

Simone Lira

Departamento de Saúde - Universidade Nove de Julho
(UNINOVE)

Renaide Rodrigues Ferreira

Departamento de Saúde - Universidade Nove de Julho
(UNINOVE)

Vanessa Yamamoto Tambellini

Departamento de Saúde - Universidade Nove de Julho
(UNINOVE)

Isabel Priscila Garcia

Departamento de Saúde - Universidade Nove de Julho
(UNINOVE)

Renato Ribeiro Nogueira Ferraz

Programa de Mestrado Profissional em Administração -
Gestão em Sistemas de Saúde (PMPA-GSS) - Universi-
dade Nove de Julho (UNINOVE)

Renata Nunes da Silva

Departamento de Saúde - Universidade Nove de Julho
(UNINOVE)

ISOLAMENTO DE *Staphylococcus aureus* NO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR DE RATO WISTAR

RESUMO

Neste trabalho, identificamos a presença do *Staphylococcus aureus* isolado de um rato macho da linhagem Wistar, e verificamos se este microrganismo foi o agente causador da dificuldade respiratória encontrada no animal em estudo. A bactéria *Staphylococcus aureus* foi encontrada no trato respiratório do rato estudado, causando-lhe consequentemente problemas respiratórios, sendo o lavado traqueobronquial o método mais indicado para a detecção da bactéria residente. O resultado observado contribui para a constatação de que a utilização de animais de experimentação portadores de agentes oportunistas, como *Staphylococcus aureus*, inviabiliza a pesquisa já que os mesmos podem desenvolver doenças ao longo da experimentação. Portanto, conclui-se que a utilização de animais de padrão sanitário adequado é a melhor maneira de se obter resultados mais precisos na experimentação animal, pois a instalação deste tipo de área necessita de um maior número de barreiras sanitárias garantindo melhores condições de criação.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*. Animais de laboratório. Experimentação. Microbiologia.

ABSTRACT

In this work, we identified the presence of isolated *Staphylococcus aureus* from a male Wistar rat, and verify that this microorganism was the causative agent of respiratory difficulty in the animal under study. The *Staphylococcus aureus* bacteria found in the respiratory tract of studied mouse thus causing her breathing problems. The tracheobronchial lavage most suitable method for the detection of the resident bacteria. The observed result contributes to the realization that the use of experimental animals bearing opportunistic agents, such as *Staphylococcus aureus*, prevents research since the same disease may develop throughout the experiment. Therefore, it is concluded that the use of appropriate sanitary standard animals is the best way to obtain more accurate results in animal experimentation, since the installation of this type of area requires a more sanitary barriers ensuring better conditions of creation.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Laboratory animals. Experimentation. Microbiology.

INTRODUÇÃO

Grande parte do conhecimento da medicina moderna advém de pesquisas realizadas, durante séculos, com a experimentação animal, sendo de suma importância a utilização destes em trabalhos experimentais, permitindo assim, o conhecimento de mecanismos dos processos vitais, métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças humanas e animais¹.

A facilidade no manejo tornou os camundongos e ratos os animais mais utilizados na experimentação animal, pois os mesmos são animais de pequeno porte, inteligentes – fácil aprendizado, ciclo reprodutivo rápido permite acompanhar muitas gerações em curto espaço de tempo, curto ciclo de vida, que facilita o estudo metabólico em muitas fases da vida de indivíduos em curto espaço de tempo e, também, são compatíveis com os experimentos, apresentando algumas características fisiológicas semelhantes as do homem¹. Por muito tempo, os testes em que se utilizavam animais eram o único meio para se estudar doenças, determinar a capacidade nociva de produtos químicos, desenvolver medicamentos, vacinas e outros compostos farmacêuticos².

Em biotérios, a higiene pessoal é fundamental, pois os animais de laboratório são prioritários no campo da experimentação, onde há uma grande preocupação com sua produção e manejo, visando o alto padrão sanitário e genético. Esse objetivo só é conseguido quando são adotadas medidas de higiene em todas as partes do biotério. Os funcionários de um biotério devem manter um alto padrão de higiene pessoal, incluindo o uso de EPI's (uniformes, máscaras, gorro, pró-pé, etc) adequado nas colônias e nos laboratórios, assim como a lavagem das mãos e a troca do vestuário quantas vezes forem necessárias. E de forma alguma é permitido usar nas salas de animais roupas usadas fora do biotério, tampouco comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos nas colônias^{3, 4}.

Além da higiene pessoal, também há a higiene ambiental, em que o propósito é remover sujeiras da superfície e não redistribuí-las. Com isso, os materiais utilizados, como baldes, vassouras e panos de limpeza, devem ser desinfetados regularmente. A limpeza em um ambiente como o biotério é uma prática adotada para manter a saúde e a segurança dos homens e dos animais³.

Os agentes infecciosos podem ser divididos em vírus, bactérias, fungos e parasitas, que são capazes de afetar os animais de laboratório e o homem, variando na resistência inata a métodos químicos e físicos, podendo ultrapassar as barreiras sanitárias. Dentre estes agentes, podemos citar em ordem decrescente de resistência de microrganismos à germicidas químicos: *Bacillus subtilis*, *Cryptosporidium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. terrae*, *Enterovirus poliovirus*, *coxsakievirus*, *Aspergillus*, *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *herpes* e *hepatite B*⁵.

Vários destes patógenos tem sido a causa de doenças em animais de laboratório, dentre eles o *Staphylococcus aureus*, frequentemente encontrado, fazendo parte da microbiota de homens e animais, encontrado na pele e mucosa, onde resulta em doenças somente quando existe baixa imunidade na integridade destas estruturas por traumas ou corpos estranhos⁶.

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria anaeróbia facultativa, que apresenta peptidoglicano como componente principal de sua parede celular, caracterizando uma coloração roxa no Gram, apresentando-se em forma esférica quando visualizados no microscópio óptico. Seu crescimento ocorre em vários meios bacteriológicos, abundantemente em Ágar Sangue, que produz colônias amarelo douradas, e em Ágar Manitol, cujo crescimento de outra bactéria é inibido, devido a uma alta concentração de sais. A incubação da bactéria no meio de cultura deve ser de pelo menos 48h à 37°C, para que se desenvolva uma boa colônia^{6, 7}.

O *Staphylococcus aureus* tem sido ocasionalmente isolado da pele, trato respiratório e gastrointestinal dos ratos de laboratório, embora o estado residente deste organismo nestes animais é incerto, infecções naturais podem ocorrer em roedores em todas as partes do mundo, devido à transmissão que ocorre entre animais por contato direto com animais infectados e portadores⁷.

A presença de *Staphylococcus aureus* como contaminante em colônias de roedores utilizados na pesquisa pode comprometer os resultados. A bactéria é transmitida por contato entre os animais infectados e devido a isto este agente deve ser frequentemente monitorado através de amostragem periódica. A partir da detecção desta bactéria, pode-se considerar que os outros animais da unidade também são portadores do mesmo agente, desde que a amostragem feita tenha sido adequada para aquela colônia de animais⁸.

Evitar a entrada de microrganismos em uma colônia é um processo passível de falhas ocasionais, para isso são utilizadas barreiras sanitárias com a finalidade de impedir que agentes indesejáveis, presentes no meio ambiente, tenham acesso às áreas de criação ou experimentação animal⁸. Neste trabalho, identificamos a presença do *Sta-*

phylococcus aureus, isolado de um rato macho da linhagem Wistar, e verificamos se este microrganismo foi o agente causador da dificuldade respiratória encontrada no animal em estudo.

MÉTODO

Foi utilizado um rato macho da linhagem Wistar que se apresentava debilitado, com dispneia, pelos ericados e secreção nasal, cujo status microbiológico é definido como convencional. Foi mantido em gaiola de polipropileno e permaneceu sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), umidade relativa ($55 \pm 10\%$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão. Recebeu água e ração ad libitum.

Para a colheita de material, o animal foi anestesiado via intraperitoneal com uma combinação de Xilazina (10 mg/quilo de peso) e Quetamina (100 mg/quilo de peso) para a retirada de 1ml de sangue para exames bioquímicos e hematológicos. Após a sangria, o animal passou por eutanásia através da administração de uma alta dosagem de anestésicos e, em seguida a traqueia foi canulada para a realização da lavagem dos pulmões com 3ml de BHI (Brain Heart Infusion-BIOBRÁS) estéril.

O material recuperado da lavagem foi utilizado para cultura e verificação do o crescimento do microrganismo. Após este procedimento, o animal foi lavado com álcool 70% e a cavidade torácica foi seccionada com material cirúrgico estéril, para acessar o pulmão do mesmo. Os pulmões foram retirados para exames patológicos e mantidos em formol a 10%, segundo preconiza Sah⁹.

O material foi incubado por 24 horas a 37°C, os meios turvos foram repicados em Ágar Sangue, por 24-48h a 37°C. Após o crescimento de colônias, as mesmas foram passadas para o Painel de Identificação Crystal (Gram-Positive ID), que tem por objetivo identificar bactérias aeróbicas Gram-positivas. Este painel foi incubado a 37°C em câmara úmida por 24h. Após este procedimento, a leitura foi feita em luz ultravioleta para a identificação da bactéria.

RESULTADOS

O material recuperado da lavagem foi inoculado em Ágar Sangue a 37°C por 24-48hrs, onde houve crescimento de colônias amarelo douradas (Figura 1).

Figura 1 - Crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* no meio de cultura Ágar Sangue, apresentando colônias amarelo douradas.



As colônias foram submetidas à coloração de Gram e ao teste da catalase. Os microrganismos visualizados apresentaram forma de cocos e coloração roxa (Figura 2), e o teste de catalase apresentou resultado positivo (Figura 3), indicando que a bactéria encontrada é do gênero *Staphylococcus*.

Figura 2 - Morfologia do *Staphylococcus aureus* corada pelo método de Gram apresentando formato de cacho de uva.

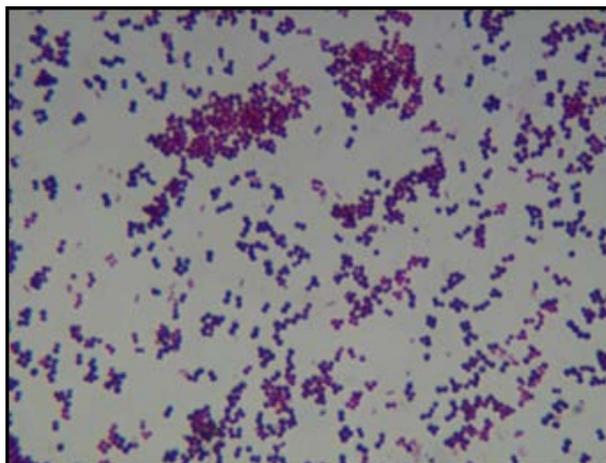


Figura 3 - Teste de catalase apresentando resultado positivo.



Para identificar a espécie, as colônias foram submetidas à prova bioquímica BBL Crystal (Gram-Positive ID Kit), incubadas por 24h em câmara úmida a 37°C, apresentando resultado positivo para *Staphylococcus aureus* (Figura 4). Neste kit foram analisados os substratos ligados a cromogênicos e fluorogênicos, que se destinam à detecção de enzimas utilizada pelos microrganismos para metabolizar vários substratos, ocorre relativamente à existência de alterações de cor ou à presença de fluorescência, consequência das atividades metabólicas dos microrganismos. O padrão das reações obtido é convertido num número de perfil com 10 dígitos, que é usado como base de identificação em um sistema de leitura informatizado. No caso desta amostra, o número encontrado foi 0160777465.

Figura 4 - Prova bioquímica BBL Crystal (Gram-Positive ID Kit) apresentando resultado para *Staphylococcus aureus*.



DISCUSSÃO

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi encontrada no trato respiratório do rato estudado, causando-lhe conseqüentemente, problemas respiratórios, assim como descrito na literatura por Gaillard (2009) e Shimizu (1994), sendo o lavado traqueobronquial o método mais indicado para a detecção da bactéria residente. Ko (2009) descreve que a introdução inadvertida de microrganismos em biotérios de experimentação é muito maior que em biotérios de criação devido à necessidade de novos animais, materiais de experimentação e circulação de pessoas nas instalações experimentais^{5, 6, 7}.

Para que possa ser controlada a contaminação por este e outros patógenos, Gaillard (2000) sugere a implantação de barreiras sanitárias para reduzir o risco de contaminação e, salienta a necessidade da realização de testes microbiológicos rotineiros. Também, Damy (2009) informa que a padronização sanitária dos animais de laboratório é sem dúvida nenhuma um pré-requisito para a reprodutibilidade dos resultados experimentais, garantindo assim a manutenção do estado sanitário^{6, 10}.

Este trabalho contribui para a constatação de que a utilização de animais de experimentação portadores de agentes oportunistas, como *Staphylococcus aureus*, inviabiliza a pesquisa porque os mesmos podem desenvolver a doença ao longo da experimentação. Portanto, concluímos que a utilização de animais de padrão sanitário SPF é a melhor maneira de se obter resultados mais precisos na experimentação animal, pois a instalação deste tipo de área necessita de um maior número de barreiras sanitárias garantindo melhores condições de criação.

REFERÊNCIAS

1. Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009.
2. Mezadri TJ, Tomáz VA, Amaral VLL. Animais de Laboratório: Cuidados na iniciação experimental. Florianópolis: Editora da UFSC; 2004.
3. Marques MAP. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fio-cruz; 2002. 369-373.
4. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Manual Sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Goiânia: Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; 2003. 162p.
5. Ko GM, Damy SB. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. 273-294.
6. Gaillard ET, Clifford BC. Common Diseases. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. The laboratory rat. San Diego: Academic Press; 2000. 99-132.
7. Shimizu A. *Staphylococcus aureus*. In: Waggle K, Kagiyama N, Allen AM, Nomura T. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals. 2 ed.: National Center for Research Resources; 1994. 159-164.
8. Ferreira RR, Damy SB. Controle Bacteriológico. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009.p. 359-369.
9. Sah RL, Mall MP, Mohanty GC. Septicemic *Proteus* infection in japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). Avian Diseases. 1983; 27(1):296-301
10. Damy SB. Doenças Prevalentes em Animais de Laboratório. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009.p. 315-336.