VERA LISA GENEROSA DA SILVA PAIVA

**Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos
Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes idades**

São Paulo

2015

VERA LISA GENEROSA DA SILVA PAIVA

**Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar
(*Rattus norvegicus*) em diferentes idades**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Lilian Rose Marques de Sá

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3242
FMVZ

Paiva, Vera Lisa Generosa da Silva
Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes idades / Vera Lisa Generosa da Silva Paiva. -- 2015.
91 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Lilian Rose Marques de Sá.

1. Controle sanitário. 2. Patologia. 3. *Mycoplasma pulmonis*. 4. Respiratório. 5. Biotério.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes idades", protocolado sob o CEUA nº 5470060214, sob a responsabilidade de **Lilian Rose Marques De Sá e equipe; Vera Lisa Generosa da Silva Paiva; Cláudia Madalena Cabrera Mori; Renaide Rodrigues Ferreira Gacek; Thaís Marques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 13/08/2014.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 210 Heterogenics rats (105 males and 105 females), protocol number CEUA 5470060214, under the responsibility of **Lilian Rose Marques De Sá and team; Vera Lisa Generosa da Silva Paiva; Cláudia Madalena Cabrera Mori; Renaide Rodrigues Ferreira Gacek; Thaís Marques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 08/13/2014.

Vigência da Proposta: de 03/2014 a 06/2015

Área: Departamento De Patologia -vpt

Procedência: Biotério do Departamento de Patologia

Espécie: Rato heterogêneo

Gênero: Machos

idade: 1 a 18 meses
de idade N: 105

Linhagem: Wistar

Peso: 50 a 500 g

Procedência: Biotério do Departamento de Patologia

Espécie: Rato heterogêneo

Gênero: Fêmeas

idade: 1 a 18 meses
de idade N: 105

Linhagem: Wistar

Peso: 50 a 300 g

São Paulo, 13 de dezembro de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 25 de fevereiro de 2015
CEUA N [5470060214](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Lilian Rose Marques De Sá
Depto/Disc: Departamento De Patologia -vpt
Lilian Rose Marques De Sá (orientador)

Título do projeto: "Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (Rattus norvegicus) em diferentes idades".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 04/fevereiro/2015) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Pedido de mudança do título do projeto de "Caracterização hematológica, bioquímica, anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (Rattus norvegicus) em diferentes idades", para "Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (Rattus norvegicus) em diferentes idades", pelo motivo da retirada do procedimento da Patologia Clínica do projeto."

Comentário da CEUA: "Projeto já aprovado pela CEUA. As alterações apresentadas no projeto original estão de acordo com as diretrizes da Comissão."

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PAIVA, Vera Lisa Generosa da Silva

Título: **Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes idades**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido,

*sem ti nada disto seria possível, és a minha força e inspiração, o amigo e
companheiro da vida. Amo-te mais que tudo!*

Aos meus pais,

*que sempre moveram “mundos e fundos” para eu chegar até aqui. Tudo o que fiz e
algum dia farei, é para que se possam orgulhar de mim.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lilian Rose Marques de Sá, primeiramente pelo voto de confiança em ter-me aceite como orientanda e por toda a ajuda, momentos vividos, ensinamentos e conselhos que jamais esquecerei.

À Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori, pela concepção inicial deste projeto e pelo apoio prestado durante o seu curso.

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira e Dra. Claudete Serrano Astolfi Ferreira pela disponibilização dos equipamentos e materiais do Laboratório de Ornitopatologia I da FMVZ-USP e pela imensa ajuda, conselhos e partilha de sabedoria.

Ao Alex de Souza, colega e amigo, pela realização de parte dos procedimentos de biologia molecular no Laboratório de Biologia Molecular, do Instituto Evandro Chagas e pela paciência, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Nilson Roberti Benites e Dra. Priscilla Anne Melville do Laboratório de Bacteriologia e Micologia, da FMVZ-USP pela colaboração e por estarem sempre dispostos e prontos a prestar auxílio.

Ao Marco André Alves do Biotério Central do ICB I- USP, por todo o apoio e disponibilidade na realização dos exames parasitológicos.

À Dra. Renaide Rodrigues Ferreira, Simone Lira da Cruz e Ágatha Chaves, do Laboratório de Controle Sanitário Animal do Biotério Central do ICB I- USP, por toda a colaboração e auxílio, nas determinações bacteriológicas e pela amizade.

À Profa. Dra. Silvia Maria Gomes Massironi do Biotério de Experimentação, do ICB IV-USP pela disponibilização do material e auxílio prestado no procedimento de ELISA.

Ao Edson e Raimundo, do Serviço de Anatomia Patológica do VPT, por toda a boa disposição inerente e carinho.

Ao pessoal do Biotério, D. Idalina, Aline, Luciana, Mauro e Nelsinho, por toda a devoção ao seu trabalho, ajuda e pelas boas gargalhadas.

Aos funcionários do Laboratório de Histopatologia do VPT, Cláudio Arroyo e Luciano Antas Bugalho, pelo preparo de algum do meu material e por toda a disponibilidade para ensinar.

Ao Dennis Zanatto, técnico, amigo e salvador nas horas amargas.

Às colegas e amigas de Laboratório Ana López e Ivy Gomes, pela motivação, força e optimismo.

À Thaís Gamon e Andressa Arévalo, pela amizade, desabafos e momentos vividos e partilhados.

Ao Leo Mesquita, pela amizade, carinho, palavras de conforto e sábios conselhos.

Aos amigos da sala da Pós da Farmacologia, Natália, Thaísa, Daniel, Thiago e Rafael, por todos os bons momentos, convívio e apoio.

À Paulinha, minha amiga de coração, tão espontânea, companheira e boa ouvinte. Esteja eu onde estiver, sei que vamos estar sempre próximas.

Ao Luis e Silvana, por toda a ajuda braçal e paciência na realização deste projeto e por serem aqueles amigos para todas as situações, que boas ou ruins, ficam sempre ao meu lado. Vocês são a minha família equatoriana.

À Luciana, a minha doce amiga e a melhor ouvinte do mundo, sempre atenta; estás e ficarás para sempre no meu coração.

Aos restantes amigos, colegas e funcionários do VPT, pela partilha de inúmeros momentos.

À Aline, Guilherme e Júlia, por me terem aberto as portas de sua casa de uma forma tão bonita e generosa, algo que nunca esquecerei e que jamais conseguirei agradecer devidamente.

Às minhas queridas amigas Andreia, Carina, Filipa, Lúcia, Mendes, Sara e Ussman, que apesar de longe, estão sempre tão perto.

À minha família em Portugal, Avó Rosária, Avó Lina, primo Hugo, Sylvie, Beatriz e Joana, de quem morro de saudades, mas que sempre me apoiaram e me deram forças para sonhar e lutar.

Aos meus sogros, sem eles nada disto seria possível.

Aos meus pais maravilhosos, que sempre me ensinaram a ser independente e lutadora, mesmo que sofram com isso.

Ao meu maridão, que sempre me apoiou nas decisões, por mais que o magoem e também pela sua ajuda preciosa, sempre quando mais preciso.

CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para tornar este trabalho possível.

***“O homem não sabe mais que os outros animais; sabe menos.
Eles sabem o que precisam saber. Nós não.”***

Fernando Pessoa, in “*Reflexões Sobre o Homem*” - Textos de 1926-1928

RESUMO

PAIVA, V. L. G. S. **Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes idades.** [Anatomopathological, microbiological and parasitological characterization of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) at different ages]. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os ratos Wistar são amplamente empregados como modelo animal na pesquisa biomédica e o controle sanitário dos biotérios é essencial para garantir a qualidade dos experimentos. O objetivo do estudo foi a caracterização do estado sanitário da colônia de ratos Wistar em sistema de criação convencional e para tanto determinar as bactérias, fungos, vírus e parasitos, bem como caracterizar as lesões anatomopatológicas do sistema respiratório. Foram utilizados 273 ratos (N), machos (M) e fêmeas (F), das faixas etárias 4, 8, 12, 16 a 20 semanas e entre 12 a 18 meses, para as determinações de peso e condição corpórea (N=273, 140M, 133F); avaliação bacteriológica de orofaringe, mucosa intestinal e lavado traqueobrônquico (N=40, 20M, 20F); determinação de anticorpos para vírus e bactérias (N=20, 10M, 10F); exame parasitológico (N=60, 30M, 30F); identificação molecular de *Mycoplasma pulmonis* em amostras de pulmão (N=25, 15M, 10F), e caracterização anatomopatológica da cavidade nasal, orofaringe, laringe, traqueia e pulmão (N=106, 53M, 53F). Foram realizadas ainda avaliações microbiológicas das salas dos ratos em três períodos com isolamento de *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. O peso se mostrou homogêneo dentro da faixa etária e gênero, com apenas sete animais magros (2,56%) e nove em sobrepeso (3,30%). Não foram isoladas bactérias patogênicas na orofaringe, mucosa intestinal e lavado traqueobrônquico por cultivo. *Mycoplasma pulmonis* foi determinado em 72% das amostras pulmonares e em 100% dos soros testados. Em 35% foram detectados anticorpos para Reovirus tipo III e em 100% para bacilos associados ao epitélio respiratório ciliado. *Syphacia muris* foi diagnosticada em 91,67%, *Eimeria* spp. em 3,33% e *Entamoeba muris* em 1,67%. Lesões relacionadas a infecção por agentes exógenos foram observadas em cavidade nasal e na orofaringe, laringe e traqueia a partir da 4 semanas de idade e, em pulmão desde as 12 semanas, com aumento de frequência de ocorrência e do grau de progressão, com o avançar da idade, nos vários segmentos estudados. Concluímos que a caracterização do estado sanitário dos ratos permite conhecer as particularidades do modelo

biológico utilizado e compor base de dados para auxiliar no desenho e na interpretação experimental dos pesquisadores, além de garantir uma base para o programa de monitorização sanitária de biotérios em condições similares.

Palavras-chave: Controle sanitário. Patologia. *Mycoplasma pulmonis*. Respiratório. Biotério.

ABSTRACT

PAIVA, V. L. G. S. **Anatomopathological, microbiological and parasitological characterization of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) at different ages.** [Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes idades]. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The Wistar rats are widely used as an animal model in biomedical research and the health monitoring of animal facilities is essential to ensure the experiments quality. The aim of this study was to characterize the Wistar rats colony's health status in a conventional breeding facility, to determine both bacteria, fungi, viruses and parasites, as well as characterize the anatomopathological lesions of the respiratory system. 273 rats (N) were used, males (M) and females (F), ages 4, 8, 12, 16 and 20 weeks, and between 12 to 18 months, for weight and body condition determination (N=273, 140M,133F); bacteriological evaluation of the oropharynx, intestinal mucosa and tracheobronchial lavage (N=40, 20M, 20F); antibodies to viruses and bacteria determination (10M, 10F); parasite examination (N=60, 30M, 30F); molecular identification of *Mycoplasma pulmonis* in lung samples (N=25, 15M, 10F) and histopathological characterization of the nasal cavity, oropharynx, larynx, trachea and lung (N=106, 53M, 53F). Microbiological evaluations of the rats rooms were made in three periods with isolation of *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. Weight proved to be homogeneous within age and gender, with only seven lean animals (2.56%) and nine overweight (3.30%). Pathogenic bacteria weren't isolated by cultivation in the oropharynx, intestinal mucosa and tracheobronchial lavage. *Mycoplasma pulmonis* was determined in 72% of lung samples and in 100% of tested serum. In 35% antibodies were detected to Reovirus type III and 100% for cilia-associated respiratory bacillus. *Syphacia muris* was diagnosed in 91.67%, *Eimeria* spp. in 3.33%, and *Entamoeba muris* in 1.67%. Lesions related to infection by exogenous agents were observed in the nasal cavity and oropharynx, larynx and trachea from the 4 weeks of age, and lungs from 12 weeks, with an increase of occurrence frequency and degree of progression, with advancing age, in the various studied segments. We conclude that the characterization of rats health status allows us to know the particularities of the animal model used, and compose a database to assist in the design and experimental interpretation of researchers, as well as ensure a basis for

the health monitoring program of breeding and research facilities in similar conditions.

Keywords: Health monitoring. Pathology. *Mycoplasma pulmonis*. Respiratory. Animal facility.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	RATOS WISTAR (<i>RATTUS NORVEGICUS</i>) DA COLÔNIA DO BIOTÉRIO DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	28
4.1.1	Métodos de Eutanásia	29
4.1.2	Avaliação do Estado Geral dos Animais Baseada no Peso e na Condição Corpórea	30
4.2	DETERMINAÇÃO DOS AGENTES BACTERIANOS, FÚNGICOS, VIRAIS E PARASITÁRIOS NA COLÔNIA DE RATOS.....	30
4.2.1	Determinação dos Agentes Bacterianos e Fúngicos das Salas dos Ratos	31
4.2.2	Cultivo e Isolamento Bacteriológico de Amostras de Raspado de Orofaringe, de Mucosa Intestinal e de Lavado Traqueobrônquico	32
4.2.3	Identificação Molecular de <i>Mycoplasma</i> spp. de Amostras Pulmonares	34
4.2.3.1	Procedimento de Eletroforese e Sequenciamento do DNA Bacteriano	35
4.2.4	Determinação de Anticorpos para Agentes Virais e Bacterianos por ELISA	36
4.2.5	Determinação dos Agentes Parasitários	37
4.2.5.1	Método Direto para Pesquisa de Ectoparasitos por Fita Adesiva	37
4.2.5.2	Pesquisa de Endoparasitos.....	38
4.2.5.2.1	<i>Método Direto para Pesquisa de Exemplares e Ovos de Parasitos em Amostras das Mucosas Intestinal e Vesical</i>	38
4.2.5.2.2	<i>Método Direto com Fita Adesiva para Pesquisa de Ovos de Oxiurídeos (Método Graham).....</i>	38
4.2.5.2.3	<i>Método Direto de Flutuação Passiva em Solução Saturada de Cloreto de Sódio (Método de Willis)</i>	39
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO	39
4.3.1	Macroscopia	39
4.3.2	Microscopia	39
4.3.3	Classificação das Lesões	40
4.3.3.1	Alterações de Base do Sistema Respiratório	40

4.3.3.2	Classificação das Lesões Observadas Devido a Agentes Exógenos.....	41
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	AVALIAÇÃO DO ESTADO GERAL DOS ANIMAIS BASEADA NO PESO E NA CONDIÇÃO CORPÓREA.....	44
5.2	DETERMINAÇÃO DOS AGENTES BACTERIANOS, FÚNGICOS, VIRAIS E PARASITÁRIOS NA COLÔNIA DE RATOS	46
5.2.1	Determinação dos Agentes Bacterianos e Fúngicos das Salas dos Ratos.....	46
5.2.1.1	TSA das Bactérias Ambientais	46
5.2.3	Cultivo e Isolamento Bacteriológico de Amostras de Raspado de Orofaringe, de Mucosa Intestinal e de Lavado Traqueobrônquico	49
5.2.4	Identificação Molecular de <i>Mycoplasma</i> spp. de Amostras Pulmonares	49
5.2.5	Determinação de Anticorpos para Agentes Virais e Bacterianos por ELISA	51
5.2.6	Determinação dos Agentes Parasitários	51
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO	52
5.3.1	Cavidades Nasais	52
5.3.2	Orofaringe, Laringe e Traqueia	53
5.3.3	Pulmão	55
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A avaliação e caracterização do estado sanitário de um biotério convencional, através da descrição das lesões anatomopatológicas de fundo e dos agentes virais, bacterianos, fúngicos e parasitários presentes numa colônia de roedores, como ratos Wistar, representa fundamental etapa para a adequação destes animais na experimentação animal.

No contexto de garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos em pesquisas que utilizam animais de experimentação, é primordial a elaboração de um plano de monitorização sanitário e ambiental, periódico, que garanta além do levantamento das lesões de base e causadas por patógenos presentes nas colônias, a manutenção da qualidade dos animais utilizados nas pesquisas, uma vez que o estado de saúde dos animais de laboratório afeta profundamente a sua adequação em investigação, como modelo biológico. As infecções, apesar de geralmente assintomáticas, alteram as respostas teciduais e imunológicas frente aos agentes possivelmente administrados nos estudos, modificando a fisiologia do animal e interferindo, direta ou indiretamente, nos resultados experimentais.

Assim, a importância de conhecer os perfis anatomopatológico, virológico, parasitológico e microbiológico, se torna bem evidente e justifica os objetivos deste estudo, para ser possível distinguir entre as alterações observadas nos animais por agentes presentes no Biotério, lesões características e específicas da própria espécie e até de senescência, das alterações resultantes dos estudos. Este conhecimento do *status* sanitário da colônia com que se trabalha, auxilia quer na elegibilidade dos animais para determinado estudo, assim como na interpretação dos resultados obtidos.

Os ratos da linhagem Wistar são amplamente utilizados em pesquisas biomédicas nas mais diversas áreas do conhecimento. Contudo, devido à insuficiência de informações sobre as lesões de base destes, em ambos os sexos e nas diferentes faixas etárias, se ressalta a importância também da criação de base de dados com os resultados anatomopatológicos, microbiológicos e parasitológicos. Essa base de dados servirá de guia comparativo para todos os usuários de Biotério Convencional, como o Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e de outros, em condições similares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, cerca de 80% do total de animais utilizados em estudos científicos são roedores. Os ratos representam 20% do total de mamíferos usados como modelo biológico, seguidos pelos camundongos, coelhos, cachorros, porco e primatas não humanos (SENGUPTA, 2013).

O rato (*Rattus norvegicus*) é considerado o primeiro mamífero domesticado especificamente para fins científicos (TUCKER, 1997; PERCY; BARTHOLD, 2007). A sua utilização em pesquisa se iniciou precocemente, mas, apenas em 1906, no Instituto Wistar, Filadélfia, nos Estados Unidos da América, pelas mãos de Henry H. Donaldson e equipe, ocorreu a grande dispersão destes animais como modelo biológico (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; KOOLHAAS, 2010; SENGUPTA, 2013). Estes pesquisadores padronizaram as colônias destes animais, coletando sistematicamente os seus dados biológicos e fisiológicos e os compilou em tabelas. Foram assim criadas várias linhagens consanguíneas e a *outbred* Wistar, que começou a ser distribuída e utilizada, local e mundialmente, em praticamente todas as vertentes da biomedicina, estudos de comportamento e nutrição (SHARP; LA REGINA, 1998; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; SENGUPTA, 2013).

Das várias linhagens de ratos existentes, as mais utilizadas na atualidade são as heterogênicas: Sprague-Dawley, Wistar e a Long-Evans (KOOLHAAS, 2010; JOHNSON, 2012).

Os ratos albinos da linhagem Wistar, são frequentemente os selecionados pelos investigadores, quer pelo conhecimento exaustivo dos seus parâmetros biológicos e fisiológicos, seu temperamento dócil, pela facilidade de sua aquisição e manipulação e por serem um modelo polivalente, utilizado em pesquisa de doenças infecciosas, estudos farmacológicos, toxicológicos, de senescência, cirurgia, entre outras (SHARP; LA REGINA, 1998; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; KOOLHAAS, 2010; JOHNSON, 2012).

Um resumo com os principais parâmetros fisiológicos destes animais está no Quadro 1. No entanto, destaca-se que estes valores variam não só de acordo com a linhagem, mas também com a colônia específica dos animais.

Quadro 1 - Principais parâmetros fisiológicos dos ratos Wistar

Parâmetro	Valor
Longevidade	2,5 a 3,5 anos
Temperatura retal	35,9 a 37,5°C
Período de gestação	20 a 22 dias
Idade adulta	90 dias
Peso ao desmame (17 a 19 dias)	35 a 45g
Peso fêmea adulta	200 a 400g
Peso macho adulto	450 a 600g

Fonte: (Adaptado de SHARP; LA REGINA, 1998; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; KOOLHAAS, 2010 por PAIVA, 2015).

Os animais de laboratório, como modelo biológico que representam, têm que possuir boa qualidade genética e sanitária, que deverão ser monitorizadas, para que exista uma padronização e estes apresentem respostas constantes, confiáveis, previsíveis e, cujos resultados obtidos nos estudos experimentais, sejam passíveis de reprodutibilidade (REHBINDER et al., 1996; SHARP; LA REGINA, 1998).

A sua padronização genética possibilitou o desenvolvimento e a manutenção de colônias de animais de linhagens isogênicas (*inbred*) e heterogênicas (*outbred*), mutantes, animais *knock-out* e, mais recentemente transgênicos (KACEW; FESTING, 1996; PRITCHETT-CORNING, et al., 2011; JOHNSON, 2012; NEVES; FILHO; MENEZES, 2013).

A par do controle genético, a monitorização do estado sanitário dos animais de uma colônia é, também, de primordial importância na investigação científica, uma vez que as respostas fisiológicas e comportamentais dos animais, submetidos à experimentação, não deverão ser influenciadas pela presença de agentes exógenos, não desejáveis (BAKER, 1998; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; BORBA et al., 2009).

Do ponto de vista sanitário, os animais de um biotério são classificados de acordo com a sua microbiota intrínseca (bactérias, fungos, vírus e parasitas), os microrganismos presentes no ambiente que os rodeia, assim como do tipo de barreiras sanitárias presentes, em três grandes grupos (BAKER, 1998; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; BORBA et al., 2009):

1 - Animais Convencionais quando possuem microbiota indefinida, o seu ambiente é desprovido de barreiras sanitárias rigorosas e os animais permanecem em gaiolas abertas

(SHARP; LA REGINA, 1998; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; POLITI et al., 2008; REIS; FRANCO, 2012);

2 - Animais Livres de Patógenos Específicos (SPF- *Specific Pathogen Free*), os quais apresentam apenas uma microbiota inócua conhecida, constituída por microrganismos não patogênicos, o seu biotério é protegido por barreiras sanitárias rigorosas e podem ou não permanecer no interior de isoladores;

3 - Animais Gnotobióticos, com microbiota bem definida conhecida, cujos biotérios apresentam barreiras sanitárias muito estritas e os animais são obrigatoriamente mantidos em isoladores (NRC, 1991; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; POLITI et al., 2008; REIS; FRANCO, 2012).

O programa de controle sanitário dos animais pode ser realizado através da utilização de animais sentinelas e/ou residentes da colônia no biotério. A utilização de animais residentes é mais vantajosa, pois evita o risco de introdução de novos agentes infecciosos, como poderia ocorrer no caso de animais sentinelas. Além disso, não é necessário dispendir de tempo para a exposição aos agentes (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; BORBA et al., 2009; PRITCHETT-CORNING et al., 2010, MÄHLER et al., 2014). O número de sentinelas recomendado, não segue uma norma rigorosa e varia com o tipo de gaiolas utilizadas, risco de infecção, métodos de diagnóstico, entre outros e deverá ser determinado pelo responsável técnico dos programas de monitorização de cada biotério (PRITCHETT-CORNING et al., 2010; MÄHLER et al., 2014). No caso de animais residentes, a amostragem, segundo Mähler et al. (2014), deverá seguir a fórmula ILAR:

$$\text{Fórmula ILAR: } \frac{\log(1 - \text{nível de confiança desejado})}{\log(1 - \text{prevalência presumida})} = \text{Número de animais a ser amostrados}$$

A fórmula ILAR se baseia na previsão da prevalência de um determinado agente na colônia, como foi apresentado na Tabela 1.

Esta fórmula apenas pode ser aplicada no caso dos seguintes pressupostos estarem presentes na colônia:

- 1 - O Biotério possuir pelo menos 100 animais de uma mesma linhagem ou estoque;
- 2 - Manejo convencional com gaiolas abertas;
- 3 - Amostragem aleatória das várias salas e dentro delas, utilizando animais de ambos os sexos e nas várias idades.

Tabela 1 - Número de animais necessários para se detectar infecção em uma colônia de roedores em Biotério convencional

Prevalência prevista (%)	Amostragem para os diferentes níveis de confiança		
	95%	99%	99,9%
10	29	44	66
20	14	21	31
30	9	13	20
40	6	10	14
50	5	7	10

Fonte: (MÄHLER et al., 2014).

Teoricamente, recomenda-se que cada biotério possua um programa de controle sanitário individualizado e ajustado às suas necessidades, que deverá monitorizar os potenciais agentes presentes e aqueles que possam interferir nos estudos a serem desenvolvidos. No entanto, na prática, existe um consenso quanto aos principais agentes a serem pesquisados e sua periodicidade mínima, como proposto, nomeadamente por Mähler et al. (2014). Estas diretrizes são aceitas mundialmente como a base para o delineamento dos programas de monitorização sanitária em biotérios (Quadro 2). Ainda assim, outros agentes poderão e deverão ser acrescentados, consoante a necessidade e padrão sanitário de cada biotério (GILIOLI, 2003; MÄHLER et al., 2014).

Quadro 2 - Agentes infecciosos recomendados para monitorizar e sua periodicidade mínima aconselhada, em ratos

Agentes	Periodicidade	
	Trimestral	Anual
Vírus	-	-
Vírus Kilham do rato	X	-
Vírus minute do rato	X	-
Parvovirus	X	-
Vírus Toolan H-1	X	-
Vírus da pneumonia do camundongo	X	-
Coronavirus/Vírus da Sialodacrioadenite	X	-
Theilovirus rato	X	-
Hantavirus	-	X
Adenovirus tipo 1 (FL)	-	X
Adenovirus tipo camundongo 2 (K87)□	-	X
Reovirus tipo 3	-	X
Vírus Sendai	-	X
Bactérias e fungos*	-	-
<i>Clostridium piliforme</i>	X	-
<i>Helicobacter</i> spp.	X	-
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	X	-
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	X	-
Estreptococos b-hemolítico (exceção grupo D)	X	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	X	-
Bacilos associados epitélio respiratório ciliado	-	X
<i>Pneumocystis</i> spp.□	-	X
<i>Salmonella</i> spp.□	-	X
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	-	X
Parasitos	-	-
Endo e ectoparasitos (gênero)	X	-

Fonte: (MÄHLER et al., 2014).

Legenda: *Bactérias e fungos que se considerem importantes, tais como *Bordetella bronchiseptica*, *Corynebacterium kutscheri*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, entre outros.

Os métodos de diagnóstico utilizados para monitorização destes agentes ou para determinação da causa de morte ou doença dos animais, incluem os sorológicos, para detecção de anticorpos presentes, em contraste com os que pesquisam o agente em si, por biologia molecular (PCR), cultura bacteriana e fúngica, parasitologia e, em alguns casos, a anatomopatologia (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; BORBA et al., 2009; PRITCHETT-CORNING et al., 2010; NRC, 2011).

A sorologia é a mais utilizada e poderá ser realizada por meio de métodos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Imunofluorescência Indireta (IFI), Inibição da Hemaglutinação (HAI), ou Imunoensaio Multiplexado Fluorimétrico (MFIA[®]), tendo a vantagem de se detectar, os anticorpos, que persistem pela vida do animal e a desvantagem de apenas poderem ser usados apenas em animais imunocompetentes (SHARP; LA REGINA, 1998; BORBA et al., 2009; PRITCHETT-CORNING et al., 2010; MÄHLER et al., 2014). Estes são frequentemente os métodos eleitos, nomeadamente para detecção de vírus e de bactérias, tais como *Clostridium piliforme* e *Mycoplasma pulmonis*, pela facilidade de utilização e por serem relativamente baratos (PRITCHETT-CORNING et al., 2010; MÄHLER et al., 2014).

Quanto às técnicas diretas de detecção do agente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) pesquisa o agente que está presente no momento. É uma técnica molecular muito usada para pesquisa de vírus e também de agentes fastidiosos, como *Mycoplasma* spp., outras bactérias, helmintos e protozoários, que não são pesquisados pelos métodos sorológicos, ou em situações de confirmação de sorologias positivas ou dúbias, de detecção precoce de agentes anteriores à soroconversão e também em casos de animais imunodeficientes (BORBA et al., 2009; PRITCHETT-CORNING et al., 2010; MÄHLER et al., 2014).

A necropsia completa para a observação macroscópica das lesões e para a coleta de amostras é importante. No entanto, a coleta dos órgãos para posterior histopatologia, não se realiza de forma rotineira, pois, em muitos casos as lesões anatomopatológicas são muito similares e não possibilitam determinar qual o agente envolvido. Desta forma, a etiologia dessas lesões precisará ser investigada por metodologias adicionais apropriadas, de cultivo ou de biologia molecular (SHARP; LA REGINA, 1998; BORBA et al., 2009; PRITCHETT-CORNING et al., 2010; MÄHLER et al., 2014). Ainda assim, para alguns autores o exame anatomopatológico periódico, complementa a monitorização sanitária dos animais (MÄHLER et al., 2014).

O exame parasitológico deverá constar do exame da pele e pelame do animal, para o diagnóstico de ectoparasitos. Os endoparasitos poderão ser pesquisados por exame visual direto, raspados intestinais, flutuação, fita adesiva na zona perianal e por PCR. A sua

identificação deverá, preferencialmente, determinar qual(is) a(s) espécie(s) presente(s) (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; SHARP; LA REGINA, 1998; BORBA et al., 2009; REIS; FRANCO, 2012; MÄHLER et al., 2014).

As culturas bacterianas e fúngicas, apesar de continuarem a ser usadas na sua forma mais clássica, em alguns casos em que não seja possível cultivar ou identificar os agentes, se recorrem às técnicas de biologia molecular (MÄHLER et al., 2014).

A manutenção de um determinado padrão sanitário dos animais, deve passar, tanto pela monitorização dos agentes infecciosos/parasitários pesquisados nos animais e usando técnicas adequadas, como também pelo controle do ambiente que rodeia esses animais. Para tal, deve existir uma padronização das condições onde os animais são criados e mantidos (POLITI et al., 2008; BORBA et al., 2009). As condições ambientes de um biotério, deverão, então, ser adequadas às espécies nestes mantidas e ser constantes, para manutenção da homeostasia e reduzir, ao mínimo, o nível de estresse dos animais. Preconizam-se as seguintes condições ambientais para um biotério de roedores (SHARP; LA REGINA, 1998; ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; MÄHLER et al., 2014):

- Temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$;
- Umidade relativa de $55 \pm 10\%$;
- Ventilação de 10 a 15 trocas de ar por hora (volume do ambiente), para eliminação de gás carbônico e amônia;
- Luminosidade artificial abaixo de 300 Lux, a um metro do piso;
- Fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; TUCKER, 2003; PAREDES et al., 2008; NRC, 2011; NEVES; FILHO; MENEZES, 2013).

Dentre as medidas para controle das condições ambientais, a manutenção e monitorização das condições higiênicas, deverá ser parte integrante de um programa de monitorização do biotério. Assim, esta monitorização das condições higiênicas se realiza essencialmente pelo levantamento da microbiota ambiental, pelo meio de *swabs* e/ou colocação de placas com meios de cultura nas salas, para detecção de bactérias e fungos e, posterior identificação. Em biotério convencional, esta prática é recomendada a cada três meses e, usualmente é realizada após a limpeza e desinfecção das salas dos animais, com o objetivo de avaliar a eficácia desta (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; MINAGAWA, 2007).

Além dos agentes dos programas de monitoramento básicos, existem muitos outros que poderão surgir nas colônias e interferir com os estudos em desenvolvimento, pelo que Nicklas (1999) e Baker (2003) mostraram ao compilarem os dados de inúmeras publicações, focando

nas repercussões que determinados microrganismos possam exercer sobre os animais de uma colônia e nos possíveis experimentos.

Muitos destes agentes acometem o sistema respiratório e são especialmente importantes, pois são os que ocorrem com maior frequência em ratos de biotério (Quadro 3). Tais agentes podem causar doença clínica ou, mais usualmente, subclínica e variam tanto na patogenicidade, quanto na capacidade de interferência em pesquisa, não estando as duas necessariamente relacionadas (NRC, 1991; BAKER, 1998).

Quadro 3 - Agentes com potencial para acometer o sistema respiratório dos ratos

Agentes de elevada importância que infetam o sistema respiratório	Agentes de importância moderada que infetam o sistema respiratório
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Coronavírus de rato
Vírus Sendai	Vírus da Sialodacrioadenite
CARB	Vírus da pneumonia do camundongo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	-

Fonte: (adaptado de NRC, 1991 por PAIVA, 2005).

Legenda: CARB – Bacilos associados ao epitélio respiratório ciliado.

Destes agentes, o que apresenta maior relevância e impacto em pesquisa é, sem dúvida o *Mycoplasma pulmonis*, agente causador da micoplasmose respiratória murina (MRM) que apresenta, ainda hoje, uma elevada prevalência (cerca de 60 a 100%) em alguns biotérios convencionais e é sabidamente um dos principais agentes que mais interfere nos estudos, nomeadamente na função ciliar, cinética celular e na resposta imunológica dos animais (NRC, 1991; BAKER, 1998; TIMENETSKY; DE LUCCA, 1998; NICKLAS, 1999; GILIOLI, 2003; FERREIRA, 2005; KOOLHAAS, 2010). Em biotérios mais controlados, com barreiras sanitárias, apesar de ainda existir, a sua prevalência é baixa, cerca de 3 a 4% (SCHOONDERMARK-VAN DE VEN; PHILIPSE-BERGMANN; VAN DER LOGT; 2005; MÄHLER; KOHL; 2009). Este agente coloniza principalmente o trato respiratório, e pode provocar desde infecção subclínica a lesões crônicas e progressivas graves, tais como rinite, otite média, traqueíte, bronquite, bronquiectasia, broncopneumonia e hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), principalmente quando concomitante com outros

cofatores, como os bacilos associados ao epitélio respiratório ciliado (CARB) e gases irritantes presentes no biotério, como amônia, monóxido de carbono e o dióxido de enxofre, atuando de forma sinérgica com estes (SCHOEB; DAVIDSON; LINDSEY, 1982; BAKER; 1998; SHARP; LA REGINA; 1998; BAIALARDI; 2003; GILIOLI, 2003; FERREIRA, 2005; PERCY; BARTHOLD, 2007; MÄHLER et al., 2014).

Os CARB são bastonetes Gram-negativos, filamentosos, de classificação ainda incerta, que se pensa estarem intimamente relacionadas com *Flavobacterium ferrugineum* e *Flexibacter sancti* (BAKER, 1998; PERCY; BARTHOLD, 2007). Por vezes é possível observá-las com coloração de Hematoxilina e Eosina, no epitélio ciliado do sistema respiratório, como zonas mais densas entre os cílios. As lesões por elas provocadas variam desde infecção subclínica às marcantes observadas na MRM (NRC, 1991; SCHOEB; DAVIDSON; DAVIS, 1997; BAKER, 1998; SHARP; LA REGINA, 1998; PERCY; BARTHOLD, 2007). Esta bactéria é um importante agente etiológico das infecções do sistema respiratório dos ratos, quer como agente primário, quer como secundário, sendo sem dúvida um importante contributo para a morbilidade e mortalidade de animais, principalmente quando em coinfeção com *M. pulmonis*. (NRC, 1991; SCHOEB; DAVIDSON; DAVIS, 1997; BAKER, 1998; NICKLAS, 1999; PERCY; BARTHOLD, 2007).

Outro agente encontrado com elevada frequência em ratos de biotério convencional, é o nematóide *Syphacia muris*. Este é um endoparasito oxiurídeo, com ciclo de vida direto, que permanece no ceco e cólon dos animais e deposita os seus ovos na região perianal. Os ratos infetados geralmente permanecem assintomáticos, mas animais jovens e/ou com elevada carga parasitária, podem apresentar crescimento lento, irritação perianal, impactação fecal, prolapso retal e diarreia (BAKER, 1998; SHARP; LA REGINA; 1998; NICKLAS, 1999; PERCY; BARTHOLD, 2007). Mesmo em caso de doença assintomática, há possibilidade de interferência na resposta fisiológica e imunológica (NRC, 1991; BAKER, 1998; NICKLAS, 1999; PERCY; BAKER, 2007; BARTHOLD, 2007).

Além, de se conhecerem quais os agentes que potencialmente possam interferir nos estudos, é de grande importância saber identificar as características específicas dos tecidos dos animais utilizados, assim como as lesões de base que estes possam apresentar. Só assim é possível distinguir e identificar lesões devido a microrganismos ou substâncias externas, quer intencional, quer acidentalmente (SHACKELFORD et al., 2002; RENNE et al., 2009; MCINNES, 2012).

Desta forma, este projeto foi planejado com o intuito de auxiliar os pesquisadores na interpretação dos seus resultados, criando uma base de dados com os agentes bacterianos,

fúngicos, virais e parasitários presentes nos ratos de um biotério convencional e, ao mesmo tempo verificar quais as lesões anatomopatológicas observadas no sistema respiratório, em ambos os gêneros e faixas etárias, permitindo assim diferenciar entre lesões de base e/ou devidas à eutanásia das causadas por agentes exógenos.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo é caracterizar o estado sanitário da colônia de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e para tanto determinar os agentes bacterianos, fúngicos e parasitários presentes na colônia e caracterizar as alterações anatomopatológicas do sistema respiratório destes animais em ambos os sexos e diferentes faixas etárias.

Especificamente os objetivos são:

- 1 - Caracterizar o estado geral dos animais de ambos os sexos e segundo as faixas etárias baseado no peso e na condição corpórea;
- 2 - Determinar os agentes bacterianos e fúngicos ambientais das salas dos ratos do biotério;
- 3 - Caracterizar a sensibilidade aos antibióticos dos isolados bacterianos ambientais;
- 4 - Determinar os agentes bacterianos patogênicos e a frequência de ocorrência por meio de cultura bacteriológica, sorodiagnóstico e biologia molecular;
- 5 - Determinar a frequência de ocorrência de agentes virais de importância em biotérios por meio de sorodiagnóstico;
- 6 - Determinar os endoparasitos, intestinais e das vias urinárias, e os ectoparasitos, bem como a frequência de ocorrência por faixa etária;
- 7 - Determinar a frequência de ocorrência e caracterizar as lesões anatomopatológicas do sistema respiratório em animais de ambos os sexos e segundo as faixas etárias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 RATOS WISTAR (*RATTUS NORVEGICUS*) DA COLÔNIA DO BIOTÉRIO DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

O Biotério do Departamento de Patologia (VPT), classificado como convencional, mantém duas salas, A e B, para os ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, os quais são mantidos em temperatura entre 20 e 25°C, umidade relativa do ar entre 40 a 60%, com trocas de ar controladas e ventilação por pressão positiva e manutenção de fotoperíodo claro/ escuro de 12 horas. A cama utilizada é de maravalha de pinus autoclavada, trocada duas vezes por semana. A água é filtrada e autoclavada e a ração para roedores utilizada é peletizada da marca Nuvilab CR1[®] (Nuvital Nutrientes SA, Curitiba, PR) oferecida *ad libitum*. Os ratos são alojados por sexo e faixa etária em caixas de polipropileno, medindo 41 x 34 x 16 cm, com densidade de cinco ratos/ caixa na sala A de produção, ou seja, dos ratos após o desmame até a utilização nos experimentos e, em casais na sala B de criação.

Foram utilizados 273 ratos, de ambos os sexos, nas faixas etárias 4, 8, 12, 16 a 20 semanas e 12 a 18 meses (48 a 72 semanas), retirados aleatoriamente das salas. O número de animais utilizado segundo cada procedimento diagnóstico está apresentado no Quadro 4.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), com o protocolo CEUA N° 5470060214.

Quadro 4 - Distribuição do número de animais utilizados segundo os métodos de diagnóstico, as faixas etárias e o gênero

Faixa Etária Métodos/Amostras	4 semanas		8 semanas		12 semanas		16 a 20 semanas		12 a 18 meses	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Exame físico/ peso e condição corpórea	18	18	15	15	45	45	13	23	42	39
Bacteriológico/ orofaringe, mucosa intestinal, e lavado traqueobrônquico	-	-	-	-	10	10	-	-	10	10
Biologia molecular para <i>Mycoplasma</i> spp./ pulmão	-	-	-	-	-	5	-	-	10	10
ELISA para bactérias e vírus/ soro	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-
Parasitológico/ mucosa intestinal, fezes e pelame	10	10	-	-	10	10	-	-	10	10
Anatomopatológico/sistema respiratório	8	8	15	15	15	15	-	-	15	15

Fonte: (PAIVA, 2005).

Legenda: F=Fêmea; M=Macho.

4.1.1 Métodos de Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada por um dos três procedimentos: 1. Inalatório utilizando câmara de eutanásia por gás carbônico (CO₂) (Red Autoclaves[®], São Paulo, Brasil); 2. Exsanguinação por punção cardíaca, após anestesia geral profunda com uma associação tripla de acepromazina (Acepran 0,2%[®], Univet S/A, São Paulo, Brasil), cloridrato de xilazina (Anasedan injetável[®], Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, Brasil) e cloridrato de quetamina (Dopalen injetável[®], Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, Brasil), nas doses de 2mg/kg, 10mg/kg e 60mg/kg, respectivamente, administrados intraperitonealmente (adaptado de FLECKNELL, 2009); 3. Sobredosagem de anestésicos injetáveis com uma associação tripla de acepromazina (Acepran 0,2%[®], Univet S/A, São Paulo, Brasil), cloridrato de xilazina (Anasedan injetável[®], Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, Brasil) e cloridrato de quetamina (Dopalen injetável[®], Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, Brasil), administradas intraperitonealmente. Os métodos de eutanásia utilizados, estão de acordo com o “Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais” (CFMV, 2013).

4.1.2 Avaliação do Estado Geral dos Animais Baseada no Peso e na Condição Corpórea

Os animais foram avaliados com relação ao peso e à condição corpórea, sem período de jejum e imediatamente após a eutanásia. A mensuração do peso foi realizada em balança semianalítica com precisão de 0,01g. A condição corpórea foi avaliada com base na palpação sendo considerado:

- 1 - Animal caquético aquele que exibia ausência de gordura, atrofia muscular e evidentes proeminências ósseas;
- 2 - Animal magro, aquele com poucos depósitos de gordura sem redução da musculatura esquelética;
- 3 - Animal em bom ou regular estado corpóreo, com presença de depósitos de gordura adequados;
- 4 - Animal com sobrepeso, aquele que apresentava amplos depósitos de gordura no subcutâneo e intracavitário.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS AGENTES BACTERIANOS, FÚNGICOS, VIRAIS E PARASITÁRIOS NA COLÔNIA DE RATOS

Os procedimentos para a determinação dos agentes foram subdivididos em: 1 - Determinação dos agentes ambientais (item 4.2.1), 2 - Determinação dos agentes de amostras da orofaringe, mucosa intestinal e lavado traqueobrônquico (item 4.2.2), 3 - Identificação molecular de *Mycoplasma* spp. de amostras pulmonares (item 4.2.3), 4 - Determinação de anticorpos para agentes virais e bacterianos por ensaio imuno-enzimático (ELISA) (item 4.2.4), e 5 - Determinação dos agentes parasitários (4.2.5).

4.2.1 Determinação dos Agentes Bacterianos e Fúngicos das Salas dos Ratos

O estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório de Bacteriologia e Micologia, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP.

A avaliação microbiológica das duas salas dos ratos, A e B, consistiu no levantamento bacteriológico e fúngico ambiental em três momentos: 1 - na primavera, outubro de 2014; 2 - no outono, abril de 2015; 3 - no inverno, agosto de 2015. Para tal foram utilizados meios de *Sabouraud* Dextrose com cloranfenicol (100 mg/L) para a detecção de fungos ambientais e Ágar Sangue carneiro 5%, Ágar *MacConkey* e Ágar Sal Manitol, da Oxoid® (Oxoid Limited, Hampshire, Reino Unido), para isolamento de bactérias. As placas com os meios foram abertas e colocadas em cada uma das salas, durante 1 hora, após a troca das gaiolas, com modificação do procedimento de Minagawa (2007).

O cultivo bacteriológico foi conduzido em estufa a 37°C, em aerobiose, com leituras as 24 e 48 horas. Os isolamentos bacterianos da segunda coleta foram ultracongeladas a -80°C para posterior realização do TSA (item 4.2.1.1).

Quanto ao cultivo micológico, este foi realizado a temperatura de 25°C e a leitura ocorreu diariamente durante sete dias consecutivos.

Os microrganismos isolados (bactérias e fungos) foram identificados e classificados de acordo com Kreeger-Van-Rig (1984); Sneath et al. (1986) e Murray et al. (1999).

4.2.1.1 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) das Bactérias Ambientais

Os TSAs foram realizados junto ao Laboratório Ornitopatologia I da FMVZ-USP.

As bactérias ambientais anteriormente isoladas e ultracongeladas foram semeadas em caldo BHI (Difco® Becton, Dickinson and Company, Maryland, Estados Unidos da América) e incubadas por 18 a 24 horas, em estufa a 37°C, em aerobiose. Estas foram ressemeadas em BHI sólido (Difco® Becton, Dickinson and Company, Maryland, Estados Unidos da América) e, uma colônia foi passada para caldo Muller-Hinton (MH) (Difco® Becton, Dickinson and Company, Maryland, Estados Unidos da América), que permaneceu novamente em incubação em estufa a 37°C por 18 horas. Dessa suspensão bacteriana, alíquota de 100 µl foi transferida para novo caldo MH e incubada a 37°C sob agitação de 150 rotações por minuto (RPM), até

se obter uma densidade ótica de 0,08 a 0,140 para bactérias Gram Negativas e, 0,300 a 0,350 para as Gram Positivas, utilizando espetrofotômetro a 690 nm (Biomate 3, Thermo Scientific Sorvall®, Massachusetts, Estados Unidos da América). Para a realização do TSA foi realizado o método semi-quantitativo baseado em difusão segundo Bauer e Kirby (1966), para o qual foi pipetado 100 µl da suspensão bacteriana em absorbância adequada, para o ágar MH e foi empregada Alça de *Drigalsky* descartável, para o espalhamento.

A distribuição dos antibióticos nas placas de MH e a sua concentração em fármaco estão no Quadro 5. As placa foram incubadas por 24 horas, a 37°C em aerobiose e foi realizada medição do diâmetro do halo de inibição do crescimento do microrganismo. A sua interpretação foi baseada nos Manuais do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008 e 2013).

Quadro 5 - Distribuição dos discos de antibióticos e concentração em fármaco por disco (µg) segundo as placas com Ágar Muller-Hinton (MH) de 1 a 3

Placas	Placa MH 1	Concentração fármaco por disco (µg)	Placa MH 2	Concentração fármaco por disco (µg)	Placa MH 3	Concentração fármaco por disco (µg)
Antibióticos	Doxicilina (DOX)	30	Tetraciclina (TET)	30	Ciprofloxacina (CIP)	5
	Sulfatrimetoprim (SUT)	25	Clindamicina (CLI)	2	Amoxicilina e ácido clavulânico (AMC)	30
	Enrofloxacin (ENO)	5	Eritromicina (ERI)	15	Cefalexina (CFE)	30
	Cefoxitina (CFO)	30	Cloranfenicol (CLO)	30	Gentamicina (GEN)	10
	Oxacilina (OXA)	1	-	-	Vancomicina (VAN)	30

Fonte: (adaptado de CLSI, 2008, 2013).

4.2.2 Cultivo e Isolamento Bacteriológico de Amostras de Raspado de Orofaringe, de Mucosa Intestinal e de Lavado Traqueobrônquico

Os exames bacteriológicos dos ratos (n=40) foram realizados junto ao Laboratório de Controle Sanitário Animal do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas I (ICB I) da USP e a distribuição do número de animais segundo gênero e faixa etária está no Quadro 4.

A eutanásia dos animais foi por sobredosagem anestésica (item 4.1.1) e foi seguida pela coleta de amostras de raspado de orofaringe, de *pool* de mucosa do intestino delgado e grosso e, de lavado traqueobrônquico, o qual utilizou para infusão o caldo Brain Heart Infusion (BHI), (Difco[®], Becton, Dickinson and Company, Maryland, Estados Unidos da América). A sequência adotada de cultivo está descrita na Figura 1.

A identificação e o isolamento bacterianos se basearam em Fischer e Kunstyr (1992); Waggle et al. (1994) e Gaillard e Clifford (2000). Para a identificação final, foram utilizados kits bioquímicos, tais como Staphclin[®] e Sistemas Bactray[®] 1,2 e 3 (LABORCLIN, São José do Rio Preto, São Paulo) e BBL Crystal GP[®] (Becton, Dickinson and Company, Maryland, Estados Unidos da América).

Os agentes bacterianos pesquisados, segundo recomendação de Mähler et al. (2014) foram: *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptobacillus moniliformis* e *Streptococcus pneumoniae*.

Figura 1 - Esquema da sequência de processamento para o cultivo das amostras de raspados da orofaringe e mucosa intestinal e do lavado traqueobrônquico

Fonte: (PAIVA, 2015).

4.2.3 Identificação Molecular de *Mycoplasma* spp. de Amostras Pulmonares

A identificação molecular do *Mycoplasma* spp. foi realizada junto ao Laboratório Ornitopatologia I da FMVZ-USP e ao Laboratório de Biologia Molecular, da Secção de Hepatologia, do Instituto Evandro Chagas.

Alíquotas de 20 mg das amostras ultracongeladas de pulmão (n=25, Quadro 4) especificamente para identificação de *Mycoplasma* spp. foram descongeladas, suspensas individualmente em 100 µl de PBS (0,1M) e lisadas em TissuLyser LT[®] (Qiagen, California,

Estados Unidos da América) durante 5 minutos. Para a extração de DNA de *Mycoplasma* spp. foi usado DNeasy Blood & Tissue Kit® (Qiagen, California, Estados Unidos da América) seguindo as indicações do fabricante.

O DNA extraído das amostras dos pulmões, foi submetido a PCR convencional, utilizando o protocolo modificado de Timenetsky et al. (2006), para amplificação de um produto com 270 pares de bases, usando os *primers* para detecção de *Mycoplasma* spp. GPO3 5' GGGAGCAAACACGATAGATACCCT 3' e MGSO 5' TGCACCATC TGTCACCTCTGTTAACCTC 3'.

Na reação de PCR foi empregado 25 µL de mix de reação que continha: 0,5 µM de cada um dos *primers* senso e antisenso, 1X de tampão da reação, 1,25 mM de cada dNTPs (*deoxy Nucleoside TriPhosphate*), 37,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq DNA Polymerase Platinum® (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos da América), 2,5 µL de DNA e água ultrapura. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94°C e 35 ciclos de temperaturas 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, seguida de um último passo de extensão a 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf, Nova Iorque, Estados Unidos da América).

4.2.3.1 Procedimento de Eletroforese e Sequenciamento do DNA Bacteriano

Para visualização dos produtos amplificados, foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1%, em cuba horizontal, imerso em tampão Tris- Borato-EDTA (Tris-Borato 0,045 M, EDTA 1mM) e voltagem adequada às dimensões do gel (10 V/ 1 cm de gel) (MORENO, 1999). As amostras foram coradas com Sybr Safe® DNA gel stain (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos da América). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos da América). O resultado foi analisado por meio de transluminador e foto documentador AlphaImager® Mini Analyses System (Alpha Innotech Corp, Califórnia, Estados Unidos da América).

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o ExoSAP-IT Kit® (GE Healthcare, Ohio, Estados Unidos da América), seguindo as recomendações do fabricante. Cada produto purificado foi sequenciado no sentido senso e antisenso, usando Big Dye®

Terminator Version 3.1 CycleSequencing Kit (Applied Biosystems[®], LifeTechnologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América). O sequenciamento nucleotídico foi desenvolvido no sequenciador ABI 3500 DNA Analyzer[®] (Applied Biosystems[®], Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América).

Posteriormente as sequências senso e antisenso de cada amostra, foram editadas e alinhadas, para montagem de sequências consenso, com auxílio do software BioEdit (v7.0.5.3). As sequências consenso foram, posteriormente, submetidas na plataforma *BLAST*, para determinação do grau de similaridade das sequências com aquelas depositadas no *GeneBank* (NCBI, [20-]). Adicionalmente, as sequências foram analisadas filogeneticamente, pelo método de *Maximum-Likelihood*, modelo de substituição *Kimura 2-parameter* e análise de *bootstrap* (1000 replicatas), no software MEGA (v5.1) (TAMURA et al., 2011).

4.2.4 Determinação de Anticorpos para Agentes Virais e Bacterianos por ELISA

A pesquisa de anticorpos para os agentes bacterianos e virais no soro dos ratos (n=20) foi realizada junto ao Biotério de Experimentação, do Departamento de Imunologia, do ICB IV, USP, e a distribuição do número de animais segundo gênero e faixa etária se encontra no Quadro 4.

Após anestesia profunda via intraperitoneal (item 4.1.1), o sangue foi coletado por punção cardíaca, a amostra permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos e foi centrifugado a 3500 RPM por 10 minutos (Legend Mach 1.6R, Thermo Scientific Sorvall[®], Massachusetts, Estados Unidos da América). O soro obtido de cada animal foi ultracongelado.

As análises foram conduzidas em *pools* de três a quatro animais para cada gênero. O teste foi realizado utilizando microplacas de ELISA (360 DIAGNOSTICS[®], Charles River, Massachusetts, Estados Unidos da América), segundo as instruções do fabricante, para a detecção de anticorpos para os agentes infecciosos apresentados no Quadro 6. A leitura das amostras foi obtida a 450 nm em leitor de microplacas (Stat Fax[®] 2100, Awareness Technologies, Florida, Estados Unidos da América). Os resultados foram interpretados com base no *Serologic Methods Manual* (CHARLES RIVER, 2011).

Quadro 6 - Distribuição dos agentes virais e bacterianos pesquisados no ELISA, segundo as microplacas 1 e 2

Microplacas ELISA	Microplaca 1	Microplaca 2
Agentes pesquisados	Bacilos associados ao epitélio respiratório ciliado (CARB)	Vírus Sendai (SEN)
	<i>Clostridium piliforme</i> (CPIL)	Reovirus tipo III (REO3)
	Theilovirus rato (GD7)	<i>Mycoplasma pulmonis</i> (MPUL)
	Vírus de Toolan H-1 (H1)	Vírus da pneumonia murina (PVM)
	Vírus de Kilham (KRV)	-
	Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV)	-

Fonte: (adaptado de CHARLES RIVER, 2011).

4.2.5 Determinação dos Agentes Parasitários

A pesquisa de parasitos foi realizada junto ao Biotério Central, no ICB I, USP, e a distribuição dos animais utilizados (n=60) por gênero e faixa etária está no Quadro 4. O método de eutanásia foi o inalatório com recurso da câmara de CO₂ (item 4.1.1).

Os procedimentos de pesquisa e a identificação dos ecto e endoparasitos foram baseados em De Luca et al. (1996); Urquhart et al. (1998); Foreyt (2005) e Baker (2007).

4.2.5.1 Método Direto para Pesquisa de Ectoparasitos por Fita Adesiva

A pesquisa de ectoparasitos foi realizada com fita adesiva (Durex®) que foi aplicada na pelagem nas zonas da base da cauda e dorso, atrás das orelhas e focinho, colocadas em lâminas de vidro e observadas ao microscópio ótico Eclipse 50i (Nikon, Japão) em diferentes aumentos.

4.2.5.2 Pesquisa de Endoparasitos

A pesquisa de endoparasitos utilizou três procedimentos nomeadamente: 1 - Método direto para pesquisa de exemplares de parasitos e ovos em amostras de mucosa intestinal e vesical, obtidos durante a necropsia; 2 - Método direto com fita adesiva para pesquisa de ovos de oxiurídeos na região perianal (Método de Graham), e 3 - Método direto por flutuação espontânea (Método de Willis).

4.2.5.2.1 Método Direto para Pesquisa de Exemplares e Ovos de Parasitos em Amostras das Mucosas Intestinal e Vesical

Para a pesquisa de parasitos intestinais e da bexiga, foi realizado método direto a partir de amostras colhidas durante a necropsia. Os vários segmentos intestinais (duodeno, jejuno/íleo, ceco, cólon/reto) e a bexiga foram amostrados. A mucosa de cada segmento foi raspada em solução fisiológica e, o resultante desses raspados, observado ao microscópio ótico Eclipse 50i (Nikon, Japão) para mucosa intestinal e estereoscópio GROUP ES (ALLTION[®], Guangxi, China) da mucosa vesical.

4.2.5.2.2 Método Direto com Fita Adesiva para Pesquisa de Ovos de Oxiurídeos (Método Graham)

O método consistiu em aderir fita adesiva (Durex[®]) na região perianal, colar a fita em lâmina de vidro e observada no microscópio ótico Eclipse 50i (Nikon, Japão).

4.2.5.2.3 Método Direto de Flutuação Passiva em Solução Saturada de Cloreto de Sódio (Método de Willis)

As fezes frescas das gaiolas dos animais foram dissolvidas em solução saturada de cloreto de sódio. O princípio do método é baseado na flutuação de ovos leves de helmintos e oocistos de protozoários em solução saturada por apresentarem menor gravidade específica. Os ovos e oocistos foram observados em microscópio ótico Eclipse 50i (Nikon, Japão).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

A distribuição dos animais por gênero e faixa etária utilizados, na avaliação anatomopatológica (n=106), está no Quadro 4. O método de eutanásia foi o inalatório com recurso da câmara de CO₂ (item 4.1.1).

4.3.1 Macroscopia

A necropsia completa dos animais foi realizada em até duas horas após eutanásia, segundo técnica padrão para mamíferos não ruminantes, usada no Serviço de Patologia Animal, do Departamento de Patologia. A documentação fotográfica foi realizada com câmara digital Canon G10 com auxílio de estativa. As alterações macroscópicas foram anotadas em fichas individualizadas e a análise destes resultados foi por gênero e faixa etária.

4.3.2 Microscopia

Os fragmentos das cavidades nasais (1), orofaringe (1) e pulmões (pelo menos 3) coletados foram fixados em solução de formol a 10% tamponado para posterior inclusão em

parafina, e cortes em 5µm de espessura. As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina. Colorações específicas quando pertinente, foram realizadas. A análise das lâminas se realizou por dois observadores que desconheciam a identificação do animal analisado. A documentação fotográfica foi realizada no microscópico Eclipse NiU com câmara digital DSU3 acoplada (Nikon, Japão). As alterações microscópicas foram anotadas em tabelas e análise foi conduzida segundo gênero e faixa etária.

4.3.3 Classificação das Lesões

As lesões observadas no sistema respiratório dos ratos foram separadas em 1 - Alterações de base e 2 - Lesões observadas devido a agentes infecciosos e gases irritantes presentes no biotério.

4.3.3.1 Alterações de Base do Sistema Respiratório

As alterações consideradas de base, que incluem aquelas relacionadas com a espécie, linhagem Wistar, a senescência e eutanásia segundo Conlee et al. (2005); Renne et al. (2009) e McInnes (2012) nas cavidades nasais, orofaringe, laringe, traqueia e pulmões em ratos estão no Quadro 7.

Quadro 7 - Principais alterações de base observadas nas cavidades nasais, orofaringe, laringe e traqueia e no pulmão em ratos

Tecido	Cavidades Nasais	Orofaringe Laringe e Traqueia	Pulmão
Lesões base	Corpos amiláceos	Ectasia de glândulas submucosas com acúmulo de secreção	Cistos congênitos
	Depósitos amilóides	Inclusões eosinofílicas no epitélio e nas células secretoras	Corpos neuroepiteliais
	Inclusões eosinofílicas no epitélio e nas células secretoras	Leucócitos globulares no epitélio	Cristais eosinofílicos nos alvéolos
	Mineralização muco	Ossificação dos anéis traqueais	Ectasia acinar alveolar subpleural
	Osteopetrose dos ossos turbinados	Ossificação da cartilagem laríngea	Focos de metaplasia óssea
	-	Pelos ectópicos mineralizados, restos celulares, de alimento e outros corpos estranhos na bolsa ventral	Focos de infiltrados mononucleares subpleurais
	-	-	Hemorragia alveolar, congestão e edema
	-	-	Histiocitose alveolar
	-	-	Inclusões eosinofílicas em células da Clara
	-	-	Infiltrado de eosinófilos perivascular
	-	-	Mineralização das artérias
	-	-	Mineralização do muco no interior de bronquíolos
	-	-	Presença de hemossiderina, lipofusцина ou pigmento de carbono nos macrófagos

Fonte: (CONLEE et al., 2005; RENNE et al., 2009; MCINNIS, 2012, adaptado por PAIVA, 2015).

4.3.3.2 Classificação das Lesões Observadas Devido a Agentes Exógenos

A gravidade e distribuição das lesões foram parâmetros usados para graduação destas em análise semi-quantitativa, seguindo as indicações de Shackelford (2002). As alterações anatomopatológicas causadas por agentes infecciosos ou por substâncias irritantes observadas nas cavidades nasais, na orofaringe, laringe, traqueia e nos pulmões, foram agrupadas em três Graus consoantes a progressão das lesões observadas de I a III.

Graduação das lesões observadas nas cavidades nasais:

- Grau I, discreta (fase I)

Ausência de alterações macroscópicas.

Alterações microscópicas - Rinite neutrofílica, linfoplasmocítica, eosinofílica ou linfocítica focal.

- Grau II, moderada (fase II)

Ausência de alterações macroscópicas.

Alterações microscópicas - Rinite neutrofílica ou linfoplasmocítica ou linfocítica, focal ou multifocal, presença de muco no lúmen, erosão e metaplasia do epitélio respiratório.

- Grau III, marcante (fase III)

Ausência de alterações macroscópicas.

Alterações microscópicas - Rinite neutrofílica ou linfoplasmocítica, focalmente extensiva a difusa, presença de muco, restos celulares e bactérias no lúmen, metaplasia do epitélio respiratório, erosão e hiperplasia do epitélio.

Graduação das lesões observadas na orofaringe, laringe e traqueia:

- Grau I, discreta (fase I)

Sem alterações macroscópicas.

Alterações microscópicas - Infiltrado linfoplasmocítico, neutrofílico, linfocítico ou eosinofílico focal, presença de muco no lúmen, hiperplasia tecido linfoide associado e adenite neutrofílica das glândulas submucosas.

- Grau II, moderada (fase II)

Sem alterações macroscópicas.

Alterações microscópicas - Infiltrado neutrofílico, linfoplasmocítico ou linfocítico, focal ou multifocal, presença de muco e neutrófilos no lúmen, erosão e metaplasia do epitélio, hiperplasia tecido linfoide associado e adenite neutrofílica das glândulas submucosas.

- Grau III, marcante (fase III)

Sem alterações macroscópicas.

Alterações microscópicas - Infiltrado neutrofílico ou linfoplasmocítico, extenso a difuso, presença de muco, neutrófilos, restos celulares e bactérias no lúmen, metaplasia e hiperplasia do epitélio e hiperplasia do tecido linfoide associado e adenite neutrofílica das glândulas submucosas.

Graduação das lesões observadas no pulmão:

- Grau I, discreta (fase I)

Alterações macroscópicas - Presença de hemorragia multifocal centrada ou não em brônquios e múltiplos focos esbranquiçados disseminados pelo parênquima.

Alterações microscópicas - Bronquite e bronquiolite neutrofílicas ou eosinofílicas ou linfoplasmocíticas ou linfocitárias e hiperplasia de BALT.

- Grau II, moderada (fase II)

Alterações macroscópicas - Consolidação lobar acometendo pelo menos um lobo, com exsudação mucopurulenta e áreas de hemorragia centradas ou não nos brônquios.

Alterações microscópicas - Broncopneumonia ou pneumonia broncointersticial focal ou bronquite e bronquiolite, neutrofílicas ou linfocitárias ou linfoplasmocíticas, associadas a erosão do epitélio brônquico e bronquiolar, hiperplasia de epitélio brônquico, bronquiolar, de células caliciformes, de BALT e metaplasia glandular peribrônquica.

- Grau III, marcante (fase III)

Alterações macroscópicas - Consolidação lobar acometendo dois ou mais lobos, com exsudação mucopurulenta e extensas áreas de hemorragia.

Alterações microscópicas - Broncopneumonia ou pneumonia broncointersticial neutrofílicas ou linfocitárias, coalescentes a focalmente extensivas, associadas a fibrose pulmonar, bronquiectasia, hiperplasia do epitélios brônquicos e bronquiolares, dos pneumócitos tipo II, de células caliciformes, de BALT e metaplasia glandular peribrônquica.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros peso e condição corpórea foram analisados descritivamente, com apresentação em forma de frequência absoluta (n), frequência relativa (%) e/ou média e desvio-padrão.

Os resultados da microbiologia, das técnicas moleculares, dos TSA e da parasitologia foram apresentados na forma descritiva em presença ou ausência e frequência relativa (%). Quanto aos parâmetros anatomopatológicos, as variáveis classificatórias foram descritivamente apresentadas, quanto às frequências absolutas (n) e relativas (%), segundo gênero e faixa etária.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO ESTADO GERAL DOS ANIMAIS BASEADA NO PESO E NA CONDIÇÃO CORPÓREA

O peso médio dos machos foi $114,72 \pm 12,74\text{g}$ às 4 semanas, $256,93 \pm 18,58\text{g}$ às 8 semanas, $351,10 \pm 31,45\text{g}$ às 12 semanas, $415,61 \pm 42,65\text{g}$ às 16 a 20 semanas e $446,81 \pm 65,62\text{g}$ às 48 a 72 semanas (12 a 18 meses). Quanto ao peso médio das fêmeas foi $113,53 \pm 17,17\text{g}$ às 4 semanas, $168,53 \pm 6,93\text{g}$ às 8 semanas, $212,54 \pm 19,14\text{g}$ às 12 semanas, $242,73 \pm 17,83\text{g}$ às 16 a 20 semanas e $279,44 \pm 27,92\text{g}$ às 48 a 72 semanas. A distribuição do peso médio dos ratos segundo o gênero e faixa etária está representada no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Distribuição do peso médio em gramas dos ratos segundo gênero e faixa etária em semanas

Fonte: (PAIVA, 2015).

Ao exame físico, do total de 273 animais utilizados, 257 ratos (94,14%) apresentavam condição corpórea boa, com 7 animais magros (2,56%) e 9 com sobrepeso (3,30%). Os 36 animais (100%) nas 4 semanas e os 30 animais utilizados nas 8 semanas (100%) possuíam condição corpórea boa. Nas 12 semanas, dos 90 animais utilizados, 89 (98,89%) apresentavam condição corpórea boa, dos quais 45 pertenciam ao gênero feminino (100%) e 44 ao masculino (97,78%), em que um dos 45 machos (2,22%) exibia sobrepeso. Na faixa etária das 16 a 20 semanas, 35 dos 36 animais pesquisados (97,22%) apresentavam condição corpórea boa, em que todas as 13 fêmeas (100%) estavam em condições regulares e um dos 23 machos (4,35%) exibia sobrepeso. Quanto à faixa etária dos 12 a 18 meses, do total de 81 animais analisados, 7 estavam magros (8,64%), 67 regulares (82,72%) e 7 em sobrepeso (8,64%); das 42 fêmeas utilizadas, 2 animais foram considerados magros (4,76%), 39 regulares (92,86%) e 1 em sobrepeso (2,38%); nos machos, do total de 39, 5 estavam magros (12,82%), 28 com condição corpórea boa (71,79%) e 6 em sobrepeso (15,38%). Estes dados estão representados no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Distribuição das condições corpóreas dos ratos segundo gênero e faixa etária

Fonte: (PAIVA, 2015).

Legenda: 1 - Condição corpórea correspondente a animal magro; 2 - Condição corpórea correspondente a animal bom/regular; 3 - Condição corpórea correspondente a animal com sobrepeso; s - semanas de idade.

5.2 DETERMINAÇÃO DOS AGENTES BACTERIANOS, FÚNGICOS, VIRAIS E PARASITÁRIOS NA COLÔNIA DE RATOS

Os resultados obtidos na avaliação microbiológica das salas do Biotério, assim como os agentes bacteriológicos, virais e parasitológicos presentes nos ratos são apresentados nos itens 5.2.1.

5.2.1 Determinação dos Agentes Bacterianos e Fúngicos das Salas dos Ratos

Os resultados da cultura microbiológica das duas salas de ratos, na primeira avaliação, em outubro de 2014 foram:

- Sala A - *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp.;
- Sala B - *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp.

Quanto à segunda avaliação realizada em abril de 2015, os microrganismos isolados foram:

- Salas A e B - *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp e *Aspergillus* spp.

Os resultados da terceira e última avaliação, realizada em junho de 2015 foram:

- Sala A - *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp., *Penicillium* spp. e fungo contaminante não especificado;
- Sala B - *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp. e fungo contaminante não especificado.

5.2.1.1 TSA das Bactérias Ambientais

Foram isoladas três diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp. e dez de *Bacillus* spp. da segunda avaliação bacteriológica das salas dos ratos. Os resultados do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos do *Staphylococcus* spp. estão no Quadro 8 e Gráfico 3 e os dos *Bacillus* spp. estão no Quadro 9 e Gráfico 4.

Quadro 8 - Distribuição do número (N) de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas das salas segundo a classificação de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Susceptibilidade Antimicrobianos	Resistente	Intermediária	Sensível
	N	N	N
Amoxicilina e ácido clavulânico	0	0	3
Cefalexina	0	0	3
Cefoxitina	3	0	0
Ciprofloxacina	0	1	2
Clindamicina	0	2	1
Cloranfenicol	0	1	2
Doxicilina	0	0	3
Enrofloxacin	0	0	3
Eritromicina	1	2	0
Gentamicina	0	1	2
Oxacilina	1	0	2
Sulfatrimetoprim	0	0	3
Tetraciclina	1	1	1
Vancomicina	1	0	2

Fonte: (PAIVA, 2015).

Legenda: N – Frequência absoluta das bactérias.

Gráfico 3 - Resultado percentual da susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas

Fonte: (PAIVA, 2015).

Quadro 9 - Distribuição do número (N) de estirpes de *Bacillus* spp. isoladas das salas segundo a classificação de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados

Susceptibilidade Antimicrobianos	Resistente	Intermediária	Sensível
	N	N	N
Amoxicilina e ácido clavulânico	1	0	9
Cefalexina	1	0	9
Cefoxitina	4	0	6
Ciprofloxacina	0	2	8
Clindamicina	2	5	3
Cloranfenicol	0	1	9
Doxicilina	1	0	9
Enrofloxacina	0	0	10
Eritromicina	0	5	5
Gentamicina	1	0	9
Oxacilina	5	0	5
Sulfatrimetoprim	0	0	10
Tetraciclina	1	0	9
Vancomicina	0	0	10

Fonte: (PAIVA, 2015).

Legenda: N – Frequência absoluta das bactérias.

Gráfico 4 - Resultado percentual da susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos das estirpes de *Bacillus* spp. isoladas

Fonte: (PAIVA, 2015).

5.2.3 Cultivo e Isolamento Bacteriológico de Amostras de Raspado de Orofaringe, de Mucosa Intestinal e de Lavado Traqueobrônquico

Não houve isolamento e/ou identificação dos agentes potencialmente patogênicos pesquisados nas amostras.

5.2.4 Identificação Molecular de *Mycoplasma* spp. de Amostras Pulmonares

Das 25 amostras de pulmão, 18 (72%) deram positivas pela PCR para *Mycoplasma* spp. Dos 5 machos testados, com 12 semanas, 4 deles (80%) apresentaram PCR positiva para *Mycoplasma* spp.. Catorze dos 20 ratos testados (70%), com 12 a 18 meses, apresentaram PCR positiva para *Mycoplasma* spp., dos quais 6 eram machos (30%) e 8 fêmeas (40%).

Após sequenciamento do seu genoma, todas as amostras apresentaram 99% de similaridade com *Mycoplasma pulmonis*, tal como se pode observar na árvore filogenética apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Relações filogenéticas do *Mycoplasma pulmonis* isolado do pulmão dos ratos

Fonte: (PAIVA, 2015).

Legenda: Os números 190 (1), 198 (3), 221 (6), 222 (7), 224 (9), 225 (10), 227 (12), 239 (14), 240 (15), 241 (16), 242 (17), 243 (18), 244 (19), 247 (21), 248 (22), 249 (23), 253 (24) e 255 (25) correspondem à identificação do ratos e às suas respectivas amostras de pulmão, que apresentaram positividade para *Mycoplasma* spp. pela PCR.

5.2.5 Determinação de Anticorpos para Agentes Virais e Bacterianos por ELISA

Dos agentes infecciosos pesquisados por sorologia, os 20 animais (100%) apresentaram presença de anticorpos para CARB e para *Mycoplasma pulmonis* e 7 fêmeas (35%) para Reovírus tipo 3.

5.2.6 Determinação dos Agentes Parasitários

Ausência de ectoparasitos e de parasitos vesicais em todas as amostras. Cinquenta e cinco animais (91,67%) apresentaram *Syphacia muris*, dois (3,33%) *Eimeria* spp. e 1 (1,67%) *Entamoeba muris*.

Na faixa etária das 4 semanas, 18 (9 machos e 9 fêmeas, 90%) apresentaram *Syphacia muris* (Figura 3).

Nas 12 semanas, 17 animais (85%) apresentaram endoparasitos. A totalidade das fêmeas (100%) apresentaram *Syphacia muris*, uma (10%) apresentava, também, *Eimeria* spp. e uma (10%), *Eimeria* spp. e *Entamoeba muris*. Quanto aos machos, 7 (70%) apresentaram positividade para *Syphacia muris*.

Os ratos, na faixa etária dos 12 aos 18 meses (100%), foram positivos para *Syphacia muris*.

Figura 3 - Fotomicrografia de ovos e da região cefálica do parasito adulto de *Syphacia muris*

Fonte: (PAIVA, 2015).

Legenda: A - Ovos de *Syphacia muris* (400x); B - Parasito adulto de *Syphacia muris* (600x); observar esôfago (seta).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

Em seguida são apresentadas as alterações anatomopatológicas do sistema respiratório observadas durante a necropsopia e no exame histopatológico.

5.3.1 Cavidades Nasais

Nas cavidades nasais não foram observadas alterações macroscópicas.

Quanto ao exame histopatológico, a lesão de base identificada foram inclusões eosinofílicas nas células do epitélio, em animais a partir das 8 semanas de idade.

A frequência de ocorrência das lesões histopatológicas das cavidades nasais causadas por agentes infecciosos e gases irritantes está na Tabela 2.

Tabela 2 - Frequência de ocorrência das lesões observadas em cavidades nasais, devido a agentes e gases irritantes presentes no biotério, agrupadas por grau de lesão, gênero e faixa etária

Cavidades Nasais																	
Grau lesão	4 semanas				8 semanas				12 semanas				12 a 18 meses				
	Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas		
	N=8		N=8		N=15		*N=13		N=15		N=15		N=15		N=15		
	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	
I	6	75	6	75	8	53,3	7	53,8	5	33,3	5	33,3	2	13,3	3	20	
II	1	12,5	-	-	3	20	-	-	8	53,3	6	40	6	40	4	26,7	
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	46,7	8	53,3	
Total	7	87,5	6	75	11	73,3	7	53,8	13	86,7	11	73,3	15	100	15	100	

Fonte: (PAIVA, 2015).

Legenda: N – Número de animais totais por faixa etária; FA – Frequência absoluta; *N=13 - das 15 fêmeas totais utilizadas no estudo anatomopatológico, em duas delas, as cavidades nasais não foram representados no corte histológico; Grau de lesão I – Discreta, II – Moderada, III – Marcante.

Na faixa etária de 4 semanas, 81,2% dos animais apresentaram lesões, sendo 87,5% machos e 75%, fêmeas. O Grau I (inicial) da lesão foi observado em 75% dos machos e o Grau II em 12,5%, enquanto 75% das fêmeas exibiram lesões de Grau I. A frequência de ocorrência e o grau de progressão das lesões acompanharam a idade dos animais, ou seja, lesões mais graves foram observadas mais frequentemente nos ratos mais velho. Todos os animais na faixa etária dos 12 aos 18 meses apresentaram lesões, 13,3% dos machos com lesões de Grau I, 40% com lesões de Grau II e 46,7% de Grau III. Por sua vez, em 20% das fêmeas nesta idade apresentaram lesões de Grau I, 26,7%, Grau II e 53,3%, Grau III.

As Figura 4 exemplifica as lesões histopatológicas nos graus I a III.

5.3.2 Orofaringe, Laringe e Traqueia

Na orofaringe, laringe e traqueia não foram visualizadas alterações macroscópicas.

Quanto ao exame microscópico, as lesões de base foram ectasia das glândulas da submucosa com acúmulo de secreção e início da ossificação da cartilagem dos anéis traqueais em animais desde as 8 semanas de idade e inclusões eosinofílicas no epitélio a partir das 12 semanas. As Figura 5 demonstra as lesões de base na orofaringe, laringe e traqueia.

A frequência de ocorrência das lesões histopatológicas causadas por agentes infecciosos e gases irritantes segundo graduação, está na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência de ocorrência das lesões observadas em orofaringe, laringe e traqueia, devido a agentes e gases irritantes presentes no biotério segundo grau de lesão, gênero e faixa etária

Orofaringe, Laringe e Traqueia																
Grau lesão	4 semanas				8 semanas				12 semanas				12 a 18 meses			
	Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas	
	N=8		N=8		N=15		N=14*		N=14*		N=15		N=15		N=15	
	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%
I	4	50	4	50	8	53,3	7	50	5	35,7	11	73,3	3	20	8	53,3
II	-	-	-	-	-	-	1	7,1	6	42,8	4	26,7	8	53,3	4	26,7
III	-	-	-	-	-	-	-	-	2	14,3	-	-	4	26,7	3	20
Total	4	50	4	50	8	53,3	8	57,1	13	92,8	15	100	15	100	15	100

Fonte: (PAIVA, 2015).

Legenda: N- Número de animais totais por faixa etária; FA – Frequência absoluta; *N=14 - dos 15 animais totais utilizados no estudo anatomopatológico, nesta faixa etária, em um deles, os tecidos não foram representados no corte histológico; Grau de lesão I – Discreta, II – Moderada, III – Marcante.

Na faixa etária das 4 semanas foram observadas apenas lesões de Grau I em 50% dos machos e 50% das fêmeas. A frequência de ocorrência e a gravidade das lesões aumentaram com o avançar da idade. Na faixa etária das 12 semanas 93,3% dos ratos exibiram lesões, destes os machos corresponderam 92,8% e fêmeas, 100%. Nos machos desta idade, 35,7% apresentaram lesões de Grau I, 42,8%, Grau II e 14,3%, Grau III. Em 73,3% das fêmeas foram diagnosticadas lesões de Grau I e em 26,7%, Grau II. Quanto à faixa etárias dos 12 aos 18 meses, todos os animais apresentaram lesões nos vários Graus de progressão. Nos machos desta idade, foram observadas lesões de Grau I em 20% , Grau II, em 53,3% e Grau III, em 26,6%. Nas fêmeas nesta faixa etária, 53,3 apresentaram lesões Grau I, 26,7%, Grau II e 20%, Grau III.

A Figura 4 exemplifica as lesões nas graduações de I a III.

5.3.3 Pulmão

Na análise histopatológica, as lesões de base foram hemorragia, congestão e edema associados a eutanásia, discreto infiltrado de eosinófilos perivascular e focos de infiltrado mononuclear subpleurais nos animais a partir das 4 semanas de idade; nas 8 semanas foram observados macrófagos com pigmento e ectasia acinar alveolar. A partir das 12 semanas foram histiócitos intralveolares e subpleurais. As Figuras 5 e 6 demonstram as lesões de base observadas no parênquima pulmonar.

A frequência de ocorrência das lesões macroscópicas e histopatológicas causadas por agentes infecciosos e gases irritantes segundo a graduação de I a III está na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequências de ocorrência das lesões observadas em pulmão, devido a agentes e gases irritantes presentes no Biotério, segundo grau de lesão, gênero e faixa etária

Pulmão																
Grau lesão	4 semanas				8 semanas				12 semanas				12 a 18 meses			
	Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas	
	N=8		N=8		N=15		N=15		N=15		N=15		N=15		N=15	
	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%	FA	%
I	-	-	-	-	-	-	-	-	7	46,7	8	53,3	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	-	-	6	40	6	40	9	60	11	73,3
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	40	4	26,7
Total	-	-	-	-	-	-	-	-	13	86,7	14	93,3	15	100	15	100

Fonte: (PAIVA, 2015)

Legenda: N – Número de animais totais por faixa etária; FA – Frequência absoluta; Grau de lesão I – Discreta, II – Moderada, III – Marcante.

As lesões de Grau I foram diagnosticadas nos animais às 12 semanas na frequência de 90%, sendo 86,7% machos e a 93,3% fêmeas. Segundo o gênero e o grau, grau I ocorreu em 46,7% dos machos, Grau II em 40%. As fêmeas exibiram em 53,3% lesões pulmonares Grau I e em 40%, Grau II. Na faixa etária dos 12 aos 18 meses, foram observadas lesões em todos os animais de ambos os gêneros, sendo 60% machos com Grau II e 40%, Grau III. Em 73,3% das fêmeas foram observadas lesões Grau II e em 26,7%, Grau III.

As Figuras 7 e 8 caracterizam as lesões anatomopatológica em pulmão nos graus I a III.

Figura 4 - Fotomicrografias de cavidade nasal, orofaringe, laringe e traqueia segundo lesões de Grau I a III, em ratos Wistar, Hematoxilina-Eosina (H&E)

(Fonte: PAIVA, 2015).

Legenda: A- Cavidades nasais, rinite neutrofílica discreta, Grau I; B- Orofaringe, orofaringite linfoplasmocítica com exsudação de neutrófilos, cujo infiltrado inflamatório discreto se distribui entre os anéis traqueais e periglandulares, Grau I; C- Cavidades nasais, rinite neutrofílica proliferativa e exsudativa, Grau II; D- Orofaringe, orofaringite moderada com adenite das glândulas submucosas e presença de neutrófilos entre os anéis e em exsudação, Grau II; E- Cavidades nasais, rinite crônica proliferativa com exsudação neutrofílica, hiperplasia epitelial e metaplasia epitelial, Grau III; F- Orofaringe, orofaringite proliferativa hiperplásica com exsudação neutrofílica e presença de restos celulares e neutrófilos no lúmen, Grau III.

Figura 5 - Fotomicrografias das lesões de base do sistema respiratório observadas em ratos Wistar (H&E)

(Fonte: PAIVA, 2015).

Legenda: A- Orofaringe, inclusões eosinofílicas em epitélio; B- Orofaringe, ectasia das glândulas da submucosa; C- Traqueia, ossificação das cartilagens traqueais; D- Pulmão, ectasia acinar alveolar; E- Pulmão, eosinófilos perivascularres; F- Pulmão, histiócitos subpleurais (seta).

Figura 6 - Lesões de base em pulmão em ratos Wistar devidas à eutanásia em câmara de CO₂

(Fonte: PAIVA, 2015).

Legenda: A e B- Macroscopia de pulmão, com áreas de hemorragia multifocais, mais extensas em B; C- Fotomicrografia de pulmão, discreta congestão e focos de hemorragia, H&E.; D- Fotomicrografia de pulmão, detalhe de focos de hemorragia perivascular (seta), H&E.

Figura 7 - Alterações anatomopatológicas de pulmão, Grau I e II em ratos Wistar

(Fonte: PAIVA, 2015).

Legenda: A- Macroscopia de pulmão, com áreas de hemorragia focalmente extensivas, Grau I; B- Fotomicrografia de pulmão, com bronquiolite neutrofílica, Grau I, H&E; C e D- Macroscopia de pulmão, distensão pulmonar e áreas de consolidação, Grau II; E- Fotomicrografia de pulmão, bronquite erosiva marcante, Grau II, H&E; F- Fotomicrografia de pulmão, foco de broncopneumonia intersticial linfoplasmocítica marcante, Grau II, H&E.

Figura 8 - Alterações anatomopatológicas de pulmão em Grau III em ratos Wistar

(Fonte: PAIVA, 2015).

Legenda: A- Macroscopia de pulmão, lobos craniais e caudais direitos com consolidação e nódulos amarelados, lobo caudal esquerdo com foco de bronquiectasia; B- Fotomicrografia, pulmão, brônquio, bronquiectasia com erosão do epitélio, H&E; C- Fotomicrografia, pulmão, abscesso em brônquio, H&E; D- Fotomicrografia, pulmão, bronquite com erosão e ruptura do epitélio brônquico, H&E; E- Fotomicrografia, pulmão, múltiplos abscessos brônquicos, H&E; F- Fotomicrografia pulmão, fibrose peribronquial ao redor de abscesso, Tricrômico de Masson.

6 DISCUSSÃO

A caracterização do estado sanitário da colônia de ratos Wistar do biotério do VPT, que envolveu a avaliação do estado geral dos ratos, em ambos os gêneros e nas diferentes faixas etárias, assim como o levantamento das bactérias, fungos, vírus e parasitos presentes, mostraram particularidades da colônia a qual apresenta animais com peso e condição corpórea dentro do padrão de normalidade, mas com elevada frequência de ocorrência de *Syphacia muris*, de *Mycoplasma pulmonis* e de CARB. As lesões anatomopatológicas do sistema respiratório foram observadas em muitos animais, o que nos motivou a estudar em profundidade estas lesões, por faixa etária e segmento. Assim, a avaliação dos bioressóis biológicos presentes nas salas dos ratos, os agentes isolados e/ou detectados nos animais, assim como as lesões anatomopatológica de base e devidas a agentes exógenos no sistema respiratório são tópicos de relevância e impacto no contexto de um biotério de criação e de experimentação animal como serão destacados.

Primeiramente, ao analisar o peso e condição corpórea para determinação do estado geral dos animais, podemos comprovar que 94,14% dos ratos apresentaram condição corpórea boa, 3,30% em sobrepeso e, 2,56% dos animais, na faixa etária dos 12 aos 18 meses, foram considerados magros. Este resultado mostra que apenas uma minoria está fora do padrão e exhibe sinal clínico inespecífico de doença como já foi descrito por outros autores (SHARP; LA REGINA, 1998). A distribuição do peso e condição corpórea indica maior desvio padrão nos animais mais velhos na faixa etária dos 12 a 18 meses, com valores de $446,81 \pm 65,62$ g para os machos e de $279,44 \pm 27,92$ g para as fêmeas, comparativamente aos obtidos nas outras faixas etárias.

Os parâmetros fisiológicos dos animais de experimentação, como o peso médio, são muito variáveis na literatura pois dependem das condições de criação e, além disso, a maioria dos dados foi determinada por grandes empresas com longa história em produção e comercialização de animais de experimentação, como a Taconic Farms, Charles River Laboratories e Harlan Laboratories. Os dados disponíveis nas suas fichas técnicas, se tornam a “base” comparativa para os outros biotérios e são tomados como constantes para os animais de uma mesma linhagem (SANTOS et al., 2010; JOHNSON, 2012). No entanto, estes são laboratórios que trabalham em condições muito diferentes das encontradas em biotérios convencionais como o do VPT. Assim, a avaliação do peso médio, por gênero e faixa etária, neste trabalho, em comparação com os dados de outro biotério convencional, como o da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa (DTAEP, [20-]), mostra grande similaridade, como por exemplo o peso médio dos animais nas 4 semanas de 51 a 100g para machos e de 50 a 80g para as fêmeas, nas 8 semanas de 250 a 299g para machos e de 170 a 200g para as fêmeas e, com mais de 10 semanas superior a 321g para machos e superior a 220g para as fêmeas. Por sua vez, para o biotério do VPT, o peso determinado foi nas 4 semanas de $114,72 \pm 12,74$ g para os machos e de $113,53 \pm 17,17$ g para as fêmeas, às 8 semanas de $256,93 \pm 18,58$ g para os machos e de $168,53 \pm 6,93$ g para as fêmeas e, nas 12 semanas de $351,10 \pm 31,45$ g para os machos e de $212,54 \pm 19,14$ g para as fêmeas. Assim, analisando os pesos é possível observar pequena diferença na faixa etária das 4 semanas, possivelmente pois nesta idade os animais se encontram na fase de crescimento mais rápida, com elevado ganho médio de peso diário e, outra variável pode ser atribuída ao fato dos animais terem sido pesados ao longo da 4 semana próximos das 5 semanas de idade, podendo explicar desta forma a diferença de pesos encontrada nesta faixa etária. Destaca-se também que esses parâmetros sofrem a influência da dieta, manejo e ambiente, o que também pode justificar a variação do peso na faixa etária (KOOLHAAS, 2010; SANTOS et al., 2010; JOHNSON, 2012).

Considerando estas variações dentro de uma mesma linhagem e nas diferentes faixas etárias é muito importante que cada biotério estabeleça os seus próprios valores de referência, de acordo com o sexo e idade de cada espécie utilizada como é reforçado por outros autores (KOOLHAAS, 2010; SANTOS et al., 2010). Destaca-se que a análise de peso médio e de condição corpórea é importante, pois reflete, em termos gerais, a condição sanitária destes animais na colônia e permitem estabelecer um banco de dados de peso e condição corpórea do biotério que poderá ser usado nos estudos experimentais futuros.

As condições ambientais deste biotério respeitam as normas indicadas quanto à temperatura do ar entre 20 e 25°C, umidade relativa do ar entre 40 a 60% e com trocas de ar controladas por pressão positiva. Em um biotério convencional é importante, também, conhecer e estabelecer controle microbiológico do ambiente (de bioaerossóis) das salas e também a monitorização periódica deste.

A importância da avaliação microbiológica ambiental do biotério, realizada de forma periódica, é essencial para a manutenção de uma boa condição sanitária dos animais, conseguindo desta forma verificar se os mecanismos de higienização e desinfecção estão adequados e eficientes (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; MINAGAWA, 2007). No caso do biotério do VPT, atualmente, essa avaliação não é realizada periodicamente.

A avaliação microbiológica ambiental é feita geralmente através da análise de

bioaerossóis, que são partículas ubiqüitárias de origem biológica presentes no ar, constituídas por bactérias ou fragmentos destas, esporos de fungos, vírus e subprodutos resultantes do seu metabolismo (STETZENBACH; BUTTNER; CRUZ, 2004; SRIKANTH; SUDHARSANAM; STEINBERG, 2008). A análise por meio de cultivo, tal como por nós realizada, pode subestimar os agentes presentes, uma vez que apenas detectam e isolam os microrganismos passíveis de crescer sob as condições fornecidas (STETZENBACH; BUTTNER; CRUZ, 2004).

Os bioaerossóis podem provocar doença em seres humanos e animais (STETZENBACH; BUTTNER; CRUZ, 2004). A infecção ocorre principalmente por inalação, mas também por ingestão e/ou contato físico com a pele, provocando doenças infecciosas, respiratórias e até câncer (SRIKANTH; SUDHARSANAM; STEINBERG, 2008). Desta forma, reforçamos a importância de determinar e monitorizar a qualidade microbiológica do ar, na tentativa de evitar o surgimento de doença ocupacional dos usuários do biotério e dos próprios animais.

Neste contexto, as bactérias ambientais isoladas do biotério do VPT foram *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp. e, quanto aos fungos, os identificados foram *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.

A grande maioria das espécies dos *Bacillus* spp. são considerada saprófitas, sem potencial patogênico, e estão amplamente distribuídos no meio ambiente, devido à resistência dos endósporos por eles formados (TRABULSI; MARTINEZ, 2004; QUINN et al., 2007). Entretanto, estes agentes podem estar ligados a infecções oportunistas ou provocar doença a indivíduos imunodeprimidos (DROBNIEWSKI, 1993; ØKSTAD; KOLSTØ, 2011).

Os estafilococos são na maioria das vezes comensais da pele e mucosas dos animais e seres humanos, podendo ser agentes oportunistas e piogênicos, pelo que traumas, imunossupressão ou coinfeção por outros agentes, podem predispor o hospedeiro ao desenvolvimento de infecções (QUINN et al., 2004; QUINN et al., 2007; ENGELHIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2008). Os *Staphylococcus* spp. coagulase negativos são os mais frequentemente presentes no ambiente e, a sua grande maioria é não patogênica, mas, ocasionalmente, também podem causar doença, nomeadamente em pessoas imunossuprimidas (QUINN et al., 2004; TRABULSI; MARTINEZ, 2004; MINAGAWA, 2007; ENGELHIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2008).

Os *Micrococcus* spp. são bactérias consideradas não patogênicas e estão presentes no ambiente, sendo encontradas de forma transitória na pele de humanos e, muito raramente estão associados a infecção (TRABULSI; MARTINEZ, 2004; QUINN et al., 2007; ENGELHIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2008).

Os fungos também se encontram presentes no ambiente e a grande maioria deles são considerados saprófitas ou comensais de animais e humanos, mas em condições de desregulação da microbiota habitual, como nos casos de administração prolongada de antibióticos, imunossupressão, infecções intercorrentes, trauma e até elevada dose infectante presente no ambiente, podem predispor à infecção micótica (QUINN et al., 2004; QUINN et al., 2007).

As consequências mais frequentemente causadas por exposição a *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. são reações alérgicas nos seres humanos (STETZENBACH; BUTTNER; CRUZ, 2004; TRABULSI; MARTINEZ, 2004), podendo causar asma, conjuntivite e rinite (TRABULSI; MARTINEZ, 2004; SRIKANTH, SUDHARSANAM, STEINBERG, 2008).

Os aspergilos têm ampla distribuição geográfica, estando presentes no solo, ar, plantas até na matéria orgânica, mas raramente provocam doença primária, mas indivíduos imunodeprimidos são mais susceptíveis (TRABULSI; MARTINEZ, 2004). A aspergilose pulmonar é a manifestação clínica mais importante, mas também pode afetar outros órgãos (TRABULSI; MARTINEZ, 2004; QUINN et al., 2007). Raramente os *Penicillium* spp. causam infecções oportunistas de gravidade similar às causadas por *Aspergillus* spp. (QUINN et al., 2007).

A resistência dos microrganismos a múltiplos fármacos surgiu devido ao seu uso generalizado em humanos e animais e atualmente é motivo de preocupação mundial, nomeadamente no que diz respeito as estirpes meticilina resistentes, quer de estafilococos coagulase negativos pela sua enorme relevância e presença em ambiente hospitalar (BONESSO; MARQUES; CUNHA, 2011; BECKER, HEILMANN; PETERS, 2014) quer de coagulase positivos, pela maior patogenicidade associada à infecção por *S. aureus*. Inicialmente a preocupação destas estirpes resistentes era apenas devido à sua elevada ocorrência em infecções nosocomiais não responsivas aos antimicrobianos utilizados, mas atualmente o seu impacto é muito maior, pela sua ocorrência fora dos centros médicos, na comunidade em geral, (LOWY, 2003; BONESSO; MARQUES; CUNHA, 2011; GREMA et al., 2015) e em animais silvestres e domésticos (GREMA et al., 2015).

A meticilina é uma penicilina semissintética resistente à penicilinase, introduzida em 1959, após o surgimento dos estafilococos penicilina-resistentes. No entanto, apenas 2 anos após a sua introdução no mercado, surgiram as primeiras estirpes meticilina-resistentes (BONESSO; MARQUES; CUNHA, 2011; GREMA et al., 2015). A oxacilina é um fármaco da mesma classe, mas mais utilizado no Brasil (BONESSO; MARQUES; CUNHA, 2011).

Os testes de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) indicam a susceptibilidade *in vitro* de

uma dada bactéria aos antimicrobianos pesquisados (QUINN et al., 2004; QUINN et al., 2007). São muito importantes e úteis, pois só desta forma se conhece a sensibilidade ou resistência de um dado fármaco para uma cepa específica (ENGELHIRE; DUBEN-ENGELKIRK, 2008). Por este motivo consideramos pertinente realizar esta determinação, pelo potencial risco a que os bioteristas, mas também os outros usuários e os próprios animais estão sujeitos, devido à exposição prolongada aos agentes presentes no ambiente, sabendo desta forma, antecipadamente, quais os antimicrobianos mais eficazes no tratamento de uma possível doença, para os isolados de *Staphylococcus* spp. e de *Bacillus* spp..

Entre os métodos aceitos e considerado fidedigno para verificar a resistência *Staphylococcus* spp. a metilina, é o da difusão em disco (TSA) frente à cefoxitina, visto que a oxacilina quando *in vitro*, origina falsos susceptíveis e induz em erro de interpretação (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; GREMA et al., 2015). Nos resultados dos TSAs dos isolados de *Staphylococcus* spp. do biotério do VPT, os três apresentavam resistência à cefoxitina, demonstrando que provavelmente são estirpes resistentes à metilina.

Desta forma, os agentes isolados são na maioria comensais e, apenas poderão apresentar um real potencial patogênico, em situações de imunossupressão do hospedeiro ou como oportunistas, motivo pelo qual os usuários do biotério, deverão sempre usar os meios de proteção individual apropriados para evitar doenças ocupacionais. Mas, no caso de ocorrência de doença clínica, os antibióticos mais eficazes e de primeira escolha no tratamento das estirpes isoladas do biotério seriam para os *Staphylococcus* spp. a Doxicilina, Amoxicilina e Ácido Clavulânico, Cefalexina, Enrofloxacin, Sulfatrimetoprim, Cloranfenicol, Gentamicina e Ciprofloxacin e para os *Bacillus* spp. a Vancomicina, Enrofloxacin e Sulfatrimetoprim, Cloranfenicol e Ciprofloxacin.

Além do conhecimento de quais os agentes presentes no ambiente de um biotério, é essencial saber quais os vírus, parasitos e bactérias numa colônia de animais utilizados em experimentação animal. Estes, apesar de indesejáveis, continuam a existir, principalmente em biotérios com barreiras sanitárias menos estritas, mas, mesmo em locais apropriados e modernos, com rígidos programas de controles sanitários, continuam a ser um risco e deverão ser sempre periodicamente monitorizados (REHBINDER et al., 1995; PRITCHETT-CORNING; CONSENTINO; CLIFFORD, 2009; MCINNES et al., 2012).

O único vírus detectado no Biotério do VPT foi o Reovírus tipo III, observado apenas em fêmeas com 12 semanas e com frequência de ocorrência de 35%. Este vírus RNA afeta ratos e camundongos, no entanto, em ratos a doença é subclínica. Já em camundongos lactentes, foram descritos nanismo, diarreia, alopecia abdominal, icterícia e pelame oleoso (NRC, 1991;

PERCY; BARTHOLD; 1997; BAKER, 1998). Frequentemente há soroconversão em ratos para este vírus, o que explica a presença nestas fêmeas, como foi colocado por diversos autores (JACOBY; GAERTNER, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007; MÄHLER et al., 2014). No entanto, a infecção natural pode interferir de múltiplas formas na resposta imunológica dos animais, assim como em estudos que envolvam o intestino, pode ainda provocar contaminação em pesquisas relacionadas com transplante de tumores e com linhagens de células (NRC, 1991; BAKER, 1998), sendo desta forma um agente indesejável, mesmo sem provocar doença natural nos animais.

A eliminação de reovírus da colônia pode ser alcançada pela rederivação cesariana e pela boa manutenção das barreiras sanitárias como são recomendadas na literatura (NRC, 1991; BAKER, 1998; KOOLHAS, 2010).

Em estudo de Zenner e Regnault (1999) entre 1988 e 1998, foi demonstrado prevalência de infecção por Reovírus tipo III em menos de 1% nos animais dos biotérios da França. Por sua vez, Gilioli et al. (2003) detectaram prevalência de 18,2% em biotérios brasileiros. Em estudo de Pritchett-Corning, Cosentino e Clifford (2009), verificaram existir nos animais provenientes de vários biotérios em um período de 5 anos na América do Norte prevalência de 0,01% e, por outro lado, durante os 3 de anos de pesquisa na Europa, não foi encontrado nenhum rato com anticorpos para este vírus. Adicionalmente, Kohale e Raut (2013) realizaram pesquisa na Índia e também não detectaram anticorpos em ratos para o Reovirus tipo III.

Os Reovírus estão presentes no trato respiratório e entérico de humanos e animais assintomáticos (WARD et al., 2007; GAUVIN et al., 2013), mas a infecção experimental por Reovírus tipo III em ratos e camundongos é utilizada como modelo de pneumonia viral em humanos, bem como hepatite, linfoma, obstrução biliar, pancreatite entre outros (MORIN; WARNER; FIELDS, 1996; BAKER, 1998; GAUVIN et al., 2013). Estudos recentes demonstraram que este vírus tem propriedades oncolíticas e, foi questionado o quanto realmente se sabe sobre esse vírus e sua patogenicidade em humanos e em animais de experimentação (GAUVIN et al., 2013). Reforçando por estes motivos, a importância da monitorização periódica quanto à frequência de ocorrência deste vírus em colônias de experimentação.

Quanto aos parasitos presentes na colônia de ratos do VPT, foram diagnosticados endoparasitos *Syphacia muris* em 91,67%, *Eimeria* spp. em 3,33% e *Entamoeba muris* em 1,67% dos animais. Não foram identificados ectoparasitos e endoparasitos das vias urinárias.

O endoparasito *Syphacia muris*, é um nematoídeo, oxiurídeo, frequentemente presente em

ratos de laboratório (ZENNER, 1998; BAKER, 1998; 2007; GILIOLI, 2003; SCAINI et al., 2003; MOREIRA et al., 2013). Gilioli et al. (2000), em estudo de prevalência dos agentes parasitários determinou prevalência de 80%; por sua vez, Bicalho et al. (2007), obtiveram prevalência de 85,7% em amostras de sete instalações do estado de Minas Gerais. Pritchett-Corning, Cosentino e Clifford (2009) encontraram valores consideravelmente menores com prevalência de 1,10% na América do Norte e 3,58% na Europa. Esta diferença está relacionada, essencialmente à existência de barreiras sanitárias mais estritas e programas de controle sanitários mais rígidos. Nos ratos do VPT, a frequência de ocorrência encontrada nos animais é considerada um valor bastante elevado.

Vários motivos podem explicar a manutenção de elevadas frequências de ocorrência de *Syphacia muris* em biotérios com poucas barreiras sanitárias, tais como: ciclo de vida curto de aproximadamente 6 a 8 dias, ovos muito leves e resistentes que dispersam facilmente na forma de aerossóis no ambiente, onde podem permanecer viáveis por 4 semanas (KLEMENT et al., 1996; PRITCHETT; JOHNSTON, 2002; BAKER, 1998; 2007; MEADE; WATSON, 2014; DE SOUSA, 2014) ou até muito mais, segundo estudo de Meade e Watson (2014), em que 30 semanas pós oviposição, 69,2% dos ovos ainda se encontravam viáveis. Devido a estas características, estes parasitos são muito difíceis de ser eliminados de uma colônia de criação. O programa de erradicação será eficiente quando associar protocolo terapêutico baseado em anti-helmínticos (ZENNER; 1998; PRITCHETT; JOHNSTON, 2002; BAKER, 2007; MOREIRA et al., 2013), e limpeza e desinfecção das instalações e gaiolas (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002; DIX; ASTILL; WHELAN, 2004; MOREIRA et al., 2013; MEADE; WATSON, 2014). Porém, este protocolo é trabalhoso e de elevado custo e não elimina a possibilidade de reinfecção (ZENNER; 1998; SOUSA et al., 2014). A forma mais eficaz para a erradicação total deste parasito é a formação de uma nova colônia, com animais obtidos por técnicas de rederivação cesariana ou transferência embrionária (ZENNER; 1997; PRITCHETT; JOHNSTON, 2002).

Adiciona-se que além do seu curto ciclo, a eclosão destes parasitos ocorre algumas horas após a oviposição e, pode haver infecção por retroinfecção, ingestão direta dos ovos da região perianal ou indiretamente, através do consumo de água, alimento ou de material contaminado (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002; BAKER, 2007; MEADE; WATSON, 2014; SOUSA et al., 2014). Desta forma é possível detectar a sua presença em animais muito jovens, logo após o desmame (SCAINI et al., 2003; MEADE; WATSON, 2014). No entanto, animais com exame parasitológico negativo ao desmame não significa que realmente não apresentem o parasito, pois podem estar no intervalo anterior ao período pré-patente (MEADE; WATSON,

2014). Provavelmente por este motivo, se obteve frequência de ocorrência menor (90%) nos animais de 4 semanas de idade em comparação as demais faixas etárias. Quanto aos animais das faixas intermediárias, como os ratos de 12 semanas (85%), pensa-se que ocorra um período refratário, em que os animais são mais resistentes, havendo posteriormente aumento da susceptibilidade com o avançar da idade, como se observou pelo aumento da frequência de ocorrência na faixa etária dos 12 aos 18 meses, em que todos os animais apresentaram o endoparasito. Tais resultados corroboram com a literatura (MEADE; WATSON, 2014).

O parasitismo por *Syphacia muris* geralmente é subclínico como nos ratos do biotério do VPT, nos quais não se observou prolapso retal, impactação, enterite, entre outros sinais clínicos. No entanto, mesmo assim, a parasitose altera a fisiologia, metabolismo e resposta imunológica do animal, podendo, desta forma, interferir nos resultados de pesquisas como apontam diferentes autores (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002; DIX; ASTILL; WHELAN, 2004; BAKER, 2007; PERCY; BARTHOLD, 2007; MEADE; WATSON, 2014).

Oocistos de *Eimeria* spp. também foram encontrados em duas das fêmeas na faixa etária das 12 semanas (3,33%). A *Eimeria* spp. é um parasita coccídea intracelular obrigatório e as principais espécies que podem acometer os ratos de laboratório são a *E. miyairii*, *E. nieschulzi* e *E. separata*. No entanto todas elas são raras em animais de laboratório e pouco se conhece acerca das suas prevalências (KREIER, 1993; BAKER, 2007; MÄHLER et al., 2014). Em estudo realizado em território nacional, por Gilioli et al. (2000) foi constatado prevalência de 60% em biotérios de ratos de diversos Estados do Brasil.

Uma vez que não se determinou qual a *Eimeria* spp. presente nos animais deste biotério, é importante conhecer um pouco de cada uma das espécies que podem acometer ratos de experimentação, visto que elas podem causar diferentes impactos nos animais.

A *E. nieschulzi* é a mais patogênica, no entanto a gravidade da doença vai depender da quantidade de oocistos ingeridos e da capacidade de resposta imunológica do hospedeiro. Pode provocar hiperplasia das criptas, atrofia das vilosidades intestinais, alterações no transporte/absorção de nutrientes através da barreira intestinal e interferir com a resposta imunológica. Apenas os animais mais jovens até aos 6 meses e com uma grande carga parasitária apresentam sinais clínicos como diarreia, caquexia, fraqueza e, ocasionalmente morte (KREIER; BAKER, 1993; BAKER, 2007; PATRA et al., 2011). Geralmente a infecção é autolimitante e induz boa resposta humoral (BAKER, 2006).

A *E. separata* e *E. miyairii*, são consideradas geralmente não patogênicas, pois mesmo a ingestão de uma grande dose infectante, não provoca doença clínica. As alterações pela *E. separata* são observadas no local, alterando o transporte de íons pela barreira intestinal e o

aumento das citocinas inflamatórias. O único sinal clínico observado é diminuição do ganho de peso, mesmo em animais altamente infectados (BAKER 2006, 2007).

Neste estudo não houve associação a sinal clínico nas duas fêmeas positivas e, apesar de apenas se ter observado os oocistos em fêmeas, o sexo do rato não influencia a infecção (BAKER, 2006), este fato pode ser decorrente do número de animais amostrados por faixa etária e sexo.

Embora diagnosticada em baixa frequência (3,33%) nos animais deste biotério, o parasitismo por *Eimeria* spp. é um dado importante, pois a colônia é considerada positiva e, assim, é necessário continuar o programa de monitoramento sanitário, pois um aumento na carga parasitária pode provocar a morte de animais (BAKER, 2007; PATRA et al., 2011).

Em uma das fêmeas foi diagnosticado parasitismo por *Eimeria* spp. e *Syphacia muris* (1,67%), e também coinfeção por *Entamoeba muris*. Este parasito, historicamente apresentava elevada prevalência em biotérios, mas atualmente a frequência de ocorrência varia entre 5 a 55% (MÄHLER et al., 2014). O estudo de Gilioli et al. (2000) determinou prevalência de 80% em vários biotérios de Estados do Brasil e, Bicalho et al. (2007), prevalência de 85,7% em biotérios do Estado de Minas Gerais.

A *Entamoeba muris* é a única ameba presente em animais de laboratório, é considerada como agente comensal do ceco e colón dos animais e a sua infecção ocorre por via fecal-oral. Não se tem conhecimento de provocar doença em animais, nem da sua interferência em pesquisa, no entanto, é um indicador das condições higiênico-sanitárias do biotério (BAKER, 2006, 2007; BICALHO et al., 2007; MÄHLER et al., 2014). Destaca-se que a coinfeção por vários parasitos, como ocorreu neste estudo, pois é algo a ter em conta, visto que por exemplo relata-se que a *Eimeria nieschulzi* altera a resposta do hospedeiro a outros parasitos também presentes (PATRA et al., 2011).

A *Entamoeba muris* e a *Eimeria* spp. podem ser eliminadas da colônia por técnicas de rederivação cesariana e aumento dos cuidados higiênico-sanitários. No entanto, a *Entamoeba muris* isoladamente, não requer tal gasto, por ser um agente considerado não patogênico. Mas, é um parasito não desejável nos animais de um biotério (NRC, 1991; BAKER, 2006, 2007).

No que diz respeito às bactérias presentes nos ratos do VPT, não se obteve isolamento bacteriológico no raspado da orofaringe, de mucosa intestinal e do lavado traqueobrônquico por cultivo clássico. Este resultado, não foi corroborado pela sorologia, uma vez que com essa técnica, foi detectado *Mycoplasma pulmonis* em 100% dos animais e, ainda, em 72% das amostras por PCR. Os CARB foram detectados em 100% dos soros por ELISA. Tais bactérias são de difícil crescimento em meios de cultura e condições clássicas (FRANKLIN et al.,

1999; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007), como as que foram utilizadas por nós.

Os micoplasmas são agentes de importância na maioria das espécies animais e humanos (NICKLAS, 1999; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007). O *Mycoplasma pulmonis* em ratos, tem tropismo para o trato genital e para o epitélio respiratório, onde é o agente primário da Micoplasmose Respiratória Murina (MRM) (WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007; DESJARDINS; KENNEDY; AGNEW, 2012). Sendo desta forma uma agente muito importante a ter em conta, ao utilizar o sistema respiratório de ratos nas pesquisas.

Atualmente, a infecção por este agente limita-se a animais que tiveram contato com outras colônias contaminadas, devido à inoculação accidental de material contaminado ou a pequenas instituições de produção de animais sem fins de comercialização externa (WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007), tal como é o caso do VPT, em que os animais criados são para uso institucional.

O *Mycoplasma pulmonis* é um dos agentes ainda hoje presente em biotérios, apesar de ter diminuído bastante nos últimos anos pela melhoria dos programas de controlo de qualidade e de monitoramento sanitário das colônias (PERCY; BARTHOLD, 2007). Quando presente em um biotério, a sua prevalência é bastante elevada dentro da colônia, pois é um agente em que a transmissão ocorre por via intrauterina e por aerossóis, facilitando muito a infecção dos filhotes e entre os coabitantes de uma gaiola (BAKER, 1998; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007) e, uma vez infectados, os animais permanecem como portadores e como fontes de infecção ao longo da sua vida (WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007), visto que a soroconversão não lhes confere imunidade protetora (LANGAN et al., 2000). Tal facto foi realmente observado no biotério do VPT, pela sua elevada frequência de ocorrência encontrada, quer pelo ELISA (100%), quer pela PCR (72%).

A infecção por este agente, por vezes assintomática e considerada por alguns investigadores como comensal em condições ideais, tende a ter uma apresentação clínica muito variável consoante a linhagem do hospedeiro, como por exemplo ratos Lewis são muito susceptíveis, fatores ambientais e do próprio indivíduo, como infecções concomitantes por outros agentes (DAVIS; CASSEL, 1982; PINSON et al., 1986; BAKER, 1998; LANGAN et al., 2000; PERCY; BARTHOLD, 2007). Os sinais clínicos podem estar ausentes, mesmo quando se observam lesões pulmonares significantes e, quando as alterações clínicas estão presentes são inespecíficas, tais como a perda de peso, dispneia, pelame em mau estado,

espiros, estertor respiratório, pigmentação vermelha periocular e perinasal devida à porfirina, torcicolo e infertilidade (SHARP; LA REGINA, 1998; LANGAN et al., 2000; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007). Nos ratos do VPT, foram observados sete (2,56%) animais magros, na faixa etária dos 12 aos 18 meses, que apresentavam pulmão bastante comprometido, corroborando a literatura quanto à ausência de demais sinais clínicos, para além dos inespecíficos.

As lesões anatomopatológicas observadas no sistema respiratório nas diferentes faixas etárias foram caracterizadas por serem progressivas e crônicas, como é descrito nos casos de micoplasmose complicada ou não por agentes associados. Inicialmente, na Micoplasmose Respiratória Murina (MRM) são observadas macroscopicamente pequenas zonas vermelhas escuras ou acinzentadas multifocais no pulmão que, com a progressão da doença alastram, até ocuparem todo o lobo pulmonar, concomitantemente com presença de consolidação dos pulmões e de exsudado muco-purulento (BAKER, 1998; NICKLAS, 1999; LANGAN et al., 2000; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007). A fase final da lesão se caracteriza por pulmão com superfície irregular, similar a uma calçada devido ao elevado grau de bronquiectasia e ao grave comprometimento pulmonar por processo supurativo (SHARP; LA REGINA, 1998; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007). Os abscessos bronquiolares presentes, de coloração amarelada variam de tamanho de apenas poucos milímetros a cerca de 1 centímetro e coalescendo, circundados por zonas escuras, de pulmão consolidado (WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007). As alterações macro e microscópicas descritas por esses autores quanto a fase final da doença, é similar à descrita por nós nos ratos na faixa etária de 12 a 18 meses e considerada aqui por grau III.

Na cavidade nasal e traqueia pode existir secreção serosa a purulenta, mas nem sempre é possível identificá-la macroscopicamente (SHARP; LA REGINA, 1998; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007), como verificado também por nós no exame necroscópico dos ratos analisados e caracterizados por rinite e traqueíte na histopatologia.

Destacamos que todas as lesões descritas pelos diferentes autores foram também observadas por nós, porém estes autores não realizaram análise sistemática por segmento ou faixa etária dificultando a discussão e comparação com os nossos resultados. Estas alterações incluem infiltrado de neutrófilos e linfócitos na lâmina própria da submucosa do sistema respiratório (DAVIS; CASSEL, 1982; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007), exsudação de neutrófilos para o lúmen bronquilar e brônquico,

hiperplasia do epitélio respiratório e hiperplasia do tecido linfoide na lâmina própria da submucosa (NRC, 1991; SHARP; LA REGINA, 1998; LANGAN et al., 2000), metaplasia do epitélio respiratório para cuboide ou escamoso, hiperplasia das células caliciformes (PERCY; BARTHOLD, 2007) e ectasia das glândulas da submucosa com neutrófilos no seu lúmen (DAVIS; CASSEL, 1982).

A primeira lesão histopatológica observada no pulmão e muito característica de MRM é a hiperplasia de BAL, devido à ação mitogênica deste agente sobre os linfócitos do rato (DAVIS; CASSEL, 1982; DAVIS et al., 1982; NRC, 1991; BAKER, 1998; SHARP; LA REGINA, 1998; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006). Outra lesão observada na fase precoce da doença é a presença de infiltrado linfocítico peribrônquico, peribronquiolar e perivascular (PERCY; BARTHOLD, 2007). Tal como observado nos animais do biotério do VPT, em que ambas as alterações surgiram nos pulmões dos animais com 12 semanas de idade, consideradas na fase inicial da lesão de Grau I.

Tendo em conta que os ratos só possuem cartilagem nos brônquios primários, a bronquite e bronquiolite crônicas presentes nesta lesão, com o acúmulo de leucócitos nos lúmens, e a estase ciliar provocada pelo agente, resultam no enfraquecimento das suas paredes, o que conduz a bronquiectasia e bronquiolectasia, podendo até causar a ruptura destes. As células epiteliais brônquicas e bronquiolares, por vezes sofrem hiperplasia e/ou metaplasia para células cuboides ou escamosas (WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007). É possível observar, ainda, hipertrofia das glândulas secretoras de muco e presença de fibrose peribronquiolar (WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006). Quanto aos alvéolos, podem apresentar macrófagos, neutrófilos e muco, presença de enfisema e, nos seus septos pode haver infiltrado linfocítico. A grande quantidade de infiltrado presente nas lesões por este agente se deve ao estímulo antigênico e à resposta imune exagerada do hospedeiro (PERCY; BARTHOLD, 2007).

Tal como referido, as lesões causadas por *Mycoplasma pulmonis* aqui descritas foram observadas no nosso estudo, variando, no entanto, quanto ao seu grau de desenvolvimento e à frequência de ocorrência, consoante a idade do animal avaliado e o segmento do trato respiratório envolvido.

Ao analisar os dados relativos à avaliação anatomopatológica dos animais, podemos verificar que as lesões surgiram nas cavidades nasais, em animais na faixa etária das 4 semanas de idade, em que 12 dos 16 (75%) dos animais apresentavam lesão de Grau I ou inicial e que um (6,25%) dos animais já apresentava lesão de Grau II. Esta frequência de ocorrência de lesão, assim como o grau de lesão aumentaram progressivamente com o

avancar da idade e, nos animais da faixa etária dos 12 aos 18 meses, todos eles apresentaram lesões, em que apenas cinco dos animais em 30 (16,67%) apresentavam lesões de Grau I, 10 (33,33%) de Grau II e 15 (50%) de Grau III.

Na orofaringe, laringe e traqueia os resultados foram similares, surgindo as lesões na faixa etária das 4 semanas, mas apenas de Grau I e com uma menor frequência de ocorrência, em 8 dos 16 animais (50%). As lesões foram aumentando de gravidade e de frequência de ocorrência com a idade e, novamente nos animais da faixa etária dos 12 aos 18 meses, todos eles apresentavam lesão, em que 11 dos 30 ratos (36,67%) apresentavam alterações de Grau I, 12 (40%) de Grau II e 7 (23,33%) de Grau III.

Quanto ao pulmão, as primeiras lesões foram observadas mais tarde, nas 12 semanas de idade. Quinze dos 30 animais (50%) apresentavam lesão de Grau I e 12 (40%) de Grau II e, na faixa etária dos 12 aos 18 meses, todos os animais apresentavam lesão, em que em 20 dos 30 (66,67%) foram observadas alterações de Grau I e, nos restantes 10 animais (33,33%) de Grau III.

Resultados similares de progressão da lesão de uma forma descendente ao longo do trato respiratório e da menor frequência de ocorrência da lesão em pulmão relativamente ao trato respiratório superior, foram já publicados em outras linhagens de ratos, no entanto estavam presentes outros cofatores, nomeadamente vírus como o Sendai e o Sialodacrioadenite e bactérias oportunistas. Não foram verificadas e/ou não estudadas de forma minuciosa as lesões anatomopatológicas observadas especificamente em cada segmento do trato respiratório em cada uma das faixas etárias, nem como ocorre a progressão da doença/grau da lesão ou o seu aumento de frequência de ocorrência, com o decorrer da idade, tal como nós descrevemos (LINDSEY et al., 1971; DAVIDSON et al., 1981; LINDSEY et al., 1985). Estas lesões, suas frequências de ocorrência e graus de lesão, podem, no entanto, ter sofrido influência pela presença concomitante do *M. pulmonis* com os CARB e amônia.

Uma vez que há limitações para o diagnóstico de micoplasma apenas por sorologia, quer pela reação cruzada com o *M. arthritis* quer pela sua soroconversão tardia de até 4 ou 5 meses pós exposição, é importante realizar outros meios complementares de diagnóstico, como biologia molecular (SCHOEB et al., 1997; SHARP; LA REGINA, 1998; PERCY; BARTHOLD, 2007), tal como realizado no nosso estudo. As técnicas de culturas bacterianas clássicas também falham na detecção desta bactéria, por ser um agente fastidioso (LANGAN et al., 2000; PERCY; BARTHOLD, 2007; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; MÄHLER et al., 2014), comprovando o fato de apesar da grande frequência de ocorrência nesta colônia, não se ter observado crescimento no exame bacteriológico de orofaringe e de lavado

traqueobrônquico.

Considerando que todos os animais apresentaram sorologia positiva para este agente, um dos motivos que poderá explicar a positividade em 72% dos animais pela biologia molecular, pode ser devido a colonização pelo *Mycoplasma pulmonis* apenas das vias aéreas superiores suficiente para soroconverter e ser negativo na análise dos fragmentos pulmonares. Nesta hipótese, as lesões pulmonares dos animais com PCR negativa, poderiam dever-se à presença dos CARB, visto que as alterações por estas são similares às observadas pela infecção exclusivamente por *M. pulmonis*, não sendo possível distingui-las ao exame anatomopatológico (SHOEB; LINDSEY, 1996).

Para além de afetar o sistema respiratório como referido, o *Mycoplasma pulmonis* é ainda um agente que causa interferência nas pesquisas de várias formas, quer pela alteração da fisiologia, modificação da resposta imunológica tornando-os mais susceptíveis a outros agentes, diminuiu a média de vida, provoca alterações no trato respiratório, causa infertilidade em ratos e é um frequente contaminante de culturas celulares e de imunoensaios *in vitro* (BAKER, 1998; NICKLAS, 1999; PERCY; BARTHOLD, 2007). Assim, este agente é altamente indesejável em colônias de experimentação animal.

Acrescenta-se outro motivo que reforça, ainda, o potencial impacto negativo deste agente, em que Ferreira et al. (2008), demonstraram que o *M. pulmonis*, apesar de se acreditar, até ao momento, ser espécie-específico, colonizou a orofaringe de humanos que mantinham contato com ratos positivos para o agente. Estes, no entanto, não apresentaram sinais clínicos de doença. Sendo assim, pelo perigo que representa, quer pela interferência em pesquisa, como patogênico em animais e potencialmente também para os humanos, é um agente que deverá ser eliminado das colônias. Neste contexto, as únicas formas eficazes de o erradicar são a eliminação de todos os animais infetados ou através de transferência embrionária ou rederivação cesariana, com o cuidado de testar para *M. pulmonis* o útero e ovidutos das doadoras e proles por PCR ou cultura microbiológica apropriada (LANGAN et al., 2000; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; KOOLHAAS, 2010).

As lesões histopatológicas observadas nestes animais como rinite, laringite, traqueíte e no pulmão hiperplasia de BALT, bronquite supurativa, bronquiectasia com formação de abscessos pulmonares e alveolite são consideradas características deste agente e, principalmente agravadas pela presença de cofatores, tal como os CARB, que se encontram também nesta colônia (NRC, 1991; BAKER, 1998; PERCY; BARTHOLD, 2007).

Os bacilos associados ao epitélio respiratório ciliado (CARB) são agentes que foram identificado por van Zwieten em 1980. Estas bactérias são patogênicas em ratos de laboratório

e de vida livre e, de uma forma menos marcante, em camundongos e coelhos (BAKER; 1998; MÄHLER et al., 2014). Em ratos, esta bactéria pode provocar doença subclínica ou de gravidade variável consoante a qualidade do isolado, idade do hospedeiro e efeito simbiótico de outros cofatores (WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006). É caracterizada como uma doença respiratória crônica na maioria dos casos, com lesões muito similares às observadas na MRM (NRC; 1991; BAKER, 1998; LANGAN et al., 2000), demonstrando também progressão das lesões de forma descendente ao longo do trato respiratório. Também é possível a sua identificação na nasofaringe em ratos com cerca de 3 semanas de idade e, nas 5 semanas de idade, na traqueia e pulmão (FRANKLIN et al., 1999).

Os cofatores que têm contribuído para doença multifatorial simultaneamente com os CARB são o *Mycoplasma pulmonis*, outras bactérias oportunistas e vírus, como o Sendai e da Sialodacrioadenite (GANAWAY et al., 1985; SCHOEB; LINDSEY, 1996; BAKER, 1998; PERCY; BARTHOLD, 2007; MÄHLER et al., 2014). Contudo, podem, também, ser considerados agente primário de infecção (SCHOEB; LINDSEY, 1996; BAKER, 1998; LANGAN et al., 2000; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006; PERCY; BARTHOLD, 2007).

Analisando os ratos do VPT, todos os animais testados apresentaram positividade simultânea de anticorpos para *Mycoplasma pulmonis* e para CARB, o que demonstra de forma clara, a coinfeção por estes dois agentes, que atuam por simbiose e exacerbam as lesões (GANAWAY et al., 1985; BAKER; 1998; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006). Neste sentido, como as lesões afetam os mesmos tecidos e são similares, só é possível a análise anatomopatológica conjunta (SCHOEB; LINDSEY, 1996).

A transmissão dos CARB ocorre principalmente por contato direto (BAKER; 1998; WEISBROTH; KOHN; BOOT; 2006), nomeadamente de progenitoras infectadas, para os filhotes com 1 a 2 semanas de vida (GANAWAY et al., 1985; PERCY; BARTHOLD, 2007) ou através de fômites (WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006), corroborando a elevada frequência de ocorrência observada nos ratos desta colônia.

A melhor idade para realização da sorologia é entre as 10 e as 14 semanas de vida, para que decorra o tempo necessário para soroconversão dos animais (FRANKLIN et al., 1999; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006), sendo que a idade dos animais por nós testados, com 12 semanas de idade, foi adequada. Outra forma de diagnóstico que não foi realizada, motivo pelo qual não observamos estas bactérias durante a análise histopatológica, é a realização de coloração histoquímica à base de prata, como a Warthin-Starry ou a coloração de Steiner modificada (SCHOEB; LINDSEY, 1996; FRANKLIN et al., 1999; LANGAN et al., 2000; PERCY; BARTHOLD, 2007).

Os CARB podem, comprometer pesquisas que estudem o trato respiratório e também contribuem para maior morbidade e mortalidade em animais com MRM (NRC, 1991; BAKER, 1998). A sua eliminação da colônia é, então de grande importância pelos motivos anteriormente apresentados e, poderá ser realizada por rederivação cesariana (NRC, 1991).

No estudo de Pritchett-Corning, Consentino e Clifford (2009), a prevalência determinada para a presença destas bactérias foi de 4,63% na Europa e de 0,27% na América do Norte e, em outro estudo de Easterbrook et al. (2008) que testou a população de ratos silvestres na Califórnia, Estados Unidos, observaram elevada prevalência de 52,1%. Ambos os estudos também detectaram prevalência de *Mycoplasma pulmonis* com valores próximos dos observados nos CARB, tendo sido de 0.16% nos Estados Unidos e de 2.57% na Europa e, no estudo da Califórnia de 72,9%. As prevalências dos CARB e do *Mycoplasma pulmonis* muito próximas, estão de acordo com os obtidos neste estudo, em que ambas foram 100%.

Outro fator que atua em sinergia com o *M. pulmonis* é a amônia presente no microambiente, que resulta da degradação da ureia por bactérias urease-positivas na presença de umidade excessiva nas camas, e é irritante e prejudicial ao animal (BRODERSON; LINDSEY; CRAWFORD, 1976; PINSON et al., 1986; SHARP; LA REGINA, 1996; KOOLHAAS, 2010).

As lesões descritas na situação de exposição unicamente à amônia são moderadas e degenerativas, não inflamatórias e estão presentes essencialmente na cavidade nasal (PINSON et al., 1986). A exacerbação das lesões de *Mycoplasma pulmonis* causadas pela presença de amônia, podem ocorrer em todo o sistema respiratório, no entanto, uma vez que a amônia é absorvida na cavidade nasal, esta sinergia ocorre indiretamente, pela facilitação que a amônia promove ao *M. pulmonis*, favorecendo um maior e mais rápido crescimento das colônias nesta zona, que depois infectam de forma descendente o restante do trato respiratório (SCHOEB; DAVIDSON; LINDSEY, 1982; PINSON et al., 1986; WEISBROTH; KOHN; BOOT, 2006). Ocorre maior frequência de doença clínica respiratória e de graus acentuados nos animais expostos a elevados níveis de amônia e estas lesões são tidas como dose-dependentes (BRODERSON; LINDSEY; CRAWFORD, 1976). Pinson et al. (1986) compararam a resposta de ratos infectados com *Mycoplasma pulmonis* versus ratos infetados e expostos à amônia e observaram lesões inflamatórias moderadas nos animais infetados e, após 9 dias de exposição à amônia, as lesões foram principalmente degenerativas e mais marcantes com presença de inflamação, hiperplasia e metaplasia distribuídas ao longo do sistema respiratório.

A percepção olfativa da amônia é um sinal de que esta se encontra em excesso no ambiente do biotério, e nestas situações é indicado aumentar a frequência de troca das camas

ou reduzir o número de animais, uma vez que a circulação superior a 20 trocas por hora é prejudicial aos ratos (KOOLHAAS, 2010). O valor máximo da amônia recomendado é de 25 ppm na gaiola (PERCY; BARTHOLD, 2007). No biotério do VPT, entretanto, o cheiro da amônia é geralmente facilmente detectado pelos usuários, demonstrando que provavelmente se encontra acima desse valor, apesar de não ter sido realizada a medição da sua concentração e essa ser uma falha no nosso estudo.

Para além da determinação dos agentes presentes no ambiente do biotério, nos próprios animais e das lesões anatomopatológicas provocadas por agentes e gases irritantes, é ainda de salientar que os animais têm particularidades, assim como também apresentam alterações recorrentes provocadas pela forma de eutanásia, denominadas de lesões de base, e que deverão ser levadas em conta, para tornar possível a diferenciação entre estas lesões e as realmente causadas por agentes exógenos.

As lesões de base são definidas como uma variação individual dentro de um certo intervalo de referência. Elas são usualmente de origem congênita ou hereditária, sendo características da histologia da espécie, linhagem e incluem também alterações devido ao envelhecimento, algumas lesões degenerativas e outras devidas à própria eutanásia (SHACKELFORD et al., 2002; MCINNES, 2012).

As lesões de base observadas nestes animais foram as inclusões eosinofílicas no epitélio na cavidade nasal a partir das 8 semanas de idade e no epitélio da orofaringe, laringe e traqueia a partir das 12 semanas de idade. Esta lesão corresponde a alteração frequentemente descrita nos ratos e, o número destas inclusões aumenta com a decorrer da idade, sendo tida por resposta do hospedeiro não específica a um agente irritante (MONTICELLO; MORGAN; URAIH, 1990; RENNE et al., 2009; MCINNES, 2012; SAHOTA et al., 2013), como a presença de amônia. Estas inclusões são compostas por material amorfo e floculento, que permanece no interior de vacúolos intracitoplasmáticos (RENNE et al., 2009; MCINNES, 2012; SAHOTA et al., 2013).

Na orofaringe, laringe e traqueia, foi observada ectasia das glândulas da submucosa, com acúmulo de secreção no seu interior em animais a partir das 8 semanas. O seu significado é desconhecido, no entanto ocorre de forma espontânea (RENNE et al., 2009; MCINNES, 2012).

Quanto à ossificação dos anéis traqueais, observada também a partir das 8 semanas de idade nos animais deste estudo, é uma alteração que ocorre de forma espontânea e decorrente da idade (MCINNES, 2012).

Em pulmão, a presença de hemorragia, congestão e edema foi observada a partir das 4

semanas de idade, devido à forma de eutanásia dos animais, pois foi utilizada câmara de CO₂ (FAWELL; THOMSON; COOKE, 1972; CONLEE et al., 2005; RENNE et al., 2009). A congestão é devida provavelmente à morte agônica (RENNE et al., 2009) e a variação individual é praticamente nula (FAWELL; THOMSON; COOKE, 1972). O grau de hemorragia perivascular e alveolar aumenta com a concentração de CO₂ a que o animal é exposto (FAWELL; THOMSON; COOKE, 1972; CONLEE et al., 2005; RENNE et al., 2009; SAHOTA et al., 2013) ou segundo outros estudos, aumenta sim, devido a um maior tempo de exposição ao gás (FAWELL; THOMSON; COOKE, 1972; CONLEE et al., 2005). Quanto ao edema perivascular, o mecanismo não é completamente conhecido, mas se acredita que seja devido à acidose terminal (FAWELL; THOMSON; COOKE, 1972).

A presença de infiltrado inflamatório discreto eosinofílico perivascular e mononuclear subpleural, também presentes nos animais desde as 4 semanas de idade, são ambos considerados achados espontâneos e encontrados mesmo em animais jovens (MCINNES, 2012; SAHOTA et al., 2013).

A partir das 8 semanas foi verificada a presença de pigmentos acastanhados no interior dos macrófagos e ectasia acinar alveolar. A maioria destes pigmentos acastanhados presentes no interior dos macrófagos é hemossiderina e aumenta com o avançar da idade. Pode ocorrer lipofuscinose e antracose (RENNE et al., 2009; MCINNES, 2012). A ectasia dos alvéolos subpleural é considerada lesão de base, pois não ocorre destruição das paredes alveolares, distinguindo-a desta forma de enfisema; pensa-se que ocorra devido a uma remodelação do pulmão decorrente da idade (RENNE et al., 2009; MCINNES, 2012).

Nos animais a partir das 12 semanas foram observados agregados de macrófagos com citoplasma abundante e espumoso (histiocitose alveolar), que se acumulam principalmente na zona subpleural. Esta alteração ocorre com frequência nestes animais de forma espontânea, também com o avançar da idade (RENNE et al., 2009; MCINNES, 2012) e poderá dever-se a resposta inflamatória a estímulo infeccioso já resolvido (MCINNES, 2012).

Desta forma e como referido, todos os agentes isolados poderão interferir nos resultados das pesquisas de diversas formas e em maior ou menor grau, no entanto, deve dar-se especial relevância às lesões anatomopatológicas do sistema respiratório observadas, associadas à presença do *Mycoplasma pulmonis*, CARB e também da amônia, sendo importante reforçar que sem dúvida estas causam impacto significativo nos experimentos e é importante que os pesquisadores as tenham em conta, quer no delineamento experimental, quer na interpretação dos resultados obtidos.

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto, concluímos que:

- 1 - A caracterização do estado geral dos ratos demonstrou homogeneidade por gênero e dentro de cada faixa etária para o peso e, condição corpórea boa ou regular em 94,14%, mostrando que a colônia apresenta ratos em condições similares a outros biotérios de criação convencional;
- 2 - As avaliações microbiológicas realizadas nas salas de ratos identificaram *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Aspegillus* spp. e *Penicillium* spp., os quais apresentam espécies na sua maioria não patogênicas, mas que poderão representar perigo de doença clínica em animais e seres humanos imunodeprimidos, na ausência do uso de equipamento de proteção individual e/ou quando presentes em grande quantidade no ambiente;
- 3 - O teste de sensibilidade a antimicrobianos mostrou susceptibilidade variável das bactérias isoladas no ambiente, sendo que as estirpes de *Staphylococcus* spp. também apresentaram resistência à meticilina. Este resultado reforça o potencial risco de doença e a importância da monitorização periódica das espécies de bactérias nos programas de controle sanitário de biotérios;
- 4 - Baseado no teste de sensibilidade a antimicrobianos, Doxicilina, Amoxicilina e Ácido Clavulânico, Cefalexina, Enrofloxacina, Sulfatrimetoprim, Cloranfenicol, Gentamicina e Ciprofloxacina são antimicrobianos eficazes em infecções por *Staphylococcus* spp. e Vancomicina, Enrofloxacina e Sulfatrimetoprim, Cloranfenicol e Ciprofloxacina em infecções por *Bacillus* spp.. Assim, em caso de doença clínica por estas bactérias no biotério estes antimicrobianos são os mais indicados para o tratamento;
- 5 - As bactérias patogênicas identificadas na colônia foram CARB, 100% pela sorologia, e *Mycoplasma pulmonis*, 100% e 72%, pela sorologia e biologia molecular, respectivamente, sendo agentes que interferem sistemicamente na saúde dos ratos e, portanto, reduzem a adequação destes como modelo biológico e prejudicam a interpretação dos resultados experimentais;
- 6 - O não isolamento de bactérias patogênicas pelas técnicas de cultura bacteriológica clássica nos animais e a identificação sorológica e por biologia molecular de bactérias patogênicas, como CARB e *Mycoplasma pulmonis*, reforçam a importância da utilização de diferentes amostras e técnicas no programa de monitorização de biotério;

7 - A frequência de ocorrência de anticorpos para Reovírus tipo III foi 35% na população de ratos. Embora os animais sejam assintomáticos, este resultado reforça a importância da monitorização periódica dos agentes virais no biotério, por ser um potencial fator de interferência nos experimentos;

8 - A colônia de ratos não apresenta infestação por ectoparasitos e por parasitos das vias urinárias, mostrando que as barreiras sanitárias para tais agentes estão adequadas;

9 - Os endoparasitos diagnosticados foram *Syphacia muris* (91,67%), *Eimeria* spp. (3,33%) e *Entamoeba muris* (1,67%) sem considerar a faixa etária analisada. A presença de endoparasitos, mesmo na ausência de sinais clínicos, deve ser levada em consideração no delineamento e interpretação dos resultados experimentais;

10 - As alterações anatomopatológicas do sistema respiratório sejam de base ou aquelas associadas a agentes infecciosos ou gases irritantes estavam presentes em todos os segmentos analisados, porém em variável grau de progressão e frequência de ocorrência, nas diferentes faixas etárias. Assim, o conhecimento dessas lesões em cada faixa etária irá auxiliar os pesquisadores no emprego do modelo biológico e na obtenção de dados precisos e reprodutíveis.

Por fim, a caracterização do estado sanitário dos ratos permite conhecer as particularidades do modelo biológico utilizado e compor base de dados para auxiliar no desenho e na interpretação experimental dos pesquisadores, além de garantir uma base para o programa de monitorização sanitária de biotérios em condições similares.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 387 p.

BAIALARDI, C. E. G. **Avaliação de padrões morfológicos e funcionais do epitélio respiratório superior de ratos (*Rattus norvegicus*) mantidos em diferentes sistemas de ventilação**. 2003. 76 f. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2003.

BAKER, D. G. **Flynn's parasites of laboratory animals**. 2. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007.

BAKER, D. G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 231-266, Apr. 1998.

BAKER, D. G. Parasitic diseases. In SUCKOW, M.; WEISBROTH, S.; FRANKLIN, C. **The laboratory rat**, 2. ed. London: Elsevier, 2006. cap. 13, p. 454-478.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.

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

BONESSO, M. F.; MARQUES, S. A.; CUNHA, M. L. R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA): molecular background, virulence, and relevance for public health. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 378-386, 2011.

BORBA, C. M.; BORGES, C. C. A.; MOLINARO, E. M.; MAJEROWICZ, J.; NOGUEIRA, J. M. R.; MACHADO, M. P.; COSTA, M. A. F.; OLIVEIRA, M. B. S. C.; PEREIRA, M. E. C.; MURITO, M. M. C.; CARVALHO, P. R.; MANSO, P. P. A.; COUTO, S. E. R.; MOREIRA, S. V.; RAMOS, S.; MOREIRA, W. C.; FINETE, V. L. M. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2009. 290 p.

BRODERSON, J. R.; LINDSEY, J. R.; CRAWFORD, J. E. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. **American Journal of Pathology**, v. 85, n. 1, p. 115-130, Oct. 1976.

CHARLES RIVER. **Serologic methods manual**. 2011. Disponível em: <http://www.criver.com/files/pdfs/research-models/rm_ld_r_serologic_methods_manual.aspx>. Acesso em: 3 Mar. 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal**. 3 ed. Pennsylvania: CLSI, 2008. v. 28, n. 8. (CLSI document M31-A3).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal**. 4 ed. Wayne, PA: CLSI, 2013. v. 33, n. 4. (CLSI document VET01-A4).

COMISSÃO DE ÉTICA, BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL (CFMV). **Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais: conceitos e procedimentos recomendados**. Brasília: Josemar Aragão/ASCOM/CFMV, 2013. 35 p.

CONLEE, K. M.; STEPHENS, M. L.; ROWAN, A. N.; KING, L. A. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. **Laboratory Animals**, v. 39, n. 2, p. 137-161, Apr. 2005.

DAVIDSON, M. K.; LINDSEY, J. R.; BROWN, M. B.; SCHOEB, T. R.; CASSELL, G. H. Comparison of methods for detection of *Mycoplasma pulmonis* in experimental and naturally infected rats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 646-655, Dec. 1981.

DAVIS, J. K.; CASSELL, G. H. Murine respiratory mycoplasmosis in LEW and F344 rats: strain differences in lesion severity. **Veterinary Pathology**, v. 19, n. 3, p. 280-293, May 1982.

DAVIS, J. K.; THORP, R. B.; MADDOX, P. A.; BROWN, M. B.; CASSELL, G. H. Murine Respiratory mycoplasmosis in F344 and LEW Rats: evolution of lesions and lung lymphoid cell populations. **Infection and Immunity**, v. 36, n. 2, p. 720-729, May 1982.

DE LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; DE SOUZA, N. L.; MERUSSE, J. L. B.; NEVES, S. P. Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: Winner Graph, 1996. 259 p.

DESJARDINS, D. R.; KENNEDY, L. H.; AGNEW, D. W. Pathology in practice. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 2, p. 155-157, Jan. 2012.

DE SOUSA, J. E. N. **Avaliação parasitológica e sorológica de coinfeção por *Syphacia muris* e *Strongyloides venezuelensis***. 2014. 59 f. Dissertação (Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas, Uberlândia, 2014

DIRETORIA TÉCNICA DE APOIO AO ENSINO E PESQUISA (DTAEP). **ROE - Wistar**. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. [20-]. Disponível em: <http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17&pes_idade=sim> Acesso em: 6 de out. 2015.

DIX, J.; ASTILL, J.; WHELAN, G. Assessment of methods of destruction of *Syphacia muris* eggs. **Laboratory Animals**, v. 38, n. 1, p. 11-16, Jan. 2004.

DROBNIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, Oct. 1993.

ENGELKIRK, G. P.; DUBEN-ENGELKIRK, J. **Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic microbiology**. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2008.

FAWELL, J. K.; THOMPSON, C.; COOKE, L. Respiratory artefact produced by carbon dioxide and pentobarbitone sodium euthanasia in rats. **Laboratory Animals**, v. 6, n. 3, p. 321-326, Sep. 1972.

FERREIRA, J. B. **Detecção de *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritidis* no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FERREIRA, J. B.; YAMAGUTI, M.; MARQUES, L. M.; OLIVEIRA, R. C.; NETO, R. L.; BUZINHANI, M.; TIMENETSKY, J. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in laboratory rats and technicians. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 5, p. 229-234, Jun. 2008.

FISCHER, G.; KUNSTYR, I. **Diagnostic microbiology for laboratory animals**: viruses, bacteria, chlamydia, fungi and parasites. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1992. 197 p.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anaesthesia**. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2009. 304 p.

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

FRANKLIN, C. L.; PLETZ, J. D.; RILEY, L. K., LIVINGSTON, B. A.; HOOK, R. R. J.; BESCH-WILLIFORD, C. L. Detection of cilia-associated respiratory (CAR) bacillus in nasal-swab specimens from infected rats by use of polymerase chain reaction. **Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 114-117, Feb. 1999.

GAILLARD, E. T.; CLIFFORD, C. B.; Common diseases. In: KRINKE, G. (Ed.). **The Handbook of experimental animal**: the laboratory rat. San Diego: Academic Press, 2000. p. 99-142.

GANAWAY, J. R.; SPENCER T. H.; MOORE, T. D.; ALLEN, A. M. Isolation, propagation, and characterization of a newly recognized pathogen, cilia-associated, respiratory bacillus of rats, an etiological agent of chronic respiratory disease. **Infection and Immunity**, v. 47, n. 2, p. 472-479, Feb. 1985.

GAUVIN, L.; BENNETT, S.; LIU, H.; HAKIMI, M.; SCHLOSSMACHER, M.; MAJITHIA, J.; BROWN, E. G. Respiratory infection of mice with mammalian reoviruses causes systemic infection with age and strain dependent pneumonia and encephalitis. **Virology Journal**, v. 10, n. 67, p. 1-14, Mar. 2013.

GILIOLI, R. **Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros**: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. 2003. 155 f. Tese (Doutor em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2003.

GILIOLI, R.; ANDRADE, L. A. G.; PASSOS, L. A. C.; SILVA, F. A.; RODRIGUES, D. M.; GUARALDO, A. M. A. Parasite survey in mouse and rat colonies on brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 33-37, Feb. 2000.

GREMA, H. A.; GEIDAM, Y. A.; GADZAMA, G. B.; AMEH, J. A.; SULEIMAN, A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a review. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2, p. 79-98, Jan. 2015.

JACOBY, R. O.; GAERTNER, D. Viral disease. In: SUCKOW, M.; WEISBROTH, S.; FRANKLIN, C. **The laboratory rat**, 2. ed. London: Elsevier, 2006. cap. 12, p. 423-451.

JOHNSON, M. **Laboratory mice and rats**. Princeton, United States, Oct. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.113>>. Acesso em: 13 jul. 2015.

KACEW, S.; FESTING, M. F. W. Role of rat strain in the differential sensitivity to pharmaceutical agents and naturally occurring substances. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 47, n. 1, p. 1-30, Jan. 1996.

KLEMENT, P.; AUGUSTINE, J. M.; DELANEY, K. H.; KLEMENT, G.; WEITZ, J. I. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. **Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 286-290, Jun. 1996.

KOHALE, K. N.; RAUT, C. G.; Sero-monitoring of common pathogens in various species of laboratory animals at the animal facilities of two research institutes. **Indian Journal of Comparative Microbiology Immunology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 2, p. 44-50, Jul. 2013.

KOOLHAAS, J. M. The laboratory rat. In: HUBRECHT, R.; KIRKWOOD, J. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**. 8 ed. Oxford: Willey-Blackwell, 2010. v. 2, p. 311- 326.

KREEGER-VAN-RIG, N. J. N. **The yeasts a taxonomic study**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984.

KREIER, J.P; BAKER, J. R. **Parasitic protozoa**. 2. ed. California: Academic Press, 1993. v. 4, 323 p.

LANGAN, G. P.; LOHMILLER, J. J.; SWING, S. P.; WARDRIP, C. L. Respiratory diseases of rodents and rabbits. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 30, n. 3, p. 1309-1335, Nov. 2000.

LINDSEY, J. R.; BAKER, H. J.; OVERCASH, R. G.; CASSELL, G. H.; HUNT, C. E. Murine chronic respiratory disease. Significance as a research complication and experimental production with *Mycoplasma pulmonis*. **American Journal of Pathology**, v. 64, n. 3, p. 675-708, Sep. 1971.

LINDSEY, J. R.; DAVIDSON, M. K.; SCHOEB, T. R.; CASSEL, G. H. *Mycoplasma pulmonis*-host relationships in a breeding colony of Sprague-Dawley rats with enzootic murine respiratory mycoplasmosis. **Laboratory Animal Science**, v. 35, n. 6, p. 597-608, Dec. 1985.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Science in Medicine**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, May 2003.

MÄHLER, M.; BERARD, M.; FEINSTEIN, R.; GALLAGHER, A.; ILLGEN-WILCKE, B.; PRITCHETT-CORNING, K.; RASPA, M. FELASA Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Laboratory Animals**, v. 48, n. 3, p. 178-192, 2014.

MÄHLER, M.; KOHL, W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in Western Europe. **Lab Animal**, v. 38, n. 5, p. 161-165, May. 2009.

MCINNIS, E. F. **Background lesions in laboratory animals**. London: Saunders, 2012. 256 p.

MEADE, T. M.; WATSON, J. Characterization of rat pinworm (*Syphacia muris*) epidemiology as a means to increase detection and elimination. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 661-667, Nov. 2014.

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

MONTICELLO, T. M.; MORGAN, K. T.; URAIH, L. Nonneoplastic nasal lesions in rats and mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 85, p. 249-274, Apr. 1990.

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

MORENO, A. M. **Enterite Proliferativa Suína: Aspectos Anatomopatológicos e Epidemiológicos**. 1999. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 1999.

MORIN, M. J.; WARNER, A.; FIELDS, B. N. Reovirus infection in rat lungs as a model to study the pathogenesis of viral pneumonia. **Journal of Virology**, v. 70, n. 1, p. 541-548, Jan. 1996.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology, 2003. 1773 p.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Basic Local Alignment Search Tool**. [20-]Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 8 de set. 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Infectious diseases of mice and rats**. Washington DC: National Academy Press, 1991. p. 397.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: Instituto de Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2013. Disponível em: < <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf> >. Acesso em: 6 de set. 2015.

NICKLAS, W.; HOMBERGER, F. R.; ILLGEN-WILCKE, B.; JACOBI, K.; KRAFT, V.; KUNSTYR, I.; MÄHLER, M.; MEYER, H.; POHLMAYE-ESCH, G.; Implications of infectious agents on results of animal experiments. **Laboratory Animals**, v. 33, n. 1, p. 139-187, 1999.

ØKSTAD, O. A.; KOLSTØ, A. B. Genomics of bacillus species. In: WIEDMANN, M.; ZHANG, W. **Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Springer, 2011. cap. 2, p. 29-53.

PAREDES, F. M. F.; YANAVILCA, R. A. M.; FERNÁNDEZ, A. L. R.; TARMEÑO, R. A. C. **Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón**. Lima: Centro Nacional de Productos Biológicos, Instituto Nacional de Salud, 2008. Disponível em: < http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATIO N.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2014.

PATRA, G.; AYUB ALI, M.; CHANU, KH.V.; LALSAMTHARA, J.; KATARIA, J .L.; HAZARIKA, S.; MALSAMKIMA, D.; RAVINDRAN, R.; INAOTOMBI DEVI, L. Molecular diagnosis of naturally infection with *Eimeria nieschulzi* in laboratory rats. **Research Journal of Parasitology**, v. 6, n. 1, p. 43-52, 2011.

PERCY, D. H.; BARTHOLD, S. W. **Pathology of laboratory rodents and rabbits**. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007.

PINSON, D. M.; SCHOEB, T. R.; LINDSEY, J. R.; DAVIS, J. K. Evaluation by scoring and computerized morphometry of lesions of early *Mycoplasma pulmonis* infection and ammonia exposure in F344/N rats. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 5, p. 550-555, Sep. 1986.

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

PRITCHETT-CORNING, K. R.; CHOU, S. T.; CONOUR, L. A.; ELDER, B. J. **Guidebook on mouse and rat colony management**. 2. ed. U.S.: Charles River, 2011.

PRITCHETT-CORNING, K. R.; COSENTINO, J.; CLIFFORD, C. B. Contemporary prevalence of the infectious agents in laboratory mice and rats. **Laboratory Animals**, v. 43, n. 2 p. 165-173, Apr. 2009.

PRITCHETT, K. R.; JOHNSTON, N. A. A. Review of treatments for the eradication of pinworm infections from laboratory rodent colonies. **Contemporary Topics In Laboratory Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 36-46, Mar. 2002.

PRITCHETT-CORNING, K. R.; SHEK, W. R.; HENDERSON, K. S.; CLIFFORD, C. B.; WARREN, S. K. **Companion Guide to Rodent Health Surveillance for Research Facilities**. 2. ed. U.S.: Charles River, 2010.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R.; **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mosby, 2004. 648 p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. São Paulo: Artmed, 2007. 512 p.

REHBINDER, C.; BANEUX, P.; FORBES, D.; HERCK, H. V.; NICKLAS, W.; RUGAYA, Z.; WINKLER, G. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig and rabbit experimental units. **Laboratory Animals**, v. 30, n. 3, p. 193-208, Jul. 1996.

REIS, S. R.; FRANCO, A. M. R. **Manual básico de Bioterismo**. Manaus: [s.n.], 2012. Disponível em: <https://www.inpa.gov.br/arquivos/livro_fronteiras>. Acesso em: 3 de ago. 2015.

RENNE, R.; BRIK, A.; HARKEMA, J.; HERBERT, R.; KITTEL, B.; LEWIS, D.; MARCH, T.; NAGANO, K.; PINO, M.; RITTINGHAUSEN, S.; ROSENBRUCH, M.; TELLIER, P.; WOHRMANN, T. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. **Toxicologic Pathology**, v. 37, n. 7, p. 5-73, Dez. 2009.

SAHOTA, P. S.; POPP, J. A.; HARDISTY, J. F.; GOPINATH, C. **Toxicology pathology: Nonclinical Safety Assessment**. Florida: CRC Press, 2013. 1015 p.

SANTOS, M. R. V.; SOUZA, V. H.; MENEZES, A. C.; BITENCURT, J. L.; REZENDE-NETO, J. M.; BARRETO, A. S.; CUNHA, F. A.; MARÇAL, R. M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L. J.; BARBOSA, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, p. 1-6, 2010.

SCAINI, C. J.; TRAVERSI, M. C. F.; RHEINGANTZ, M. G. T.; SIGNORINI, V. R. M.; TEIXEIRA, M. F. Helminths of Wistar rats of different age groups bred in conventional biotery. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 265-268, 2003.

SCHOEB, T. R.; DAVIDSON, M. K.; DAVIS, J. K. Pathogenicity of cilia-associated respiratory (CARB) bacillus isolates for F344, LEW, and SD rats. **Veterinary Pathology**, v. 34, n. 4, p. 263-270, Jul. 1997.

SCHOEB, T. R.; DAVIDSON, M. K.; LINDSEY, J. R. Intracage ammonia promotes growth of *Mycoplasma pulmonis* in the respiratory tract of rats. **Infection and Immunology**, v. 38, n.1, p. 212-217, Oct. 1982.

SCHOEB, T. R.; DYBVIG, K.; KEISLING, K. F.; DAVIDSON, M. K.; DAVIS, J. K. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in cilia-associated respiratory bacillus isolates and in respiratory tracts of rats by nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1667-1670, Jul. 1997.

SCHOEB, T. R.; LINDSEY, J. R. Cilia-associated respiratory bacillus infection, rat, mouse and rabbit. In: JONES, T. C.; DUNGWORTH, D. L.; MOHR, U. **Respiratory system**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. cap. 38, p. 325-331.

SCHOONDERMARK-VAN DE VEN, E. M. E.; PHILIPSE-BERGMANN, I. M. A.; VAN DER LOGT, J. T. M. Prevalence of naturally occurring viral infections, *Mycoplasma pulmonis* and *Clostridium piliforme* in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003. **Laboratory Animals**, v. 40, p. 137-143, Apr. 2006.

SENGUPTA; P. The laboratory rat: relating its age with human's. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 6, p. 624-630, Jun. 2013.

SHACKELFORD, C.; LONG, G.; WOLF, J.; OKERBERG, C.; HERBERT, R. Quantitative and qualitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 1, p. 93-96, Jan. 2002.

SHARP, P. E.; LA REGINA, M. C. **The laboratory rat**. Florida: CRC Press, 1998.

SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1208-1234.

SOUSA, J. E.; CARVALHO, E. F.; LEVENHAGEN, M. A.; CHAVES, L. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Diagnosis of the pinworm syphacia in the Wistar rat *Rattus norvegicus*. **Journal of Helminthology**, p. 1-4, Oct. 2014.

SRIKANTH, P.; SUDHARSANAM, S.; STEINBERG, R. Bio-aerosols in indoor environment: composition, health effects and analysis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 302-312, Oct. 2008.

STETZENBACH, L. D.; BUTTNER, M. P.; CRUZ, P. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 170-174, Jun. 2004.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct. 2011.

TIMENETSKY, J.; DE LUCA, R. R. Detection of *Mycoplasma pulmonis* from rats and mice of São Paulo, Brazil. **Laboratory Animal Science**, v. 48, p. 210-13, Apr. 1998.

TIMENETSKY, J.; SANTOS, L. M.; BUZINHANI, M.; METTIFOGO, E. Detection of multiple mycoplasma infections in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 907-914, Jul. 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

TUCKER, M. J. **Diseases of the Wistar rat**. London: Taylor & Francis, 2003.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

WAGGIE, K.; KAGLYAMA K.; ALLEN, A. M.; NOMURA, T. **Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals**. 2. ed. [S.l.]: Public Health Service, 1994. 206 p.

WARD, R. L.; MCNEAL, M. M.; FARONE, M. B.; FARONE, A. L. Reoviridae. In: FOX, J. G.; BARTHOLDM S. W.; DAVISSON, M. T.; NEWCOMER, C. E.; QUIMBY, F. W.; SMITH, A. L. **The mouse in biomedical research: diseases**. 2. ed. London: Academic Press, 2007. v. 2, cap. 9, p. 236-266.

WEISBROTH, S. H.; KOHN, F.; BOOT, R. Bacterial, mycoplasmal and mycotic infections. In: SUCKOW, M.; WEISBROTH, S.; FRANKLIN, C. **The laboratory rat**. 2. ed. London: Elsevier, 2006. cap. 11, p. 339-421.

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

ZENNER, L.; REGNAULT, J. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study. **Laboratory Animals**, v. 34, n. 1, p. 76-83, Jan. 2000.