

AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA E A EFICÁCIA DE UM PROTOCOLO DE VERMIFUGAÇÃO EM RATOS MANTIDOS EM BIOTÉRIO

PARASITOLOGICAL EVALUATION AND THE EFFECTIVENESS OF A VERMIFUGAL PROTOCOL IN BIOTERAL CARRIED RATS

ANA LOUISE DE ARAÚJO LIMA. Acadêmica do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço.

BRUNA DE MATTOS IVO JUNQUEIRA. Acadêmica do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço.

LÍVIA MARIA DE ARAÚJO LIMA. Acadêmica do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço.

PATRÍCIA GONÇALVES DA MOTTA. Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES – Univaço.

ANALINA FURTADO VALADÃO. Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço

MICHELLE CARVALHO MAIA. Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES – Univaço.

JAQUELINE MELO SOARES. Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço.

Rua Juiz de Fora nº60/208, Bairro Centro, Ipatinga-MG, CEP 35160-031. E-mail: patgmotta@gmail.com

RESUMO

Os animais de laboratório são adequados e necessários para o desenvolvimento de estudos biológicos, tornando indispensável os cuidados com as condições sanitárias. O objetivo deste estudo foi verificar a eficiência da vermifugação como barreira sanitária utilizada no Biotério do Instituto Metropolitano de Ensino Superior por meio de análise parasitológica das fezes e definir o padrão de sanidade dos animais de experimentação. Foi realizada uma análise de 23 amostras de fezes dos ratos do Biotério, da espécie *Rattus norvegicus*, anterior e posteriormente à administração do medicamento Ivermectina comercial. As fezes foram processadas através da técnica de sedimentação por centrifugação e analisadas com microscópio de luz. O processo de vermifugação ocorreu em duas etapas, com intervalo de 15 dias, no intuito de melhorar a eficácia do tratamento. Antes da vermifugação foi encontrado o protozoário *Entamoeba muris* em apenas uma amostra (4,34%), sendo esta espécie considerada um micro-organismo não patogênico. Uma nova análise, 15 dias após a vermifugação, constatou a ausência de qualquer espécie de parasito. O protocolo de vermifugação utilizado foi considerado eficiente, entretanto ainda faz-se necessário a manutenção e o aprimoramento das medidas de controle que previnam o aumento da contaminação por parasitos e, conseqüentemente, a interferência nos resultados dos procedimentos experimentais.

PALAVRAS-CHAVE: Animais De Laboratório. Biotério. Controle Sanitário. Parasitoses. *Entamoeba Muris*.

ABSTRACT

Research animals are appropriate and necessary for the development of biological studies, being the animals' health conditions indispensable. The aim of this study was to verify the efficacy of vermifugation as a sanitary barrier used in the animal facility of Instituto Metropolitano de Ensino Superior through a parasitological analysis of feces and to define the sanitary standard of experimental animals. An analysis of 23 faeces samples from rats, *Rattus norvegicus* species, of the animal facility before and after administration of the commercial Ivermectin drug was performed. The feces were processed by sedimentation technique by centrifugation and analyzed under a microscope. The vermifugation process occurred in two stages, with an interval of 15 days, to improve the effectiveness of the treatment. Before the vermifugation, the protozoan *Entamoeba muris* was found in only one sample (4.34%), being this species considered a non-pathogenic microorganism. A new analysis, 15 days after vermifugation, found the absence of any parasite species. The vermifugation protocol used was considered efficient; however, it is still necessary to maintain and improve the control measures that prevent the increase of contamination by parasites and, consequently, the interference in the results of the experimental procedures.

KEYWORDS: Laboratory Animals. Animal Facility. Sanitary Control. Parasitoses. *Entamoeba Muris*.

INTRODUÇÃO

Os roedores mantidos em biotério são adequados e necessários para um bom desenvolvimento de vários ensaios biológicos que visam a melhoria da qualidade de vida humana e dos próprios animais. A utilização destes animais propicia aos pesquisadores a possibilidade de testar suas teorias e realizar suas pesquisas, balizadas pelas regulamentações éticas (CONCEA, 2016). Além disso, aprimoram-se técnicas de bioterismo para que se tenham condições adequadas e específicas de ambiente, alojamento, manuseio, controle e prevenção de doenças (BAZZANO et al., 2002; CECÍLIO; DONATO, 2013; CONCEA, 2016; POLITI, 2008). Portanto, para que os resultados experimentais sejam confiáveis, é necessário que o animal esteja em homeostase fisiológica e livre de infecções (BAUMANS, 2010; BRANCO et al., 2011; PAVANELLI, 2016).

Os biotérios são locais capazes de reproduzir e manter espécies animais destinadas a servir como reagentes biológicos em diversos tipos de ensaios controlados, com o intuito de atender as necessidades dos programas de pesquisa, ensino, produção e controle de qualidade nas áreas biomédicas, além de ciências humanas e tecnológicas de acordo com a finalidade da instituição. Na prática, o biotério de manutenção deve ser próximo ao laboratório de pesquisa, pois os animais ficarão alojados durante um período experimental determinado, facilitando o manuseio dos mesmos e reduzindo o estresse (CARDOSO, 2001; MÜLLER, 2014).

Raramente os animais de biotério são investigados quanto à presença de parasitoses e, segundo Bazzano et al. (2002) e Scaini et al. (2003), os cuidados

com as condições zootécnicas são indispensáveis para que não haja interferências nos resultados das pesquisas e em testes biológicos, além de garantir a segurança de técnicos e pesquisadores quanto ao risco de doenças ocupacionais. Por este motivo, é recomendado que animais alojados sejam monitorados e tratados, caso necessário. Segundo Minagawa (2007) e Politi (2008), deve-se garantir a integridade física dos animais, levando-se em consideração a contaminação biológica, a genética, a nutrição e a correta manipulação. A fim de minimizar testes que possam ser invalidados, a prática dos 3R's é desejável, melhorando o refinamento, viabilizando a redução e a substituição de animais na pesquisa (KILKENNY, 2010).

É fundamental que se conheça o padrão biológico dos animais presentes no biotério, para que haja controle das infecções e para que a prevenção se torne possível. Este fator é especialmente importante quando se necessita introduzir animais externos, uma vez que este fato pode gerar uma epidemia na colônia receptora, se animal recém chegado não for devidamente controlado e aclimatado ao novo ambiente (POLITI et al., 2008).

Em termos de experimentação animal, os pesquisadores almejam que esses apresentem condições zootécnicas ideais e assim atendam a parâmetros de qualidade genética e sanitária, uma vez que funcionam como "reagentes biológicos". Para assegurar a produção de animais de laboratório com qualidade satisfatória para o uso nas pesquisas, os requisitos mínimos são instalações, equipamentos e manejo apropriados, além de pessoal habilitado (CECÍLIO; DONATO, 2013).

As práticas adequadas de higiene ajudam a prevenir a transmissão de doenças infecciosas e manter a saúde dos animais e dos manipuladores. Para o estabelecimento de procedimentos operacionais de manejo em um biotério, deve-se levar em consideração a natureza dos agentes infecciosos, as prováveis vias de entrada, a maneira de prevenir o agente e a validação dos métodos de higiene (CECÍLIO; DONATO, 2013; MINAGAWA, 2007).

O biotério deve seguir um padrão de barreira sanitária, que compreende todo um conjunto de elementos físicos, químicos, de instalações, de procedimentos e de uso de equipamentos, que tende a dificultar a entrada e a propagação de enfermidades que possam afetar os animais. Sendo assim, é necessário o controle da qualidade do ar, que requer um sistema de exaustão com trocas regulares de ar, controle de temperatura e umidade visando reduzir a presença de micro-organismos e poluentes (CECÍLIO; DONATO, 2013; MINAGAWA, 2007).

Diante da importância de conhecer e controlar a saúde dos roedores mantidos em biotério, o presente trabalho visou verificar a eficiência da vermifugação como barreira sanitária utilizada em uma Instituição de Ensino Superior por meio de análise parasitológica, que permitiu inferir o padrão de sanidade dos animais de experimentação, baseado na presença ou ausência de parasitos, com intuito de promover a melhoria do bem-estar dos mesmos e de seus manipuladores.

MATERIAL E MÉTODOS

O biotério do IMES abriga uma colônia de ratos, da espécie *Rattus norvegicus*, que gira em torno de 120 animais, divididos em 23 caixas que comportam até 4 animais.

Sabendo-se que a probabilidade de ocorrência de parasitose em roedores, ratos Wistar, é de aproximadamente 20%, para a realização de um cálculo amostral numa população total de 120 animais presentes no Biotério em estudo e excluindo-se a necessidade de grupo controle, foi estimada uma amostra entre 20 e 30 animais (OpenEpi, versão 3.01)

Devido à inviabilidade de separar os animais individualmente, a amostra foi obtida diretamente das 23 caixas citadas acima, sendo cada caixa considerada como um animal apenas. Desta forma, foi possível englobar 100% da população.

Para a realização do trabalho foi feita a análise das fezes desta amostra, antes e após a administração do vermífugo Ivermectina comercial a 1%.

Inicialmente, foi realizada a coleta das fezes encontradas nas 23 caixas. Esse procedimento foi realizado no primeiro semestre/2015, antes da administração da primeira dose do vermífugo. As coletas das fezes foram realizadas em três dias alternados para a obtenção de um resultado mais confiável. Subsequentemente, os animais receberam por via oral o medicamento e, quinze dias depois da primeira administração, foi realizada uma segunda vermifugação, com intuito de melhorar a eficiência do tratamento. Quinze dias após a segunda administração do medicamento, procedeu-se novamente a coleta das fezes dos animais, agora tratados, em dias alternados.

As fezes coletadas foram acondicionadas em frascos de coleta estéreis, contendo o líquido conservante MIF (Mertiolato, Iodo e Formol) devidamente identificados com o número da caixa, sexo, idade, local e data da coleta e examinadas dentro de um prazo máximo de 24 a 72 horas.

As amostras fecais foram processadas através da técnica de Concentração por Centrífugo-Sedimentação. Foram confeccionadas para cada grupo de animais, alojados em uma caixa, três lâminas coradas com lugol e examinadas diretamente em microscópio de luz com as objetivas de 10x e 40x, sendo realizada a análise qualitativa e quantitativa dos parasitas encontrados. As análises foram feitas no Laboratório de Parasitologia do IMES com o auxílio de visualização de fotos encontradas em artigos científicos e livros texto.

A administração do vermífugo foi realizada por via oral, diluída em água filtrada na concentração de 1%. Essa solução foi oferecida nas mamadeiras por 24 a 30 horas. Os animais tiveram restrição hídrica por aproximadamente oito horas, para melhorar a ingestão da solução de Ivermectina que apresenta baixa palatabilidade. O processo foi repetido após quinze dias para abranger todo o ciclo de vida dos parasitos gastrointestinais possivelmente existentes.

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto Metropolitano de Ensino Superior – IMES (número do protocolo: 05.002.12).

RESULTADOS

Após análise ao microscópio de luz, constatou-se que das 23 amostras analisadas antes da vermifugação, em apenas uma foi encontrado o protozoário parasito da espécie *Entamoeba muris*. Uma nova análise foi realizada 15 dias após a administração do vermífugo ivermectina a 1%, onde foi constatada a ausência de qualquer espécie de parasito (Fig.1).

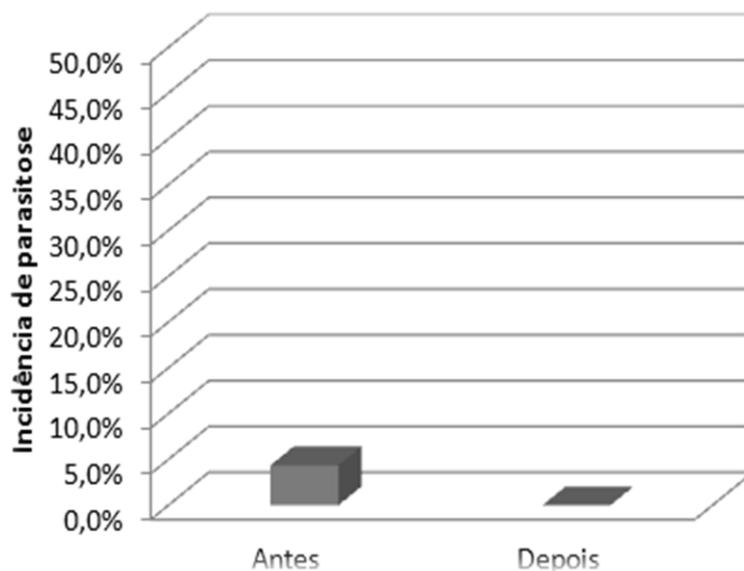


Figura 1- Incidência de parasitos nas amostras analisadas antes e depois da vermifugação.

Fonte: o autor.

DISCUSSÃO

Micro-organismos infecciosos podem estar presentes em modelos animais e comprometer a validade e a reprodutibilidade dos dados experimentais. Para evitar a ocorrência destas infecções é necessário implantar cuidados e metodologias que associados às barreiras sanitárias reduzem os riscos de contaminação nas áreas de criação e de experimentação animal. Desenvolver um programa de controle sanitário, implementar cuidados para a aquisição de novos animais e instalar quarentenas em biotérios experimentais, são algumas medidas importantes para evitar a contaminação e os riscos de alteração de resultados em pesquisas experimentais (CRUZ et al., 2014).

Na análise inicial dos resultados do presente estudo foi possível destacar a existência de regras higiênico-sanitárias adequadas e a eficiência do protocolo de vermifugação utilizado no biotério em questão. Esses parâmetros são importantes para que as interferências nos resultados experimentais e em testes biológicos sejam diluídas.

O *Entamoeba muris* é um protozoário pertencente à classe Sarcodina, família Entamoebidae. Considerado parasito comensal, não interfere na saúde dos roedores nem nos resultados de experimentos realizados. Reproduzem-se por divisão binária e sua transmissão ocorre por via fecal-oral. Os cistos são a forma infectante do parasito. Eles se rompem no duodeno e as amebas colonizam o ceco e o cólon. Essa espécie apresenta uma morfologia idêntica à *Entamoeba coli* e tem sido descrita em diversos tipos de roedores (AHMED; KOYEE; RAHEMO, 2012; BICALHO et al., 2007; MARQUES, 2013; PONCEGORDO; MARTÍNEZ-DÍAZ, 2010).

Mesmo sendo um micro-organismo não patogênico, a presença do *Entamoeba muris* evidencia que em algum momento o animal teve contato com fezes, uma vez que, como citado, a transmissão deste parasito é por via fecal-oral. Este fato demonstra que ter havido falhas de manejo dos animais, provavelmente correlacionadas à higienização das caixas, à troca da maravalha,

ao uso dos equipamentos de proteção individual ou a qualquer outra etapa do trabalho com os mesmos.

O estudo realizado por Bicalho et al. (2007) revelou a prevalência do parasito *Entamoeba muris* de 84,6% nos camundongos de biotérios e de 85,7% nas colônias de ratos. Nesse estudo também foram encontrados nos camundongos os protozoários, *Spironucleus muris* (46,2%), *Giardia muris* (46,2%), *Tritrichomonas muris* (53,8%) e *Trichomonas minuta* (61,5%). O que pode frequentemente explicar essas porcentagens é o fato de não haver esterilização das caixas desses roedores e da maravalha utilizada – sendo esta a possível fonte de contaminação – ou até mesmo da água fornecida aos animais. Em contrapartida, o estudo realizado por Ahmed, Koyee e Rahemo (2012) mostrou prevalência da *Entamoeba muris* de 4%, *Trichomonas muris* (56%), *Syphacia muris* (24%), *Giardia muris* (12%), *Hexamita muris* (8%) e *Hymenolepis spp* (4%). Esse estudo faz uma comparação com as porcentagens encontradas por Bicalho et al. (2007), também justificando o alto índice parasitário, como sendo provavelmente devido à convivência de vários animais em uma mesma caixa e a contaminação da água, dos alimentos e da maravalha.

Animais de laboratório, assim como todos que são mantidos em cativeiro, são mais propensos a infecções parasitárias e infestação, caso as medidas de prevenção necessárias não forem praticadas (MEDEIROS, 2012). Portanto, é fundamental o estudo do padrão biológico e zootécnico dos animais presentes no biotério com a finalidade de evitar doenças e, conseqüentemente a mortalidade, responsáveis por aumento de custos e atraso nos experimentos (MINAGAWA, 2007).

A definição do padrão biológico e zootécnico é especialmente importante quando se necessita introduzir um novo animal no biotério, uma vez que este pode gerar uma epidemia no ambiente se não for devidamente controlado (MINAGAWA, 2007). Com relação ao cuidado do ambiente, é necessário que seja realizada a higienização das caixas e posteriormente a utilização de produto antisséptico, como o álcool 70%. A troca da maravalha deve ser frequente e os dejetos dos animais devem receber destinação adequada segundo a classificação de resíduos.

No presente estudo, as caixas dos animais são higienizadas e desinfetadas com álcool 70%, a troca da maravalha é realizada três vezes por semana, com destinação adequada para os resíduos. A qualidade do ar no biotério é otimizada através do sistema de exaustão, com trocas completas a cada hora. A temperatura e os ruídos são controlados conforme o padrão recomendado (CONCEA, 2016). No caso da umidade, no biotério referenciado, é um parâmetro somente registrado. O acesso ao biotério é restrito, permitido somente mediante o uso de equipamentos de proteção individual (EPI's), tais como máscara, luvas, gorro, propés e jaleco com uso exclusivo nesse ambiente, e na presença de um dos funcionários responsáveis conforme orientado também por Sirois (2007).

Pesquisas apontam que as infecções parasitárias frequentemente levam a alterações fisiológicas e imunológicas nos hospedeiros, além de alta mortalidade em animais jovens. Assim, o animal afetado é mais suscetível ao stress experimental, pois o parasito induz danos teciduais, estimula o crescimento de tecido anormal, compete com o hospedeiro por nutrientes, diminui o volume de sangue e fluidos corporais do roedor e promove inclusive interferência mecânica no trato gastrointestinal (GLIOLI et al., 2000).

A manutenção da boa condição zootécnica dos animais reduz a taxa de interferência em resultados de pesquisas experimentais, além de garantir a segurança dos animais, dos técnicos e dos pesquisadores em relação às parasitoses (MINAGAWA, 2007). Por este motivo, o monitoramento sanitário e parasitológico do biotério é peça-chave na manutenção e saúde dos animais. Além disso, a vermifugação semestral dos roedores indica ser adequada, para que uma infestação seja evitada. Desta forma, é possível zelar pela biossegurança e prevenir infecções.

A forma de administração do vermífugo descrita na metodologia é o protocolo de escolha para os roedores do biotério em estudo. A cada seis meses o tratamento é repetido, visando à saúde dos animais e por consequência a proteção dos profissionais que manipulam os mesmos. A literatura consultada não evidenciou um protocolo comprovadamente eficaz de vermifugação para roedores de biotério, o qual poderia ser adotado por outras instituições, o que promove uma ampla variação de sugestões de tratamentos.

Desta forma, os parâmetros zootécnicos levantados nesse estudo podem servir como referencial para roedores mantidos em biotério. Além disso, os resultados nele encontrados eram previstos, visto que em ambiente controlado idealiza-se uma taxa de infecção baixa, inclusive de parasitos, o que demonstra um bom controle sanitário dos animais utilizados na experimentação.

CONCLUSÃO

Apesar de ter sido encontrada uma baixa taxa de contaminação parasitária, ainda assim faz-se necessário a manutenção e o aprimoramento das medidas de controle zootécnico que previnam a contaminação por parasitos e, conseqüentemente, a interferência nos resultados dos procedimentos experimentais. Além disso, existe a necessidade de mais estudos nesta área, uma vez que a literatura ainda é escassa e pouco elucidativa quanto ao tema e ao protocolo de vermifugação dos animais de biotério.

A análise dos dados indica que a vermifugação realizada nos animais desta instituição foi eficiente, uma vez que após a administração do vermífugo não mais foram encontrados parasitos. Pode-se considerar que o protocolo utilizado pelo biotério em estudo pode ser seguido por outras instituições, dado a comprovação de sua eficácia.

REFERÊNCIAS

AHMED, R. K.; KOYEE, Q. M. K.; RAHEMO, Z. I. F. Intestinal Parasites of Experimental Rodents with Testing the Efficacy of Diagnostic Methods. **International Research Journal of Pharmaceuticals**, v.2, n.3, p.77-81, 2012.

BAUMANS, V. The laboratory mouse. In: HUBRECHT, R.; KIRKWOOD, J. (Ed.). **The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals**. Oxford: Blackwell, 2010. p. 276-310.

BAZZANO, T. et al. Patterns of Infection with the Nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in Conventionally Maintained Laboratory Mice. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, v.97, n.6, p.847-853, 2002.

BICALHO, K. A. et al. Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I - Endo and ectoparasites. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootec**, v.59, n.6, p.1478-1484, 2007.

BRANCO, A. C. S. C. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciência da Saúde**, v.15, n.2, p.209-214, 2011.

CARDOSO, T. A. O. Considerações sobre a Biossegurança em Arquitetura de Biotérios. **Fundação Oswaldo Cruz**, v.64, n.67, p.3-17, 1998-2001.

CECÍLIO, A. B.; DONATO, E.C.P. Monitoramento Ambiental no Biotério. **RESBCAL**, v.2, n.1, p.31-48, 2013.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**, fascículo 1, Brasília, 2016.

CRUZ, A. C. M. et al. Avaliação bacteriológica e parasitológica de ratos (*Rattus norvegicus*) mantidos em biotérios experimentais no Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 2, n. 4, 2014.

GILIOLI, R. 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, n.1, 2000.

KILKENNY, C. et al. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLoS Biology**, v. 8, Issue 6, p. 1-5, 2010.

MARQUES, M. A. P. Controle parasitológico. In: _____ **Animais de laboratório - criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed. FioCruz, 2002, p.333-315.

MEDEIROS, V. B. Endo and ectoparasites in conventionally maintained rodents laboratory animals. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v.3, n.1, p.27-40, 2012.

MINAGAWA, C. Y. **Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, estirpes de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios**. São Paulo, 2007. 108f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MÜLLER, R. et al. Animais de laboratório: qualidade e controle da produção. **RESBCAL**, v.2 n.4, p. 281-287, 2014.

PAVANELLI, M. F. et al. Eficácia de fármacos contra *Giardia muris* em camundongos swiss naturalmente infectados effectiveness of drugs against

Giardia muris in swiss mice naturally infected. **Rev. Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p.1-7, 2016.

POLITI, F. A. S. et al. Caracterização de Biotérios, Legislação e Padrões de Biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.1, p.17-28, 2008.

PONCE-GORDO, F.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. Taxonomía y filogenia del género Entamoeba. Una revisión histórica. **Revista Ibero-Latinoamericana Parasitológica**, v.69, n.1, p.5-37, 2010.

SCAINI, C. J. et al. Helmintos de Ratos Wistar de Diferentes Faixas Etárias Criados em Biotério Convencional. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.70, n.3, p.265-268, 2003.

SIROIS, M. Rato. In: SIROIS, M. **Medicina de Animais de Laboratório: princípios e procedimentos**. São Paulo: Editora Roca, 2007.