

Classificação dos animais de laboratório quanto ao *status* sanitário

Sebastião Enes Reis Couto

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao *Status* Sanitário

Sebastião Enes Reis Couto

INTRODUÇÃO

Quanto mais uniforme os animais utilizados na experimentação, menor será o número necessário para atingirmos o padrão de exatidão ou receptibilidade. Por isso, os pesquisadores estabeleceram os animais como um dos mais refinados componentes da experimentação.

Após vários anos de pesquisa, foram descobertas numerosas linhagens de animais consangüíneos e híbridos capazes de reduzir as variáveis causadas por diferenças genéticas e, mais recentemente, classificaram os animais quanto ao *status* sanitário ou ecológico, visando a prevenir erros induzidos por diferenças ambientais.

A classificação dos animais quanto ao *status* sanitário ou ecológico pode ser definida como a relação dos animais com o seu particular e específico ambiente. Este ambiente inclui os organismos associados aos animais e os organismos presentes dentro dos limites do ambiente físico e barreiras sanitárias. O conjunto de organismos associados é denominado microbiota (vírus, bactérias, fungos e parasitas), e quanto mais eficientes forem as barreiras sanitárias deste ambiente, menores as chances de contaminação dos animais.

A partir dessa definição, podemos classificá-los em três grupos distintos:

- Animais Gnotobióticos;
- Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos (*Specific Pathogen Free* – SPF);
- Animais Convencionais.

ANIMAIS GNOTOBIÓTICOS

GNOTOBIÓTICO – palavra de origem grega (*gnoto* = conhecer + *biota* = vida)

DEFINIÇÃO: são animais que possuem microbiota associada definida e devem ser criados em ambientes dotados de barreiras sanitárias absolutas. Outra definição comumente usada: são os animais que possuem flora microbiológica conhecida, não existente ou não detectável.

A produção de animais desse padrão sanitário somente é possível mediante sua manutenção em equipamentos especiais, como isoladores.

A evolução tecnológica dos isoladores permitiu o avanço da gnotobiologia, ciência que teve início com Pasteur, que questionava a sobrevivência de organismos superiores na ausência de bactérias. Nesse tipo de estudo, equipamentos como os isoladores são imprescindíveis. Diferentes materiais foram utilizados no desenvolvimento das primeiras unidades, que evoluíram para aço inox plástico rígido, acrílico, fibra de vidro etc. (Gustafsson, 1948). Porém, os isoladores rígidos apresentaram algumas dificuldades práticas e técnicas

(acomodação da pressão etc.). O sucesso definitivo no avanço tecnológico dos isoladores somente foi alcançado em 1957, quando Trexler e Reynolds desenvolveram o isolador flexível, mais adequado pela transparência, que permite a visão total de seu interior e pela flexibilidade, que facilita a sua manipulação. Esse novo modelo permitiu o uso mais extenso dos isoladores com aplicabilidade prática em diferentes áreas, como em laboratórios de pesquisa, biotérios e até na indústria.

O termo gnotobiótico (vida conhecida) pode ser utilizado tanto para animais livres de germes como para aqueles contaminados com um ou mais organismos detectáveis. Assim, em virtude da quantidade de microbiotas que estejam associados ao animal, este pode ser classificado como *germfree* (GF) ou Flora Definida (FD).

GERMFREE (GF)

DEFINIÇÃO: são animais totalmente livres de microbiota, isto é, isentos de quaisquer parasitas internos e externos, bactérias, fungos, protozoários, algas, rickettsia e vírus. Um termo similar usado neste contexto é animais axênicos (animais livres de vida associada).

Vários animais têm sido criados e mantidos livres de germes, tais como: ratos, camundongos, cobaias, coelhos, galinhas, porcos, peixes, macacos, carneiros e cães. Embora com alguns desses animais não se tenha obtido sucesso em sua reprodução no ambiente GF, os camundongos e ratos têm respondido muito bem.

OBTENÇÃO: o método primário de obtenção de animais GF, é por meio da intervenção cirúrgica (histerectomia estéril do útero gravídico) e sua subsequente introdução num isolador estéril. Os embriões em desenvolvimento são protegidos da contaminação pela barreira placentária, uma membrana semipermeável constituída de tecidos placentários que limita o tipo e a quantidade de material 'trocado' entre a mãe e os fetos no útero. Dentro desse ambiente protegido, os fetos são essencialmente descontaminados, mas, após o parto, são geralmente expostos a vários organismos. Para se obter camundongos GF, o problema está na preservação do estado virtual não-contaminado após a perda da proteção da barreira placentária.

Para que os recém-nascidos possam sobreviver, o útero deve ser removido da camundonga grávida (fêmea doadora) no período de 24 horas que antecede o parto. O período de gestação da camundonga varia em cada linhagem, mas geralmente seu limite fica entre 19 a 21 dias.

Após a morte da mãe doadora, mediante o deslocamento cervical, a parte ventral do abdômen é preparada para a cirurgia. Inicialmente, faz-se a tricotomia e, então, o corpo da fêmea é imerso numa solução esterilizante (à temperatura corporal de 36 °C a 37 °C). Coloca-se o animal em uma bancada e sobre o abdômen uma tira adesiva de plástico estéril. Uma incisão na linha média é feita através do plástico e da pele.

A seguir, abre-se a pele e o peritônio, expõe-se o útero e liga-se próximo aos ovários e na cérvix com fio cirúrgico ou com pinças hemostáticas, cortando-o em seguida. Liberado o útero, este deve ser colocado em um recipiente contendo solução esterilizante, com temperatura entre 36 °C a 37 °C, com o objetivo de proteger os filhotes em seu interior contra possível contaminação e choque térmico. Logo em seguida, transporta-se para o interior de um isolador o recipiente com o útero, através de um tanque de imersão com substância esterilizante, ou através do porto de passagem do isolador, utilizando substância esterilizante (ácido peracético), vaporizado com auxílio de um nebulizador acionado por corrente de ar comprimido.

Uma vez dentro do isolador, remove-se o útero gravídico do recipiente e, então, cuidadosamente, retiram-se os filhotes, limpando-os e ativando-lhes a circulação e a respiração, mantendo-os aquecidos e ligados à placenta por um pequeno período antes de removê-los para a gaiola da ama-de-leite.

Os recém-nascidos obtidos assepticamente nos isoladores estéreis têm a opção de usar uma ama-de-leite GF ou amamentação manual para mantê-los.

O parto da ama-de-leite deve ocorrer sempre um pouco antes da introdução do útero da fêmea doadora para assegurar aos recém-nascidos a alimentação, já que estará em plena lactação. É muito importante ter a certeza de que a ama-de-leite e os recém-nascidos não sejam perturbados por algumas horas, a fim de que sua adaptação seja facilitada. Para confundir o olfato da ama-de-leite, recomendamos o uso da própria 'cama' e/ou da urina sendo colocada sobre os recém-nascidos, compelindo-a a aceitá-los como seus próprios filhos.

Se não houver nenhuma ama-de-leite disponível, é necessário amamentar os recém-nascidos manualmente. Essa técnica é extremamente cansativa, trabalhosa e nem sempre bem-sucedida, tornando-se frustrante na maioria dos casos e sendo raramente utilizada.

A maioria das colônias de GF é obtida pelo método de ama-de-leite. Estas podem ser obtidas em criações comerciais e usadas para obtenção de GF e de outra classificação ecológica. O estado GF é o primeiro degrau para atingirmos os animais de Flora Definida e SPF.

Todo material (ração, água, cama, gaiolas etc.) a ser introduzido no isolador deve ser esterilizado, porém podem ocorrer falhas na operação e materiais não-estéreis que podem comprometer a qualidade dos animais.

O fato de que algumas bactérias e muitos vírus são difíceis de se cultivar ou detectar limita o grau ao qual o animal pode ser chamado de GF, assim como também os procedimentos operacionais para a obtenção desses animais não são infalíveis. Infelizmente, a barreira placentária não bloqueia toda contaminação. Alguns vírus, portanto, são conhecidos por transporem essa eficiente barreira. Um exemplo desse tipo de transmissão intra-uterina ou vertical é o vírus da Córion Meningite Linfocítica. Pollard (1966) indicou que os agentes da leucemia entraram na colônia pela barreira placentária ou pelo plasma seminal sem que tivessem certeza da rota.

Se animais GF podem ser obtidos de colônias existentes que tenham sido testadas e são reconhecidas como livres de agentes que possam ser transmitidos verticalmente, as chances serão maiores de se alcançar o verdadeiro estado GF. Em qualquer nível para a classificação desses animais, devemos testá-los para uma ampla variedade de microorganismos, uma vez que os animais GF não são antígenos *free*. Existem organismos mortos mais intactos nos alimentos e na 'cama', diretamente associados aos animais e que estão sujeitos a numerosas estimulações antigênicas.

UTILIZAÇÃO: apesar dessas limitações, informações suficientes foram utilizadas para fazer dos animais GF uma ferramenta adicional de pesquisa no estudo do câncer, da imunologia, das radiações, doenças entéricas, dentárias e nutricionais etc.

FLORA DEFINIDA (FD)

DEFINIÇÃO: são animais GF que foram intencionalmente contaminados com microorganismos ou parasitos específicos. São continuamente monitorados para constatar a presença dos organismos selecionados e a ausência de outros.

Também o termo monoxênico é usado quando o animal foi contaminado, deliberadamente, com apenas um tipo de microbiota, o que equivale a dizer que possui um microbiota associado. Dixênico é o termo designado ao animal contaminado, deliberadamente, com dois tipos de microbiota e polixênico é relativo ao animal contaminado, deliberadamente, com vários microbiotas.

OBTENÇÃO: o primeiro passo para a obtenção de animais de FD é obter-se animais GF, uma vez que esse estado é alcançado e confirmado por teste laboratorial. Qualquer número de microorganismos pré-selecionados pode ser administrado, de várias maneiras, aos animais. Um dos métodos adotados é a transferência dos animais GF do isolador para um equipamento de barreira restrita (outro isolador). Uma vez dentro desse equipamento, o animal GF pode ser alimentado com ração saturada com

microorganismos específicos. Os animais nascidos nesse ambiente são contaminados por microorganismos através da amamentação, contato com a ração, com a ‘cama’ e com as fezes de seus pais. Para maior confiabilidade, inoculamos cultura pura dos contaminantes selecionados, antes de retirá-los do isolador. Depois que a flora selecionada estiver estabelecida, os animais devem ser testados e então transferidos para outro isolador.

UTILIZAÇÃO: a seleção da flora ideal depende do pesquisador que vai usar o animal. Uma quantidade considerável de pesquisa tem sido feita para restabelecer a relação entre a flora entérica selecionada e a taxa de crescimento, susceptibilidade à infecção experimental e o efeito de endotoxinas.

ANIMAIS LIVRES DE GERMES PATOGÊNICOS ESPECÍFICOS (SPF)

DEFINIÇÃO: são animais livres de microorganismos e parasitos específicos, porém não necessariamente livres de outros não-específicos.¹

Também denominamos Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos (*Specific Pathogen Free* – SPF), ou heteroxênicos, aqueles que não apresentam microbiota capaz de lhes determinar doenças, ou seja, albergam somente microorganismos não-patogênicos.

Sua criação é realizada em ambientes protegidos por barreiras sanitárias rigorosas, as quais podem ser resumidas do seguinte modo: cada vez que se entra nas áreas onde se encontram os animais, os técnicos devem tomar banho e utilizar uniforme esterilizado. Todo material a ser utilizado (peças do vestiário, ração, gaiolas, ‘cama’, água, bebedouro e outros) deve ser esterilizado, seja por meio de autoclavação, câmara com gás esterilizante ou por solução esterilizante em guichê de passagem de materiais. Sua criação também pode ocorrer dentro de isoladores.

OBTENÇÃO: animais SPF são obtidos e mantidos livres de contaminantes específicos (condições opostas dos animais FD, os quais são intencionalmente expostos a contaminantes específicos).

Para se estabelecer uma colônia de animais SPF, animais GF são infectados com flora conhecida e não-patogênica. Então, o animal SPF é alojado em um ambiente estéril, porém não necessitando mais de isoladores. Os materiais utilizados para sua criação e manutenção podem ser transferidos para ambientes estéreis, através de barreiras físicas e químicas.

A freqüente monitoração dos animais SPF é absolutamente necessária, para se ter certeza de que os contaminantes indesejáveis não se estabeleceram. A freqüência e a quantidade de amostras necessárias para essa avaliação devem ser padronizadas de acordo com a instituição. É necessário, no entanto, colher-se amostras ao acaso dos animais, materiais, equipamentos e do ambiente.

UTILIZAÇÃO: os animais SPF estão sendo cada vez mais utilizados, à medida que os pesquisadores necessitam de respostas mais confiáveis e seguras de seus experimentos.

ANIMAIS CONVENCIONAIS

DEFINIÇÃO: são animais que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.

¹ Nomenclatura recomendada pelo Comitê Internacional de Animais de Laboratório, em 1964.

Sua criação apresenta apenas princípios básicos de higiene nos quais se procede somente à limpeza e desinfecção do ambiente e material utilizado. Quanto ao pessoal técnico, em geral, realiza-se apenas troca de uniforme (avental) para o trabalho com os animais.

Por causa da dificuldade de uma definição precisa de animais convencionais, muitos mal-entendidos têm surgido entre diferentes centros e fornecedores de equipamentos. O método para classificação desses animais consiste em definir que aqueles que não são *germfree*, Flora Definida, ou SPF, são arbitrariamente chamados de Convencionais.

Por definição própria, animais que não são espontaneamente infectados por alguns microorganismos patogênicos são considerados convencionais, ao passo que animais infectados com todos os microorganismos também são considerados convencionais. Dessa forma, temos alguns animais mais convencionais do que outros, embora ainda se ajustem aos limites da nossa definição.

Como problema prático, muitas vezes a escolha do grau convencional dos animais depende primariamente de dois fatores:

- origem dos animais;
- condições sob as quais os animais são mantidos durante a experiência.

Obviamente, o que se pretende fazer com os animais é a chave para o problema. Isto é, não faz sentido pedir-se animais SPF e colocá-los diretamente num ambiente altamente contaminado. O processo de receber os animais é também importante. Quarentena e testes são necessários quando os animais convencionais são recebidos, a menos que o investigador queira aceitar qualquer infecção que esses animais possam ter. Enquanto outra classificação ecológica requer sistemas especiais de estrutura física, o prédio para colônia de animais convencionais varia desde as possíveis barreiras sanitárias até espaços sem ventilação e iluminação. É claro que esses extremos do ambiente podem ser tolerados pelos animais convencionais porque estes já se encontram de alguma forma resistentes. A maioria dos animais usados em pesquisa, nos últimos 30 anos, tem sido convencional. Eles são relativamente mais baratos para se produzir e manter, são adequados propriamente a determinados experimentos e têm sido usados praticamente em todo tipo de pesquisa, desde a genética até a cirúrgica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUSTAFSSON, B. Germ-free rearing of rats. *Acta Pathol Microbiol Scand* (Suppl), 77: 1-30, 1948.
- POLLARD, M. Viral status of germ-free mice. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 20, 1966.

BIBLIOGRAFIA

- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1984.
- CENTRO DE DESENVOLVIMENTO E APOIO TÉCNICO À EDUCAÇÃO (CEDATE). *Programação Arquitetônica de Biotérios*. Brasília: MEC, SG. Cedate, 1986.
- DE LUCA, R. R. et al. (Orgs.). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2.ed. São Paulo: Winner Graph, 1996.
- PARROTT, R. F. & FESTING, M. F. W. *Standardised Laboratory Animals*. 1.ed. Department of Genetics Medical Research Council Laboratory Animals Centre Carshalton, 1971.
- SABOURDY, M. *L'Animal de Laboratoire-dans la recherche biologique et médicale*. Paris: Presses Universitaires de France, 1967.

SAIZ MORENO, L.; GARCIA DE OSMA, J. L. & COMPAIRE FERNANDEZ, C. *Animales de Laboratorio: producción, manejo y control sanitario*. Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias/Ministerio da Agricultura, Pesca y Alimentación, 1983.

SIMMONS, M. L. & BRICK, J. O. *The Laboratory Mouse: selection and management*. New Jersey: Prentice-Hall, 1970.

TREXLER, P. C. & RENOLDS, L. I. Flexible film apparatus for the rearing and use of germ-free animals. *Appl. Microbiol.*, 5:406-412, 1957.

UNIVERSITIES FEDERATION FOR ANIMAL WELFARE (UFAW) *The Ufaw Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 5th ed. London/New York: Churchill Livingstone, 1976.