

INSTITUTO METROPOLITANO DE ENSINO SUPERIOR
UNIÃO EDUCACIONAL DO VALE DO AÇO

Ana Louise de Araújo Lima
Bruna de Mattos Ivo Junqueira
Livia Maria de Araújo Lima
Jaqueline Melo Soares
Michelle Carvalho Maia

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA VERMIFUGAÇÃO EM
RATOS DO BIOTÉRIO DE UMA INSTITUIÇÃO PRIVADA DE
ENSINO

IPATINGA

2014

Ana Louise de Araújo Lima
Bruna de Mattos Ivo Junqueira
Lívia Maria de Araújo Lima
Jaqueline Melo Soares
Michelle Carvalho Maia

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA VERMIFUGAÇÃO EM
RATOS DO BIOTÉRIO DE UMA INSTITUIÇÃO PRIVADA DE
ENSINO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Metropolitano de Ensino Superior – IMES/Univaço, como requisito parcial para aprovação à graduação no curso de Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Michelle Carvalho Maia
Co-orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Melo Soares

IPATINGA

2014

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA VERMIFUGAÇÃO EM RATOS DO BIOTÉRIO DE UMA INSTITUIÇÃO PRIVADA DE ENSINO

Ana Louise de Araújo Lima ¹, Bruna de Mattos Ivo Junqueira ¹, Livia Maria de Araújo Lima ¹, Jaqueline Melo Soares ² & Michelle Carvalho Maia ³

- 1- Acadêmicas do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil.
- 2- Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil.
- 3- Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES – Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. Orientadora do TCC.

RESUMO

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

Palavras-chave: Animais de laboratório. Biotério. Controle sanitário. Parasitoses. *Entamoeba muris*.

Introdução

Biotério é o local próprio para o alojamento e a reprodução de animais destinados a servir como “reagentes biológicos” em diversos tipos de ensaios controlados, com o intuito de atender às necessidades dos programas de pesquisa, ensino, produção e controle de qualidade nas áreas biomédicas, além de ciências humanas e tecnológicas de acordo com a finalidade da instituição. Na prática, o biotério de experimentação deve ser próximo ao laboratório de pesquisa, pois os animais ficarão alojados durante um período experimental determinado, facilitando o manuseio e reduzindo o estresse dos mesmos (CARDOSO, 2001).

Animais de laboratório são adequados e necessários para um bom desenvolvimento de vários ensaios biológicos que visam a melhoria da qualidade de vida humana. A preferência pela espécie *Rattus norvegicus* em experimentos, deve-se ao conhecimento profundo de sua genética e a facilidade de manipulação, tendo seus ciclos de vida e reprodutivo curtos e dimensão corporal reduzida. A utilização destes animais propicia aos estudiosos a possibilidade de testar suas teorias e realizar suas pesquisas com prejuízos mínimos para os próprios animais e os seres humanos, uma vez que são seguidas regulamentações éticas para a sua utilização. Além disso, aprimoram-se técnicas de bioterismo para que se tenham condições adequadas e específicas de ambiente, alojamento, manuseio e controle, e prevenção de doenças e parasitoses (BAZZANO et al., 2002; DEGUCHI, 2013; CECÍLIO; DONATO, 2013; POLITI; PIETRO; SALGADO, 2008).

Raramente os animais de biotério são investigados quanto à presença de parasitoses e, segundo Bazzano et al. (2002) e Scaini et al. (2003), os cuidados com a condição sanitária dos animais de laboratório são indispensáveis para que não haja interferências nos resultados de pesquisas e em testes biológicos, além de garantir a segurança de técnicos e pesquisadores quanto ao risco de doenças ocupacionais no biotério. Por este motivo, é recomendado que animais alojados sejam vermifugados a cada seis meses. Segundo Minagawa (2007) e Politi, Pietro e Salgado (2008), deve-se garantir a integridade física dos animais, levando-se em consideração as contaminações microbiológicas, a genética, a nutrição e a correta manipulação, a fim de se evitar que ocorram conclusões inválidas nos experimentos ou que se utilize um grande número de animais desnecessariamente.

É fundamental que se tenha a definição do padrão microbiológico e parasitário dos animais presentes no biotério, para que haja controle das infecções e para que a prevenção se torne possível. Este fator é especialmente importante quando se necessita introduzir um novo animal, uma vez que este pode gerar uma epidemia no ambiente se não for devidamente examinado e aclimatado (POLITI; PIETRO; SALGADO, 2008).

Atualmente, os pesquisadores exigem que os animais reúnam condições ideais, isto é, que atendam aos parâmetros de qualidade genética e sanitária, uma vez que funcionam como “reagentes biológicos”, e os resultados dos experimentos são afetados em razão da qualidade de cada espécie utilizada. Para assegurar a produção de animais de laboratório com a qualidade que satisfaça os requisitos para o uso nas pesquisas médicas, são necessárias instalações apropriadas, equipamentos especializados e pessoal habilitado (CECÍLIO; DONATO, 2013).

Práticas adequadas de higiene ajudam a prevenir a transmissão de doenças infecciosas e manter a saúde dos animais e manipuladores, além de garantir o bem estar dos animais. Para o estabelecimento de procedimentos operacionais de higiene em um biotério deve-se levar em consideração a natureza dos agentes infecciosos, as prováveis vias de entrada desses agentes na área de criação, as maneiras de prevenir ou destruir os agentes na via de entrada e a validação dos métodos de higiene (CECÍLIO; DONATO, 2013; MINAGAWA, 2007).

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

Além dos endoparasitos, é importante ressaltar a possível presença de ectoparasitos, representados pelos piolhos, ácaros, carrapatos e pulgas, que também devem receber igual importância no que se refere aos cuidados com a saúde dos animais de experimentação, zelando pelo bem estar dos mesmos.

Não é conhecido na literatura um protocolo consagrado, que possa garantir a prevenção das infecções parasitárias, sendo assim, cada instituição implanta seu próprio protocolo, podendo este ter ou não a eficácia necessária.

No Biotério do Instituto Metropolitano de Ensino Superior (IMES), localizado na região Leste de Minas Gerais, os alunos realizam atividades de pesquisa de iniciação científica e trabalhos monográficos. O local possui ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar. Duas técnicas de laboratório e uma bioterista são responsáveis pela administração de todos os cuidados necessários.

Diante da importância em se saber quanto à saúde dos animais, o presente trabalho visou verificar a eficiência da vermifugação utilizada na rotina do Biotério do IMES através de uma análise parasitológica e definir o padrão de sanidade dos animais de experimentação, visando melhoria do bem-estar dos mesmos.

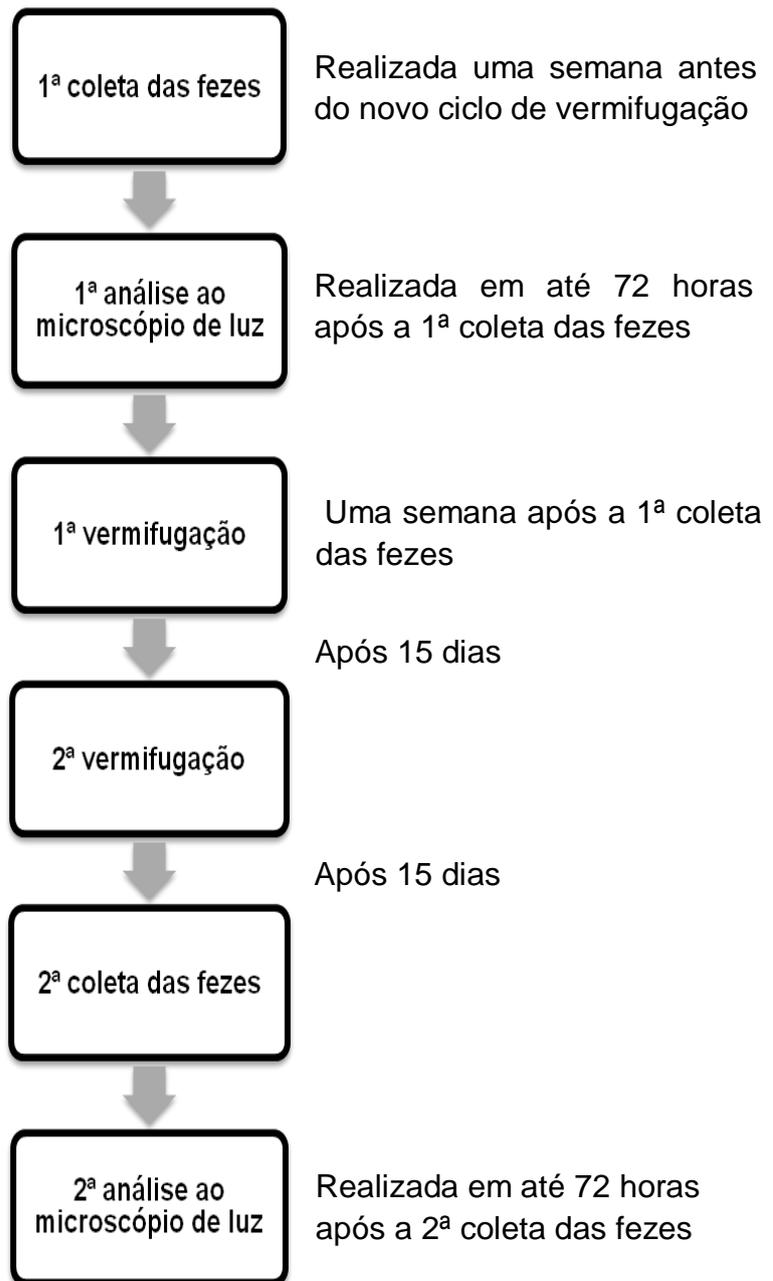
Métodos

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

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

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

A forma de administração do vermífugo empregada neste estudo é o protocolo utilizado pelo IMES, onde foi realizada a pesquisa. Semestralmente o mesmo é utilizado, visando à saúde dos animais de experimentação e dos profissionais que trabalham diretamente com os mesmos. Para a realização do trabalho utilizou-se o esquema abaixo:



A primeira amostra foi obtida seis meses após a vermifugação de rotina deste Biotério. As fezes foram coletadas diretamente das 23 caixas, antes da administração da primeira dose do vermífugo do ciclo seguinte. As coletas foram realizadas em três dias alternados para a obtenção de um resultado mais abrangente.

As fezes foram acondicionadas em frascos de coleta estéreis, contendo o líquido conservante Mertiolato-Formol, devidamente identificados com o número da caixa, sexo e data da coleta inicial e examinadas dentro de um prazo máximo de 72 horas.

As amostras fecais foram processadas através da técnica de concentração por centrífugo-sedimentação descrita por Ritchie (1948 apud ROCHA; MELLO, 2011), com algumas modificações. Foram confeccionadas para cada grupo de animais, alojados em uma caixa, três lâminas coradas com lugol e examinadas diretamente ao microscópio de luz com as objetivas de 10x e 40x, sendo realizada a análise qualitativa e quantitativa dos helmintos e protozoários encontrados. As análises foram feitas no Laboratório de Parasitologia do IMES com o auxílio de visualização de fotos disponíveis em artigos científicos (DOYLE et al. 2006; ALVES et al, 2007).

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

Essa pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética no uso de animais – CEUA do Instituto Metropolitano do Ensino Superior – IMES (número do protocolo: 05.002.12).

Resultados

Após análise ao microscópio de luz, constatou-se que das 23 amostras analisadas antes da vermifugação, em apenas uma foi encontrado o protozoário parasito da espécie *Entamoeba muris*, que representou uma prevalência de 4,34%. Uma nova análise foi realizada 15 dias após a administração do vermífugo Ivermectina a 1%, onde foi constatada a ausência de qualquer espécie de parasito (Gráfico 1).

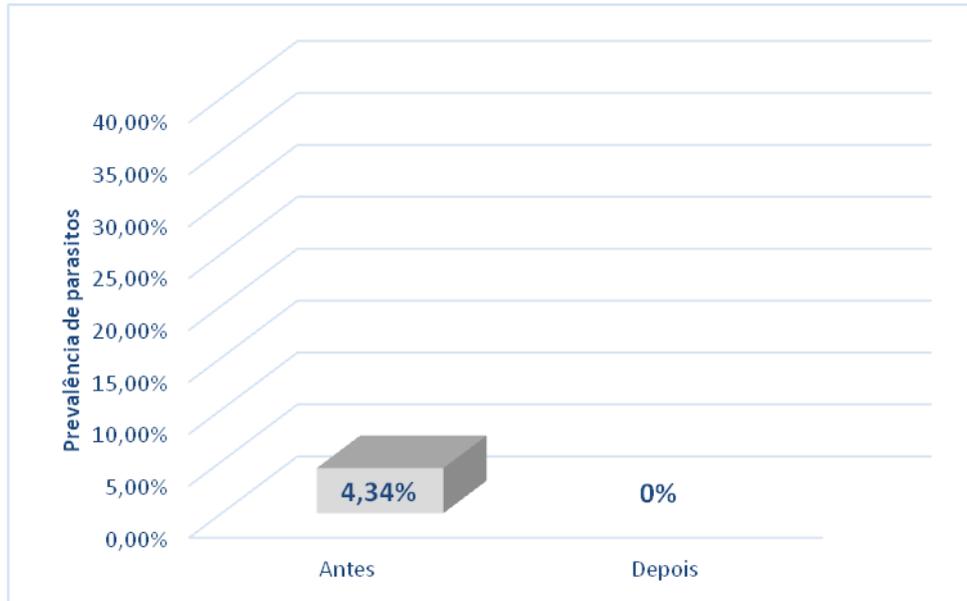


Gráfico 1: Prevalência de parasitos nas amostras analisadas antes e depois da vermifugação

Discussão

Nos resultados do presente estudo destaca-se a existência de regras higiênico-sanitárias adequadas e a eficiência do protocolo de vermifugação utilizado no biotério em questão. Esses parâmetros corroboram para que as interferências nos resultados experimentais e em testes biológicos sejam diluídas.

O *Entamoeba muris* é um protozoário pertencente à classe Sarcodina, família Entamoebidae. Considerado parasito não patogênico, não interfere na saúde dos roedores nem nos resultados de experimentos realizados. Reproduzem-se por divisão binária e sua transmissão ocorre por via fecal-oral. Os cistos são a forma infectante do parasito. Eles se transformam em trofozoíto no duodeno, que é a forma ativa do protozoário e colonizam o ceco e o cólon. Essa espécie apresenta uma morfologia idêntica à *Entamoeba coli* e tem sido descrita em diversos tipos de roedores (AHMED; KOYEE; RAHEMO, 2012; BICALHO et al., 2007; MARQUES, 2006; MARQUES; CRUZ, 2009; PONCE-GORDO; MARTÍNEZ-DÍAZ, 2010).

Mesmo sendo um micro-organismo não patogênico, a presença do *Entamoeba muris* evidencia que em algum momento o animal esteve em contato com fezes, uma vez que, como já foi citado, a transmissão deste parasito é por via fecal-oral. Este fato demonstra que pode ter havido uma falha no manejo dos

animais, podendo ser na higienização das caixas, da maravalha, no uso dos equipamentos de proteção individual ou em qualquer outra etapa do trato dos mesmos.

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

Quando as medidas de prevenção necessárias não são praticadas, os animais de laboratório, assim como todos que são mantidos em cativeiro, ficam mais suscetíveis às infecções parasitárias (MEDEIROS, 2012). Portanto, é fundamental o estudo do padrão microbiológico de cada animal presente no biotério com a finalidade de evitar doenças e alta mortalidade, os quais são responsáveis por aumento de custos e atraso nos experimentos (MINAGAWA, 2007).

A definição do padrão microbiológico é especialmente importante quando se necessita introduzir um novo animal no biotério, uma vez que este pode gerar uma epidemia no ambiente se não for devidamente examinado (MINAGAWA, 2007). Com relação ao cuidado do ambiente, é necessário que seja realizada a higienização das caixas com produto anti-séptico adequado, como álcool 70%, a troca da maravalha com frequência e que os dejetos dos animais recebam destinação adequada.

No presente estudo, as caixas dos animais são higienizadas com álcool 70%, a troca da maravalha é realizada três vezes na semana, com destinação própria. A qualidade do ar no biotério é garantida através do sistema de ventilação, com trocas completas a cada hora. A temperatura, umidade e ruídos são controlados conforme

o padrão sanitário. A entrada no biotério é controlada e o seu acesso é permitido mediante o uso de equipamentos de proteção individual, tais como máscara, luvas, gorro, propés e jaleco com uso exclusivo no Biotério, e na presença de um funcionário responsável, conforme orientado por Sirois (2007).

Além da alta mortalidade em animais jovens causadas por algumas infecções, parasitos podem complicar pesquisas através da indução de alterações fisiológicas e imunológicas nos hospedeiros, aumentando ou diminuindo a suscetibilidade do hospedeiro ao estresse experimental, induzindo danos teciduais, estimulando o crescimento de tecido anormal, competindo com o hospedeiro por nutrientes, diminuindo o volume de sangue e fluidos corporais do hospedeiro e por interferência mecânica (GILIOI et al., 2000).

A manutenção da boa condição de saúde dos animais reduz a taxa de interferência em resultados de pesquisas, além de garantir a segurança de técnicos e pesquisadores em relação às parasitoses (MINAGAWA, 2007). Por este motivo, o monitoramento sanitário e parasitológico do Biotério se faz necessário para a manutenção da saúde dos animais nele presentes. Além disso, a vermifugação dos mesmos a cada seis meses é necessária para que uma infestação do ambiente seja evitada. Desta forma, é possível zelar pela biossegurança e prevenir infecções.

Os resultados encontrados neste estudo já eram esperados, visto que em ambiente controlado é esperado uma taxa de infecção baixa, inclusive de parasitos, o que demonstra um bom controle sanitário dos animais utilizados na experimentação.

Conclusão

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

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

EFFICIENCY EVALUATION OF RAT WORMING IN A PRIVATE EDUCATIONAL INSTITUTION

BIOTERIUM

ABSTRACT

Introduction: Laboratory animals are appropriate and necessary for the development of biological studies, therefore it is essential to take care of the health conditions. The aim of this study was to verify the efficiency of worming used in the Bioterium of Instituto Metropolitano de Ensino Superior through a parasitological examination and set the standard of health of experimental animals.

Methods: An analysis of 23 stool samples from mice of the Bioterium of the species *Rattus norvegicus*, before and after the administration of the drug Ivermectin was performed. The stool samples were processed using the technique of concentration by centrifugation and analyzed by light microscopy. The process of worming occurred in two stages, with an interval of 15 days, in order to improve the effectiveness of the treatment.

Results: Before worming it was found the protozoan *Entamoeba muris* in only one sample (4.34%), however this species is considered a non-pathogenic micro-organism. 15 days after worming, a new analysis revealed the absence of any kind of parasite.

Conclusion: The worming protocol used was effective, however it is still necessary the maintenance and improvement of control measures that prevent increasing contamination by parasites and therefore, also prevent the interference in the results of the experimental procedures.

Keywords: Laboratory animals; Vivarium. Sanitary control. *Entamoeba muris*. Parasites.

Referências bibliográficas

- AHMED, R. K.; KOYEE, Q. M. K.; RAHEMO, Z. I. F. Intestinal Parasites of Experimental Rodents with Testing the Efficacy of Diagnostic Methods. *International Research Journal of Pharmaceuticals*, Curdistão Iraquiano, v. 2, n. 3, p. 77-81, 2012.
- ALVES, L. C. et al. Endoparasitos em Cobaias (*Cavia porcellus*) (Mammalia, Rodentia, Caviidae) Provenientes de Biotérios de Criação e Experimentação do Município do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1380-1386, 2007.
- BAZZANO, T. et al. Patterns of Infection with the Nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in Conventionally Maintained Laboratory Mice. *Memorial Institute Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 847-853, 2002.
- BICALHO, K. A. et al. Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I - Endo and ectoparasites. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1478-1484, 2007.
- CARDOSO, T. A. O. Considerações sobre a Biossegurança em Arquitetura de Biotérios. *Fundação Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 64, n. 67, p. 3-17, 1998-2001.
- CECÍLIO, A. B.; DONATO, E. C. P. Monitoramento Ambiental no Biotério. *RESBCAL*, São Paulo, v.2, n.1, p.31-48, 2013.
- DEGUCHI, G.G.F. Bem estar de animais de laboratório: questões relevantes ao refinamento. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- DOYLE, R. L. et al. Avaliação Helmintológica de Camundongos (*Mus Musculus*) Criados em Biotério Experimental. *Revista da FZVA*, Uruguaiana, v. 13, n. 2, p. 108-115, 2006.
- GILIOLI, R. et al. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 33-37, 2000.
- MARQUES, M. A. P. *Controle parasitológico*. Disponível em: <http://books.scielo.org>. Acessado em: 21/12/ 2013.

MARQUES, T.; CRUZ, R. J. Controle Parasitológico. In: LAPCHIK, V. V.; MATTARAIA, V. M.; KO, G. M. *Cuidados e Manejos de Animais de Laboratório*. 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2009, v. único, p. 337-357.

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

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

ROCHA, M. O.; MELLO, R. T. Exame Parasitológico de Fezes. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*. 12ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2011, v. único, p. 509-522.

POLITI, F. A. S.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Caracterização de Biotérios, Legislação e Padrões de Biossegurança. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Araraquara, v.único, n.1, p.17-28, 2008.

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

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

SIROIS, M. Ambiente de Pesquisa. In: SIROIS, M. *Medicina de Animais de Laboratório: princípios e procedimentos*. 1ª edição. São Paulo: Editora Roca, 2007, v. único, p. 29-54.