitary conditions of animal houses and occurrence of rodent parvoviruses in Brazilian mouse and rat colonies.** J Am Assoc Lab Anim Sci. Submetido. (Anexo 8.2).

Os dados de ocorrência deste estudo foram determinados com base na porcentagem de amostras positivas testadas individualmente. A figura 10 (a-f) demonstra a ocorrência de infecção por parvovírus murinos em biotérios de diferentes regiões do Brasil, através de técnicas sorológicas e moleculares. As Figuras 10 a e 10 d referem-se à infecção genérica por parvovírus de roedores. As demais referem-se à infecção específica por MVM e MPV, respectivamente. Animais positivos foram detectados através das duas técnicas e uma alta ocorrência foi observada no total de camundongos examinados.

A ocorrência de parvovírus murinos avaliada por métodos sorológicos foi de 18,3% e a positividade variou de 0,0 a 22% nas diferentes regiões (Fig. 10 a). A



ocorrência de MVM foi de 6,2 % e a positividade variou de 0,0 a 8,3% (Fig. 10 b). A ocorrência de MPV foi de 12,3 % e variou de 0,0 a 14,2 % (Fig. 10 c). A ocorrência avaliada por métodos moleculares foi de 49,2% e a positividade variou de 16,7 a 100,0% nas diferentes regiões avaliadas (Fig. 10 d). A ocorrência de MVM foi de 12,3 % e a positividade variou de 0,0 a 13,7% ((Fig. 10 e). A ocorrências de MPV foi de 43,5 % e a positividade variou de 16,7 a 100,0 % nas demais regiões avaliadas (Fig. 10 f).

Maior taxa de ocorrência detectada pela sorologia foi observada na região sudeste e pela PCR, nas regiões Norte e Sudeste (Fig. 10 a). A ocorrência foi melhor elucidada através da técnica de PCR e análises estatísticas baseadas no teste qui-quadrado comprovaram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de ocorrência dos vírus MVM e MPV entre as colônias, sendo MPV o mais detectado em todas as regiões do Brasil. Resultados discrepantes foram observados na ocorrência de parvovírus detectada através de técnicas sorológicas e moleculares na região Norte (Figs. 10 a e 10 c), sendo observada ocorrência de 100% através da PCR e ausência de animais positivos através da sorologia .

Com relação aos camundongos *Swiss webster* e demais linhagens de camundongos avaliados, maior frequência de animais positivos para parvovírus murinos (PAR) através de técnicas sorológicas e moleculares foi observada em *Swiss webster*, seguida de BALB/c. Camundongos C57Bl/6 apresentaram menor taxa de positividade quando comparados com os demais.

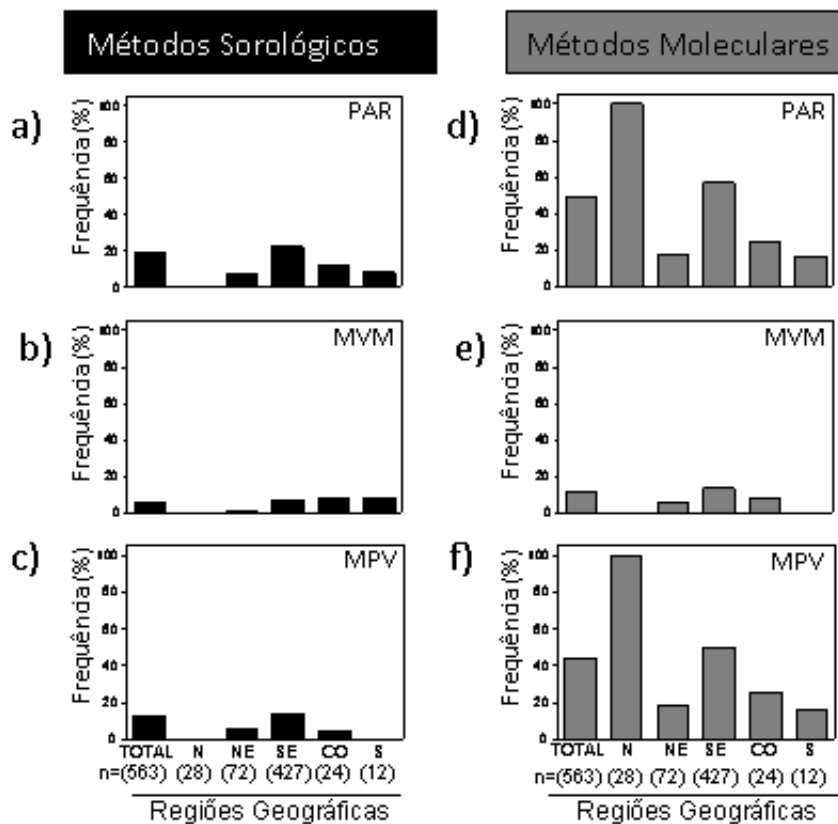


Figura 10: Ocorrência de infecção por parvovírus murinos em biotérios de diferentes regiões do Brasil: a) PAR= Parvovírus de roedores; b) MVM= *Minute virus of mice*; c) MPV = *Mouse parvovirus*.

Os resultados de ocorrência de infecção por parvovírus em ratos, através de técnicas sorológicas e moleculares, em biotérios de diferentes regiões do Brasil estão mostrados na Figura 11 (a-j). As Figuras 11a e 11f referem-se a resultados de infecção genérica por parvovírus de roedores. As demais referem-se à infecção específica por parvovírus de rato. O biotério avaliado correspondente à região Centro-Oeste não criava ratos, somente camundongos. Por este motivo, ratos desta região aparecem como não testados (NT). Soros de ratos IFI positivos e negativos para KRV e H-1 pela IHA foram sugestivos de infecção por RPV-1 / RMV-1

Alta ocorrência foi observada no total de camundongos examinados. A ocorrência avaliada por métodos sorológicos foi de 40,7% (Fig. 11 a) e amostras positivas foram detectadas apenas na região Sudeste, sendo RPV-1/RMV-1 os vírus mais prevalentes. A ocorrência de KRV e H-1 foi de 3,0 % e 1,8% e na região SE foi de 3,8% a 2,1%

respectivamente (Figs. b-c). A ocorrência de RPV-1/RMV-1 no total de amostras avaliadas foi de 35,9 % e na região SE foi de 45,5% (Figs. 11 d–e).

A ocorrência avaliada por métodos moleculares foi de 73,7 e a positividade variou de 25,0 a 73,7 nas demais regiões avaliadas (Fig. 11 f). A ocorrência RPV foi de 54,5% e a positividade variou de 25,0 a 100% nas diferentes regiões (Fig. 11 i). A ocorrência de KRV foi de 6,0% (Figs. 11 g) e de RMV foi de 37,7% (Fig. 11 j) e estes vírus foram detectadas apenas na região SE). H-1 não foi detectado por PCR (Fig. 11 h).

Assim como para camundongos, a ocorrência foi melhor elucidada através da técnica de PCR e análises estatísticas baseadas no teste qui-quadrado demonstraram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de ocorrência entre todos parvovírus de rato, sendo o RPV-1 o mais prevalente (Fig.11 i), seguido de RMV-1 (Fig. 11 j).

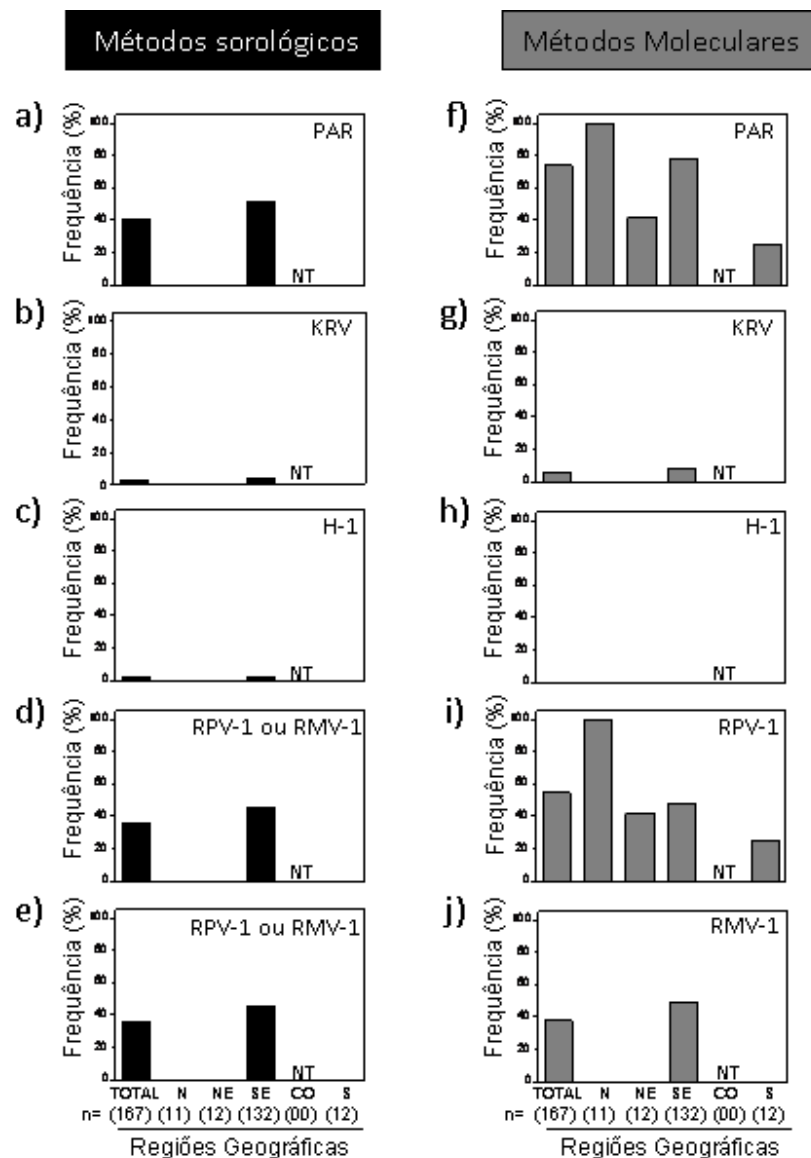


Figura 11: Ocorrência de infecção por parvovírus de ratos em biotérios de diferentes regiões do Brasil: a) PAR= Parvovírus de roedores; b) KRV=*Kilhan rat virus*; c) H-1 = *H-1 parvovirus*; d) RPV-1= *Rat parvovirus -1*; e) RMV-1=*Rat minute virus - 1*. NT= Não Testado

Os gráficos em radar da Figura 12 ilustram a ocorrência de infecção por parvovírus de roedores em função do número de barreiras sanitárias dos biotérios avaliados. As porcentagens de resultados positivos obtidos por métodos sorológicos e moleculares para cada vírus pesquisado em biotérios da categoria A (Letra a), da categoria B (letra b) e da categoria C (letra c) foram calculadas para visualização da ocorrência dos vírus avaliados nas diferentes categorias. As análises dos gráficos

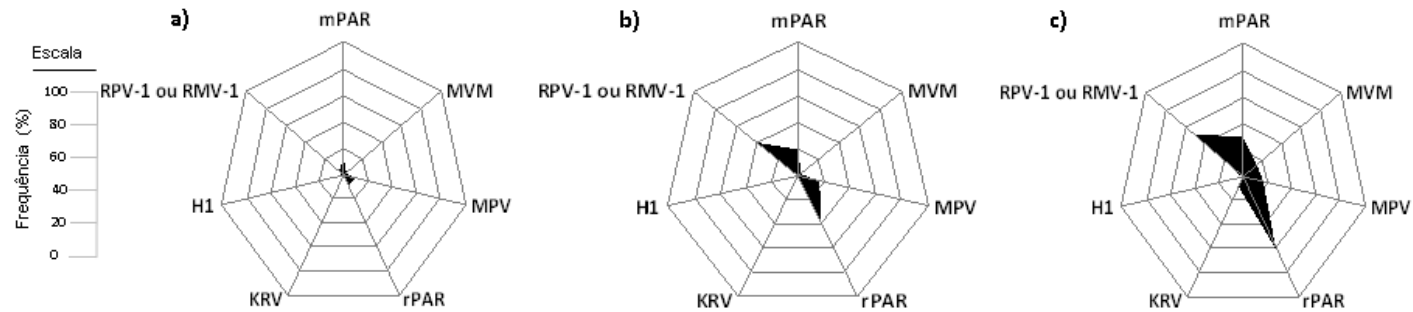
demonstram maior ocorrência em biotérios das categorias B e C e que existe uma relação inversa entre a presença dos vírus e o número de barreiras sanitárias, ficando evidente que quanto menor o número de barreiras sanitárias, maior a ocorrência dos vírus.

Métodos Serológicos

Categoria A (09-12 Barreiras Sanitárias)

Categoria B (05-08 Barreiras Sanitárias)

Categoria C (01-04 Barreiras Sanitárias)



Métodos Moleculares (PCR)

Categoria A (09-12 Barreiras Sanitárias)

Categoria B (05-08 Barreiras Sanitárias)

Categoria C (01-04 Barreiras Sanitárias)

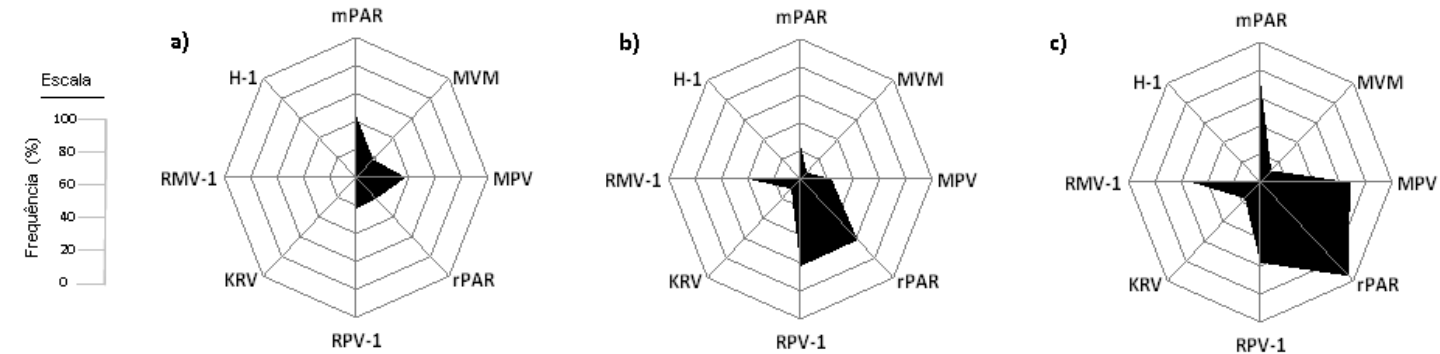


Figura 12: Ocorrência de infecção por parvovírus de roedores versus sistemas de barreiras sanitárias em biotérios brasileiros: a) Biotério categoria A; b) Biotério categoria B; c) Biotério categoria C. mPAR= Parvovírus de camundongo; MVM= *Minute virus of mice*; MPV= *Mouse parvovirus*; rPAR= Parvovírus de rato; KRV=*Kilhan rat virus*; H-1= *H-1 parvovirus*; RPV-1= *Rat parvovirus - 1*; RMV-1= *Rat minute virus - 1*

Com relação aos ensaios moleculares, fotos de géis de poliacrilamida que ilustram fragmentos de DNA de parvovírus -PAR, MPV, MVM, KRV, RMV-1 e RPV-1 obtidos através da PCR em amostras de camundongos e ratos naturalmente infectados estão demonstrados nas Figuras 13, 14 e 15. Estes dados, juntamente com outros obtidos no Laboratório de Controle de Qualidade Animal do CEMIB/Unicamp, serão incluídos no artigo:

Daniele MR Demolin, Kelly A Bicalho, Flávio G da Fonseca, Alvaro J. Romanha, Rovilson Gilioli. **Molecular assays for detection of infection agents in laboratory rodents.** Em preparação.

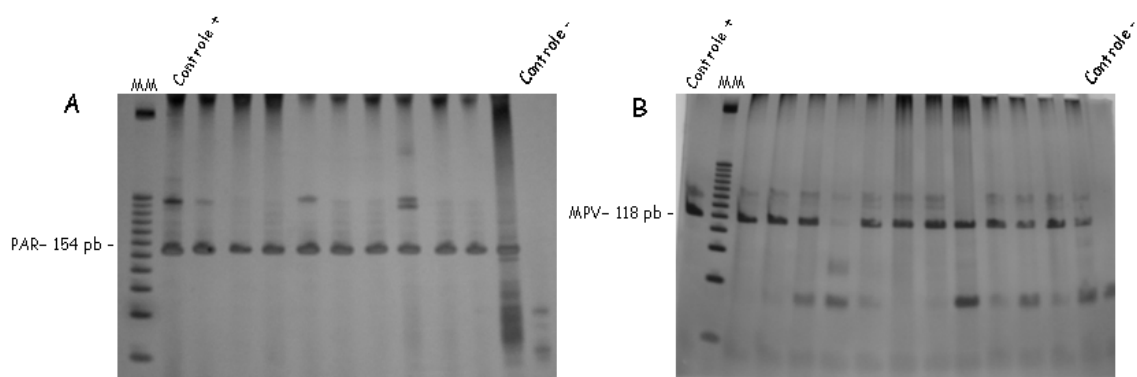


Figura 13: Géis de poliacrilamida 8% corados pela prata, representativos de DNA de parvovírus obtido por PCR em amostras de baço e de linfonodos mesentéricos de camundongos naturalmente infectados: A) PAR = Parvovírus de roedores, identificado pelo fragmento de 154pb, B) MPV=*Mouse parvovirus*, identificado pelo fragmento de 118pb. Marcador molecular de 25 pb.

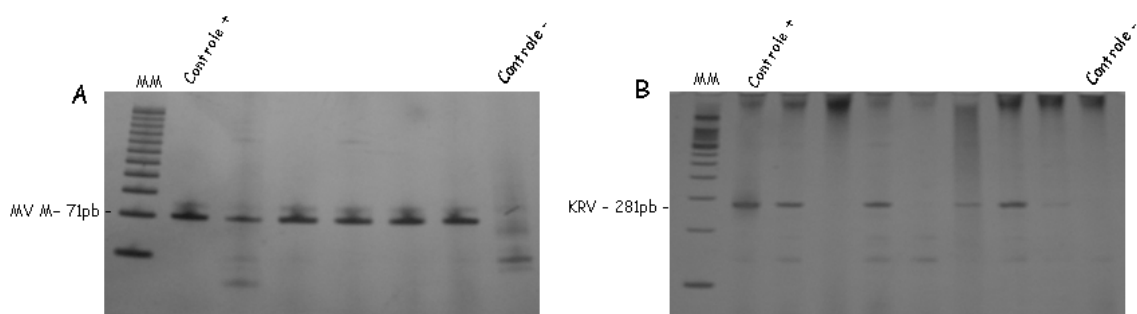


Figura 14: Géis de poliacrilamida 8% corados pela prata, representativos de DNA de parvovírus obtido por PCR em amostras de baço e de linfonodos mesentéricos de camundongos (A) e de ratos (B) naturalmente infectados: A) MVM = *Minute virus of mice*, identificado pelo fragmento de 71pb. Marcador molecular de 25 pb; B) KRV= *Kilhan rat virus*, identificado pelo fragmento de 281pb. Marcador molecular de 100 pb.

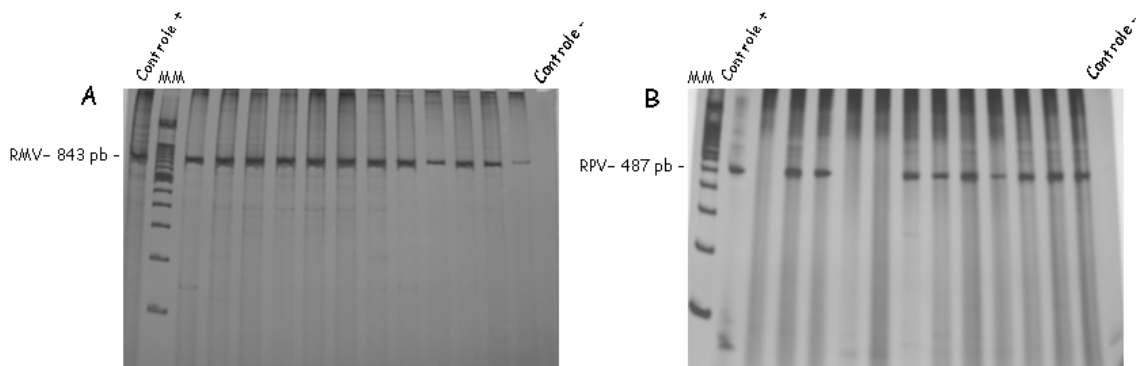


Figura 15: Géis de poliacrilamida 8% corados pela prata, representativos de DNA de parvovírus obtido por PCR em amostras de baço e de linfonodos mesentéricos de ratos naturalmente infectados: A) RMV - 1 = *Rat minute virus* -1, identificado pelo fragmento de 843pb; B) RPV-1= *Rat parvovirus* - 1, identificado pelo fragmento de 487pb. Marcador molecular de 100 pb.

Com relação aos ensaios sorológicos, a Figura 16 ilustra reações de IFI em células L-929 infectadas com vírus MVM com soro de camundongo positivo para MVM (a) e com soro de camundongo negativo (b).

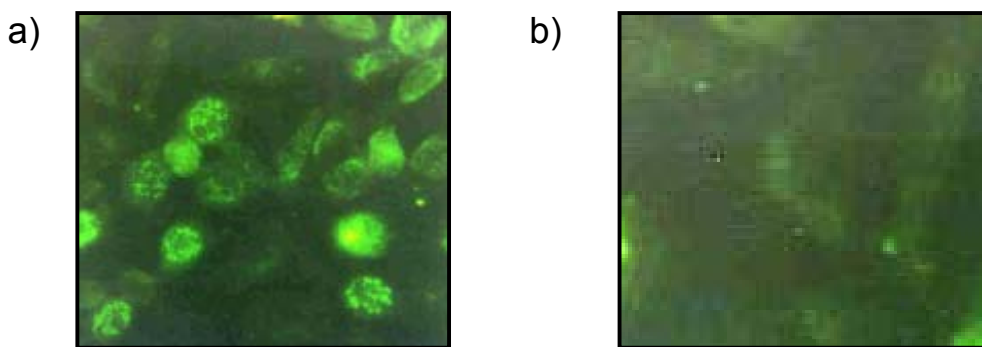


Figura 16: Reação de Imunofluorescência Indireta em células L-929 infectadas com vírus MVM, após 24 horas de infecção. a) Controle positivo - soro de camundongo infectado com MVM; b) Controle negativo soro de camundongo SPF. Aumento 400 X

Análise comparativa de métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico de infecção por parvovírus murinos está demonstrada na Figura 17 (a-c). Os ensaios de



PCR PAR, MVM e MPV foram capazes de detectar maior número de animais positivos quando comparados com as respectivas técnicas sorológicas. Os resultados do índice *kappa* próximos de zero demonstram que não houve concordância entre as duas técnicas de diagnóstico. Dos 106 camundongos com sorologia positiva PAR(18,8%), 42 animais (39,6%) foram negativos pela PCR (Fig. 17 a). Com relação aos resultados de MVM, dos 35 (6,2%) animais com sorologia positiva, 29 (82,8%) foram negativos pela PCR (Fig. 17 b) e para MPV, dos 69 (12,3%) positivos na sorologia, 33 (47,8%) foram negativos pela PCR (Fig. 17 c).

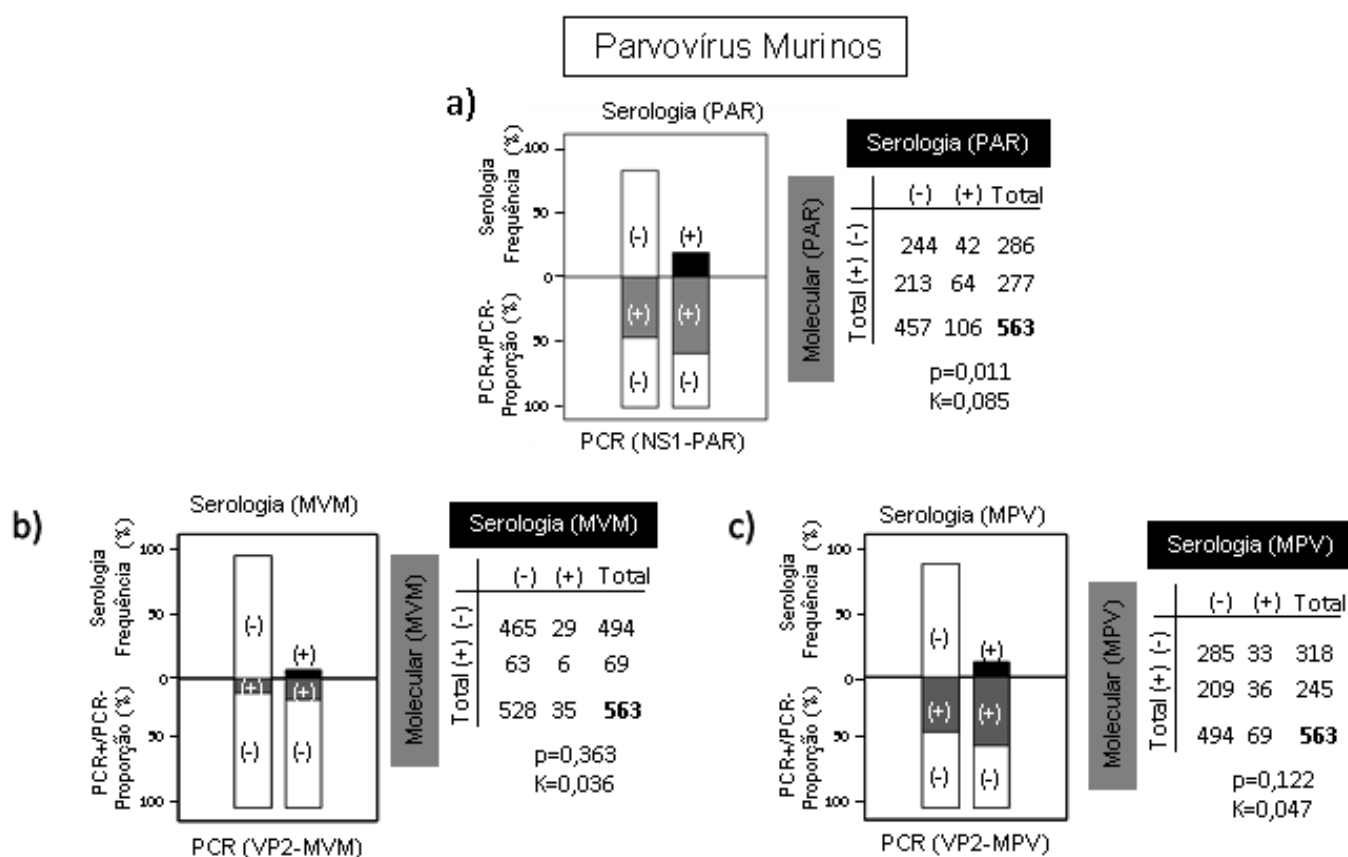


Figura 17: Análise comparativa de métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico de infecção por parvovirus murinos: a) Parvovirus de roedores (PAR); b) MVM= *Minute virus of mice*; c) MPV= *Mouse parvovirus*. Os gráficos ao lado de cada tabela de contingência ilustram a frequência de animais com sorologia positiva e negativa para cada parvovirus estudado e a proporção de animais com PCR + ou - dentro do grupo de animais com sorologia positiva e negativa.

Análise comparativa de métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico de infecção por parvovírus de rato está demonstrada na Figura 18 (a-c). Os ensaios de PCR PAR e KRV foram capazes de detectar maior número de animais positivos quando comparados com as respectivas técnicas sorológicas. Já para o vírus H-1, nenhum animal foi detectado pela PCR, sendo observados três animais (1,8%) positivos pela sorologia. Os resultados de avaliação de concordância entre as duas técnicas de diagnóstico determinados pelo índice *kappa* demonstraram ser de 32,8% para PAR e de 51,4% para KRV. Comparação entre as técnicas de diagnóstico para detecção específica de infecção por RPV-1 ou RMV-1 não foi possível, devido à indisponibilidade de antígenos específicos para os ensaios sorológicos no laboratório onde foi executado o referido estudo.

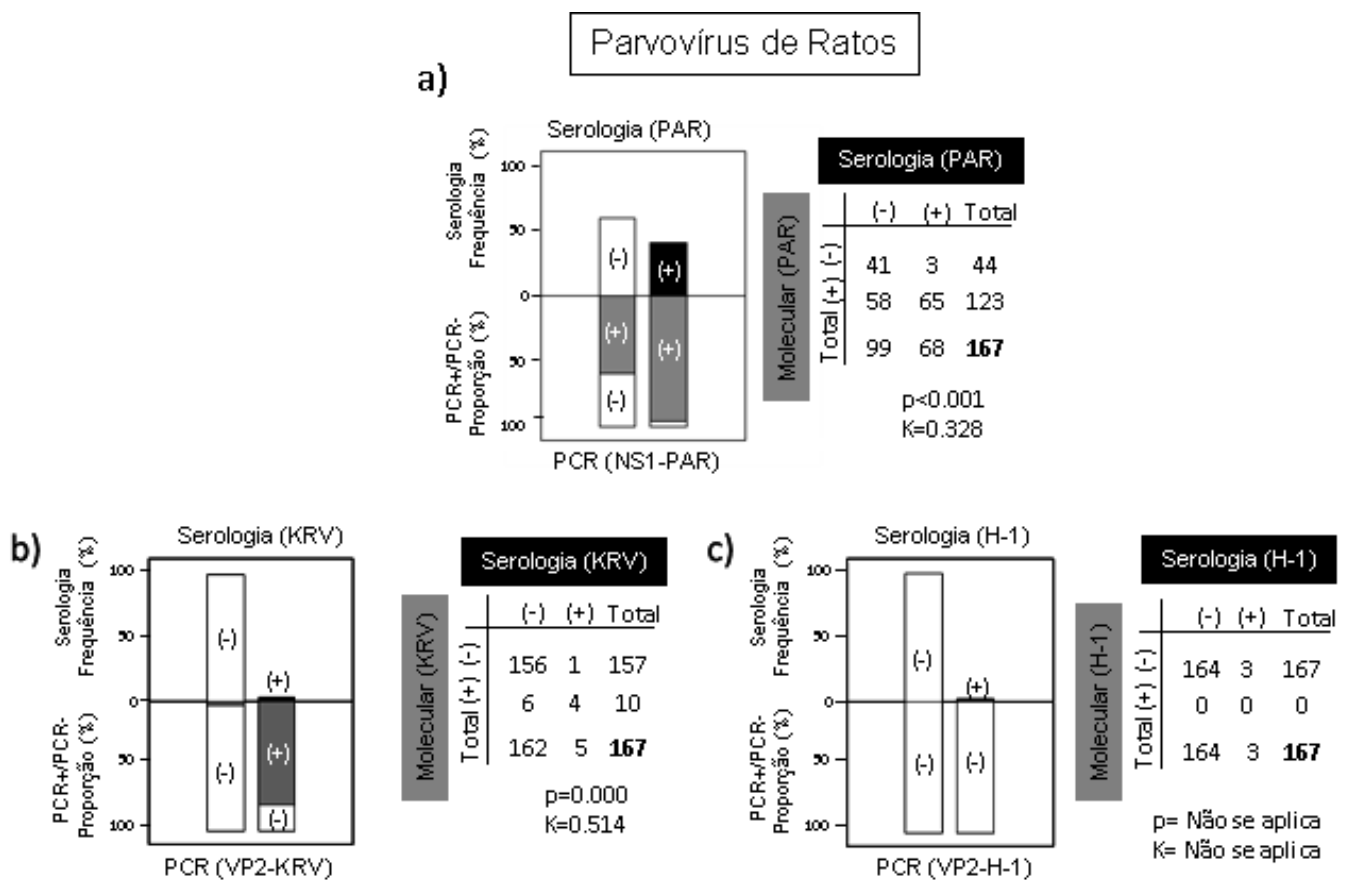


Figura 18: Análise comparativa de métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico de infecção por parvovírus de ratos: a) Parvovírus de roedores (PAR); b) KRV=*Kilhan rat virus*; c) H-1 = *H-1 Parvovirus*. Os gráficos ao lado de cada tabela de contingência ilustram a frequência de animais com sorologia positiva e negativa para cada parvovírus estudado e a proporção de animais com PCR + ou - dentro do grupo de animais com sorologia positiva e negativa.

Uma vez que os ensaios de PCR foram capazes de detectar maior número de animais positivos quando comparados com as técnicas sorológicas e que a região sudeste teve o maior número de biotérios avaliados, foi avaliada a ocorrência por PCR de infecção por parvovírus de roedores em biotérios da região sudeste do Brasil através da PCR. As informações sobre estes resultados se encontram nas Figuras 19 e 20 e serão incluídas no artigo:

Kelly A Bicalho, Alvaro J. Romanha, Flávio G da Fonseca, Olindo A Martins-Filho, Rovilson Gilioli. **Ocurrence of parvoviruses in laboratory mice and rats in southeast of the Brazil.** Em preparação.

Os resultados demonstram que MVM e MPV foram detectados nos biotérios avaliados nesta região em colônias de camundongos, sendo observada alta ocorrência de MPV em biotérios dos Estados de São Paulo (44,6%), Rio de Janeiro (33,3%) e Minas Gerais (48,3%). Já em colônias de ratos, KRV, RPV-1 e RMV-1 foram detectados em biotérios dos Estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais, sendo observada alta ocorrência de RPV-1 (57,6%) e RMV-1 (63,7%) nas colônias de ratos dos biotérios de Minas Gerais (Fig. 19).

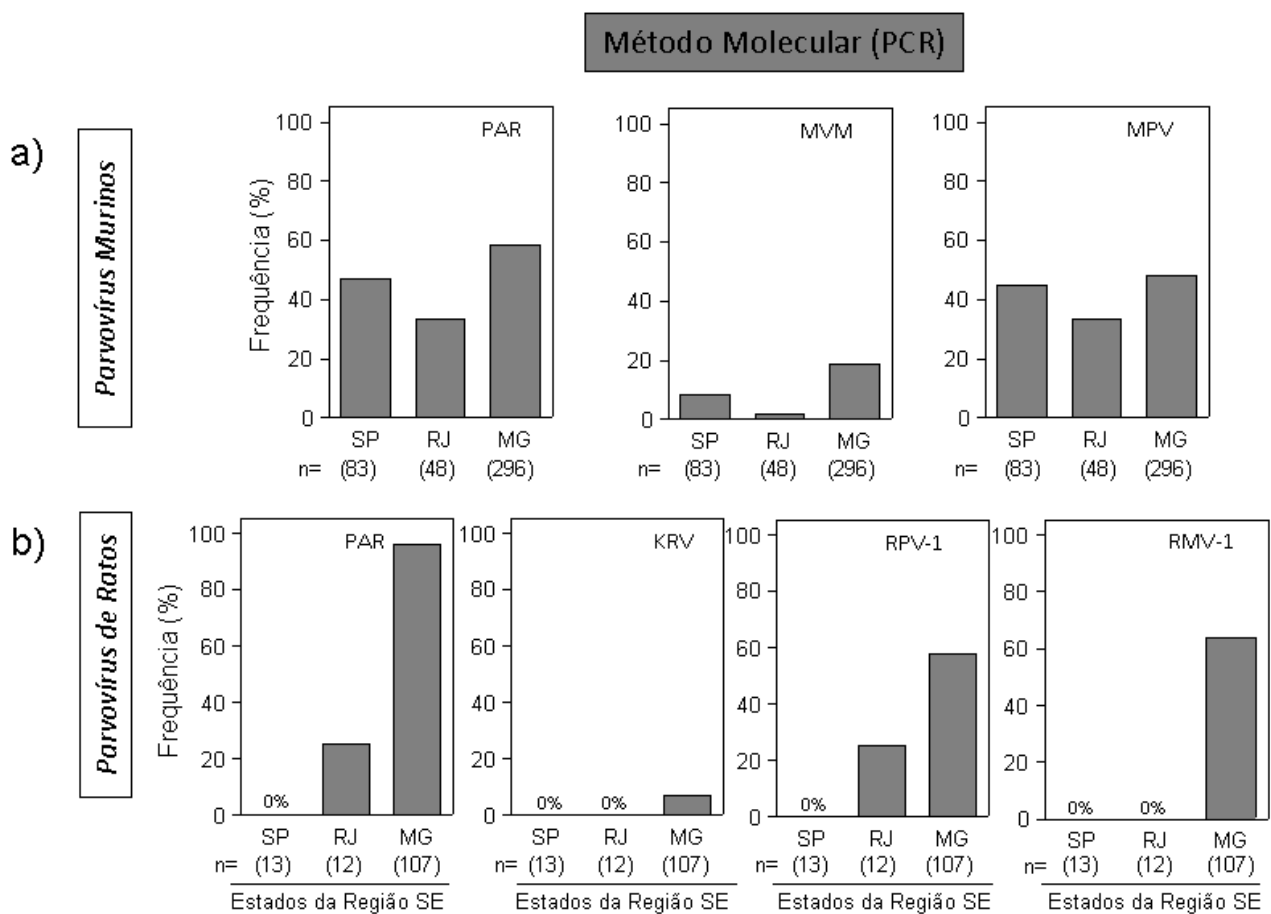


Figura 19: Ocorrência de infecção por parvovírus de roedores em biotérios da região sudeste do Brasil. a) Parvovírus murinos: PAR= Parvovírus de roedores; MVM= *Minute virus of mice*; MPV= *Mouse parvovirus*. b) Parvovírus de ratos: PAR = Parvovírus de roedores; KRV= *Kilhan rat virus*; H-1= *H-1 parvovirus*; RPV-1= *Rat parvovirus - 1*; RMV-1= *Rat minute virus - 1*.

Ocorrência de infecção por parvovírus de roedores e co-infecção por RPV-1 e RMV-1 foi avaliada em biotérios do Estado de Minas Gerais através de ensaios de PCR. (Fig. 20). Em todos biotérios foi detectada infecção por parvovírus murinos em colônias de camundongos. MPV foi o vírus mais frequente, com altas taxas de ocorrência, sendo que em um biotério foi observada frequência de 100% para este vírus. Já em colônias de ratos, ocorrência de 100% de infecção por parvovírus de ratos foi observada em vários biotérios, sendo RPV-1 e RMV-1 os vírus mais frequentes. Dos oito biotérios que produzem camundongos no Estado de Minas Gerais, co-infecção por

MVM e MPV em camundongos foi observada em seis biotérios (75%). Já em biotérios que produzem ratos, co-infecção por RPV-1 e RMV-1 em ratos foi observada cinco biotérios (71,4%).

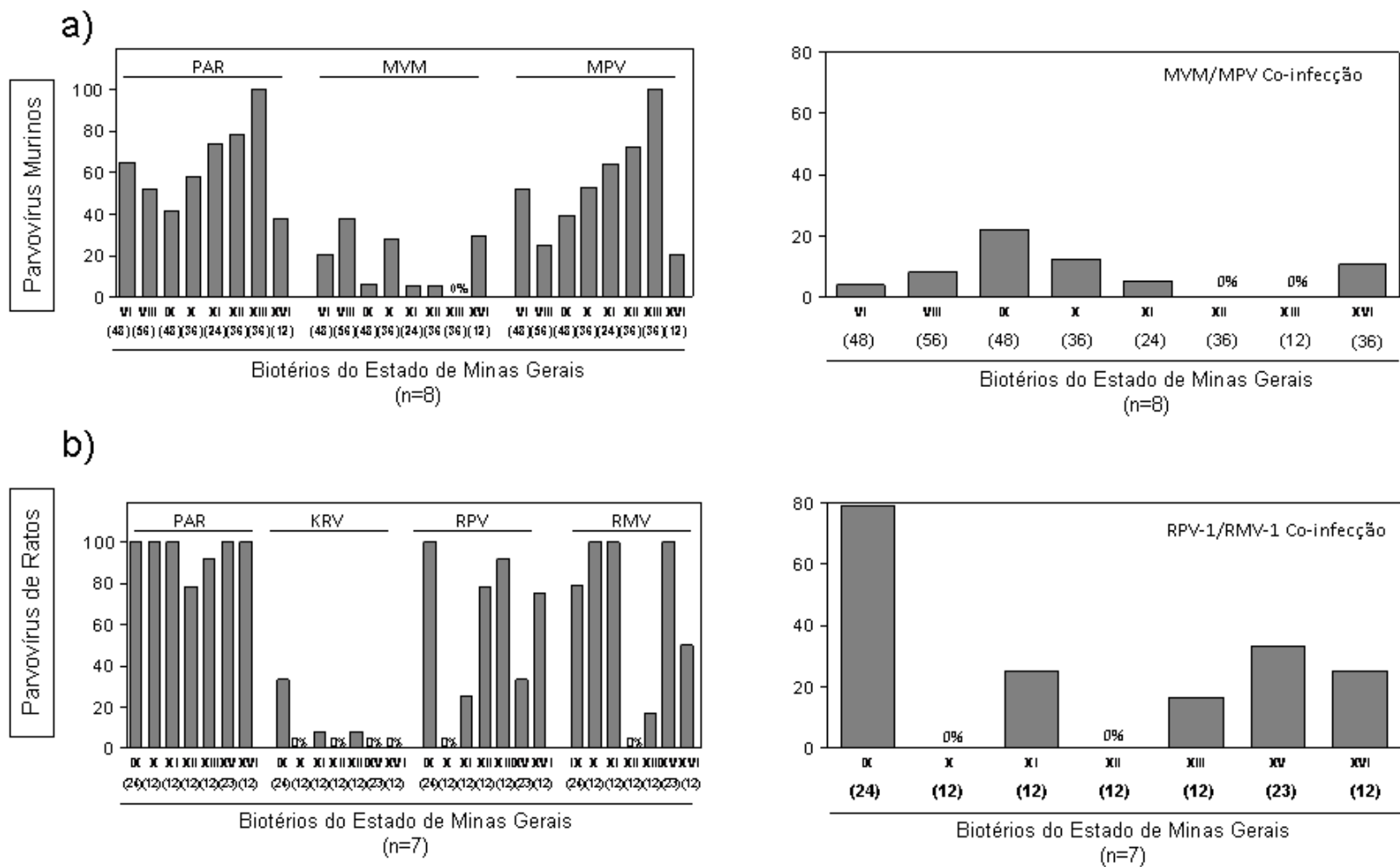


Figura 20: Ocorrência de infecção por parvovírus de roedores e co-infecção em biotérios do Estado de Minas Gerais, Brasil. a) Parvovírus murinos: PAR= Parvovírus de roedores; MVM= *Minute virus of mice*; MPV= *Mouse Parvovirus*. b) Parvovírus de ratos: PAR = Parvovírus de roedores; KRV= *Kilhan rat virus*; H-1= *H-1 parvovirus*; RPV-1= *Rat parvovirus - 1*; RMV-1= *Rat minute virus - 1*.

Com relação ao gênero dos animais avaliados, os resultados de prevalência de infecção por parvovírus de roedores em biotérios do Brasil obtidos neste estudo através de técnicas moleculares demonstraram através de análises estatísticas baseadas no teste qui-quadrado e teste exato de Fischer que não houve diferença significativa de prevalência de parvovírus de roedores entre machos e fêmeas ( $P < 0,05$ ).

#### *5.5 Sequenciamento de DNA de RPV-1 e RMV-1*

Fragmentos de DNA amplificados por ensaios de PCR RPV-1 e RMV-1 foram sequenciados e apresentaram similaridade com sequências relatadas para RPV-1 (Ball Goodrich et al., 1998) e RMV-1 (Wan et al. 2002) (Figs. 21 e 22). Estes fragmentos foram ligados em vetor PCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> (TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit, Invitrogen, EUA) para produção de controles positivos para detecção de RPV-1 e RMV-1 pela PCR, conforme descrito no item 4.11.2.



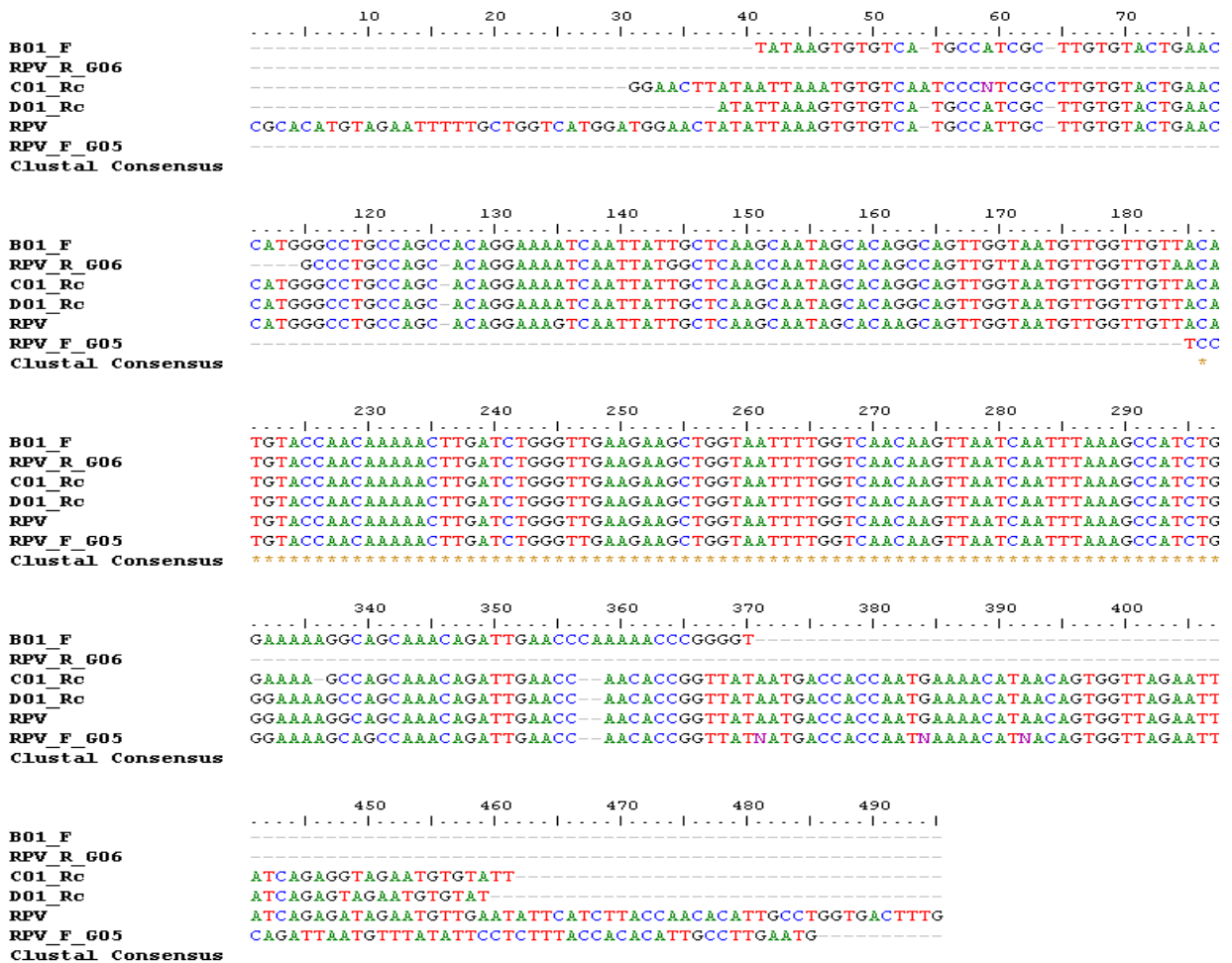


Figura 21: Alinhamento de sequências (B01\_F; RPV-1\_R\_G06; C01\_Rc; D01\_Rc e RPV-1\_F\_G05) de DNA de parovírus de rato naturalmente infectado com RPV-1 AF036710. Os alinhamentos das sequências foram gerados através do programa Clustal X2.

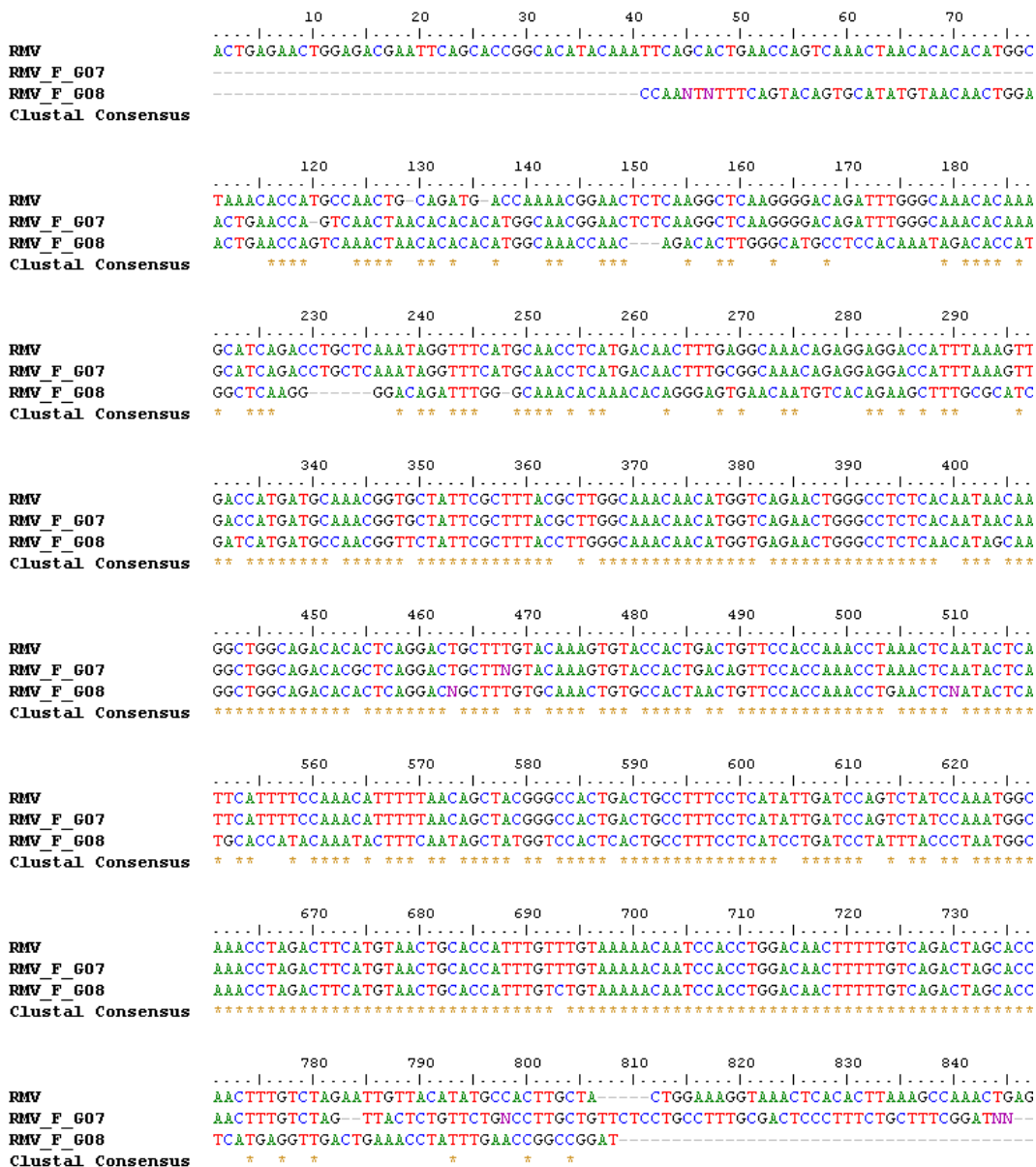


Figura 22: Alinhamento de seqüências (RMV-1\_F\_07 e RMV-1\_F\_G08) de DNA de parovírus de rato naturalmente infectado com RMV-1 AF332882. Os alinhamentos das seqüências foram gerados através do programa Clustal X2.

### 5.6 Prevalência de Parasitas em Colônias de Camundongos e Ratos de Biotérios Brasileiros

Os dados de ocorrência deste estudo foram determinados com base na porcentagem de biotérios avaliados onde uma infecção particular foi detectada.

As informações sobre prevalência de parasitas em colônias de camundongos e ratos de biotérios de Minas Gerais se encontram nas Tabelas 5 e 6 e em:

K. A Bicalho, F.T.M. Araújo, R.S. Rocha, O.S. Carvalho. **Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I - Endo e ectoparasites.** Arq Bras Med Vet Zootec. v.59, n.6, p.1478-84. 2007. (Anexo 8.3).

Os resultados demonstraram que em colônias de camundongos de três biotérios os animais foram negativos para todos os parasitos pesquisados (Tabs. 5 e 7). Já em colônias de ratos, somente em um biotério os animais apresentaram resultados negativos (Tab. 8). Nas colônias de camundongos e de ratos da maioria dos biotérios foi detectado pelo menos um parasito investigado, sendo *Syphacia sp* e protozoários os agentes mais prevalentes.

Em colônias de camundongos de 13 biotérios investigados no Estado de Minas Gerais, apenas um biotério (B) foi negativo para todos os parasitas pesquisados, sendo que 92,3% dos biotérios foram positivos para *Syphacia obvelata*, 61,5% para *Trichomonas minuta*, e 84,6% para *Entamoeba muris* (Tab. 5).

Tabela 5. Prevalência de parasitas em colônias de camundongos em 13 biotérios investigados no Estado de Minas Gerais

	Biotério (Número de animais examinados)													Total de positivos (%)
	A (48)	B (19)	C (12)	D (13)	E (48)	F (72)	G (36)	H (12)	I (12)	J (12)	K (12)	L (12)	M (36)	
<b>Ectoparasitas</b>														
<i>Myobia musculi</i>	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	0	0	1	23,1
<i>Myocoptes musculinus</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	4	2	12	0	12	38,5
<i>Radfordia affinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	15,4
<b>Helmintos</b>														
<i>Syphacia obvelata</i>	14	0	3	2	11	16	28	9	7	6	9	7	20	92,3
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4	0	23,1
<i>Hymenolepis nana</i>	0	0	0	0	6	0	0	0	0	3	0	0	0	15,4
<b>Protozoários</b>														
<i>Spiroucleus muris</i>	0	0	2	0	0	5	0	0	2	1	10	0	5	46,2
<i>Giardia muris</i>	1	0	0	0	1	6	0	3	5	0	0	0	2	46,2
<i>Tritrichomonas muris</i>	0	0	0	0	29	0	23	0	12	12	12	11	30	53,8
<i>Trichomonas minuta</i>	0	0	2	0	0	2	24	0	12	12	12	11	30	61,5
<i>Hexamastix muris</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,7
<i>Entamoeba muris</i>	6	0	4	0	9	2	13	2	4	1	4	1	10	84,6

Em colônias de ratos de sete biotérios investigados no Estado de Minas Gerais, pelo menos um dos parasitas pesquisados foi detectado em todos biotérios, sendo que 85,7% foram positivos para *Syphacia muris* e para a maioria das espécies de protozoários pesquisadas (Tab. 6).

Tabela 6. Prevalência de parasitas em colônias de ratos em sete biotérios investigados no Estado de Minas Gerais

	Biotério (Número de animais examinados)							Total de positivos (%)
	A (36)	G (24)	H (7)	I (12)	J (12)	K (12)	M (8)	
<b>Ectoparasita</b>								
<i>Poliplax spinulosa</i>	0	0	0	9	0	0	0	14,3
<b>Helmintos</b>								
<i>Syphacia muris</i>	27	0	7	11	11	10	7	85,7
<i>Trichosomoides crassicauda</i>	1	0	0	0	0	0	3	28,6
<b>Protozoários</b>								
<i>Spiroucleus muris</i>	27	3	0	2	4	7	8	85,7
<i>Tritrichomonas muris</i>	36	24	0	11	12	10	7	85,7
<i>Trichomonas minuta</i>	36	16	0	12	11	11	8	85,7
<i>Hexamastix muris</i>	1	0	0	0	0	0	0	14,3
<i>Entamoeba muris</i>	20	8	0	6	6	3	5	85,7

Os dados de prevalência de parasitas de roedores em colônias de camundongos e ratos de biotérios de diferentes regiões do Brasil se encontram nas Tabelas 7 e 8. Em colônias de camundongos de oito biotérios investigados, apenas dois (S e U) foram negativos para todos os parasitas pesquisados, sendo que *Syphacia obvelata* e *Entamoeba muris* foram os parasitas mais prevalentes (62,5%) (Tab. 7).

Tabela 7. Prevalência de parasitas em colônias de camundongos em oito biotérios investigados em diferentes regiões do Brasil

	Biotério (Número de animais examinados)								Total de positivos (%)
	N (24)	O (48)	P (36)	Q (36)	R (12)	S (47)	T (28)	U (36)	
<b>Ectoparasitas</b>									
<i>Myobia musculi</i>	1	0	0	0	2	0	0	0	25,0
<i>Mycoptes musculinus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	12,5
<i>Radfordia affinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
<b>Helmintos</b>									
<i>Syphacia obvelata</i>	7	7	3	0	8	0	5	0	62,5
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	12,5
<i>Hymenolepis nana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
<b>Protozoários</b>									
<i>Spiroucleus muris</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	25,0
<i>Giardia muris</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	12,5
<i>Tritrichomonas muris</i>	12	0	12	0	4	0	0	0	37,5
<i>Trichomonas minuta</i>	0	0	12	0	4	0	0	0	25,0
<i>Hexamastix muris</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	12,5
<i>Entamoeba muris</i>	3	0	4	7	5	0	7	0	62,5

Em colônias de ratos de seis biotérios investigados, um biotério foi negativo para todos os parasitas pesquisados, sendo que *Syphacia muris* e *Entamoeba muris* foram os parasitas mais prevalentes (66,6%) (Tab. 8).

Tabela 8. Prevalência de parasitas em colônias de ratos em seis biotérios investigados em diferentes regiões do Brasil

	Biotério (Número de animais examinados)						Total de positivos (%)
	O (12)	Q (12)	R (12)	T (11)	U (13)	V (12)	
<b>Ectoparasita</b>							
<i>Poliplax spinulosa</i>	0	0		0	0	0	0,0
<b>Helmintos</b>							
<i>Syphacia muris</i>	2	0	11	6	0	9	66,6
<i>Trichosomoides crassicauda</i>	0	0	2	0	0	0	16,6
<b>Protozoários</b>							
<i>Spironucleus muris</i>	0	0	0	0	0	5	16,6
<i>Tritrichomonas muris</i>	0	0	12	9	0	12	33,3
<i>Trichomonas minuta</i>	0	0	12	9	0	12	50,0
<i>Hexamastix muris</i>	0	0	0	0	0	0	0,0
<i>Entamoeba muris</i>	0	2	3	1	0	7	66,6

As figuras 23 a 29 ilustram os principais parasitas encontrados neste estudo.



Figura 23. Ácaro ectoparasita do camundongo *Myocoptes musculus* coletado de pelos da região cervical posterior de camundongo infestado. a) larva; b) ninfa; c) adulto. Microscopia óptica comum. Aumento 100 X.

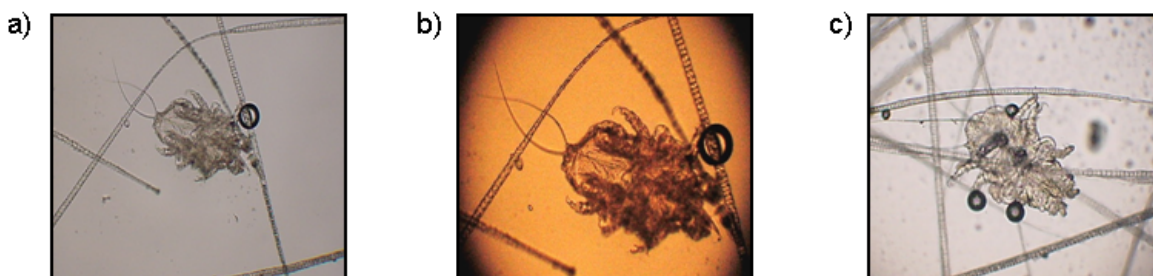


Figura 24. Ácaros ectoparasitas do camundongo coletados de pelos da região cervical posterior de camundongos infestados. Microscopia óptica comum. a) *Radfordia affinis* (Aumento 40 X); b) *Radfordia affinis* (Aumento 100 X); c) *Myobia musculi* (Aumento 100 X )

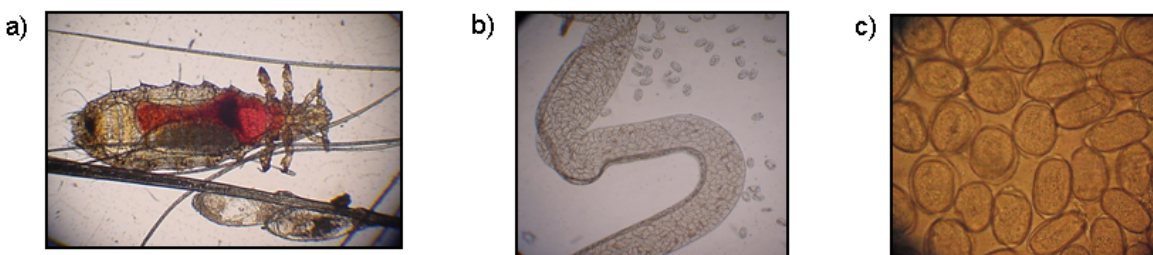


Figura 25. a) Piolho fêmea ectoparasita do rato *Poliplax spinulosa* coletado de pelos da região cervical posterior de rato infestado. Microscopia óptica comum. Aumento 100 x. b) Seguimento de fêmea do helminto endoparasita *Trichosomoides crassicauda*, coletados de bexiga urinária de rato Wistar. Microscopia óptica comum. Aumento 100 X. c) Ovos de coloração acastanhada do helminto endoparasita *Trichosomoides crassicauda*. Aumento 400 X



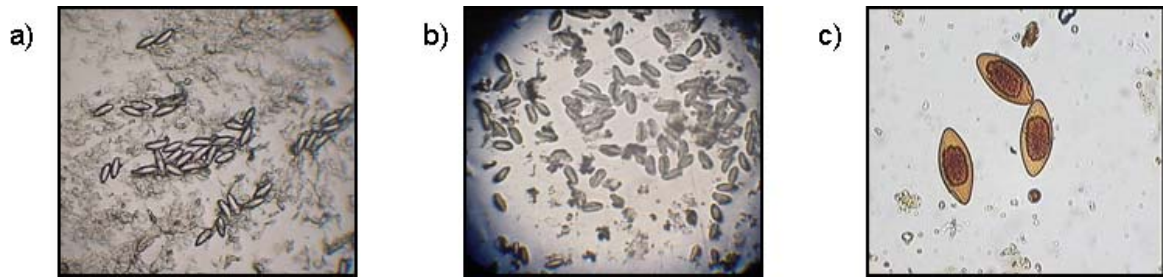


Figura 26. Ovos de endoparasitas oxiurídeos: a) *Syphacia obvelata*, ovos coletados da região peri-anal de camundongo infectado com fita gomada; b) *Syphacia muris*, ovos coletados da região peri-anal de rato infectado com fita gomada . Microscopia óptica comum. Aumento 100 X. c) *Aspiculuris tetraptera*, ovos obtidos de amostra de fezes de camundongo infectado. Coloração com solução de iodo forte. Microscopia óptica comum. Aumento 400 X.

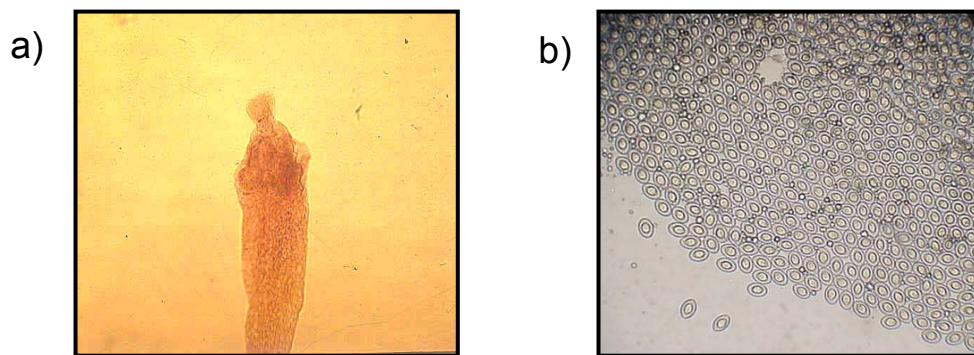


Figura 27. a) Escólex de cestódeo adulto endoparasita *Hymenolepis nana* coletado de intestino delgado de camundongo infectado. Coloração com solução de iodo forte. Microscopia óptica comum. Aumento 100 x. b) Ovos de cestódeo endoparasita *Hymenolepis nana* obtido de camundongo infectado. Aumento 100 x

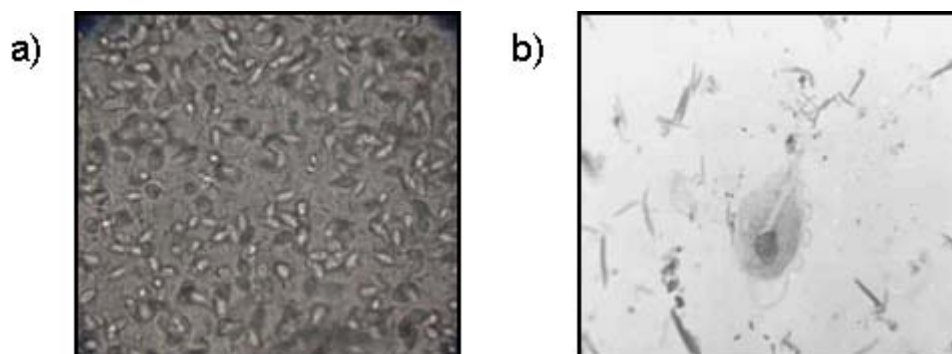


Figura 28: Trofozoítos de protozoário endoparasita *Trichostrongylus axei* obtidos de conteúdo fecal do intestino grosso (ceco) de camundongo infectado. a) Material a fresco. Microscopia óptica comum. Aumento 100 X. b) Coloração pela Hematoxilina férrica. Microscopia óptica comum. Aumento 400 X.

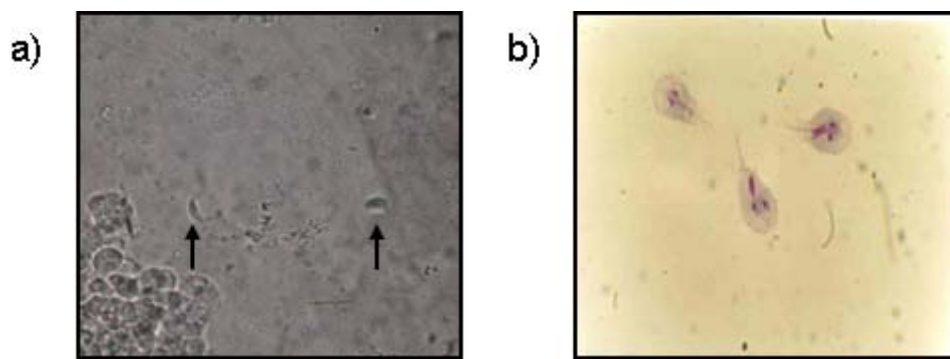


Figura 29. Trofozoítos de protozoário endoparasita *Giardia muris* obtidos de conteúdo duodenal de camundongo infectado: a) material a fresco (indicação pelas setas). Microscopia óptica comum. Aumento 100 X. b) Coloração pelo método de Giemsa. Microscopia óptica comum. Aumento 400 X.

## 6 DISCUSSÃO

A região SE é a mais populosa do Brasil e onde se encontra a maioria das instituições públicas de pesquisa e ensino do país. A maior parte das atividades realizadas neste estudo ocorreu em um Centro de Pesquisas do Estado de Minas Gerais, localizado região SE. A proximidade de instituições do local de execução deste trabalho foi um fator facilitador para o transporte e recebimento dos animais. Estes fatores justificam o porquê da maioria dos biotérios avaliados estarem localizados na região SE, sendo nove pertencentes ao estado de Minas Gerais. Porém, deve ser considerado que os biotérios avaliados neste estudo, provavelmente traduzem uma medida relativa válida de ocorrência dos patógenos investigados em colônias de camundongos e ratos de instituições de ensino e pesquisa do Brasil.

A análise das informações obtidas com o questionário para avaliação dos sistemas de barreiras sanitárias dos biotérios investigados, bem como com as visitas aos mesmos, demonstra que a maioria deles mantém colônias de camundongos e ratos sob condições convencionais. Apenas dois biotérios demonstraram possuir o conjunto completo de barreiras sanitárias de proteção eficientes para produzir e manter animais com padrão sanitário controlado. Em estudo realizado por Gilioli et al. (2000), os autores relataram resultados semelhantes ao avaliarem a existência de barreiras sanitárias através da aplicação de questionário e a ocorrência de parasitas em colônias de camundongos e ratos de 18 biotérios do Brasil. Os dados do questionário mostraram que a maioria dos biotérios analisados não possuía um sistema de barreiras sanitárias eficientes capazes de manter animais sob condições controladas, pois infestações e infecções por ecto e endoparasitas foram generalizadas nas colônias. Apenas um dos biotérios avaliados demonstrou possuir um conjunto de sistemas de barreiras sanitárias de proteção eficiente para produção e manutenção de animais com padrão sanitário SPF e gnotobiótico.

Desinfecção periódica das áreas de criação de animais foi relatada na maioria dos biotérios. Embora não exista uma rotina de limpeza universalmente aplicável, nem mesmo critérios rígidos sobre os intervalos de tempo para higienização das salas de criação, a limpeza periódica semanal reduz a

velocidade de disseminação de microorganismos e o risco de contaminações cruzadas dentro das colônias (Eaton, 1987).

Presença de autoclave foi relatada na maioria dos biotérios (70,6%), porém em apenas 53% a adoção de procedimentos de esterilização dos materiais e insumos foi descrita. Autoclave de dupla-porta é um equipamento fundamental em biotérios, que deve ser utilizado para a esterilização de materiais e insumos utilizados na área de criação de animais. Recomenda-se que sejam utilizados pelo menos duas autoclaves em um biotério, as quais devem passar periodicamente por manutenções preventivas. Assim, no caso de manutenção corretiva de uma autoclave, utiliza-se a outra para não comprometer todo o processo de esterilização de materiais e insumos. Atenções especiais devem ser dadas a água oferecida aos animais e à maravalha utilizada para forrar as gaiolas. A água deve ser potável, esterilizada e trocada freqüentemente, a fim de evitar substâncias nocivas, agentes patogênicos e oportunistas indesejáveis, principalmente protozoários (De Lucca et al., 1996; Ko e Damy, 2009). Já a maravalha, esta é uma das principais fontes de contaminação nas colônias, portanto, deve ser sempre esterilizada para evitar a propagação de doenças (Andrade et al., 2002).

Com relação às racks ventiladas, o uso deste equipamento para criação e manutenção dos animais foi relatado em 47% dos biotérios, indicando que há uma substituição gradativa do sistema aberto (estantes abertas) para o sistema fechado, pois o uso deste equipamento não foi relatado no estudo realizado por Gilioli et al., (2000).

Com relação ao sistema de ventilação e filtração do ar, em 41,2% dos biotérios foi relatado a presença deste sistema. A ventilação ambiente provê um sistema de insuflamento forçado de ar climatizado e filtrado no interior da área de criação dos animais e o ar contaminado é exaurido do interior das salas. Sistema semelhante de troca de ar ocorre no interior dos microisoladores acoplados em racks ventilados, o qual não recebe apenas o ar refrigerado. Este tipo de ventilação contribui para a proteção das colônias de contaminação com microrganismos externos e, além disso, resulta em uma diminuição dos poluentes e substâncias alergênicas em suspensão no ambiente, promovendo conforto e saúde dos animais e dos trabalhadores (Harrison, 2001).

A estratificação dos biotérios em A, B e C de acordo com o número de barreiras sanitárias permitiu a visualização de como as diferentes categorias estão distribuídas no Brasil e nas regiões brasileiras. A categoria A (09 - 12 barreiras), que agrupa 35,3% dos biotérios, sinaliza que esforços da comunidade científica estão sendo feitos para adequar os biotérios com barreiras sanitárias para produzir animais com qualidade apropriada para pesquisa científica. A categoria B (05 - 08 barreiras), que agrupa 23,5% dos biotérios e está distribuída de forma homogênea em quase todas as regiões, exceto Norte, também pode estar relacionada ao possível incremento em instalações físicas, equipamentos e procedimentos de rotina. A categoria C (01-04 barreiras), que agrupa 41,2% dos biotérios, e grande parte dos biotérios da categoria A estão localizadas no SE, pois esta foi a região que incorporou a maioria das instituições avaliadas, conforme discutido anteriormente.

A alta ocorrência de infecção por parvovírus em colônias de camundongos e ratos demonstra que estes vírus são circulantes em biotérios de instituições públicas de ensino e/ou pesquisa do Brasil. Segundo Clifford et al. (2008) estes patógenos estão entre as principais ameaças à pesquisa científica. Ao longo tempo vêm alterando resultados experimentais e são detectados tanto em biotérios convencionais, como em biotérios mantidos sob estrito sistema de barreiras com extensivo programa de monitorização de saúde animal (Janus et al., 2008).

Em relação aos resultados de comparação de ocorrência de parvovírus entre *Swiss webster* e linhagens de camundongos, a maior prevalência observada em *Swiss webster*, seguida de BALB/c corrobora com dados da literatura onde os autores relatam que estes camundongos são mais susceptíveis à infecção (Jacoby e Ball Goodrich, 1995; Jacoby et al., 1996; Riley, comunicação pessoal). Da mesma forma, a menor ocorrência observada na linhagem C57Bl/6 está de acordo com dados da literatura, onde os autores relatam que esta linhagem seja relativamente resistente à infecção, requerendo doses infecciosas 10 a 100 vezes maiores que as linhagens BALB/c ou CD1 (Besselsen et al., 2000; Skek, 2005).

Conforme relatado na literatura, os camundongos infectados não apresentaram qualquer sinal clínico que permitisse o diagnóstico clínico de infecção por parvovírus nas colônias. O caráter assintomático da doença deixa

evidente a importância de um método de diagnóstico laboratorial para detecção da infecção.

Com relação à ocorrência de infecção por parvovírus murinos relatados neste estudo, MPV foi o mais frequente nas colônias analisadas, observado em todas as regiões do Brasil, confirmando os dados de sua alta circulação indicada por Jacoby et al. (1996); Jacoby e Lindsey (1997); Livingston e Riley (2003); Besselsen et al. (2006); Pritchard-Corning et al. (2009); Mähler e Kohl (2009) e Liang et al. (2009). Com relação aos parvovírus de ratos, RRV-1 foi o vírus mais frequente nas regiões avaliadas, seguido de RMV-1 que foi detectado na região Sudeste. Os resultados corroboram com os dados de alta circulação destes vírus em colônias de ratos nos USA, Europa, Japão e Taiwan relatados por Pritchard-Corning et al., 2009; Mähler e Kohl 2009, Liang et al., 2009, Wan et. al., 2006, Schoondermark-van de Ven e Logt, 2006, e Ueno et al., 1998. KRV e H-1 também circulam em colônias de ratos de biotérios da região Sudeste do Brasil, porém com frequência bastante inferior às relatadas para RRV-1 e RMV-1, podendo ser comparadas às descritas por Pritchard-Corning et al. (2009) e Liang et al. (2009) nos USA e Taiwan.

Um levantamento sorológico realizado por Mähler e Köhl (2009) em amostras de soros de camundongos e ratos de laboratório provenientes do oeste da Europa, demonstrou que em colônias de ratos, RMV-1 foi o parvovírus mais prevalente, seguido de KRV e RRV-1, não sendo detectados anticorpos contra H-1. Já no Japão, Ueno et al., (1998) demonstrou que a prevalência de RRV-1 em colônias de ratos variou de 13 a 22% e que este agente está presente por no mínimo dez anos nas colônias japonesas. Nos EUA, Besselsen et al. (2006) testaram por PCR amostras de DNA de baço e de linfonodos mesentéricos de 381 camundongos naturalmente infectados por parvovírus e relataram que MPV foi detectado em 77% das amostras, MVM em 16% e co-infecção com MPV e MVM em 7%. Em Taiwan no ano de 2007, MPV e RRV-1 foram os vírus mais prevalentes em colônias de camundongos e ratos, respectivamente (Liang et al., 2009).

Na América do Sul, Cagliada et al. (2010) relataram alta prevalência de anticorpos (27,8% a 75%) para KRV em colônias convencionais de ratos experimentais da Argentina. Estes resultados e os apresentados no presente estudo confirmam que os parvovírus demonstram alta taxa de ocorrência em

colônias enzooticamente infectadas. Já em colônias de biotérios mantidos sob rigorosos sistemas de barreiras sanitárias de proteção, estes vírus, em especial MPV, RPV-1 e RMV-1 continuam circulantes com baixas taxas de prevalência indicando infecção persistente e de difícil erradicação, sendo considerados agentes de alto risco e que devem ser monitorados frequentemente (Clifford e Watson, 2008; Mähler e Kohl, 2009). No Brasil, um levantamento sorológico de ocorrência de vírus de roedores em 18 biotérios brasileiros foi realizado por Gilioli et al. (1996) através de técnicas de IFI e IHA. Com relação aos parvovírus, os autores relataram uma ocorrência média de 47,1% de MVM em colônias de camundongos e de 36,4% em colônias de ratos, nas quais também foram detectadas ocorrências de 63,6% para KRV e de mesmo valor para H-1. Assim como ocorreu em inúmeros laboratórios de diagnóstico de agentes infecciosos de roedores para finalidade científica em diferentes continentes, os resultados do estudo em questão podem ter sido superestimados para MVM. MPV pode ter contribuído para os resultados atribuídos a prevalência de MVM em camundongos assim como RPV-1 e RMV-1 podem ter contribuído para os resultados atribuídos a prevalência de MVM em colônias de ratos. Na ocasião, iniciava-se a descrição dos novos parvovírus na literatura e não havia testes de diagnóstico específicos disponíveis para detecção destes agentes. Considerando os resultados de ocorrência de MVM obtidos por Gilioli e colaboradores como indicação genérica de infecção para parvovírus de roedores em colônias de camundongos, observa-se que ele é superior ao relatado neste estudo através da IFI (PAR = 18,3%) e inferior ao relatado pela PCR (PAR=73,7%). Com relação às colônias de ratos, os resultados de MVM relatados por Gilioli como indicação genérica são similares aos obtidos para RPV-1 ou RMV-1 no presente estudo, através da IFI e inferiores ao relatado pela técnica de PCR. Com relação à KRV e H-1 os resultados de Gilioli e colaboradores foram muito superiores aos observados no presente estudo tanto pela IFI quanto pela PCR.

Uma exata comparação dos dados ocorrência e prevalência de agentes parasitários e infecciosos de roedores de laboratório em diferentes estudos nem sempre é possível, porque estes diferem na forma de indicação das amostras positivas que podem ser a porcentagem de biotérios avaliados onde uma infecção particular foi detectada (no caso de Gilioli et al. (1996), (2000));

porcentagem de amostras (grupos de amostras coletadas de animais de uma única população) na qual no mínimo uma foi positiva ou porcentagem de amostras positivas testadas individualmente (no caso deste estudo). Contudo, podemos inferir que atualmente MPV é o parvovírus mais frequente em colônias de camundongos e RPV-1 e RMV-1 são os parvovírus mais frequentes em colônias de ratos de biotérios do Brasil, concordando com Schoondermark-van de Vem e Logt (2006); Mähler e Kohl (2009); Pritchard-Corning et al. (2009). Com relação à KRV e H-1 os dados atuais sugerem que tenha diminuído consideravelmente a frequência destes vírus em colônias de ratos do Brasil, ao contrário do que foi descrito recentemente por Cagliada et al. (2010), onde os autores relataram alta prevalência de KRV em colônias de ratos convencionais da Argentina.

Com relação à frequência de infecção por parvovírus de roedores em colônias de camundongos e ratos nas regiões N, NE, CO e S, deve-se ressaltar que o número de animais examinados em cada região foi bastante inferior ao da região SE por razões discutidas anteriormente. Apesar disso, os vírus com maior taxa de circulação (MPV e RPV-1) foram detectados tanto na região SE, como nas demais regiões avaliadas. Já os vírus RMV-1, KRV e H-1 foram detectados somente na região SE, provavelmente devido às precárias condições de alguns biotérios avaliados. Baseando-se no exposto, para confirmação dos dados de ocorrência obtidos fora da região SE, uma nova pesquisa será necessária, devendo ser avaliado um maior número de animais.

Os resultados de ocorrência de infecção por parvovírus de roedores versus os sistemas de barreiras sanitárias de proteção em biotérios do Brasil permitiram a visualização da relação inversa existente entre o número de barreiras e a frequência dos vírus, ou seja, quanto menor o número de barreiras, maior a frequência dos vírus avaliados. Barreiras sanitárias podem ser definidas como sendo os sistemas que combinam aspectos construtivos, equipamentos e métodos operacionais, sendo que a contenção é alcançada a partir da combinação apropriada destes três elementos fundamentais (Pessoa et al., 2008). Embora os biotérios da categoria A apresentem um número razoável de barreiras sanitárias, eles ainda possuem um número significativo de colônias infectadas com parvovírus. Este fato provavelmente está relacionado às falhas nas barreiras de contenção que propiciam a entrada



destes vírus e outros patógenos nas instalações. Além disso, é possível que no programa de monitoração de saúde animal destes biotérios sejam utilizadas técnicas de diagnóstico sorológico com baixa sensibilidade de detecção de parvovírus de roedores, como por exemplo, ELISA convencional. A alta ocorrência de parvovírus observada em biotérios da categoria C está relacionada às suas precárias condições de infraestrutura e sistemas de barreiras de proteção, o que propicia a contaminação dos animais com inúmeros agentes patogênicos e oportunistas.

Vale a pena ressaltar que embora em 47 % dos biotérios foi relatado o uso de racks ventiladas com microisoladores e top – filtro em substituição às estantes com gaiolas abertas, os animais ainda permanecem infectados. Este fato demonstra que instalação apropriada e outras medidas de controle como depopulação de animais contaminados, desinfecção de ambiente, repopulação com animais SPF, uso de duchas sanitizantes para adentrar às áreas de criação e desinfecção e esterilização de materiais e insumos é fundamental para produção de animais com padrão de qualidade apropriada para pesquisa biomédica (Gilioli, 2003).

Em biotérios sob rígidos sistemas de barreiras sanitárias, parvovírus podem ser eliminados de matrizes reprodutoras infectadas através de rederivação cesariana asséptica ou por transferência de embriões, ou por depopulação e repopulação com colônias SPF, desde que seja realizada cuidadosa desinfecção das instalações e que sejam investigadas as fontes de infecção, como por exemplo, contato de roedores silvestres ou importados, animais, pessoas, materiais infectados provenientes de salas do mesmo biotério e materiais biológicos. A prevenção de infecção por parvovírus deve ser realizada por meio do controle dos fatores de risco que são associados com as prováveis fontes de infecção (Shek, 2003; Brayton et al., 2004).

Além disso, é importante ressaltar que programas de quarentena são necessários para que os animais novos ou materiais biológicos possam ser isolados até o momento serem atestados livres de contaminantes, para em seguida serem introduzidos em biotérios com padrão sanitário controlado (Rehg e Toth, 1998; Gilioli, 2003).

A ocorrência de infecção por parvovírus murinos e de ratos em biotérios da região SE do Brasil, demonstra que embora estados como São Paulo e Rio de

Janeiro que concentram a maioria dos biotérios da categoria A do Brasil, possuem um número significativo de colônias infectadas com parvovírus, indicando a necessidade de avaliação dos fatores de risco de infecção por estes vírus e por outros patógenos, de descontaminação das áreas, de repopulação das salas de criação com animais SPF e de uso de técnicas de diagnóstico com maior precisão para diagnóstico de parvovírus nos programas de monitoração de saúde animal.

A elevada ocorrência de infecção por parvovírus de roedores e presença de co-infecção por parvovírus murinos (MVM e MPV) e de ratos (RPV-1 e RMV-1) observadas em um número significativo de biotérios do Estado de Minas Gerais confirma que as condições de infra-estrutura e de sistema de barreiras de proteção dos biotérios da categoria C são precárias.

Embora nestes últimos anos tenham sido feito esforços concretos para melhoria da infraestrutura (instalações e equipamentos) dos biotérios das instituições públicas de ensino e pesquisa de Minas Gerais através de recursos obtidos pela Rede Mineira de Bioterismo frente à FAPEMIG, outras agências financiadoras e pelas próprias instituições, a qualidade dos camundongos e ratos de laboratório produzidos no Estado ainda está aquém do padrão exigido pelas normas internacionais da moderna ciência da experimentação animal. Diante disso, se faz necessário a implementação de programas sustentáveis de modernização dos biotérios de produção e experimentação, desenvolvidos em conjunto com profissionais qualificados da área da ciência de animais de laboratório, buscando adequar e melhorar não somente a infra-estrutura, mas também a formação de pessoal técnico para manejo e manutenção de colônias de animais de laboratório (Silva et al., 1994; Gilioli et al., 2003).

A ocorrência de infecções por parvovírus nas colônias de camundongos e ratos avaliadas foi influenciada pela metodologia utilizada, de modo que um grande número de animais positivos foi detectado através da PCR. Besselsen et al. (2008) relatam que esta técnica parece ser a mais eficiente para a identificação de infecção de parvovírus em tecidos-alvo de roedores, como linfonodos mesentéricos e baço. A alta sensibilidade e especificidade deste método de diagnóstico permitem a identificação de infecção ativa e, portanto, de surtos agudos em animais que ainda não soroconverteram. Este fato pode explicar os resultados discrepantes observados na prevalência de infecção de

parvovírus murinos deste estudo, onde na região Norte, 100% dos animais foram positivos pela PCR e nenhum animal positivo foi detectado através de métodos sorológicos. É importante lembrar que a sorologia proporciona uma medida indireta de exposição ao agente, enquanto a PCR detecta diretamente a presença do agente (Livingston e Riley, 2003).

Apesar da técnica de PCR ter sido capaz de detectar maior número de animais positivos neste estudo, análises comparativas de resultados sorológicos e moleculares de infecção por parvovírus em camundongos (PAR, MVM e MPV) demonstraram que não houve concordância total entre as duas técnicas de diagnóstico. Dos 106 animais (18,3%) com sorologia (PAR) positiva, 42 não foram detectados através da técnica de PCR. Por outro lado, análises comparativas de resultados sorológicos e moleculares de infecção por parvovírus em ratos (PAR, KRV e H-1) demonstraram que dos 68 animais (40,7%) com sorologia (PAR) positiva, apenas três não foram detectados através da técnica de PCR. Duas hipóteses podem explicar os resultados negativos de PCR dos camundongos com sorologia positiva. Primeiro, as colônias de camundongos avaliadas foram provenientes de biotérios com diferentes sistemas de barreiras de proteção, sendo que alguns possuíam sistemas rígidos de barreiras. Provavelmente os animais destes locais possuíam baixo nível de infecção que não foi detectável pela PCR qualitativa devido a fatores intrínsecos desta metodologia de diagnóstico, cuja sensibilidade pode ser comprometida devido a fatores como inibidores de polimerase, quantidade ou qualidade do DNA da amostra teste, dentre outros. Segundo, dos 42 camundongos com sorologia positiva e PCR negativa para infecção por parvovírus, 12 possuíam idade superior a seis meses. Animais mais velhos possuem populações menores de células se dividindo ativamente quando comparados a animais jovens (com menos de 12 semanas), fase em que a detecção de infecção ativa é mais provável. É possível que os animais mais velhos tenham sido expostos ao agente e que tenham desenvolvido resposta de anticorpos detectáveis pela sorologia, mas que a infecção tenha clareado, justificando o resultado negativo pela PCR (Livingston e Riley, 2003).

A concordância de positividade observada entre sorologia e PCR para diagnóstico de infecção por parvovírus nas colônias de ratos avaliadas era esperada. Os animais avaliados possuíam a mesma faixa etária e a grande

maioria era proveniente de biotérios com precários sistemas de barreiras, favorecendo a exposição dos mesmos a alta carga infecciosa de agentes patogênicos.

No que se refere à sensibilidade de técnicas de diagnóstico sorológico para detecção de infecção por parvovírus de roedores, melhores resultados de sensibilidade são relatados através do uso de ELISA preparado com antígenos recombinantes. O primeiro a ser desenvolvido foi ELISA rNS1 (Riley et al., 1996) que pode ser usado para triagem genérica de soroconversão para parvovírus de roedores devido a alta homologia genética deste gene conservada entre as espécies. Para diferenciação viral, ELISA que utiliza rVP2 como antígeno foi desenvolvido pelo fato deste gene ser divergente entre as espécies. VP2 é o principal constituinte de capsídeos de parvovírus e, portanto, tem sido utilizada como antígeno para detecção de MPV outros parvovírus. ELISA MPV rVP2 produzido em baculovírus – células infectadas de inseto (Lindsay et al. 2002) se arranjam em partículas “virus-like”, que demonstram seletividade sorológica equivalente a partícula natural do vírus, (Shek , 2003, Besselsen et al., 2008). Além disso, Besselsen et al. (2000), relata que MPV IFA e MPV HAI são técnicas mais sensíveis do que MVM IFA, principalmente para detectar MPV em camundongos com idade superior a 12 semanas. Camundongos inoculados com MPV com 4 a 8 semanas de idade produziram anticorpos contra a proteína NS detectáveis e camundongos inoculados com 12 semanas não. MPV IFA e MPV IHA podem detectar anticorpos contra proteínas estruturais (VP) que estão presentes na ausência de infecção viral produtiva. Portanto, Shek (2003) relata que evidências experimentais mostram que a resposta de anticorpos a NS1 pode ser ausente ou atrasada quando comparada a resposta a VP2.

Com relação à sensibilidade de técnicas de diagnóstico molecular, PCR Real-time (Fluorogenic Nuclease PCR “assays” ou PCR *TaqMan*) tem sido amplamente utilizada para diagnóstico de infecção ativa por parvovírus de roedores em colônias com baixas taxas de prevalência que indicam infecção persistente de difícil detecção (Redig e Besselsen, 2001). Esta técnica possui inúmeras vantagens sobre a técnica de PCR com detecção em gel, como por exemplo, eliminação de contaminantes indesejáveis e aumento da especificidade via sonda interna. Assim tem sido empregada para diagnóstico

de vários patógenos de roedores de laboratório, como *Helicobacter* spp. (Drazenovich, et al., 2002), coronavírus de roedores (Besselsen et al., 2002), Vírus Sendai e Vírus da Pneumonia do Camundongo (Wagner, et al., 2003), Reovírus tipo 3 (Uchiyama e Besselsen, 2003) e Vírus da Coriomeningite Linfocítica (Besselsen et al., 2003).

Segundo Compton e Riley (2001) e Livingston e Riley (2003) é essencial enfatizar que na prática nenhum teste de diagnóstico é 100% sensível ou 100% específico, pois há sempre a chance de obter resultados falso-negativos ou falso-positivos. Tanto as técnicas sorológicas quanto as moleculares possuem pontos fortes e pontos fracos e, portanto, nenhum método isolado deve ser usado para todos os testes em programas de monitoração de saúde de animais de laboratório. O uso coletivo de diversos métodos é determinante para detecção precisa e para identificação de fases de infecções.

Laboratórios de referência que realizam programa de monitoração de saúde animal no Brasil têm envidado esforços no sentido consolidar diretrizes para implantação de metodologias com maior precisão para diagnóstico de patógenos e agentes oportunistas de roedores utilizados para pesquisa, através de aquisição de equipamentos e formação de recursos.

Com relação à pesquisa de ecto e endoparasitas realizada neste estudo em colônias de camundongos e ratos de biotérios do Brasil, os resultados demonstraram que parasitas não foram detectados em colônias de camundongos de três biotérios e em colônias de ratos de apenas um biotério, sendo estes biotérios mantidos sob rígidos sistemas de barreiras de proteção. Porém, na maioria dos biotérios foi detectado pelo menos um dos parasitas pesquisados, demonstrando a deficiência ou ausência de barreiras sanitárias. Os endoparasitas *Syphacia* spp. e a maioria das espécies de protozoários pesquisados foram os parasitas mais prevalentes nas colônias de animais dos biotérios investigados .

A elevada prevalência observada para *Syphacia obvelata* e *Syphacia muris* em colônias de camundongos e ratos, demonstram a distribuição mundial desses helmintos em biotérios mantidos sob condições convencionais. (Baker 2006; Liang et al., 2009, Pritchett-Cornin et al., 2009). Tal fato também pode ser devido ao curto ciclo de vida destes nematóides que podem induzir

infecção em um grande número de animais em curtos períodos de tempo (Zenner e Regnault, 2000; Bazzano et al, 2002).

Com relação aos protozoários *Trichomonas Muris*, *Tritrichomonas minuta*, *Hexamastix muris* e *Entamoeba muris*, estes são considerados comensais não relacionados com alterações da saúde dos animais ou interferências em resultados experimentais até o momento. Por outro lado, *Spironucleus muris* e *Giardia muris*, protozoários de importância clínica elevada, também foram detectados em biotérios deste estudo. Infecções leves por estes patógenos em animais imunocompetentes é geralmente assintomática e subclínica. Já em infecções mais graves, sinais clínicos como diarreia, calafrios, letargia, perda de peso e raquitismo podem ser observados (Hsu, 1982; Gilioli, 2003, Baker, 2006 Wasson, 2007).

Quanto aos ectoparasitas pesquisados, as colônias de camundongos apresentaram maior taxa de infestação por *Myocoptes musculinus*, confirmando a alta prevalência deste ectoparasita em animais convencionais (Owen, 1992; Bressan et al., 1997; Jacoby, et al., 1997; Gilioli et. al, 2000; Baker, 2006). O piolho ectoparasita *Poliplax spinulosa* foi detectado em uma colônia de ratos. Esta espécie de piolho tem sido relacionada como vetor biológico de *Haemobartonella muris* e *Rickettsia typhi* e como provável vetor de *Trypanosoma lewisi* (Khachoian e Arakelian, 1978). A presença de ectoparasitas em colônias de camundongos e de ratos indica precariedade de rotinas de manejo e ausência de barreiras sanitárias de proteção (Jacoby e Lindsey, 1997). Em colônias mantidas sob sistemas de barreiras de proteção, ectoparasitas estão ausentes ou raramente são detectados (Gilioli, 2003).

O cestódeo *Hymenolepis nana*, parasita que pode ser encontrado em colônias de camundongos e de ratos mantidos sob condições convencionais, foi detectado em dois biotérios. Este parasita possui potencial zoonótico e suas características de auto-infecção e ciclo direto contribuem para manter a re-infecção dos animais nas colônias (Fox et al., 1984; Gilioli et al., 2000). É importante ressaltar que roedores silvestres são importantes fontes de contaminação em biotérios e a manipulação de animais contaminados por pesquisadores e demais profissionais está associada ao risco de transmissão de zoonoses como himenolepidiose, coriomeningite linfocitária, hantavíroses,

leptospirose e salmoneloses (Hotchim et al., 1976; Fox et al., 1984; Lloyd et al., 1984; Detmer, 1994; Gilioli, 2003; Müller, 2008).

Ainda sobre os helmintos pesquisados, em três biotérios foi detectado o endoparasita *Trichosomoides crassicauda* que se aloja na bexiga urinária de ratos. “A infecção por este patógeno tem sido associada à eosinofilia, à presença de leucócitos globulares no trato urinário, vesículas e tumores. Além disso, a migração de larvas para os pulmões pode aumentar a incidência de doenças respiratórias crônicas, tornando os animais impróprios para a pesquisa” (Zubaidy e Majeed, 1981).

Animais infestados e infectados com ecto e endoparasitas, não são indicados para uso em pesquisa científica, devido a influências negativas em resultados experimentais. Embora a maioria dessas infecções seja subclínica, elas são relevantes, pois são capazes de afetar a fisiologia do animal, levando a alterações em parâmetros imunológicos, histológicos, bioquímicos, nutricionais e hematológicos, além de afetar a susceptibilidade a outros agentes infecciosos (Owen, 1992; Pinto et al., 1994; Gilioli, 2000; Bazzano et al., 2002; Baker 2006; Pritchett, 2007).

O controle de infestações por ectoparasitas e endoparasitas pode ser realizado através do uso de diversos tipos de drogas antiparasitárias existentes no mercado, sendo tiabendazole, albendazole e o endectocida ivermectina um dos mais utilizados (Jacob e Gaertner, 2006). No caso de controle de ectoparasitas, os inseticidas podem ser aplicados na forma de banhos de imersão, borrifados diretamente sobre a pelagem do animal, administrados por via subcutânea ou ainda misturados à cama ou na água dos bebedouros. “O controle de helmintos pode ser feito por meio de uso de várias drogas anti-helmínticas, isoladas ou em combinação, de acordo com vários protocolos descritos na literatura” (Gilioli, 2003). É importante ressaltar que a maioria das drogas antiparasitárias altera a fisiologia de camundongos e ratos, comprometendo o uso dos mesmos em determinadas pesquisas científicas. Os efeitos colaterais de cada droga devem ser avaliados e quando tratamento químico não é recomendado, a eliminação de parasitas nas colônias deve ser feito por meio de rederivação cesariana, após cuidadosa desinfecção ambiental (Jacob e Gaertner, 2006).

Com relação ao controle de protozoários, “a administração de solução aquosa de sacarose a 1% (p/v) contendo metronidazol ou tinidazol a 2,5mg/ml na água dos bebedouros tem mostrado ser eficiente na eliminação de *T. muris* (Roach et al., 1988). Dimetridazole 0,1% (p/v) na água dos bebedouros durante 14 dias e cloroquina, quinacrina ou amodiaquina são efetivos no tratamento de doenças clínicas causadas por *Giardia muris* e *Spironucleus muris*, porém não erradicam a infecção” (Gilioli, 2003).

Os resultados deste estudo demonstram a importância do monitoramento de saúde de camundongos e ratos de laboratório e devem estimular a comunidade científica investir em melhorias da qualidade microbiológica dos animais utilizados para fins de pesquisa, ensino e controle de qualidade de imunobiológicos através da elaboração e implementação de programas sustentáveis de adequação dos biotérios de produção e experimentação animal. Portanto, investimentos maciços devem ser feitos em instalações, equipamentos e principalmente na formação de profissionais devidamente qualificados para manejo e manutenção de colônias de animais de laboratório com padrão sanitário apropriado para a pesquisa biomédica, conforme os padrões internacionais.



## 7 CONCLUSÕES

- ✓ A maioria dos biotérios avaliados não possui instalações e barreiras sanitárias de proteção apropriadas para evitar a transmissão de infecções e infestações por patógenos.
- ✓ A ocorrência de parvovírus de roedores variou de acordo com o método de diagnóstico empregado, sendo detectada maior positividade pela técnica de PCR. Alta ocorrência de parvovírus de roedores foi observada em camundongos e em ratos, sendo MPV e RPV-1 os vírus mais freqüentes e detectados em todas as regiões geográficas do Brasil avaliadas.
- ✓ A ocorrência de parvovírus de roedores foi menor em biotérios da categoria A, ou seja, com maior número de barreiras sanitárias e maior em biotérios da categoria C, ou seja, com menor número de barreiras sanitárias.
- ✓ Análises de concordância realizadas pelo índice *Kappa* demonstraram não haver concordância ou concordância fraca entre os métodos de diagnóstico sorológicos e molecular para detecção de infecção por parvovírus de roedores.
- ✓ Na região SE, parvovírus foram detectados por PCR em biotérios dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Porém, elevada ocorrência de parvovírus murinos e de ratos, co-infecções por MVM e MPV e por RPV e RMV foi detectada em amostras de roedores de biotérios de instituições públicas de ensino e/ou pesquisa do Estado de Minas Gerais.
- ✓ Colônias de camundongos de três biotérios e de ratos de um biotério foram negativas para todos os parasitas pesquisados. Porém, a maioria dos biotérios avaliados possui alta ocorrência de parasitas, sendo o helminto *Shypacia spp.* e protozoários os mais frequentes em colônias de camundongos e ratos.

## 8 ANEXOS

### Anexo 8.1

#### Questionário: Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos Biotérios de Produção

##### 1. Identificação

Data: -----/-----/-----

Nome da Instituição: -----

Endereço: -----

Bairro: -----Cidade: ----- Estado:- ----

CEP: -----Telefone: (----) ----- Ramal:-----

FAX:- ----- E-mail:-----

Responsável pelo Biotério: -----

Formação Profissional: -----

##### 2. Possui outros Biotérios além do Biotério de Produção?

( ) Experimentação ( ) Manutenção ( ) Outro (especificar) -----

##### 3. Tipo de Biotério quanto ao status sanitário:

( ) Convencional ( ) SPF ( ) Outro (especificar) -----

##### 4. Tipos de animais produzidos pela instituição e quantitativo anual (especificar a espécie e a linhagem):

( ) Ratos -----

( ) Hamsters -----

( ) Camundongos heterogênicos -----

( ) Camundongos isogênicos -----

5. Número de salas de criação de animais: -----

6. Número de animais por sala: -----

##### 7. Infra-estrutura

- a). As áreas de entrada e de saída de materiais são separadas?  
 Sim       Não
- b). Possui área de quarentena?  
 Sim       Não
- c) Existe sistema de ventilação com climatização e filtração do ar?  
 Sim       Não
- d) É realizado um controle diário da temperatura das salas de criação?  
 Sim       Não

#### 8. Equipamentos

- a) Quais equipamentos existem no Biotério?  
 Autoclave (s)       Estante (s) ventilada (s)  
 Rack (s) ventilado (s)       Máquina de lavar gaiolas  
 Outros (especificar) -----  Nenhum

#### 9. Acesso dos técnicos às instalações

- a) É obrigatório o uso de duchas sanitizantes?  
 Sim       Não
- b) Quais acessórios são obrigatórios para o acesso ao Biotério?  
 Uniforme específico       Avental  
 Luvas       Máscara       Gorro       Pantufas  
 Outros (especificar) -----  Nenhum

#### 10. Manejo

- a). Quais os métodos utilizados para a sanitização de materiais e insumos?

Método sanitizante	Materiais e insumos				
	Ração	Água	Maravalha	Gaiolas	Uniformes
Autoclavagem					
Desinfec. Química					
Outros					
Nenhum					

- b) Animais de espécies diferentes são mantidos numa mesma área do biotério?  
 Sim       Não

c) Os animais são criados em microisoladores?

( ) Todos ( ) Parte ( ) Não

d) Qual é a frequência de desinfecção das áreas do biotério?

( ) Diária ( ) Semanal ( ) Quinzenal ( ) Mensal

( ) Outra (especificar) ( ) Não realiza desinfecção

e) Realiza algum tratamento medicamentoso nas colônias?

( ) Sim (especificar) -----

( ) Não

11. Controle de qualidade sanitária

a) Possui programa de monitoramento da saúde dos animais?

( ) Não

( ) Parasitológico ( ) endoparasitas ( ) ectoparasitas

( ) Bacteriológico ( ) Viroológico

b) Qual a frequência dos exames realizados?-----

12. Tipo de dieta oferecida aos animais: -----

13. Recursos Humanos

a) Possui pessoal técnico qualificado para o trabalho?

( ) Sim (formação ou curso de especialização realizado)----- ( )

Não

b) O número de técnicos é suficiente para realizar o trabalho?

( ) Sim ( ) Não

c) É realizado treinamento periódico do corpo técnico?: ( ) Sim ( ) Não

## Anexo 8.2

Sanitary conditions of animal houses and occurrence of rodent parvoviruses in Brazilian mouse and rat colonies. J Am Assoc Lab Anim Sci – Submetido (11-000047)

Autores:

Kelly A Bicalho,<sup>1,\*</sup> Rovilson Gilioli<sup>2</sup>, Olindo A Martins-Filho<sup>1</sup>, Aretta AA Gomes<sup>1</sup>, Ângela C Volpini<sup>1</sup>, Daniele MR Demolin<sup>2</sup>, Flávio G Da Fonseca<sup>3</sup>, Alvaro J. Romanha<sup>1</sup>

Institutional affiliations:

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG; Brazil;

<sup>2</sup>Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, UNICAMP, Campinas, SP;

Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Microbiologia, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

\*Corresponding author: Email: [bkelly@cpqrr.fiocruz.br](mailto:bkelly@cpqrr.fiocruz.br)

Running head: Rodent parvoviruses in Brazilian animal houses

Abbreviations: VP, virion protein; NS, nonstructural protein; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFA, immunofluorescent assay; HAI, hemagglutination inhibition; PAR, rodent parvovirus; MVM, *Minute virus of mice*; MPV, *Mouse parvovirus*; KRV, *Kilhan rat virus*; H-1, *H-1 parvovirus*; RPV-1, *Rat parvovirus -1*; RMV-1, *Rat minute vírus - 1*.

## **Abstract**

The sanitary conditions of 17 Brazilian animal houses and the occurrence of rodent parvovirus infections in 563 mice and 167 rats were evaluated. Data on sanitary barriers and health monitoring program were obtained through the application of a standardized questionnaire. Serological (IFA and IHA) and molecular (PCR) methods were used for diagnosis. Results show that most of the animal houses do not present appropriate protective sanitary barriers to prevent transmission of infections, although an improvement in infrastructure and routine procedures was observed when compared to previous studies. Occurrence of rodent parvovirus varied according to the diagnostic method. The occurrence of murine parvoviruses assessed by serological methods was 18.3% (MVM 6.2%; MPV 12.3%) and the positivity ranged from 0.0 to 22.5% in different geographic regions. The occurrence assessed by PCR was 49.2% (MVM 12.3%; MPV 43.5%) and positivity ranged from 16.7 to 100.0%. The occurrence of rat parvoviruses assessed by serological methods was 40.7% (H-1 1.8%; KRV 3.0%; RPV-1 or RMV-1 35.9%) and positive samples were detected only in the Southeast region (51.5%). The occurrence assessed by PCR was 73.7% (KRV 6.0%; RMV-1 37.7%; RPV-1 54.5%), and positivity ranged from 25.0 to 100.0%. H-1 was not detected using PCR. As expected, occurrence of rodent parvoviruses was inversely proportional to the number of sanitary barriers on given facility. MPV and RPV-1 were the most frequently detected viruses. Statistical analysis revealed either no correlation or weak correlation between the serological and molecular diagnostic methods.

## Introduction

Parvoviruses are important viral pathogens in laboratory rats and mice. It has been shown that a high occurrence is found not only in conventionally housed rodents, where these viruses' presence tend to be higher, but also in animals maintained behind strict sanitary barrier systems and subjected to extensive health surveillance programs.<sup>8,11,12,13,19,26,33,39</sup> These viruses are among the smallest known, measuring 15-28 nm in diameter, non-enveloped and with a single-stranded DNA genome of approximately 5 Kb. The genomes of members of the *Parvovirus* genus encode two non-structural proteins (NS-1 and NS-2) which are highly conserved among different species and account for prominent cross-reactivity in generic serological assays. The capsid proteins (VP-1, VP-2, VP-3) are virus-specific and form the basis for serological and molecular differentiation between species.<sup>10</sup> Two distinct species can naturally infect laboratory mice: the *Minute virus of mice* (MVM) and the *Mouse parvovirus* (MPV). Each one contains multiple variants. Clinical disease in mice has never been documented in natural infections.<sup>1,4,7,15</sup> Rat parvoviruses include Rat virus (RV) or *Kilham rat virus* (KRV), *H-1 parvovirus* (H-1), *Rat parvovirus -1* (RPV-1) and *Rat minute virus -1* (RMV-1). Of these, RV is the only species reported to cause clinical disease in rats. The other parvoviruses are antigenically distinct from RV.<sup>2,27,46,48,49</sup>

Regarding the diagnosis of these viruses, serology is regarded as essential for primary detection of infections because they are frequently asymptomatic. Until the 1980's, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using whole virions or immunofluorescence assays (IFA) using infected cells as generic

antigens were used to detect all known species. Hemagglutination inhibition (HAI) was employed to directly distinguish KRV, H-1 and MVM infections.<sup>25,44,45</sup>

After the report of newer parvoviruses (MPV, RPV-1 and RMV-1)<sup>1,2,35,48</sup> the diagnosis of rodent parvovirus infections became dependant on the complementary use of several methods. Multiple diagnostic assays were developed based on serology and PCR.<sup>6,8</sup> The new identified parvoviruses are poorly grown in cell culture or have not yet been cultivated *in vitro*, making it difficult to produce sufficient quantities of antigens to use in serological assays. This difficulty was circumvented by the production of recombinant viral antigens.<sup>8</sup> The first test using such recombinant antigens was a rNS-1 ELISA from MVM which can detect infections caused by parvoviruses of mice and rats, once NS-1 is highly conserved among rodent parvoviruses.<sup>25,41</sup> Afterwards, an ELISA test using rVP2 antigens from MPV and other parvoviruses expressed in *E. coli* or baculovirus was developed.<sup>3,16,29,32</sup> Nonetheless, some diagnostic laboratories still employ HAI as complementary technique to distinguish new parvovirus infections on the basis of an MVM HAI negative result associated with an MVM IFA positive result. Similarly, generic ELISA and /or IFA positive rats' sera which are negative in HAI tests could suggest RPV-1 or RMV-1 infection.<sup>10,25</sup>

Although serologic testing indicates a previous or recent exposure to viruses, molecular diagnostics may be used to detect active current infections. Similar to the serologic approach, Polymerase Chain Reaction (PCR) assays target either NS1 gene sequences that are highly conserved among all rodent parvoviruses or VP2 gene sequences that are conserved only among variant strains of each viral species.<sup>8</sup> This method has been applied for detection of



viral contaminants, for diagnosis of viral infection in immunodeficient rodents; for environmental monitoring; to demonstrate that animals in quarantine are not infected with parvoviruses; for serotype and strain identification; for characterization and confirmation of serological findings.<sup>7,8,44</sup>

Earlier studies in Brazilian mouse and rat colonies using IFA revealed only the occurrence of MVM<sup>19</sup>. That could be explained by the use of limited diagnostic methods and also by the fact that some rodent parvoviruses had not been described then. In the present study, we evaluated the sanitary conditions of animal houses and the occurrence of rodent parvoviruses in laboratory mice and rats reared in Brazilian animal facilities.

## **Materials and methods**

### ***Animal facilities, mice and rats***

This study was conducted in accordance with Ethical Principles for the Use of Laboratory Animals, provided by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL), and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, by Institute for Laboratory Animal Research (ILAR).<sup>36</sup> All experiments were approved by Ethics Committee for Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) according protocol number L031/07.

Seventeen animal facilities of public institutions that supply animals for teaching and/or research purposes were evaluated from October 2008 to May 2010, located in different Brazilian regions.

The majority of the visited institutes had conventional animal facilities whereas some kept animals under controlled sanitary conditions. Data on barriers to prevent the transmission of diseases and on the animal health

monitoring program were obtained through a questionnaire that was carried out according to the date scheduled by the head of the animal house. The questionnaire was based on ILAR guidelines<sup>36</sup> and main topics were: adequate facilities with architectural isolation; unidirectional flow; air filtration and central ventilation system with acclimatization; frequency of disinfection of the animal house areas; temperature control; double door autoclave; open shelves; ventilated racks and isolators; disinfection and/or sterilization of materials and input (food, water, wood shavings, cages and uniforms); sanitizing showers and adequate garment (uniform, cap, face shield, gloves, and shoe cover) for technicians to enter the clean area; the presence of regular animal health monitoring; and quarantine programs.

Sample sizes were determined by the statistical formula:  $A = -\log \alpha / \log(1-P)$ , being: A= sample size; P= percentage of infected animals in the colony; and  $\alpha$ = confidence limit. Considering that P= 0.25 and  $\alpha = 0.05$ : A= 12 animals/breeding room/colony, i.e., 95% probability to detect at least one positive animal in the sample.<sup>21,37</sup> Thus, 730 animals, 563 mice (273 males and 290 females) and 167 rats (82 males and 85 females) randomly chosen from 16 mice and 12 rat colonies were assessed. Different animal lineages/stocks were sampled. The vast majority of the mice and rats (n=708) were between eight to ten weeks old. Only 22 mice ranged in age from 20 weeks to 1 year since they were readily available. Animals were properly transported in polycarbonate cages containing top filter media for laboratory animals. After arrival, they were kept in microisolators up to the examination time, usually 48 hours after housing. Mice and rats were fed with a standard pelleted rodent chow, and housed in an environmentally controlled room with a 12/12h, light/dark cycle.

Animals were euthanized with an inhaled overdose of CO<sub>2</sub> followed by blood collection by cardiocentesis. Mesenteric lymph nodes and spleen were harvested using sterile technique and stored at -70<sup>0</sup> until processed for DNA isolation.

### ***Viral isolation and clones***

The MVMp was propagated in L-929 cells; KRV and H-1 were propagated in primary cells from rat embryo in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell, Brazil). Viral stocks were made using previously published methods<sup>28</sup>. All cell cultures were infected with a multiplicity of infection of 0.1, and the viruses were harvested when cell cultures exhibited complete cytopathic effect. Viral stocks were stored at -70<sup>0</sup>C until use.

Rodent parvoviruses (PAR), MVM and MPV VP2 plasmid clones (PAR-NS1-pT7Blue-2, MVM-VP2-pT7Blue-2 and MPV-VP2-pT7Blue-2) were kindly provided by Dr. David G. Besselsen of the University Animal Care, University of Arizona, USA. RPV-1 and RMV-1 plasmid clones (RPV-1-NS1-pCR®2.1-TOPO® and RMV-1-VP-pCR®2.1-TOPO®) were produced using PCR products sequenced of rats naturally infected with RPV-1 and RMV-1. The 487- base pair (bp) RPV-1 product and 843 pb RMV-1 product were then subcloned into the pCR®2.1-TOPO® (TOPO TA Cloning® Kits, Invitrogen, USA) in accordance with manufacturer's instruction. Colonies were screened for insertion of the correct RPV-1 and RMV-1 fragments. Chemically competent *E. coli* cells, TOP 10 strain (Invitrogen, USA), were used for plasmid amplification. Plasmid clones were used as template DNA for positive controls in mice/rat specific PCR assay.

### ***DNA isolation***

Total DNA was isolated from mesenteric lymph nodes and spleen using the DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA) in accordance with manufacturer's instruction. Plasmid DNA was isolated using the QIAprep® miniprep kit (Qiagen, USA) following the kit directions for the miniprep spin protocol. DNA concentration in eluted samples was determined by absorbance at 260nm using a NanoDrop ND -1000 (NanoDrop Technologies, USA). All DNA extractions were performed in a PCR/ ultraviolet (UV) workstation (VECO, Brazil). Cross contamination during extractions was assessed by extracting a known negative sample along with test samples, followed by subsequent PCR testing of the negative control sample along with the test samples.

### ***PCR amplification***

PCR tests were conducted based on methods previously described with some modifications. The primers used in this study were obtained from Sigma-Aldrich™ (USA) and were previously published: KRV-specific and H-1 specific; Rodent Parvovirus (PAR) -specific and MVM, MPV-specific, RPV-1-specific and RMV-1-specific.<sup>5,40,49</sup> DNA of the sample tests was screened using a PCR assay (PAR) that detects all rodent parvovirus species (target template is a conserved region of the NS1 exon). The positive samples were evaluated by specific PCR assays (MVM, MPV in mice and KRV, H-1, RPV-1 and RMV-1 in rats).

PCR assays were performed in a GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, CA, USA) with a final volume of 20.0 µl which contained 0.6U of Taq DNA polymerase for PCR assays PAR, MVM and MPV; 1U for PCR assays KRV, H-1, RPV-1 and RMV-1; 2.0µl of the supplied buffer (Invitrogen Brazil, Ltd.); 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5 µM of each primer and 200µM of

each dNTP (BioLabs, New England, USA). Thermal cycler parameters were as previously published.<sup>5,40,49</sup> A final extension at 72<sup>0</sup>C was performed for seven minutes. Amplicons obtained from PCR reactions were subjected to electrophoresis on 8% polyacrylamide gels, revealed by silver fast staining,<sup>42</sup> and visualized on a transilluminator. Positive and negative controls were included in each assay. Spleen DNA extracts from rats and mice free of rodent parvovirus and no-DNA template controls were included.

### ***RPV-1 and RMV-1 DNA sequencing***

Rats naturally infected with RPV-1 and RMV-1 were assessed by PCRs assays for these viruses as described above. The 843bp and 487bp amplified DNA fragments were purified on 2% agarose gels using the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, USA). Nucleotide sequences were determined by the Taq dideoxy-chain termination method using a commercially available kit (Taq Dye Deoxy Terminatory Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, USA). At least two different initial amplification products were gel-purified for each virus, and each gel-purified preparation was sequenced in triplicate in both directions. Sequence alignments and similarity plots with other RPV-1 and RMV-1 sequences, obtained from GenBank, were performed using Clustal X2.<sup>30</sup>

### ***Serological tests***

Whole blood obtained by cardiac puncture was indentified and the serum was collected from the clotted whole blood samples by centrifugation. IFA was performed as described,<sup>28</sup> using sera previously heated at 56 °C for 30 minutes and diluted 1/20 with PBS 0.01M, pH 7.2. Monolayers of L 929 cells grown on wells of tephlon multitest slides and infected by MVM were used as generic antigen for serological tests to detect antibodies to rodent parvoviruses. In each

assay, 25µl of serum was added to a microscope slide well coated with a 50/50 mixture of infected and uninfected cells. Fluorescein conjugated goat antimouse and antirat IgG (Sigma, USA) was used as the secondary antibody. Both positive and negative control wells were included in each assay. A positive result was determined by comparing the intensity and fluorescence distribution with that of the positive and negative controls.

HAI tests were performed according to published method<sup>38</sup> in order to detect antibodies to KRV, H-1 and MVM. The sera were previously heated at 56 °C for 30 minutes and treated with an equal volume of 1% Kaolin suspension to remove nonspecific inhibitors of hemagglutination. Two-fold dilutions of each serum sample (ranging from 1:10 to 1:320) were incubated with eight hemagglutinating units of each virus in a 100 µl total volume for 45 minutes at 37°C. Then, a 50µl volume of 1% guinea pig- erythrocytes suspension was added to each well and incubated for 45 minutes. Each well was examined for hemagglutination inhibition and titers  $\geq$  1:20 were considered as a positive result. Positive and negative controls, as well as a erythrocytes suspension control, were included in each assay.

Diagnosis of MPV infections was given on the basis of an MVM HAI negative result coupled to an MVM IFA positive result. Sera of rats positive by IFA and negative by HAI for KRV and H-1 were suggestive of RPV-1 or RMV-1 infection.

### **Statistics**

Qui-square and Fischer tests were used to compare proportions. Comparisons were considered statistically significant at  $P < 0.05$ . *Kappa* index

was used to verify concordance between serological and molecular assays. All statistical analyses were performed by use of GraphPad Prism (GraphPad software, USA).

## **Results**

Figure 1 shows the distribution of the 17 animal facilities analyzed in this study. The majority of them are located in the Southeast (SE) region and nine belong to the State of Minas Gerais.

Sanitary conditions of the 17 Brazilian animal facilities investigated, concerning barrier systems, are shown (Figure 2a). Only two animal facilities (II and IV) presented the whole set of sanitary barriers assessed. Generally, the periodical disinfection of the areas, use of IPE's and architectural isolation were the most frequently observed barriers. Nine animal facilities (53%) reported to sterilize materials and supplies, and eight (47.0%) reported breeding animals in ventilated racks. Air filtration and ventilation were described in seven animal facilities (41.2%). The use of sanitizing shower, unidirectional flow and quarantine program were absent in many animal facilities, and together they were related only in three institutions.

According to the number of sanitary barriers, the animal facilities were grouped into three categories A (9-12 barriers), B (05-08 barriers) and C (01-04 barriers) (Figure 2b). This group showed that 35.3% of the animal facilities belong the category A; 23.5% of them fit in the category B; and most of them (41.2%) are grouped in category C. Figure 2c shows the relative frequency of animal facilities in categories A, B and C distributed in different regions. Five category A facilities were in to Southeast region and one in the Northeast.

Interestingly, the majority of the category A and C animal facilities are located in the Southeast region. Since category B animal facilities are distributed evenly in almost all regions, except North.

The occurrence of rodent parvovirus infections on animal houses in Brazil was analyzed in 730 animals, being 563 mice and 167 rats. Figure 3 (a-f) shows the positivity of murine parvoviruses infections at animal facilities in different regions, as assessed by molecular and serological assays. Positive animals were detected by both techniques; however the highest occurrence was detected through PCR assays.

The occurrence of murine parvovirus (PAR) as assessed by serological methods was 18.3% and positivity ranged from 0.0 to 22% in different regions (Figure 3a). The occurrence of MVM was 6.2% and positivity varied from 0.0 to 8.3% (Figure 3b). Finally, the occurrence of MPV was 12.3% and ranged from 0.0 to 14.2% (Figure 3c). The PAR occurrence as assessed by PCR was 49.2%, and positivity ranged from 16.7 to 100.0% in the different regions (Figure d). The occurrence of MVM was 12.3% and positivity varied from 0.0 to 13.7% (Figure 3e). At last, the occurrence of MPV was 43.5% and positivity ranged from 16.7 to 100.0 % (Figure 3f).

The highest positivity rate detected by serologic assay was found in Institutes located at the Southeast region (Figure 3a). When PCR was used, highest rates were seen at the North and Southeast regions (Figure 3d). Statistical analysis based on chi-square test showed significant difference ( $p < 0.05$ ) in the positivity for MVM and MPV between colonies, being MPV the most present in all regions of the country (detected by PCR). Discrepant results were observed in the parvovirus occurrence detected by serological and PCR



assays in samples from the North region (Figures 3a, 3d, 3c and 3f). PCR tests revealed the occurrence of a 100% positivity rate. Contrarily, no positive animals were detected through serology. A similar result pattern was observed when sample from rats were analyzed. Co-infections between MVM and MPV were detected in 6.0% of the samples analyzed by PCR.

The positivity of PAR infections in rats from the different at animal facilities from different regions is shown in Figure 4. Rats at the Central West region facilities were not evaluated. Sera from IFA positive rats which were negative for KRV and H-1, assessed by HAI, were suggestive of RPV-1 or RMV-1 infection.

Like in the mice analyses, high positivity was observed in samples examined by PCR. The occurrence assessed by serological methods was 40.7% and positive samples were detected only in the Southeast Institutes (Figure 4a). The general positivity rate for KRV and H-1 was 3.0% and 1.8%, respectively. In the Southeast region these rates were 3.8% and 2.1% respectively (Figures 4b, 4c). Overall, the occurrence of RPV-1 or RMV-1 was 35.9% and the in Southeast region the incidence was 45.5% (Figures 4d-e). These were the most prevalent viruses. The general occurrence of PAR, assessed by PCR, was 73.7%, and positivity ranged from 25.0 to 100.0% in the other evaluated regions (Figure 4f). The positivity of KRV was 6.0% (Figure 4g) and RMV-1 was 37.7% (Figure 4j) and these viruses were detected only at the Southeast region. The occurrence of H-1 was not detected by PCR (Figure 4 h). The general positivity of RPV-1 was 54.5%, and positivity ranged from 25.0 to 100% in different regions, and statistical analysis based on chi-square test showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the positivity of rat parvoviruses, being RPV-1 the most present

(Figure 4i), followed by RMV-1 (Figure 4j). Co-infections between RPV and RMV were detected in 13.2% of the samples analyzed by PCR.

The radar graphs on Figure 5 illustrate the occurrence of rodent parvovirus infections in relation to the use of sanitary barrier systems at different animal facilities. The percentages of positive results obtained by serological and molecular methods for each virus studied in animal houses of category A (Letter a), category B (Letter b) and category C (Letter c) were calculated in order to visualize the presence of viruses in different categories. The analyses show greater dispersion of the viruses at animal houses of categories B and C. As expected, the smaller the number of sanitary barriers at a given animal facility, the greater the virus spread.

Comparative analysis of serological and molecular methods for diagnosis of murine parvovirus infection is shown in Figure 6 (a-c). Specific PCR assays (PAR, MVM and MPV) were able to detect higher numbers of positive animals when compared to their respective serological studies. *Kappa* indexes indicate that there was no agreement between the two diagnostic techniques. Of the 106 (18.8%) PAR seropositive mice, 42 animals (39.6%) were negative by PCR (Figure 6a). Regarding the results of MVM, 35 (6.2%) animals with positive serology, 29 (82.8%) were negative by PCR (Figure 6b) and MPV, 69 (12.3%) with positive serology, 33 (47.8%) were negative by PCR (Figure 6c). Similar analysis for rat parvoviruses is shown on Figure 7 (a-c). PAR and KRV PCR assays were able to detect a larger number of positive animals when compared to serological techniques. As for the H-1 virus, no animal was detected by PCR, and three animals (1.8%) were positive by serology. Concordance evaluation results between the two specific diagnostic techniques, as determined by *kappa*

indexes, were 32.8% for PAR and 51.4% for KRV. Comparison between the diagnostic techniques for specific detection of RPV-1 or RMV-1 infection was not done.

DNA fragments amplified by RPV-1 and RMV-1 PCR assays were sequenced and showed similarity to sequences reported for RPV-1 and RMV-1 (Wan et al., 2002) (data no shown).<sup>2,48</sup>

## **Discussion**

The Southeast is the richest and most populous region in Brazil. As a consequence, the region concentrates the majority of public research and the education institutions within the country. However, it is noteworthy consider that animal facilities on this study, including those located in geographically different regions, were not selected randomly and may represent a biased sample. Nonetheless, because the chosen institutions are important centers of research in the country, the obtained results give a relative measure of parvoviruses occurrence in research and educational mouse and rat colonies in Brazil.

As revealed by the applied questionnaire, most facilities still maintain mouse and rat colonies under conventional conditions. Only two animal houses (II and IV) presented the whole set of sanitary barriers to effectively produce and keep animals in controlled sanitary standards. Similar results were reported previously<sup>9,20</sup>, however, current results suggest an improvement in infrastructure and the routine procedures in Brazilian animal houses.<sup>20</sup>

The stratification of the animal houses into A, B and C categories according to the number of sanitary barriers, allowed the visualization of how the categories are distributed in Brazil. The number of category A (09 - 12 barriers),

comprising 35.3% of the evaluated animal houses, signals that efforts are being made to improve animal quality for scientific research. Category B (05 to 08 barriers), comprising 23.5% of animal houses, is distributed evenly in almost all regions, except at the North. This may also be related to an overall quality increase. The number of category C facilities (01-04 barriers), comprising 41.2% of the animal houses, on the other hand, demonstrated that most of the evaluated institutions still lack proper facilities, devices and sanitary barriers to produce research grade mice and rats.

With regard to the occurrence of murine parvoviruses infection reported in this study, MPV was the most frequent in the colonies analyzed, present in all regions of Brazil, confirming the high circulation of MPV described earlier.<sup>7,22,23,31,33,39</sup> With respect to rat parvoviruses, the RPV-1 was the most prevalent virus in the studied regions, followed by RMV-1, detected in the Southeast. The results corroborate data describing the high distribution of these viruses in colonies of rats in Japan, Europe, Taiwan and USA.<sup>31,34,39,43,47,49</sup> High antibody occurrence (27.8% to 75%) against KRV in conventional rat colonies was reported in Argentina<sup>11</sup>. Published results and those presented in this study confirm that parvoviruses are highly prevalent in enzootically infected colonies. As for animal breeding colonies maintained under strict sanitary barrier systems of protection, MPV, RPV-1 and RMV-1 present current low prevalence rates. However the eradication of these viruses have proven difficult to achieve even under strict quality control measures.<sup>13,18,34</sup>

In Brazil, a serological survey to evaluate viral agents in laboratory mice and rats by IFA and HAI techniques was previously conducted at 18 animal houses<sup>19</sup>. With respect to parvoviruses, the authors reported MVM occurrence

of 47.1% in mouse colonies and of 36.4% in rat colonies. KRV occurrence was 63.6% and same value was described for H -1 in rat colonies. The MVM occurrence may have been overestimated in this study, <sup>19</sup> as MPV may have contributed to the results attributed to the occurrence of MVM in mice. Likewise, RPV-1 and RMV-1 may have contributed to the results attributed to the occurrence of MVM in rat colonies. Considering the results of MVM occurrence obtained by Gilioli and collaborators<sup>19</sup> as an generic indication of rodent parvovirus infections in mouse colonies, we observed that the number is still superior to the reported in our study by IFA (PAR = 18.3%) and lower than that obtained by the PCR assay (PAR = 73.7%). Interestingly, the results previously reported for MVM occurrence in rat colonies are similar to those obtained for RPV-1 or RMV-1 (35.9%) in our study, by IFA, and inferior to that observed by PCR (RPV-1= 54.5% and RMV-1= 37.5%). With respect to KRV and H-1, current data suggest a considerable decrease in the frequency of these viruses in rat colonies in Brazil.

Regarding the frequency of parvovirus infections in mouse/rat colonies at the North, Northeast, Central West and Southern regions, it should be noted that the number of animals examined in each region was much lower than the Southeast region. Nevertheless, viruses with the highest circulation like MPV and RPV-1 were detected in the Southeast as well as in the other studied regions. RMV-1, KRV and H-1 virus were detected only in the Southeast, at animal facilities with poor sanitary conditions. Therefore, to pursue the prevalence of rodent parvovirus infections outside the Southeast region, new and more comprehensive surveys are necessary.

From this study and others it is clear that there is an inverse correlation between occurrence of rodent parvovirus infections and the existing sanitary barriers at a given animal houses, that is, the fewer the number of barriers, the greater is the spread of the viruses. Although animal facilities from category A have a reasonable number of sanitary barriers, they still hold a significant number of parvovirus infected colonies. This suggests that failures in containment barriers favoring contamination of animal rooms may still exist. Furthermore, some facilities of this category employ low sensitivity and specificity methods for the monitoring of parvovirus infections. On the other hand, the high occurrence of parvovirus observed in category C animal houses is clearly related to precarious sanitary barrier system.

The occurrence of parvovirus infections in mouse/rat colonies evaluated was influenced by the diagnostic method. A large number of positive animals were detected by PCR. This technique is more efficient in the identification of parvovirus infections in target tissues of rodents, including lymph nodes and spleen.<sup>8</sup> The high sensitivity and specificity of PCR allows the identification of active infections, and hence acute outbreaks in animals that have not yet seroconverted. This may explain the discrepant results observed in the occurrence of mouse and rat parvovirus infections in this study. It's imperative to remember that serology provides an indirect measure of exposure to an agent, whereas PCR detects directly the presence of the agent.<sup>33</sup>

Although the PCR assay was able to detect a greater number of positive animals in this study, comparative analyses of serological and molecular methods to diagnose mouse parvovirus infections (PAR, MVM and MPV) showed no concordance. Of the 106 animals (18.3%) tested serologically (PAR)

positive, 42 were not detected by PCR. Moreover, comparative analyses of serological and molecular methods to diagnose parvovirus infections in rats (PAR, KRV and H-1) showed that of 68 animals (40.7%) tested serologically positive (PAR), only three were not detected by the PCR assay. Two hypotheses may explain the negative results of murine parvovirus infection by PCR with positive results by serology. First, typical slow transmission rates of these viruses in facilities with effective barriers may render low-level infections,<sup>13, 24</sup> which could have evaded the PCR sensitivity, although such infections may have been enough to trigger humoral responses on the infected animals. Secondly, these results may have been caused simply by the virus clearing in animals previously infected. For instance, older animals have lesser amounts of dividing cells, which are preferentially infected by parvoviruses, allowing them to effectively clear the infection.<sup>6,33</sup>

As for the comparison between results using serology or PCR in rats, a better concordance was generally found. That could be related to the fact that all rat colonies presenting parvovirus positive results were reared in facilities with poor sanitary barrier systems. Additionally, all animals had approximately the same age.

No diagnostic method can be absolutely accurate.<sup>14,17,33</sup> Therefore, the collective use of several methods may be critical for the timely detection and identification of current parvovirus infections.

## **Acknowledgements**

We thank Dr. David G. Besselsen for sharing Rodent parvovirus, MVM and MPV plasmids clones and those responsible for the Brazilian animal facilities for kindly providing animals for the present study.

## **References**

1. **Ball-Goodrich LJ, Johnson E.** 1994. Molecular characterization of a newly recognized mouse parvovirus. *J Virol* 68:6476-6486.
2. **Ball-Goodrich LJ, Leland SE, Johnson EA, Paturzo FX, Jacoby RO.** 1998. Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup. *J Virol* 72:3289-3299.
3. **Ball-Goodrich LJ, Hansen G, Dhawan R, Paturzo FX, Vivas-Gonzalez BE.** 2002. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mouse parvovirus infection in laboratory mice. *Comp Med* 52:160-166.
4. **Bauer BA, Riley LK.** 2006. Antemortem detection of mouse parvovirus and mice minute virus by polymerase chain reaction (PCR) of faecal samples. *Lab Anim* 40:144-152.
5. **Besselsen DG.** 1998. Detection of Rodent Parvoviruses by PCR. *Methods Mol Biol* 92:31-37.
6. **Besselsen DG, Wagner AM, Loganbill JK.** 2000. Effect of mouse strain and age on detection of mouse parvovirus 1 by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis. *Comp Med* 50:498-502.
7. **Besselsen DG, Romero MJ, Wagner AM, Henderson KS, Livingston RS.** 2006. Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice. *J Gen Virol* 87:1543-56.



8. **Besselsen DG, Franklin CL, Livingston RS, Riley LK.** 2008. Lurking in the shadows: emerging rodent infectious diseases. *ILAR J* 49:277-90.
9. **Bicalho KA, Araújo FTM, Rocha RS, Carvalho OS.** 2007. Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I - endo e ectoparasites. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59:1478-1484.
10. **Brayton C, Mähler M, Nicklas W.** 2004. Viral infections, p 357-391. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P, editors. *The laboratory mouse*. Hannover: Elsevier Academic Press.
11. **Cagliada MP, Carbone C, Ayala MA, Laborde JM, Maschi F, Milocco SN, Bonzo E, Cid De La Paz V, Galosi CM.** 2010. Occurrence of antibodies against Kilham virus in experimental rat colonies of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 42:27-29.
12. **Carty AJ.** 2008. Opportunistic infections of mice and rats: Jacoby and Lindsey revisited. *ILAR J* 49:272-276.
13. **Clifford CB, Watson J.** 2008. Old enemies, still with us after all these years. *ILAR J* 49:291-302.
14. **Compton SR, Riley LK.** 2001. Detection of infectious agents in laboratory rodents: traditional and molecular techniques. *Comp Med* 51:113-119. Comment in: *Comp Med* 51:109.
15. **Crawford LV.** 1966. A minute virus of mice. *Virology* 29:605-612.
16. **Dhawan RK, Wunderlich ML, Cowley JP, Ibriami T, Dodge M, Berg E, Shek WR.** 2004. Virus-like particles as antigen for serological detection of rat parvovirus antibodies. *Contemp Top Lab Anim* 43:43-44.
17. **Feldman SH.** 2001. Diagnostic molecular microbiology in laboratory animal health monitoring and surveillance programs. *Lab Anim (NY)* 30:34-42.

18. **Filipovska-Naumovska E, Abubakar SM, Thompson MJ, Hopwood D, Pass DA, Wilcox GE.** 2010. Serologic occurrence of mpv1 in mouse strains in a commercial laboratory mouse colony determined by using vp1 antigen. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49:437-42.
19. **Gilioli R, Sakurada JK, Andrade LA, Kraft V, Meyer B, Rangel HA.** 1996. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. *Lab Anim Sci* 46:582-584.
20. **Gilioli R, Andrade LAG, Passos LAC, Silva FA, Rodrigues DM, Guaraldo AMA.** 2000. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arq Bras Med Vet Zootec* 52:33-37.
21. **Institute for Laboratory Animal Resources.** 1976. Long term holding of laboratory rodents. A report of the Committee on Long-term Holding of laboratory rodents. *ILAR News* 19L1-L25.
22. **Jacoby RO, Ball-Goodrich LJ, Besselsen DG, McKisic MD, Riley LK, Smith AL.** 1996. Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci* 46:370-380.
23. **Jacoby RO, Lindsey JR.** 1997. Health care for research animals is essential and affordable. *Faseb J* 11:609-614.
24. **Jacoby RO, Smith AL.** 2003. Mouse parvovirus: survival of the fittest. *Comp Med* 53:470-471.
25. **Jacoby RO, Gaertner D.** 2006. Viral disease, p 423-451. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. *The laboratory rat*. San Diego: Academic Press.

26. **Janus LM, Mähler M, Köhl W, Smoczek A, Hedrich HJ, Bleich A.** 2008. Minute virus of mice: antibody response, viral shedding, and persistence of viral DNA in multiple strains of mice. *Comp Med* 58:360-368.
27. **Kilham L, Olivier LJ.** 1959. A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* 7:428-37.
28. **Kraft V, Meyer B.** 1986. Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. *Lab Anim Sci* 36:271-276.
29. **Kunita S, Chaya M, Hagiwara K, Ishida T, Takakura A, Sugimoto T, Iseki H, Fuke K, Sugiyama F, Yagami K.** 2006. Development of ELISA using recombinant antigens for specific detection of mouse parvovirus infection. *Exp Anim* 55:117-124.
30. **Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
31. **Liang CT, Shih A, Chang YH, Liu CW, Lee YT, Hsieh WC, Huang YL, Huang WT, Kuang CH, Lee KH, Zhuo YX, Ho SY, Liao SL, Chiu YY, Hsu CN, Liang SC, Yu CK.** 2009. Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:381-386.
32. **Livingston RS, Besselsen DG, Steffen EK, Besch-Williford CL, Franklin CL, Riley LK.** 2002. Serodiagnosis of mice minute virus and mouse parvovirus infections in mice by enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed recombinant VP2 proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:1025-31.
33. **Livingston RS, Riley LK.** 2003. Diagnostic testing of mouse and rat colonies for infectious agents. *Lab Anim* 32:44-51.

34. **Mähler M, Köhl W.** 2009. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in western Europe. *Lab Anim (NY)* 38:161-165.
35. **McKisic MD, Lancki DW, Otto G, Padrid P, Snook S, Cronin DC, Lohmar PD, Wong T, Fitch FW.** 1993. Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells. *J Immunol* 150:419-428.
36. **Institute for Laboratory Animal Research.** 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington (DC): National Academies Press.
37. **Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B.** 2002. FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 36:20-42.
38. **Parker JC, O'Beirne AJ, Collins MJ Jr.** 1979. Sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation, and hemagglutination inhibition serological tests for detection of Sendai virus antibody in laboratory mice. *J Clin Microbiol* 9:444-447.
39. **Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB.** 2009. Contemporary occurrence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim* 43:165-173.
40. **Redig AJ, Besselsen DG.** 2001. Detection of rodent parvoviruses by use of fluorogenic nuclease polymerase chain reaction assays. *Comp Med* 51:326-331. Erratum in: *Comp Med* 2003 52:following table of contents.

41. **Riley LK, Knowles R, Purdy G, Salomé N, Pintel D, Hook RR Jr, Franklin CL, Besch-Williford CL.** 1996. Expression of recombinant parvovirus NS1 protein by a baculovirus and application to serologic testing of rodents. *J Clin Microbiol* 34:440-444.
42. **Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJG.** 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 17:915-918.
43. **Schoondermark-van de Ven EM, Philipse-Bergmann IM, Van der Logt JT.** 2006. Occurrence of naturally occurring viral infections, *Mycoplasma pulmonis* and *Clostridium piliforme* in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003. *Lab Anim* 40:137-143.
44. **Shek W.** [Internet]. 2003. Detecting and Controlling Rodent Parvoviruses. Charles River Laboratories Short Course. [Cited 19 June 2003] Available at: [http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm\\_rm\\_r\\_detecting\\_rodent\\_parv\\_o.pdf](http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_detecting_rodent_parv_o.pdf).
45. **Shek WR, Pritchett KR, Clifford CB, White WJ.** 2005. Large-scale rodent production methods make vendor barrier rooms unlikely to have persistent low-prevalence parvoviral infections. *Contemp Top Lab Anim Sci* 44:37-42.
46. **Toolan HW.** 1960. Experimental production of mongoloid hamsters. *Science* 131:1446-1448.
47. **Ueno Y, Iwama M, Ohshima T, Sugiyama F, Takakura A, Itoh T, Yagami K.** 1998. Prevalence of "orphan" parvovirus infections in mice and rats. *Exp Anim* 47:207-210.

48. **Wan CH, Söderlund-Venermo M, Pintel DJ, Riley LK.** 2002. Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses. *J Gen Virol* 83:2075-2083.

49. **Wan CH, Bauer BA, Pintel DJ, Riley LK.** 2006. Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction. *Lab Anim* 40:63-69.

## Figure Legends

**Figure 1:** Animal facilities distributed by geographical regions of Brazil. N= North; NE= Northeast; SE= Southeast; CW= Central West; S=South.

**Figure 2:** a) Sanitary barrier systems evaluated in animal facilities from different regions in Brazil. Animal houses are identified by Roman numerals according to the regional distribution: North (N), Northeast (NE), Southeast (SE), Central West (CW) and South (S). Black squares indicate the presence of a given sanitary barrier. b) Animal facilities distributed in categories A (09-12 sanitary barriers), B (05-08 sanitary barriers) and C (01-04 sanitary barriers). c) Animal facilities distributed by regions and categories A (■), B (▣) e C (□).

**Figure 3:** Occurrence of murine parvoviruses infection at animal facilities in Brazil: a) PAR = Rodent parvovirus b) MVM = *Minute virus of mice*, c) MPV = *Mouse parvovirus*. N= North; NE= Northeast; SE= Southeast; CW= Central West; S=South.

**Figure 4:** Occurrence of rat parvoviruses infection at animal facilities in Brazil: a) PAR = Rodent parvovirus, b) KRV= *Kilhan rat virus*, c) H-1= *H-1 parvovirus*, d) RPV-1= *Rat parvovirus -1*, e) RMV-1= *Rat minute virus -1*. N= North; NE= Northeast; SE= Southeast; CW= Central West; S=South. ND= Not Done.

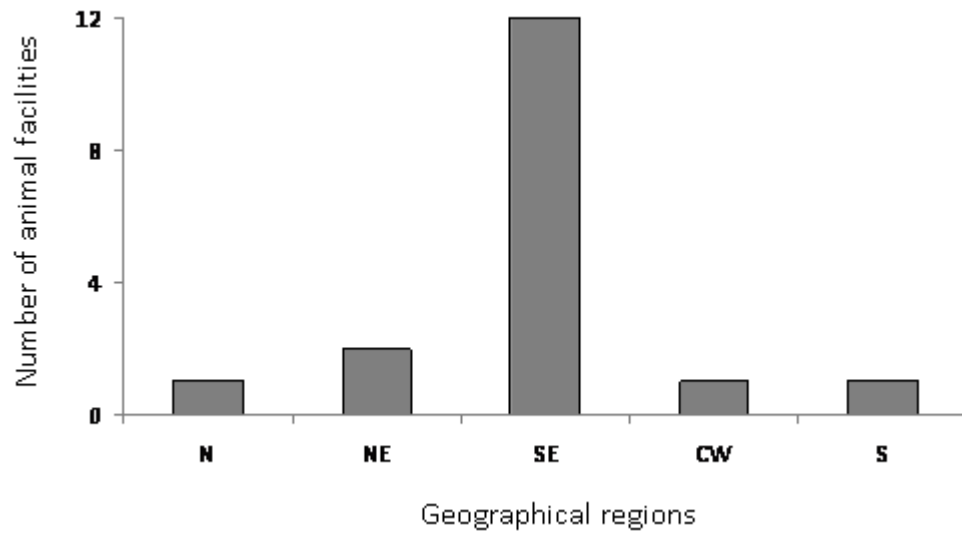
**Figure 5:** Occurrence of rodent parvovirus infections versus sanitary barrier systems at animal facilities in Brazil: a), b) and c) represent different animal facilities categories. mPAR = mouse parvoviruses; MVM = *Minute virus of mice*; MPV = *Mouse parvovirus*; rPAR = rat parvoviruses; KRV = *Kilhan rat virus*, H-1 = *H-1 parvovirus*; RPV-1 = *Rat parvovirus -1*; RMV-1 = *Rat minute virus -1*.

**Figure 6:** Comparative analysis of serological and molecular diagnosis of murine parvoviruses infection: a) PAR = Rodent parvoviruses, b) MVM = *Minute virus of mice*, MPV = *Mouse parvovirus*. The graphics next to each contingency table illustrate the frequency of animals with positive and negative serology, for each parvovirus, and the proportion of animals with PCR (+) and PCR (-) results in relation to the serology result.

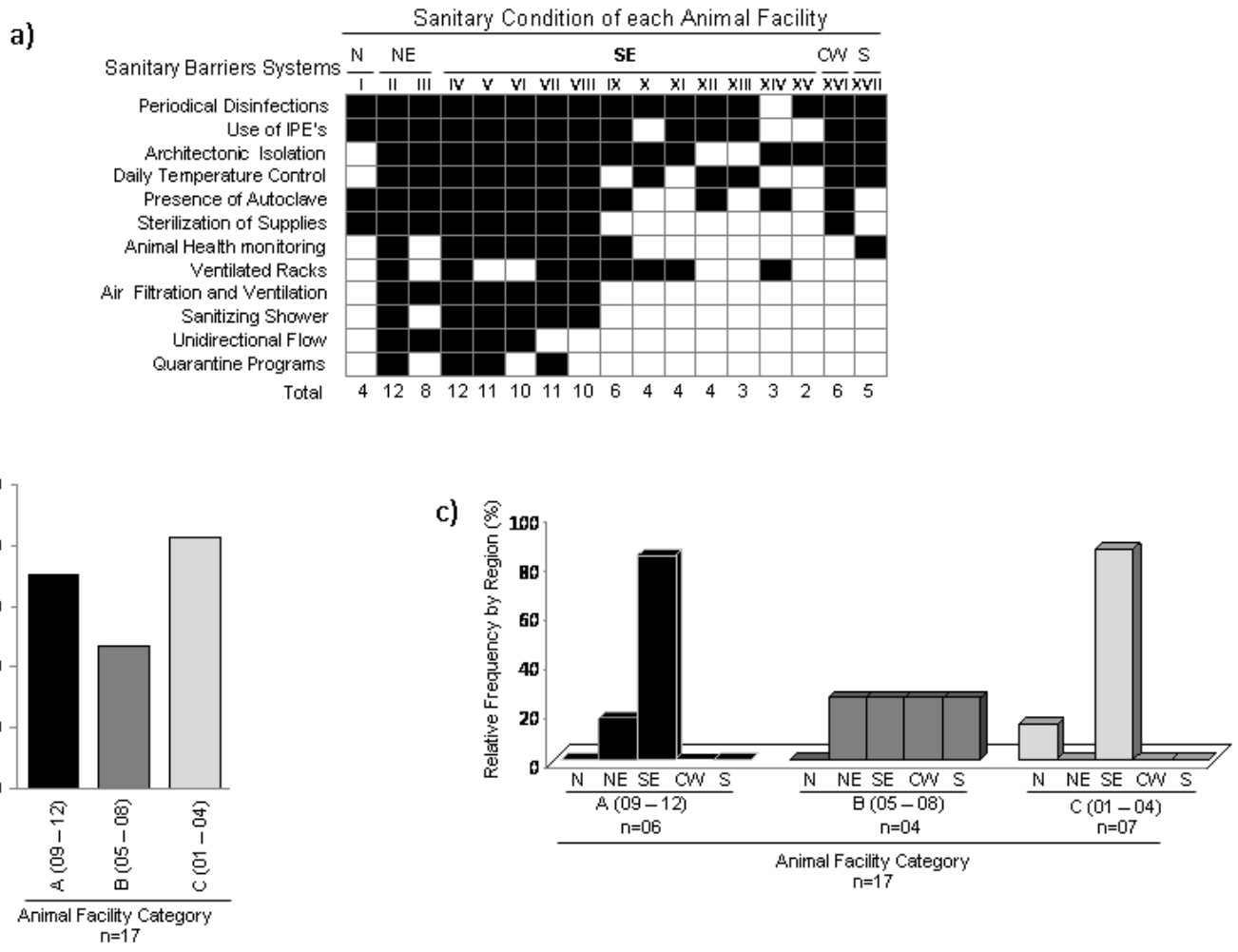
**Figure 7:** Comparative analysis of serological and molecular methods for diagnosis of rat parvoviruses infection: a) PAR = Rodent parvoviruses, b) KRV = *Kilhan rat virus*; c) H-1 = *H-1 parvovirus*. The graphics next to each contingency table illustrate the frequency of animals with positive and negative serology, for each parvovirus, and the proportion of animals with PCR (+) and PCR (-) results in relation to the serology result.



**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

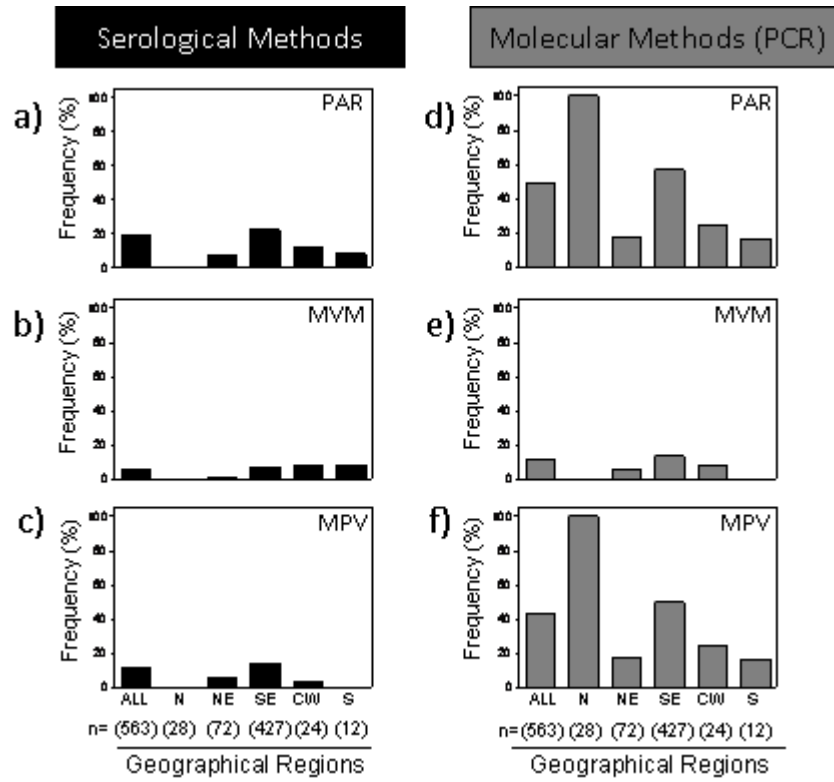


Figure 4

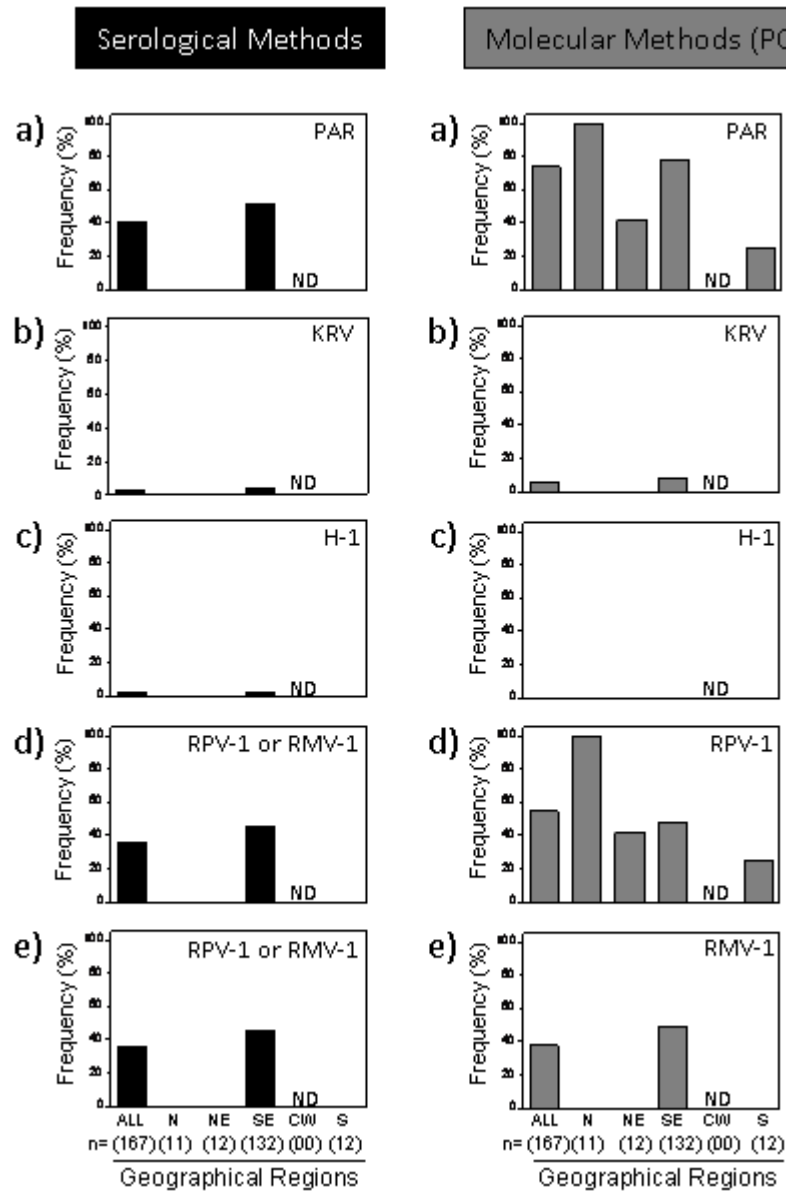
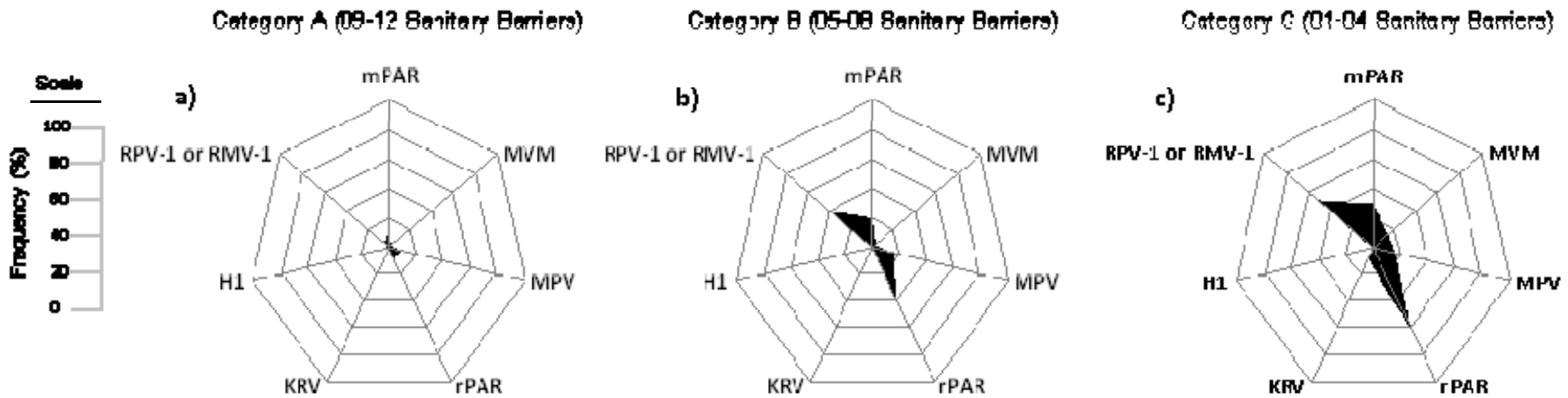


Figure 5

Serological Methods



Molecular Methods (PCR)

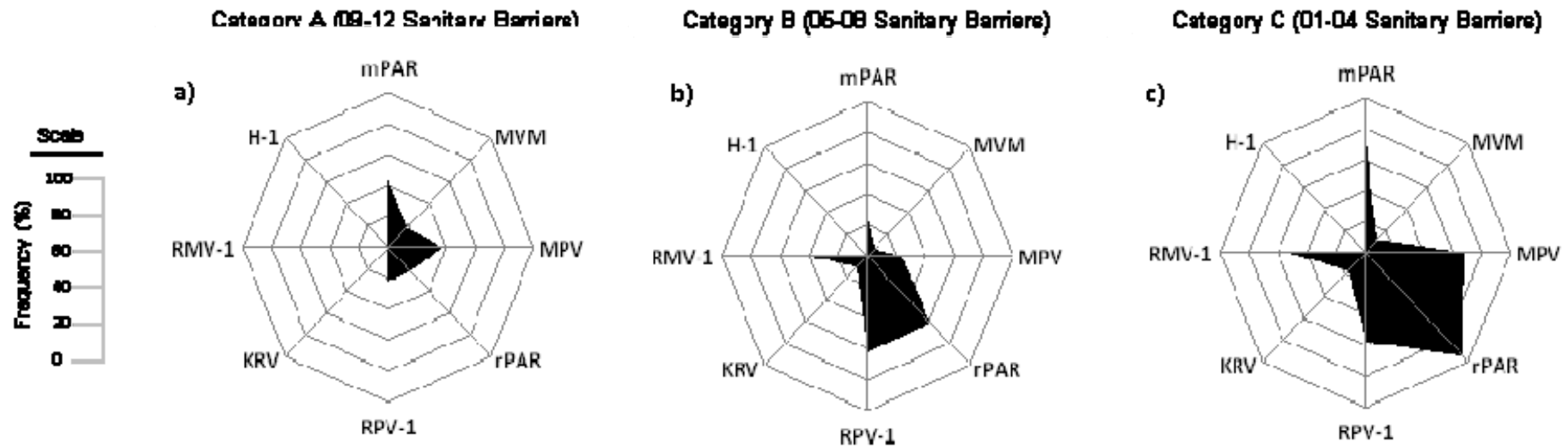


Figure 6

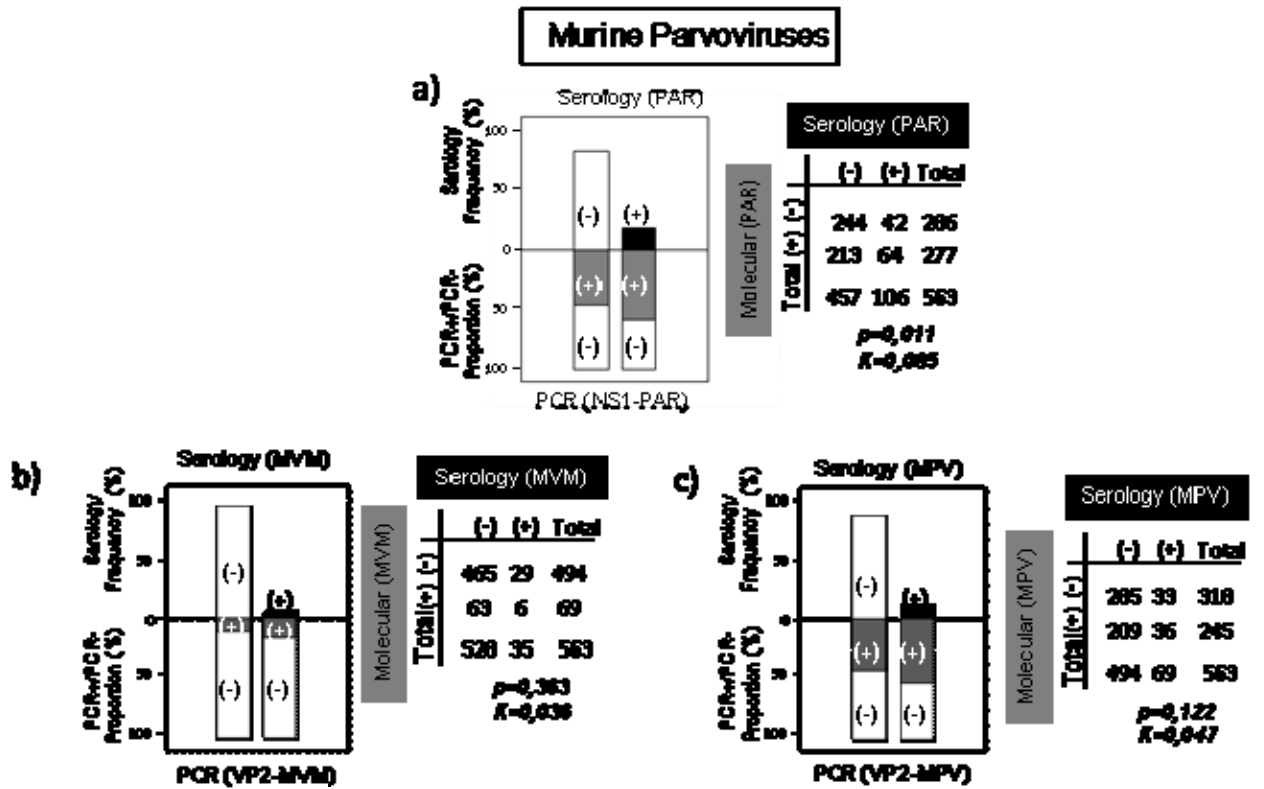
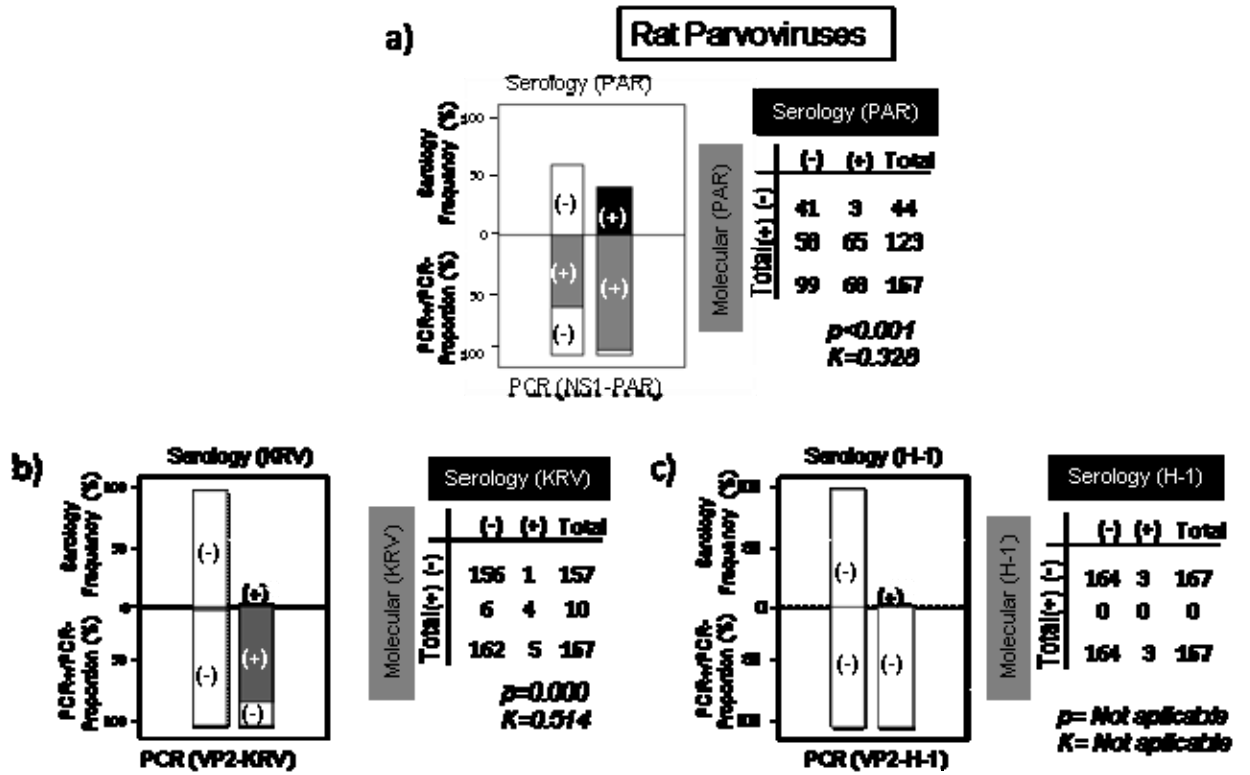


Figure 7



**Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais:  
I - Endo and ectoparasites**

[Perfil sanitário de colônias de camundongos e ratos de biotérios de Minas Gerais:  
I - Endo e ectoparasitos]

K.A. Bicalho<sup>1</sup>, F.T.M. Araújo<sup>1</sup>, R.S. Rocha<sup>2</sup>, O.S. Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto René Rachou – Fiocruz  
Av. Augusto de Lima 1715  
30190-002 - Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane – Fiocruz – Manaus, AM

**ABSTRACT**

The sanitary conditions of 13 animal houses in nine public institutions in Minas Gerais, and the presence of endo and ectoparasites of mice and rats colonies kept in these facilities were evaluated. Data about barriers to prevent the transmission of diseases and a program of sanitary monitoring were obtained through a questionnaire and local visit. Parasitological methods were performed for diagnosing mite, lice, helminthes, and protozoa parasites in 344 mice and 111 rats. Data have shown that the majority of the animal houses had neither proper physical environment nor protection barriers to prevent the transmission of infections. Parasitological results have shown that only one animal house (7.7%) had parasite free animals, whereas the others have presented infected animals and the prevalences of parasites in the mice colonies were: *Myobia musculi* (23.1%); *Myocoptes musculinus* (38.5%); *Radfordia affinis* (15.4%); *Syphacia obvelata* (92.3%); *Aspiculuris tetraptera* (23.1%); *Hymenolepis nana* (15.4%); *Spirotrichomonas muris* (46.2%); *Giardia muris* (46.2%); *Trichomonas muris* (53.8%); *Trichomonas minuta* (61.5%); *Hexamastix muris* (7.7%); and *Entamoeba muris* (84.6%). As for the rat colonies, the prevalences were: *Poliplax spinulosa* (8.1%); *Syphacia muris* (46.2%); *Trichosomoides crassicauda* (28.6%); *Spirotrichomonas muris* (85.7%); *Trichomonas muris* (85.7%); *Trichomonas minuta* (85.7%); *Hexamastix muris* (14.3%) and *Entamoeba muris* (85.7%).

Keywords: mice, rat, animal house, parasite, sanitary barrier

**RESUMO**

Avaliaram-se as condições sanitárias de 13 biotérios de nove instituições públicas do estado de Minas Gerais, bem como a presença de endo e ectoparasitos nos camundongos e ratos criados nesses biotérios. Os dados sobre barreiras contra infecções e sobre o programa de monitoramento sanitário dos animais foram obtidos por meio de um questionário e de visitas aos biotérios. Métodos parasitológicos foram utilizados para o diagnóstico de ácaros, piolhos, helmintos e protozoários em 344 camundongos e 111 ratos. A maioria dos biotérios não possuía espaços físicos adequados nem barreiras de proteção que pudessem impedir a transmissão de infecções. Os resultados parasitológicos mostraram que em apenas um biotério não foram encontrados animais parasitados. A prevalência de parasitos encontrados em camundongos nos outros biotérios foi: *Myobia musculi* (23,1%), *Myocoptes musculinus* (38,5%), *Radfordia affinis* (15,4%), *Syphacia obvelata* (92,3%), *Aspiculuris tetraptera* (23,1%), *Hymenolepis nana* (15,4%), *Spirotrichomonas muris* (46,2%), *Giardia muris* (46,2%), *Trichomonas muris* (53,8%), *Trichomonas minuta* (61,5%), *Hexamastix muris* (7,7%) e *Entamoeba muris* (84,6%). E nas colônias de ratos foram encontrados: *Poliplax spinulosa* (8,1%), *Syphacia muris* (46,2%), *Trichosomoides crassicauda* (28,6%), *Spirotrichomonas muris* (85,7%), *Trichomonas muris* (85,7%), *Trichomonas minuta* (85,7%), *Hexamastix muris* (14,3%) e *Entamoeba muris* (85,7%).

Palavras-chave: camundongo, rato, biotério, parasito, barreira sanitária

Recebido em 3 de janeiro de 2007  
Aceito em 3 de setembro de 2007  
E-mail: bkelly@cpqrr.fiocruz.br



## INTRODUCTION

The use of living laboratory animals as biological reagents has provided knowledge to better understand physiological and pathological processes in both man and other animals (Casebolt et al., 1988; Dillehay et al., 1990). Experimental results of research performed with living laboratory animals may be affected by physiological and immunological alterations caused by environmental conditions (Baker, 1998; Weisbroth et al., 1998). The presence of infectious agents in animal house colonies represents a severe problem for biomedical research once murine parasitic agents are described as the most frequent pathogens involved in immunological and metabolic alterations in the host (Pinto et al., 1994). Considering the use of laboratory living animals as models in experimental biomedical research, the animal houses are required to have barrier-maintained systems, controlled environment conditions, and periodical genetic and sanitary monitoring. It is, of utmost importance to monitor different lineages for the presence of parasites, viruses, bacteria, fungi as well as their genetic constitution (Gilioli, 2003).

In Brazil, preliminary results have shown that most animal houses that supply mice and rats for biomedical research should have facilities and devices improved, including barrier-maintained systems to produce and maintain Specific Pathogen-Free (SPF) animals under controlled sanitary conditions (Gilioli, 2003). Gilioli et al. (1996, 2000) performed a parasitological survey as well as an investigation of the antibodies involved with murine infections caused by viruses and bacteria in 18 animal houses of Brazilian institutions. The authors reported that only one institution was able to provide SPF animals. On the other hand, animals with multiple infections caused by parasites, viruses and bacteria were commonly observed in most of animal house colonies under study. A similar infection pattern was reported for universities and institutes of the United States, Germany and Canada when infectious agents were investigated (Jacoby and Lindsey, 1997; Zenner and Regnault, 2000).

The present study aimed at adding new data on sanitary-hygienic conditions of animal houses of the state of Minas Gerais, Brazil, which provide

biomedical research with mice and rats, and evaluating their health status by means of an assessment of ecto and endoparasite infections.

## MATERIALS AND METHODS

Thirteen animal houses of nine public institutions that supply animals for teaching and research purposes were evaluated from November 2004 to April 2005\*. Out of these public institutions of the state of Minas Gerais, eight were research/teaching institutions and one was an institution of research and production of pharmaceuticals, antiophidic serum and vaccines. All institutions had the purpose of breeding laboratory mice and rats of high sanitary quality to meet the demands of research/teaching, biological control of serum and feeding of ophidian. Data on barriers to prevent the transmission of diseases, on the program of sanitary monitoring and on human resources were obtained through a questionnaire and local visits that were carried out according to the date scheduled by the head of the animal house. The questionnaire had eleven questions and the main items assessed were: adequate facilities with clean area separate from the dirty one, central ventilation system with acclimatization, air filtration, temperature control, equipment like a double door autoclave, shelves, ventilated racks, isolators, cage washer, sanitizing showers, and adequate garment (uniform, cap, face shield, gloves, and shoe cover) for technicians to enter the clean area, frequency of disinfection of the animal house areas, disinfection and/or sterilization of materials and input (food, water, wood shavings, cages and uniforms), growing different species of animals in the same area, the presence of regular programs for sanitary monitoring of the colonies for virus, bacteria, parasites, and educational level of technicians, number and regular training.

The sample size was determined by the statistical formula:  $A = -\log \alpha / \log(1-P)$ , being: A= number of animals to be assessed (sample size); P=

---

\*This project was submitted to the Ethics Committee for Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) and all the procedures involving the use of animals in the current study followed the Ethical Principles for the Use of Laboratory Animals, provided by the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA), and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, by the National Research Council (National..., 2003).

percentage of infected animals in the colony; and  $\alpha$ = confidence limit. Considering that  $P= 25\%$  and  $\alpha = 0.05$ :  $A= 12$  animals/breeding room/colony, i.e., 95% probability to detect at least one positive animal in the evaluated sample (Institute ..., 1976). Thus, 455 animals, randomly chosen (344 mice and 111 rats) from isogenic and heterogenic lineages of 13 mice and seven rat colonies, aged between four and 48 weeks were assessed. Mice and rats were transported separately in polycarbonate cages containing top filter media for laboratory animals and then kept in micro isolators up to the examination time, which was within 48 hours after the animal arrival. The animals were submitted to carbon dioxide anesthesia in an appropriate chamber, bled through the retro-orbital plexus or cardiac puncture and, then, sacrificed through a deeper narcosis before necropsy.

Mites and lice were diagnosed through direct examination of the carcasses and identified through light microscopy of the fur collected from the cervical and dorsal regions as described by Weisbroth (1982) and Gilioli (2003). Specific identification was based on a microscopic morphological analysis after clarification with Hoyer liquid, at magnifications of 100x and 400x (Krantz, 1978; Owen, 1992). Eggs, larvae and adult helminthes were diagnosed by light microscopy, examining slices of the small and large intestines in samples of the lumen contents and in anal swab with scotch tape (Wescott, 1982; Owen, 1992). Coccid oocysts were searched according to the Sheater method (Sheater, 1923). Protozoan cysts and trophozoite were examined in small samples of the duodenal content and in the lumen of small intestine that were put on slides. A drop of 0,09% saline solution was added and the material was covered with cover glass and diagnosed by light microscopy, as described by Gilioli (2003). Specific identification was based on a microscopic morphological analysis at magnifications of 100x and 400x (Hsu, 1982; Owen, 1992). Whenever necessary, protozoan cysts were stained with iodine solution to enable their identification. Eggs and adult forms of the *Trichosomoides crassicauda*, endoparasite of the urinary bladder of rats were investigated. The specific endoparasite identification was made by microscopic morphological evaluation at magnifications of 100x and 400x, as described

by Owen (1992), Cornish et al. (1988), and Gilioli (2003).

## RESULTS

Data analysis based on the questionnaire and local regular visits to the animal houses have showed that only one animal house (7.7%) had a nearly complete set of sanitary barriers to supply and maintain mice under controlled sanitary conditions. Most of the animal houses (92.3%) still maintain colonies under conventional conditions that are not planned to support SPF animals, since only one animal house (7.7%) has appropriate facilities. Out of the 13 animal houses under study, three (23.0%) showed a central ventilation system, three (23.0%) had proper devices, including a double door autoclave, and seven (53.8%) used vertical autoclaves to sterilize materials and supplies. Ventilated shelves and racks (ventilated isolator cages with filter-top) were used in eight (61.5%) of the animal houses investigated, and isolators in one of them (7.7%). Sanitizing showers to access the clean areas were present in one animal house (7.7%). Cleaning-up in the breeding rooms was performed in 11 (84.6%) of the animal houses and uniform sterilization in one (7.7%) of them. Concerning disinfection/sterilization of materials and supplies, 13 (100%) performed sterilization or disinfection of cages, four (30.8%) sterilized food, and five (38.5%) sterilized the water. The wood shaving was sterilized in nine (69.2%) animal houses.

Breeding and maintenance of different species of mice and rats in the same breeding room was observed in five (38.5%) of the animal houses that were: hamsters (*Mesocricetus auratus*); marmoset (*Callithrix penicillata*); rabbits (*Oryctolagus cuniculus*); gerbils (*Meriones unguiculatus*); calomys (*Calomys sp*); and guinea pigs (*Cavia porcellus*).

A regular program for sanitary monitoring of parasites, viruses and bacteria was carried out in one (7.7%) animal house. Parasite monitoring was performed by three (23.0%) of the animal houses and bacteria monitoring was performed by one (7.7%) of them.

As for human resources to manage the animal houses, six (46.2%) animal houses reported to have a specialized technical team and five

Sanitary profile in mice and rat...

(38.5%) had sufficient personnel to perform the activities.

Results of the parasite survey, including ecto and endoparasites, in mice and rat colonies are shown in Tables 1 and 2, respectively. In 13 mice colonies, only one animal house (B) was negative for all parasites investigated, and 92.3%

were positive for *Syphacia obvelata*, 61.5% for *Trichomonas minuta*, and 84.6 % for *Entamoeba muris* (Table 1). In seven rat colonies, every animal house under study showed positive results for all parasites investigated, out of which 85.7% were positive for *Syphacia muris* and most protozoan species under study (Table 2).

Table 1. Occurrence of parasite in mice colonies in 13 animal houses investigated in the State of Minas Gerais

	Animal house (Number of examined animals)													Total of positives (%)
	A (48)	B (19)	C (12)	D (13)	E (48)	F (72)	G (36)	H (12)	I (12)	J (12)	K (12)	L (12)	M (36)	
Ectoparasite														
<i>Myobia musculi</i>	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	0	0	1	23.1
<i>Myocoptes musculus</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	4	2	12	0	12	38.5
<i>Radfordia affinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	15.4
Helminth														
<i>Syphacia obvelata</i>	14	0	3	2	11	16	28	9	7	6	9	7	20	92.3
<i>Aspicularis tetraptera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	4	0	23.1
<i>Hymenolepis nana</i>	0	0	0	0	6	0	0	0	0	3	0	0	0	15.4
Protozoan														
<i>Spiroucleus muris</i>	0	0	2	0	0	5	0	0	2	1	10	0	5	46.2
<i>Giardia muris</i>	1	0	0	0	1	6	0	3	5	0	0	0	2	46.2
<i>Tritrichomonas muris</i>	0	0	0	0	29	0	23	0	12	12	12	11	30	53.8
<i>Trichomonas minuta</i>	0	0	2	0	0	2	24	0	12	12	12	11	30	61.5
<i>Hexamastix muris</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.7
<i>Entamoeba muris</i>	6	0	4	0	9	2	13	2	4	1	4	1	10	84.6

Table 2. Occurrence of parasite in rat colonies in seven animal houses investigated in the State of Minas Gerais

	Animal house (Number of examined animals)							Total of positives (%)
	A (36)	G (24)	H (7)	I (12)	J (12)	K (12)	M (8)	
Ectoparasite								
<i>Poliplax spinulosa</i>	0	0	0	9	0	0	0	14.3
Helminths								
<i>Syphacia muris</i>	27	0	7	11	11	10	7	85.7
<i>Trichosomoides crassicauda</i>	1	0	0	0	0	0	3	28.6
Protozoan								
<i>Spiroucleus muris</i>	27	3	0	2	4	7	8	85.7
<i>Tritrichomonas muris</i>	36	24	0	11	12	10	7	85.7
<i>Trichomonas minuta</i>	36	16	0	12	11	11	8	85.7
<i>Hexamastix muris</i>	1	0	0	0	0	0	0	14.3
<i>Entamoeba muris</i>	20	8	0	6	6	3	5	85.7

DISCUSSION

The animal house B has succeeded in breeding laboratory animals with defined sanitary quality due to its aim at growing germ-free animals. In order to reach this goal, the animals were kept in positive pressure isolators and following strict sterilization procedures for all material and supplies (cages, water bottles, food, wood shaving) used for handling the animals, what

reinforces the idea that the stricter the sanitary barriers, the smaller the probability of detecting pathogens in the colonies (Gilioli, 2003). Unlike animal house B, in most of the other animal houses (92.3%), the majority of animals were kept on shelves in open cages and there was no efficient system of protection barriers for SPF animals husbandry. Besides, the absence of proper facilities for breeding and keeping the animals shows the need of planning by experts in

the area so that the facilities meet the requirements for each species and enable microbiological, parasitological, and environmental control for husbandry of high quality standard laboratory animals (Andrade et al., 2002).

Double door autoclave is the main piece of equipment used for sterilization in the animal house, and the results of this study showed that 10 animal houses did not have it, what may jeopardize material and supplies sterilization processes. Regarding water quality, it must be of potable standard, it must be sterilized before being given to the animals and frequently changed in order to prevent circulation of harmful water born substances and pathogenic agents mainly protozoa (De Lucca et al., 1996). The fact that eight animal houses did not sterilize the water or did not frequently change it may explain the large number of animal houses that were positive for protozoa, especially *Entamoeba muris* (>80%).

The results showed that nine animal houses sterilized wood shaving used for animal bedding. This supply is part of the micro environment of the animals, so it may be one of the main sources of contamination in the colonies, therefore, it should always be sterilized to prevent the outbreak of diseases (Andrade et al., 2002).

Although five animal houses in different institutions had been gradually substituting the use of open cages for ventilated isolator cages with filter-top (micro isolators), the animals were still found infected. This fact indicates that other control measures such as sanitizing showers, disinfection/sterilization of materials, supplies, breeding areas and their re-colonization with high sanitary quality animals are needed to provide SPF animals.

The lack of facilities, devices, expertise and rigorous sanitary barriers associated with poor management in animal houses enable dissemination of pathogenic agents detected within and among colonies maintained in breeding rooms, physically separated, but handled by the same personnel (Hombberger and Thomann, 1994; Gilioli, 2003).

Furthermore, high parasite prevalence was expected in the animal houses investigated due to

the presence of different species of mice and rats in the same breeding room/area. It is preconized that animals of different species are physically separate to avoid interspecific transmission of diseases, anxiety, and possible behavioral or physiological alterations caused by conflicts among species. If it is not possible to separate the species, mice and rats may be grown in the same area due to their similar pathogenic profile and compatible behavior (National..., 2003). Nowadays, transference of biological material and genetically modified mice among different institutions, with no regular quarantine sanitary programs and caesarian rederivation of the animals, has also enabled dissemination of pathogenic agents among colonies (Nicklas and Weiss, 2000; Mahabir et al., 2004).

Regarding the category of the parasites investigated, five animal houses were positive for ectoparasites, helminthes and protozoa (G, I, J, K e M), and seven animal houses were positive for helminthes and protozoa (A, C, D, E, F, H e L). Regarding the ectoparasites searched, mice colonies showed higher rate of infection by *Myocoptes musculus*, what confirmed high prevalence of this ectoparasite in conventional colonies worldwide. The ectoparasite *Poliplax spinulosa* was found in one rat colony. This species of louse has been reported as biological vector of *Haemobartonella muris* and *Rickettsia typhi* and as a likely vector of *Trypanosoma lewisi* (Gilioli, 2003). The presence of ectoparasites in mice and rat colonies indicates a faulty handling and absence of sanitary barriers (Jacoby and Lindsey, 1997).

Results of the presence of *Syphacia obvelata* and *Syphacia muris* prove the high prevalence and worldwide spread of these helminthes in colonies kept under conventional conditions. Such fact may also be due to the nematode short life cycle that can induce infection in a large number of animals within short periods of time (Zenner and Regnault, 2000; Bazzano et al., 2002).

Cestoid *Hymenolepis nana*, a commonly found parasite in mice and rat colonies kept under conventional conditions was detected in two animal houses (15.4%). It is important to remark that this parasite has a zoonotic potential and its characteristics of autoinfection and direct cycle contribute to maintain the high prevalence of animal infection in the colonies (Fox et al.,

1984). Therefore, infected animals are not recommended for research use due to the risk of transmission among technicians and investigators who handle the colonies. Besides, this parasite may affect experimental results of investigations involving gastrointestinal, hematological, immunological and nutritional issues (Potkay, 1994; Gilioli, 2003).

Yet, regarding the helminthes searched, two animal houses (A e M) were positive for *Trichosomoides crassicauda* in rat colonies. Infection by this pathogen has been associated to eosinophilia, the presence of globular leucocytes in the urinary tract, vesicles and tumors. Besides, migration of larvae to lungs may increase incidence of chronic respiratory diseases, what make animals improper for researching (Zubaidy and Majeed, 1981).

*Trichomonas muris*, *Tritrichomonas minuta*, *Hexamastix muris* and *Entamoeba muris* have been considered commensal agents not related to alterations of the animal health or interferences in experimental results so far. On the other hand, *Spironucleus muris* and *Giardia muris* were the protozoa of high clinical importance detected in this study. In mice colonies, three animal houses were positive for *S. muris* (C, J e K), three were positive for *G. muris* (A, E e H), and three were positive for two protozoa (F, I e M). Whereas in rat colonies, except for animal house H, all of them were positive for *S. muris*. Mild infections by these pathogens in immunocompetent animals are usually symptomless and subclinical. In more severe infections, some clinical signs (diarrhea, creeps, lethargy, weight loss, rachitis) may be observed (Gilioli, 2003).

Infected animals are not indicated for experimental use due to a possible negative influence on experimental results. Although most of these infections are subclinical, they are relevant as they are able to affect the animal physiology, leading to changes in immunological, histological, nutritional, biochemical, and hematological parameters, besides affecting susceptibility to other infectious agents (Pinto et al., 1994; Bazzano et al., 2002).

The results of the current study indicate the need of massive investment on laboratory animal science and technology (physical environment,

equipment, human resources qualification, implementation of strict sanitary barriers and sanitary monitoring) in the animal houses of the state targeting for the high quality of living laboratory animals for biomedical research. Furthermore, quarantine programs are also needed so that new animals or biological materials can be isolated up to the moment their health status may be assessed and then introduced into the sanitary-controlled colonies (Rehg and Toth, 1998; Gilioli, 2003).

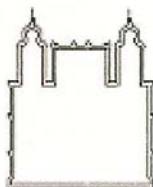
#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Rovilson Gilioli, head of the Laboratório de Controle de Qualidade Animal do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB /Unicamp), for teaching parasitological diagnosis in laboratory rodents, and the Coordinators of the Animal Houses of the state of Minas Gerais for kindly providing animals for the present study.

#### REFERENCES

- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Org). *Animais de laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 388p.
- BAKER, D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effects on research. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, p.231-266, 1998.
- BAZZANO, T.; RESTEL, T.I.; PINTO, R.M. et al. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, p.847-853, 2002.
- CASEBOLT, D.B.; LINDSEY, J.R.; CASELL, G.H. Prevalence rates of infectious agents among commercial breeding populations of rats and mice. *Lab. Anim. Sci.*, v.38, p.327-329, 1988.
- CORNISH, J.; VANDERWEE, M.A.; FINDON, G. et al. Reliable diagnosis of *Trichosomoides crassicauda* in the urinary bladder of the rat. *Lab. Anim.* v.22, p.162-165, 1988.
- DE LUCCA, R.R.; ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T. et al. *Manual para técnicos em bioterismo*. 2.ed. São Paulo: COBEA, FINEP, 1996. p.3-10.
- DILLEHAY, D.L.; LEHNER, N.D.M.; HUERKAMP, M.J. The effectiveness of microisolator cage system and sentinel mice for

- controlling and detecting MHV and Sendai virus infection. *Lab. Anim. Sci.*, v.40, p.367-370, 1990.
- FOX, J.G.; NEWCOMER, C.E.; ROZMIAREK, H. Selected zoonoses and other health hazards. In: FOX, J.G.; COHEN, B.J.; LOEW, F.M. (Eds). *Laboratory animal medicine*. New York: Academic, 1984. p.613-648.
- GILIOLI, R.; ANDRADE, L.A.G.; PASSOS, L.A.C. et al. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.33-37, 2000.
- GILIOLI, R.; SAKURADA, J.K.; ANDRADE, L.A.G. et al. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. *Lab. Anim. Sci.*, v.46, p.582-584, 1996.
- GILIOLI, R. *Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos*. 2003. 138f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- HOMBERGER, F.R.; THOMANN, P.E. Transmission of murine viruses and mycoplasma in laboratory mouse colonies with respect to housing conditions. *Lab. Anim.*, v.28, p.113-120, 1994.
- HSU, C-K. Protozoa. In: FOSTER, H.L.; SMALL, J.D.; FOX, J.G. (Eds). *The mouse in biomedical research: Diseases*. New York: Academic, 1982. v.2 . p.358-372.
- INSTITUTE for Laboratory Animal Resources. Long term holding of laboratory rodents. A report of the Committee on Long-term Holding of laboratory rodents. *ILAR News*, v.19, p.1-25, 1976.
- JACOBY, R.O.; LINDSEY, J.R. Health care for research animals is essencial and affordable. *FASEB J.*, v.11, p.609-614, 1997.
- KRANTZ, G.W. Examination and mounting techniques. In: CERVALLIS (Ed). *Manual of acarology*. 2.ed. Cervallis: Oregon State University, 1978.
- MAHABIR, E.; JACOBSEN, K.; BRIELMEIR, M. et al. Mouse antibody production test: can we do without it? *J. Virol. Meth.*, v.120, p.239-245, 2004.
- NATIONAL Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Comission on life sciences. *Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório*. Goiânia: AAALAC/COBEA, 2003. 162p.
- NICKLAS, W.; WEISS, J. Survey of embryonic stem cells for murine infective agents. *Comp. Med.*, v.50, p.410-411, 2000.
- OWEN, D.G. (Ed). *Parasites of laboratory animals*. Laboratory Animals Handbooks., n.12. London: Royal Society of Medicine Services Limited, 1992. 170p.
- PINTO, R.M.; VICENTE, J.J.; NORONHA, D. et al. Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, p.33-40, 1994.
- POTKAY, S. *Hymenolepis ssp*. In: WAGGIE, K.; KAGIYAMA, N.; ALLEN, A.M. et al. (Eds). *Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals*. Bethesda: National Institute of Health, 1994. p.191-195.
- REHG, J.E.; TOH, L.A. Rodent quarantine programs: purpose, principles and practice. *Lab. Anim. Sci.*, v.48, p.438-477, 1998.
- SHEATER, L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by flotation technique. *J. Comp. Pathol.*, v.36, p.266-275, 1923.
- WEISBROTH, S.H.; PETERS, R.; RILEY, L.K. et al. Microbiological assessment of laboratory rats and mice. *ILAR J.*, v.39, p.1-28, 1998.
- WEISBROTH, S.H. Arthropods. In: FOSTER, H.L.; SMALL, J.D.; FOX, J.G. (Eds). *The mouse in biomedical research: diseases*. New York: Academic, 1982. p.385-401.
- WESCOTT, R.B. Helminths. In: FOSTER, H.L.; SMALL, J.D.; FOX, J.G. (Eds). *The mouse in biomedical research: diseases*. New York: Academic, 1982. v.2. p.372-384.
- ZENNER, L.; REGNAULT, J.P. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study. *Lab. Anim.*, v.34, p.76-83, 2000.
- ZUBAIDY, A.J.; MAJEED, S.K. Pathology of the nematode *Trichosomoides crassicauda* in the urinary bladder of laboratory rats. *Lab Anim.*, v.15, p.381-384, 1981.



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-FIOCRUZ

## CERTIFICADO

**C**ertificamos que o protocolo intitulado :

*" Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e ratos de biotério de Minas Gerais. "*

número P-256/05, proposto por Kelly Alves Bicalho, foi licenciado pelo Nº L-004/06.


Sua licença de Nº L-004/06 autoriza o uso anual de :

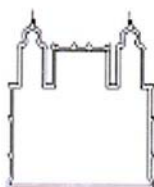
- 350 *Mus musculus*

- 120 *Rattus norvegicus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal ( COBEA ) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ( CEUA - FIOCRUZ ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 1 de junho de 2010,

Rio de Janeiro, 24/09/2008

  
Dra. Norma Vollmer Labarthe  
Coordenadora da CEUA  
FIOCRUZ



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-FIOCRUZ

## CERTIFICADO

**C**ertificamos que o protocolo intitulado :

*" Ocorrência de parvovírus murinos em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros. "*

número P-329/07, proposto por Kelly Alves Bicalho, foi licenciado pelo Nº L-031/07.


Sua licença de Nº L-031/07 autoriza o uso anual de :

- 450 *Mus musculus*

- 200 *Rattus norvegicus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal ( COBEA ) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ( CEUA - FIOCRUZ ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 11 de setembro de 2011.

Rio de Janeiro, 24/09/2008

  
Dra. Norma Vollmer Labarthe  
Coordenadora da CEUA  
FIOCRUZ



## 9 REFERÊNCIAS

- Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, organizadores. Animais de laboratório: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. 388p.
- Baer PN, Kilham L. Dental defects in hamsters infected with *Minute virus of mice*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1974;37:385-9.
- Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, editores. The Laboratory Rat: research applications. New York: Academic Press; 1980. 276p.
- Baker DG. Parasitic diseases. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, eds. The Laboratory Rat. San Diego: Academic Press; 2006. p. 453-78
- Ball-Goodrich LJ, Johnson E. Molecular characterization of a newly recognized mouse parvovirus. J Virol 1994;68(10):6476-86.
- Ball-Goodrich LJ, Leland SE, Johnson EA, Paturzo FX, Jacoby RO. Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup. J Virol 1998;72(4):3289-99.
- Ball-Goodrich LJ, Hansen G, Dhawan R, Paturzo FX, Vivas-Gonzalez BE. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mouse parvovirus infection in laboratory mice. Comp Med 2002;52(2):160-6.
- Balls M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. Lab Anim. 1994;28(3):193-211. Review.
- Balls M. The origins and early days of the Three Rs concept. Altern Lab Anim 2009;37(3):255-65.
- Bauer BA, Besch-Williford CL, Riley LK. Comparison of the mouse antibody production (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of viral contaminants. Biologicals 2004;32(4):177-82.
- Bauer BA, Riley LK. Antemortem detection of *Mouse parvovirus* and *Mice minute virus* by polymerase chain reaction (PCR) of faecal samples. Lab Anim 2006;40(2):144-52.
- Bazzano T, Restel TI, Pinto RM. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:847-53.
- Beall JR, Torning FE, Runkle RS. A laminar flow system for animal maintenance. Lab Anim Sci 1971;21(2):206-12.

Besselsen DG, Besch-Williford CL, Pintel DJ, Franklin CL, Hook RR Jr, Riley LK. Detection of newly recognized rodent parvoviruses by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(11):2859-63a.

Besselsen DG, Besch-Williford CL, Pintel DJ, Franklin CL, Hook RR Jr, Riley LK. Detection of *H-1 parvovirus* and *Kilham rat virus* by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1699-703b.

Besselsen DG, Pintel DJ, Purdy GA, Besch-Williford CL, Franklin CL, Hook RR Jr, et al. Molecular characterization of newly recognized rodent parvoviruses. *J Gen Virol* 1996;77 (Pt 5):899-911.

Besselsen DG. Detection of rodent parvoviruses by PCR. *Methods Mol Biol* 1998;92:31-7.

Besselsen DG, Wagner AM, Loganbill JK. Effect of mouse strain and age on detection of *Mouse parvovirus 1* by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis. *Comp Med* 2000;50(5):498-502.

Besselsen DG, Wagner AM, Loganbill JK. Detection of rodent coronaviruses by use of fluorogenic reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Comp Med* 2002;52(2):111-6.

Besselsen DG, Wagner AM, Loganbill JK. Detection of lymphocytic choriomeningitis virus by use of fluorogenic nucleic acid reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Comp Med* 2003;53(1):65-9.

Besselsen DG, Romero MJ, Wagner AM, Henderson KS, Livingston RS. Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 6):1543-56.

Besselsen DG, Franklin CL, Livingston RS, Riley LK. Lurking in the shadows: emerging rodent infectious diseases. *ILAR J* 2008;49(3):277-90.

Blank WA, Henderson KS, White LA. Virus PCR assay panels: an alternative to the mouse antibody production test. *Lab Anim (NY)* 2004;33(2):26-32. Comment in: *Lab Anim (NY)* 2004;33(2):7.

Bleby J. The training of laboratory animal specialists. In: Rotchild H, editor. Regional / international Scientific Meeting. Laboratory animal Science: Laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Proceedings. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil. ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética; 1986, p.86-93.

Bonnard GD, Manders EK, Campbell DA Jr, Herberman RB, Collins MJ Jr. Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma. Evidence for *Minute virus of mice* causing the inhibition. *J Exp Med* 1976;143(1):187-205.

Bootz F, Sieber I, Popovic D, Tischhauser M, Homberger FR. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials. *Lab Anim* 2003;37(4):341-51.

Botting JH, Morrison AR. Animal research is vital to medicine. *Sci Am* 1997;276(2):83-5.

Brayton C, Mähler M, Nicklas W. Viral infections. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P, eds. *The Laboratory Mouse*. Hannover: Elsevier Academic Press; 2004. p. 357-391.

Bressan CRV, Calgaro GA, Alexandre SR, Marques T. Prevalence of ecto and endoparasites in mice and rats reared in animal houses. *Braz J Vet Res Anim Sci* 1997; 34:142-6.

Brown E, Stanford L, Schellinck HM. Developing standardized behavioral tests for knockout and mutant mice. *ILAR J* 2000;41:163-74.

Brownstein DG, Smith AL, Jacoby RO, Johnson EA, Hansen G, Tattersall P. Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of *Minute virus of mice* and regulation by host genotype. *Lab Invest* 1991;65(3):357-64.

Buret A, Gall DG, Olson ME. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J Parasitol* 1990;76(3):403-9.

Burleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology: a laboratory manual*. San Diego: Academic Press; 1992. 250p.

Cagliada MP, Carbone C, Ayala MA, Laborde JM, Maschi F, Milocco SN, et al. Prevalence of antibodies against *Kilham virus* in experimental rat colonies of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2010;42(1):27-29.

Cardoso C. Legislação Brasileira para o Uso de Animais em Pesquisa. In: Lapchik VB, Mattaraia VGM, KO GM, organizadores. *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. São Paulo: Atheneu, 2009. p.11-28.

Carissimi AS, Merusse JLB. Inter-relação do Desenho Arquitetônico. In: Lapchik VB, Mattaraia VGM, KO GM, organizadores. *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. São Paulo: Atheneu, 2009. p.73-85.

Carthew P, Sparrow S, Verstraete AP. Incidence of natural virus infections of laboratory animals 1976-1977. *Lab Anim* 1978;12(4):245-6.

Carthew P, Verstraete A. A serological survey of accredited breeding colonies in the United Kingdom for common rodent viruses. *Lab Anim* 1978;12(1):29-32.

Carty AJ. Opportunistic infections of mice and rats: Jacoby and Lindsey revisited. *ILAR J* 2008;49(3):272-6.

Casebolt DB, Lindsey JR, Cassell GH. Prevalence rates of infectious agents among commercial breeding populations of rats and mice. *Lab Anim Sci* 1988;38(3):327-9.

Chang A, Havas S, Borellini F, Ostrove JM, Bird RE. A rapid and simple procedure to detect the presence of MVM in conditioned cell fluids or culture media. *Biologicals* 1997;25(4):415-9.

Clifford CB, Cosentino JM. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2006;45:86.

Clifford CB, Watson J. Old enemies, still with us after all these years. *ILAR J*. 2008;49(3):291-302.

Clough G, Gamble MR. *Laboratory Animal House: A guide to design and planning of animal facilities*. Carshalton, Surrey, Medical Research Center. Laboratory Animal Centre, 1976.p.44 (LACC manual series; m.4).

Chorilli M, Michelin DC, Salgado HR. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007;28(1):11-23.

Compton SR, Riley LK. Detection of infectious agents in laboratory rodents: traditional and molecular techniques. *Comp Med*. 2001 Apr;51(2):113-9. Comment in: *Comp Med* 2001 Apr;51(2):109.

Cornish J, Vanderwee MA, Findon GI. Reliable diagnosis of *Trichosomoides crassicauda* in the urinary bladder of the rat. *Lab Anim* 1988;22:162-5.

Cotmore SF, Tattersall P. Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* 1990;177(2):477-87.

Coutelier JP, Coulie PG, Wauters P, Heremans H, Van der Logt JT. In vivo polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J Virol* 1990;64(11):5383-8.

Couto, SER. Instalações e barreiras sanitárias. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. (Orgs). *Animais de laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. p. 33 - 43.

Crawford LV. A *Minute virus of mice*. *Virology* 1966;29(4):605-12.

Cray C, Mateo MO, Altman NH. In vitro and long-term in vivo immune dysfunction after infection of BALB/c mice with *Mouse hepatitis virus* strain A59. *Lab Anim Sci* 1993;43(2):169-74.

De Lucca RR, Alexandre SR, Marques T, organizadores. *Manual para técnicos em bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996. 259p.

Descoteaux JP, Grignon-Archambault D, Lussier G. Serologic study on the prevalence of murine viruses in five Canadian mouse colonies. *Lab Anim Sci* 1977;27(5 Pt 1):621-6.

Detmer A. Zoonoses. In: Svendsen P, Hau J, eds. Handbook of laboratory animal science. New York: CRC Press, 1994. p.71-8.

Dhawan RK, Wunderlich ML, Cowley JP, Ibriami T, Dodge M, Berg E, et al. Virus –like particles as antigen for serological detection of rat parvovirus antibodies. Contemp Top Lab Anim 2004;43:43-44.

Dillehay DL, Lehner ND, Huerkamp MJ. The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and *Sendai virus* infections. Lab Anim Sci 1990;40(4):367-70.

Drazenovich NL, Franklin CL, Livingston RS, Besselsen DG. Detection of rodent *Helicobacter* spp. by use of fluorogenic nuclease polymerase chain reaction assays. Comp Med 2002;52(4):347-53.

Eaton, P. Hygiene in the animal house. In: Poole TB, Robinson R, eds. The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. 6<sup>th</sup> edition. New York: Churchill Livingstone Inc, 1987. p.145-158.

Filipovska-Naumovska E, Abubakar SM, Thompson MJ, Hopwood D, Pass DA, Wilcox GE. Serologic prevalence of MPV 1 in mouse strains in a commercial laboratory mouse colony determined by using VP1 antigen. J Am Assoc Lab Anim Sci 2010;49(4):437-42.

Fikrig MK, Tattersall P. Latent parvoviral infection of continuous cell lines. Dev Biol Stand 1992;76:285-93.

Flynn R. Parasites of laboratory animals. Iowa: Iowa State University Press, 1973. p. 03-492.

Fox JG, Newcomer CE, Rozmiarek H. Selected zoonoses and other health hazards. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, editores. Laboratory Animal Medicine. New York: Academic Press; 1984. P. 613-48.

Gannon J, Carthew P. Prevalence of indigenous viruses in laboratory animal colonies in the United Kingdom 1978-1979. Lab Anim 1980;14(4):309-11.

Gaertner DJ, Jacoby RO, Paturzo FX, Johnson EA, Brandsma JL, Smith AL. Modulation of lethal and persistent rat parvovirus infection by antibody. Arch Virol 1991;118:1-9.

Gärtner K, Büttner D, Döhler K, Friedel R, Lindena J, Trautschold I. Stress response of rats to handling and experimental procedures. Lab Anim 1980; 14(3):267-74.

Gilioli R, Sakurada JK, Andrade LA, Kraft V, Meyer B, Rangel HA. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. Lab Anim Sci 1996;46(5):582-4.

Gilioli R, Andrade LAG, Passos LAC, Silva FA, Rodrigues DM, Guaraldo AMA. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. Arq Bras Med Vet Zootec 2000;52:33-7.

Gilioli R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. Campinas; 2003. Doutorado [Tese em Genética e Biologia Molecular]. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Gondo Y. Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics. *Nat Rev Genet* 2008;9(10):803-10.

Goto K, Hayashimoto N, Ishida T, Takakura A, Kagiya N. First trial in the developmental phase of the "performance evaluation program" based on the ICLAS animal quality network program: self-assessment of microbiological monitoring methods using test samples supplied by ICLAS. *Exp Anim* 2009;58(1):47-52.

Harris RE, Coleman PH, Morahan PS. Stability of *Minute virus of mice* to chemical and physical agents. *Appl Microbiol* 1974;28(3):351-4.

Harrison DJ. Controlling exposure to laboratory animal allergens. *ILAR J* 2001;42(1):17-36.

Henderson KS, Perkins CL, Banu LA, Jennings SM, Dhawan RK, Niksa PL. Isolation of *Rat minute virus*. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2006;45:86-7.

Hottchin J, Sikora E, Kinch W, Hinman A, Woodall J. Lymphocytic choriomeningitis in a Hamster colony causes infection of hospital personnel. *Science* 1976;185:1173-4.

Hsu CK. Parasitic diseases: how to monitor them and their effect on the research. *Lab Anim* 1980;14:48-53.

Hsu CK. Protozoa. In: Foster HL, Small JD, Fox JG, eds. *The Mouse in biomedical research: Diseases*. New York: Academic, 1982. v2. p.358-372.

Hudson M. Why do the numbers of laboratory animal procedures conducted continue to rise? An analysis of the Home Office Statistics of Scientific Procedures on Living Animals: Great Britain 2005. *Altern Lab Anim* 2007;35(1):177-87.

Institute for Laboratory Animal Resources - ILAR. Long term holding of laboratory rodents. A report of the Committee on Long-term Holding of laboratory rodents. *ILAR News* 1976;19(4) L1-L25.

Itoh T. Quality testing system for SPF animals in Japan and problems in the management of such systems. In: International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. *Microbial and phenotypic definition of rats and mice. Proceedings of the 1998 US/Japan conference*. Washington DC: National Academic Press; 1999. P. 15-23.

Jacoby RO, Bhatt PN, Gaertner DJ, Smith AL, Johnson EA. The pathogenesis of *Rat virus* infection in infant and juvenile rats after oronasal inoculation. *Arch Virol* 1987; 95:251-70.

Jacoby RO, Johnson EA, Paturzo FX, Gaertner DJ, Brandsma JL, Smith AL. Persistent *Rat parvovirus* infection in individually housed rats. *Arch Virol* 1991;117(3-4):193-205.

Jacoby RO, Johnson EA, Ball-Goodrich L, Smith AL, McKisic MD. Characterization of *Mouse parvovirus* infection by in situ hybridization. *J Virol* 1995;69(6):3915-9.

Jacoby RO, Ball-Goodrich LJ, Besselsen DG, McKisic MD, Riley LK, Smith AL. Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci* 1996;46(4):370-80.

Jacoby RO, Lindsey JR. Health care for research animals is essential and affordable. *FASEB J* 1997;11(8):609-14.

Jacoby RO, Ball-Goodrich L, Paturzo FX, Johnson EA. Prevalence of *Rat virus* infection in progeny of acutely or persistently infected pregnant rats. *Comp Med* 2001;51:38-42.

Jacoby RO, Smith AL. *Mouse parvovirus*: survival of the fittest. *Comp Med* 2003;53(5):470-1

Jacoby RO, Gaertner D. Viral disease. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL editors. *The laboratory rat*. San Diego: Academic Press; 2006. p. 423-51.

Janus LM, Mähler M, Köhl W, Smoczek A, Hedrich HJ, Bleich A. *Minute virus of mice*: antibody response, viral shedding, and persistence of viral DNA in multiple strains of mice. *Comp Med* 2008;58(4):360-8.

Kajiwara N, Ueno Y, Takahashi A, Sugiyama F, Sugiyama Y, Yagami K. Vertical transmission to embryo and fetus in maternal infection with *Rat virus* (RV). *Exp Anim* 1996;45(3):239-44.

Kamya M, Oku Y, Itoh T, kagiyama N. Iwai H. Parasitological survey on four barrier-sustained mouse and rat colonies. *Exp Anim* 1979;28:409-13.

Khachoian VI, Arakelian LA. Case of the transmission of the rat trypanosome by lice. *Parazitologia* 1978;12: 451-453.

Kilham L, Olivier LJ. A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* 1959;7(4):428-37.

Kilham L, Margolis G. Spontaneous hepatitis and cerebellar "hypoplasia" in suckling rats due to congenital infections with *Rat virus*. *Am J Pathol* 1966;49(3):457-75.

Kilham L. Mongolism associated with *Rat virus* (RV) infection in hamsters. *Virology* 1961;13:141-3.

Kimura LMS. Principais zoonoses. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. (Orgs). Animais de laboratório: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. p. 201-210.

Knight J; Abbott A. Mouse genetics: full house. Nature 2002;417(6891):785-6.

Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice and lethal intestinal virus infection of infant mice. Natl Cancer Inst Monogr 1966;20:55-61.

Ko GM, Damy SB. Controle do Macro e do Microambiente. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, KO GM, organizadores. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 273 -293.

Kraft V, Meyer B. Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. Lab Anim Sci 1986;36(3):271-6.

Krantz GW. Manual of Acarology. 2nd ed. Cervallis: Oregon State University Bookstores; 1978. 509p.

Kunita S, Chaya M, Hagiwara K, Ishida T, Takakura A, Sugimoto T, et al. Development of ELISA using recombinant antigens for specific detection of mouse parvovirus infection. Exp Anim 2006;55(2):117-24.

Lane-Petter W. The animal house and its equipment. In: UFAW, Hume CW. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 5th ed. Edinburg: Churchill Livingstone; 1976. P.75-134.

Lapchik VBV, Mattaraia VGM, KO GM, organizadores. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu, 2009. 730p.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 2007;23:2947-8.

Liang CT, Shih A, Chang YH, Liu CW, Lee YT, Hsieh WC, et al. Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. J Am Assoc Lab Anim Sci 2009;48(4):381-6.

Lindsey JR, Casebolt DB, Cassel GH. Animal health in toxicological research: an appraisal of past performance and future prospects. In: Davies CL, Baldwin JK, Hoover BK, editores. Managing conduct and data quality of toxicology studies. New Jersey: Princeton Scientific Publishing, 1986. P. 155-71.

Livingston RS, Besselsen DG, Steffen EK, Besch-Williford CL, Franklin CL, Riley LK. Serodiagnosis of *Mice minute virus* and *Mouse parvovirus* infections in mice by enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed recombinant VP2 proteins. Clin Diagn Lab Immunol 2002;9(5):1025-31.



Livingston RS, Riley LK. Diagnostic testing of mouse and rat colonies for infectious agents. *Lab Anim* 2003;32(5):44-51.

Lloyd G, Bowen ET, Jones N, Woodall JT. Lymphocitic choriomeningitis in laboratory personnel exposed to hamsters inadvertently infected with LCM virus. *J Am Vet Med Assoc* 1984;171:829-32.

Lussier G, Descôteaux JP. Prevalence of natural virus infections in laboratory mice and rats used in Canada. *Lab Anim Sci* 1986;36(2):145-8.

Mähler M, Nicklas W. Health monitoring. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P eds. *The Laboratory Mouse*. Hannover: Elsevier Academic Press; 2004. p. 449-462.

Mähler M, Köhl W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in Western Europe. *Lab Anim (NY)* 2009;38(5):161-5.

Mann MD, Crouse DA, Prentice RD. Especial topic Overview: appropriate animal numbers in biomedical research in light of animal welfare considerations. *Lab Anim Sci* 1991;41:6-14.

McKisic MD, Lancki DW, Otto G, Padrid P, Snook S, Cronin DC, et al. Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells. *J Immunol* 1993;150(2):419-28.

McLaren LC. Hemagglutination inhibition and hemadsorption. In: Specter S, Lancz GJ editors. *Clinical Virology Manual*. New York: Elsevier Science Publishing Company; 1986. p. 202-203.

Menendez RC. *Animales de laboratorio en las investigaciones biomédicas*. Cuba: La Habana Editorial Ciencias Medicas; 1985.

Müller CA. Cuidados para prevenção de zoonoses: In: Molinaro EM; Majerowicz J; Valle S, organizadores. *Biossegurança em Biotérios*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. P. 119 - 28.

Nakagawa M, Saito M, Suzuki E, Nakayama K, Matsubara J, Muto T. Ten years-long survey on pathogen status of mouse and rat breeding colonies. *Exp Anim* 1984;33(1):115-20.

National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. *Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório*. Goiânia: AAALAC/COBEA; 2003. 162p.

Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, et al.; FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 2002;36(1):20-42.

Nicklas W, Kraft V, Meyer B. Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab Anim Sci* 1993;43(4):296-300.

Orcutt RP, Phelan RS, Geistfeld JG. Exclusion of *Mouse hepatitis virus* from a filtered, plastic rodent shipping container during an in transit field challenge. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2001;40(4):32-5.

Owen DG, ed. *Parasites of laboratory animals*. London: Royal Society of Medicine Services Limited, 1992. 170p.

Parker JC, Collins MJ Jr, Cross SS, Rowe WP. *Minute virus of mice* .II. Prevalence, epidemiology, and occurrence as a contaminant of transplanted tumors. *J Natl Cancer Inst* 1970;45(2):305-10.

Parker JC, O'Beirne AJ, Collins MJ Jr. Sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation, and hemagglutination inhibition serological tests for detection of *Sendai virus* antibody in laboratory mice. *J Clin Microbiol* 1979;9(3):444-7.

Paton W. *Man and Mouse. Animals in Medical Research*. New York: Oxford University Press, 1984. 162p.

Pessoa MCTR, Lapa RCC, Vieira VM. Arquiteura e Biosegurança. In: Molinaro EM, Majerowicz J, Valle S, organizadores. *Biossegurança em Biotérios*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 19-33.

Pinto RM, Vicente JJ, Noronha D. Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994;89:33-40.

Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim* 2009;43(2):165-73. Epub 2008 Nov 17.

Pritchett KR, Henderson KS, Simmons JH, Shek WR. Differences in susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to infection with a field isolate of *Mouse parvovirus* (MPV-1). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2006;45:72.

Pritchett KR. Helminth parasites of laboratory mice. In: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL, eds. *The mouse in biomedical research*. Second edition (Academic Press). San Diego: Academic Press; 2007. p. 551-559.

Redig AJ, Besselsen DG. Detection of rodent parvoviruses by use of fluorogenic nuclease polymerase chain reaction assays. *Comp Med* 2001;51(4):326-31. Erratum in: *Comp Med* 2003;52(2):following table of contents.

Rehg JE, Toth LA. Rodent quarantine programs: purpose, principles and practice. *Lab Anim Sci* 1998;48:438-77.

Riley LK, Knowles R, Purdy G, Salomé N, Pintel D, Hook RR Jr, et al. Expression of recombinant parvovirus NS1 protein by a baculovirus and application to serologic testing of rodents. *J Clin Microbiol* 1996;34(2):440-4.

Roach PD, Wallis PM, Olson ME. The use of metronidazole, tinidazole and dimetridazole in eliminating trichomonads from laboratory mice. *Lab Anim* 1988;22(4):361-4.

Rosenkrans A, Jurkiewicz A, Corrado A. Situação dos biotérios brasileiros: fator limitante de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos de produtos naturais. *Ciênc Cult* 1978;32:156-63.

Rowe WP, Hartley JW, Capps WI. *Mouse hepatitis virus* infection as a highly contagious, prevalent, enteric infection of mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963;112:161-5.

Russel, WMS; Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen, 1959, 238p. Apud Balls M, Festing MFW, Flecknell PA. The tree Rs: development in laboratory animals science. *Lab Anim* 1994;28:193-321.

Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 1994;17(5):915-18.

Schoondermark-van de Ven EM, Philipse-Bergmann IM, van der Logt JT. Prevalence of naturally occurring viral infections, *Mycoplasma pulmonis* and *Clostridium piliforme* in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003. *Lab Anim* 2006;40(2):137-43.

Shek, W. Estandardization of rodent health surveillance: regulation versus competition. In: International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. Microbial status and genetic evaluation of mice and rats. Proceedings of the 1999 US/Japan Conference. Washington DC: National Academic Press; 2000. P. 11-15.

Shek WR, Paturzo FX, Johnson EA, Hansen GM, Smith AL. Characterization of *Mouse parvovirus* infection among BALB/c mice from an enzootically infected colony. *Lab Anim Sci* 1998;48(3):294-7.

Shek, W. Charles River Laboratories Short Course. Detecting & Controlling Rodent Parvoviruses. [s.l.]: [s.n.], 2003. 14 p. Disponível em: [http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm\\_rm\\_r\\_detecting\\_rodent\\_parvo.pdf](http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_detecting_rodent_parvo.pdf) . Acesso em: 22 nov. 2011.

Shek WR, Pritchett KR, Clifford CB, White WJ. Large-scale rodent production methods make vendor barrier rooms unlikely to have persistent low-prevalence parvoviral infections. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2005;44(4):37-42.

Silva AC. Trinta anos em apoio à pesquisa e ao desenvolvimento. Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo. São Paulo: Edusp, 1994.

Smith AL, Jacoby RO, Johnson EA, Paturzo F, Bhatt PN. In vivo studies with an "orphan" parvovirus of mice. *Lab Anim Sci* 1993;43(2):175-82.

Smith AL. Response of weanling random-bred mice to inoculation with *Minute virus of mice*. *Lab Anim Sci* 1983;33(1):37-9.

Svendsen P, Hau J. Handbook of Laboratory Animal Science: animals models. Ann Arbor: CSC Press, Inc., 1994, vll. 212p.

Svendsen P. Environmental impact on animal experiments. In: Svendsen P, Hau J, editores. Handbook of laboratory animal science: selection and handling of animals in biomedical research. Florida: CRC Press; 1994. P.191-202.

Takatsy G. The use of spiral loops in serological and virological micro-methods. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1955;3(1-2):191-202.

Tattersall P, Cawte PJ, Shatkin AJ, Ward DC. Three structural polypeptides coded for by *Minute virus of mice*, a parvovirus. *J Virol* 1976;20(1):273-89.

Tattersall P, Cotmore SF. The rodent parvoviruses. In: Bhatt PN, Jacoby RO, Morse HC, New AE, editores. Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodent: effects on biomedical research. Orlando: Academic Press; 1986. P.305-348.

Taylor K, Copley CG. Diagnosis of *Kilham rat virus* using PCR. *Lab Anim* 1994;28(1):26-30.

Toolan HW. Experimental production of mongoloid hamsters. *Science* 1960;131:1446-8.

Toolan HW. Degeneration of lens and overgrowth of Harderian glands in hamsters neonatally injected with parvovirus MVM-i. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;172:351-356.

Trexler PC. Animal of defined microbiological status. In: Poole TB, editor. The Ufaw handbook on the care and management of laboratory animals. 6th ed. New York: Churchil Livingstone; 1987. P. 85-98.

Uchiyama A, Besselsen DG. Detection of *Reovirus* type 3 by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Lab Anim* 2003;37(4):352-9.

Ueno Y, Sugiyama F, Sugiyama Y, Ohsawa K, Sato H, Yagami K. Epidemiological characterization of newly recognized rat parvovirus, "Rat orphan parvovirus". *J Vet Med Sci* 1997;59(4):265-9.

Ueno Y, Iwama M, Ohshima T, Sugiyama F, Takakura A, Itoh T, Yagami K. Prevalence of "Orphan" parvovirus infections in mice and rats. *Exp Anim* 1998;47(3):207-10.

Vessel ES, Lang CM, White WJ. Environmental and genetics factors affecting the response of laboratory animals to drugs. *Fed Proc* 1976; 35: 1125-32.

Wagner AM, Loganbill JK, Besselsen DG. Detection of *Sendai virus* and *Pneumonia virus of mice* by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Comp Med* 2003;53(2):173-7.

Wan CH, Bauer BA, Pintel DJ, Riley LK. Detection of *Rat parvovirus type 1* and *Rat minute virus type 1* by polymerase chain reaction. *Lab Anim* 2006;40(1):63-9.

Wan CH, Söderlund-Venermo M, Pintel DJ, Riley LK. Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 8):2075-83.

Wasson K. Protozoa. In: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL, editores. *The mouse in biomedical research*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press; 2007. P. 517-539.

Ward DC, Tattersall PJ. *Minute virus of mice*. In: Foster HL, Small JD, Fox JG, editores. *The mouse in biomedical research: diseases*. New York: Academic; 1982. v.2 . P.313-333.

Weisbroth S. Arthropods. In: Foster HL, Small JD, Fox JG, editores. *The mouse in biomedical research: diseases*. New York: Academic; 1982. v.2. P.385-401.

Weisbroth SH, Peters R, Riley LK, Shek W. Microbiological assessment of laboratory rats and mice. *ILAR J* 1998;39(4):272-290.

Wescott RB. Helminths. In: Foster HL, Small JD, Fox JG, editores. *The mouse in biomedical research: diseases*. New York: Academic; 1982. v.2. P.372-384.

Yang FC, Paturzo FX, Jacoby RO. Environmental stability and transmission of *Rat virus*. *Lab Anim Sci* 1995;45(2):140-4.

Zenner L, Regnault JP. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study. *Lab Anim* 2000;34(1):76-83.

Zhan D, Roy MR, Valera C, Cardenas J, Vennari JC, Chen JW, et al. Detection of *Minute virus of mice* using real time quantitative PCR in assessment of virus clearance during the purification of mammalian cell substrate derived biotherapeutics. *Biologicals* 2002;30(4):259-70.

Zubaidy AJ, Majeed SK. Pathology of the nematode *Trichosomoides crassicauda* in the urinary bladder of laboratory rats. *Lab Anim* 1981;15:381-4.