

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**ADEMAR LUIZ GOMES DO COUTO**

**Desenvolvimento e Eficácia Terapêutica de Ração Suplementada com Ivermectina  
no Tratamento de *Syphacia obvelata* em camundongos**

**RIO DE JANEIRO**

**2019**

**ADEMAR LUIZ GOMES DO COUTO**

**Desenvolvimento e Eficácia Terapêutica de Ração Suplementada com Ivermectina  
no Tratamento de *Syphacia obvelata* em camundongos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação do Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Pesquisa Biomédica (Ciência de animais de Laboratório).

Orientador: Marcel Frajblat.

**Rio de Janeiro**

**2019**

## CIP - Catalogação na Publicação

L871d Luiz Gomes do Couto, Ademar  
Desenvolvimento e Eficácia Terapêutica de Ração  
Suplementada com Ivermectina no Tratamento de  
Syphacia obvelata em camundongos / Ademar Luiz  
Gomes do Couto. -- Rio de Janeiro, 2019.  
61 f.

Orientador: Marcel Frajblat.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas  
Filho, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, 2019.

1. Ivermectina. 2. Syphacia. 3. Biotério. 4.  
Animais de laboratório. 5. Ração Animal. I. Frajblat,  
Marcel, orient. II. Título.

**Ademar Luiz Gomes do Couto**

**Desenvolvimento e Eficácia Terapêutica de Ração Suplementada com Ivermectina  
no Tratamento de *Syphacia obvelata* em camundongos**

Volume I

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação do Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Pesquisa Biomédica (Ciência de animais de Laboratório).

Aprovada em 31/05/2019

---

Dr. Marcel Frajblat. (Orientador, Doutor, IBCCF – UFRJ)

---

Dr. Debora Henrique Da Silva Anjos (Membro interno, Doutor, IBCCF – UFRJ)

---

Dr. Rossiane Claudia Vommaro (Membro interno, Doutor, IBCCF – UFRJ)

---

Dr. Gabriel Melo de Oliveira (Membro externo, Doutor, Fundação Oswaldo cruz)

## **DEDICATÓRIA**

Ao Deus supremo, criador do universo, toda honra e glória e louvor e ações de graças sejam dados somente a Ele.

A meus pais, que sempre me incentivaram “ao mestrado”. E eu lhes dizia que chegaríamos lá.

Minha esposa e filhos. Deus me deu vocês como um presente que requer cuidados. Eu os amo muito.

**Toda a boa dádiva e todo o dom perfeito vem do alto, descendo do  
Pai das luzes, em quem não há mudança nem sombra de variação.  
(Tiago 1:17)**

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus Eterno, sempre ao meu lado.

Ao meu pai, Luiz Carlos do Couto e à minha mãe, a Airam Gomes do Couto, primeira da família a se sentar num banco de universidade.

A Ricardo Torquillo, meu “Consigliere”. Obrigado por tudo.

À Belmira Santos, Sebastião Enes Couto e Joel Majerowicz, que me acolheram, me testaram e me aceitaram em seus planos. Sempre serei grato.

À equipe do CDTS – Centro de Desenvolvimento tecnológico em Saúde. A Eduardo Martins, Claudio Manuel e Carlos Morel, pelo apoio, incentivo e por acreditarem no projeto e no executor.

Aos amigos de Fiocruz, Wildeberg Moreira, Incerlande Soares, e toda a equipe de técnicos do Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos.

Michelle Guimarães e Gustavo Cunha, Gustavo Dornelles, Patrícia Furlan e Lília Marques pela paciência e lealdade; ao amigo de mestrado Luis Otavio Pacheco, do laboratório Herta Meyer de ultraestrutura celular e à família Carvalho (Jorge, Sandra e Letícia) que fizeram as fotos e edições num piscar de pixels.

E a Milton Lamônica, a quem conheci por acaso, e que me perguntou quem eu era, e que me disse o que eu precisava fazer.

Occam: *"Ao confrontar diferentes hipóteses para explicar um mesmo fenômeno, há de se selecionar as que envolvem menos ações e entidades".*

Grice: *"Implicações práticas devem ser preferidas frente a contextos semânticos abstratos para explicações linguísticas".*

Rand: *"Conceitos não devem ser multiplicados além da necessidade" Lex Parsimoniae "Entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem".*

**O mais valioso de todos os talentos é aquele de nunca usar duas palavras quando  
uma basta.**

**Thomas Jefferson (1743-1826)**

## RESUMO

COUTO, Ademar Luiz Gomes do. “ Desenvolvimento e Eficácia Terapêutica de Ração Suplementada com Ivermectina no Tratamento de *Syphacia obvelata* em camundongos”. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O status sanitário dos animais de laboratório é um importante fator que pode afetar os resultados dos experimentos neles realizados. Entre os patógenos que podem afetar estes animais, o endoparasita *Syphacia obvelata* é um dos mais prevalentes em biotérios. Os protocolos de tratamento deste parasita são laboriosos, pois envolvem tratamentos individuais ou em veículos não homogêneos e de estabilidade duvidosa. O objetivo deste trabalho foi elaborar uma ração terapêutica suplementada com ivermectina para o tratamento de camundongos positivos para *S. obvelata*. Foram realizados quatro experimentos. No primeiro experimento os camundongos fêmeas de linhagem C57BL/6 receberam ração suplementada com 12 ppm de ivermectina por 1,2,4 e 8 semanas (10 animais por grupo). Camundongos controle positivos, de mesma linhagem não receberam a ração pelo mesmo período. Ao fim cada tratamento os animais foram avaliados com testes parasitológicos de fita adesiva e necropsia. Não foi encontrada a presença do parasita em nenhum dos grupos medicados ao término do período de tratamento. Os respectivos grupos controle permaneceram parasitados. No segundo experimento foi avaliado o potencial de reinfecção do parasita. Os camundongos machos C57BL/6 (5 por grupo) receberam a ração com ivermectina por 1,2,4 e 8 semanas enquanto que um grupo controle ficou sem receber a ração. Não foi observada reinfecção por um período de até 11 semanas após a suspensão do tratamento para o grupo que recebeu por uma semana. Nos outros grupos também não foi observada reinfecção. Os experimentos 3 e 4 testaram o uso da ração em situações reais de colônias infestadas por *S. obvelata*. Camundongos positivos para o parasita de diversas linhagens receberam a ração associada por uma e duas semanas. Os animais apresentaram-se negativos para o parasita após 7 dias de tratamento. Os resultados deste estudo indicam que o uso de ração suplementada com 12 ppm de ivermectina é um método eficiente para eliminação do parasita *Syphacia obvelata*. **Palavras chave:** Animais de laboratório, Ivermectina, Ração, *Mus musculus*, *Syphacia obvelata*, *Mus musculus*, nematoides, camundongo, controle sanitário.

## ABSTRACT

COUTO, Ademar Luiz Gomes do. “ Desenvolvimento e Eficácia Terapêutica de Ração Suplementada com Ivermectina no Tratamento de *Syphacia obvelata* em camundongos”. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The sanitary status of laboratory animals is an important factor that may affect the results of the experiments performed on them. Among the pathogens that can affect these animals, the endoparasite *Syphacia obvelata* is one of the most prevalent in animal facilities. The parasite's treatment protocols is complicate, since involves individual treatments or in non-homogeneous and dubious stability vehicles. This work goals were elaborate an ivermectin supplemented therapeutic animal food to treat *S. obvelata* positive mice and put to test this efficacy. Four experiments were carried out. In the first experiment the female mice of C57BL / 6 lineage received feed supplemented with 12 ppm of ivermectin for 1,2,4 and 8 weeks (10 animals per group). Positive control mice of the same strain did not receive the food at the same period. At the end of each treatment the animals were evaluated with adhesive tape and necropsy parasitological tests. The parasite's presence was not found in any of the medicated groups at the end of the treatment period. The respective control groups remained parasitized. In the second experiment the potential of reinfection of the parasite was evaluated. C57BL / 6 male mice (5 per group) received the ivermectin diet for 1, 2, 4 and 8 weeks while a control group was left without receiving the drug associated feed. No reinfection was observed for up to 11 weeks after discontinuation of treatment for the group receiving one week. No reinfection in the other groups was observed also. Experiments 3 and 4 tested the food in usually infested *S. obvelata* colonies. Positive mice of several lineages received the associated food for one and two weeks. After 7 days of treatment the animals were found negative for the parasite. This studies indicates the use of feed supplemented with 12 ppm of ivermectin as an efficient method for elimination of the parasite *Syphacia obvelata*.  
Key words: Laboratory animals, Ivermectin, animal food, *Mus musculus*, *Syphacia obvelata*, *Mus musculus*, nematodes, mouse, sanitary control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Artrópodes potenciais parasitas de camundongos	18
Figura 2. Helmintos e protozoários potenciais parasitas de camundongos	19
Figura 3: Ovos de <i>Syphacia sp.</i>	21
Figura 4: Fotomicrografia da parte posterior de fêmea de <i>S. obvelata</i> .	21
Figura 5: Técnica de Graham para diagnóstico de ovos presentes na região perianal.	28
Figura 6: Desenho experimental do experimento 1	32
Figura 7: Desenho do experimento 2	35
Figura 8: Desenho experimental do experimento 3	37
Figura 9: Desenho experimental do experimento 4	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ação farmacológica de antiparasitários utilizados em animais de laboratório	23
Tabela 2: Tratamentos com utilização de Ivermectina em animais de laboratório	24
Tabela 3: Análise bromatológica da ração base Rhoster para camundongos	30
Tabela 4: Tratamento de camundongos infestados por <i>Syphacia obvelata</i> por períodos de 1 a 8 semanas	40
Tabela 5. Proporção de animais positivos em experimento realizado para observação do período que animais permanecem isentos da infecção por <i>Syphacia obvelata</i>	42
Tabela 6. Período pós tratamento onde os animais permaneceram negativos para <i>Syphacia obvelata</i>	43
Tabela 7. Avaliação do experimento 3	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
° C	Graus Celsius
CE	Conselho Europeu
DMSO	Dimetil sulfóxido
FD	Flora definida
G	Gramma
GABA	Ácido gama amino butírico
GF	Germfree
Ig E	Imunoglobulina E
LAT	Laboratório de transgênicos
Mg	Miligramma
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NCR	National Research Council
Oz	Onça
p/p	Peso por peso
ppm	Partes por milhão
PEG	Polietilenoglicol
<i>sp.</i>	Espécie
SPF	Specific pathogen free
UE	União Europeia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta
V	Volume

## SUMÁRIO

### Conteúdo

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
Importância da qualidade do controle sanitário em animais de laboratório .....	15
Biotérios .....	16
Classificação dos modelos biológicos quanto a qualidade sanitária .....	16
Endoparasitas e ectoparasitas .....	18
Prevalência e consequência de infestações parasitárias em animais de laboratório...	19
Ciclo Biológico da Syphacia obvelata (Rudolphi, 1802) .....	20
Efeito da presença da Syphacia nos resultados experimentais.....	21
Tratamentos antiparasitários.....	22
Terapias antiparasitárias em animais de laboratório.....	24
OBJETIVOSGERAIS .....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
JUSTIFICATIVA .....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
Diagnóstico parasitológico .....	27
Teste de Graham com fita adesiva.....	27
Teste de Willis (flutuação) .....	28
Técnica de Hoffmann (sedimentação).....	29
Necropsia.....	29
Ração .....	29
EXPERIMENTO 1 .....	30
Animais.....	30
Fornecimento de ração.....	31
Desenho experimental .....	31
Variáveis observadas .....	32
EXPERIMENTO 2 .....	33
Animais.....	33
Fornecimento de ração.....	33
Desenho experimental .....	33
Variáveis observadas .....	35
EXPERIMENTO 3 .....	35

Animais.....	35
Ração .....	36
Desenho experimental .....	36
Variáveis observadas .....	37
EXPERIMENTO 4.....	37
Animais.....	38
Ração .....	38
Desenho Experimental.....	38
Variáveis observadas .....	39
Análise estatística .....	39
RESULTADOS .....	39
Experimento 1 .....	39
Primeira semana pós início do tratamento.....	40
Grupo 1 (Iver 1sem) .....	40
Grupo 2- controle. ....	40
Segunda semana pós início do tratamento.....	40
Grupo 3(Iver2sem) .....	40
Grupo 4-controle. ....	40
Quarta semana pós início do tratamento .....	41
a) Grupo 5 (Iver 4sem).....	41
c) Grupo 6- controle. ....	41
Oitava semana pós início do tratamento.....	41
a) Grupo 7 (Iver 8sem). ....	41
c) Grupo 8- controle. ....	41
Experimento 2 .....	42
Grupos tratados com ivermectina.....	42
Grupo controle.....	43
Experimento 3 .....	43
Experimento 4 .....	44
DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÃO.....	51
PRODUTO FINAL DO ESTUDO .....	52
Recomendações quanto ao produto .....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

## INTRODUÇÃO

Há séculos o homem utiliza animais em pesquisas científicas na busca do conhecimento e benefício para a saúde de ambos. Porém, apesar de sua importância na geração deste conhecimento, estes animais foram relegados durante muito tempo a um segundo plano dentro do contexto científico. Por muito tempo foram desconsiderados em seus aspectos biológicos, sanitários, e em seu bem-estar (BAKER, 1998).

Apenas recentemente, percebeu-se a influência do modelo animal e seu bem-estar nos resultados de um experimento (POOLE, 1997). Como consequência surge a Ciência em Animais de Laboratório, cujo tema principal de estudo é o próprio animal que será utilizado na pesquisa e como este deve ser criado e manipulado (QUIMBY, 1994). A Ciência de Animais de Laboratório tem como base a ideia que o resultado final de um estudo com animais é diretamente proporcional à qualidade e confiabilidade destes animais. Desta forma, a escolha do modelo correto e a manutenção e a qualidade destes materiais são de suma importância para a obtenção de resultados fidedignos. Estas condições são fundamentais para garantir a reprodutibilidade dos mesmos por outros profissionais, quando utilizadas as mesmas metodologias.

A Ciência em Animais de Laboratório engloba uma série de áreas que servem como base para todas as outras ciências que utilizam animais em seus trabalhos. Estas áreas incluem entre outras: sanidade animal, genética, manejo reprodutivo, bem-estar, edificação, ética e educação.

A contribuição dos animais de laboratório na pesquisa biomédica envolve diversos campos, como o desenvolvimento de drogas para as mais diversas enfermidades humanas e animais, vacinas e soros, técnicas cirúrgicas, transplantes de órgãos, terapia celular e conhecimento básico da biologia dos seres vivos (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Apesar da constante discussão na sociedade e na comunidade científica sobre métodos alternativos ao uso de animais, a sua utilização ainda é necessária (FRAZIER; GOLDBERG, 1990; HORNBERGER et al, 1999).

O uso científico de animais pode ser dividido em 3 áreas principais: geração de novos conhecimentos biológicos (pesquisa básica), testes de eficácia e segurança de drogas e produtos para uso humano e ensino. A qualidade dos animais utilizados nas duas primeiras áreas é fundamental para a obtenção de resultados precisos e reprodutíveis.

A ausência dessa qualidade pode gerar resultados imprecisos e conclusões incorretas.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### *Importância da qualidade do controle sanitário em animais de laboratório*

As pesquisas realizadas em animais podem ser afetadas por agentes infecciosos presentes nas colônias e levar a diminuição da sensibilidade e precisão dos resultados (BAIRD et al., 1982). Apesar de clinicamente sadios, animais de laboratório podem ser portadores de diversos patógenos com potencial de causar alterações nos resultados de experimentos. Animais infectados não são modelos ideais para pesquisas em oncologia, imunologia, virologia, e diversas outras áreas. Em uma extensa revisão, (BAKER, 1998) apresenta os principais patógenos de camundongos, ratos e coelhos e como estes, mesmo sem induzir sinais clínicos, podem afetar as diversas áreas da pesquisa biomédica.

A maioria das contaminações em roedores não necessariamente apresenta sinais clínicos de doença e se tornam latentes (BAKER, 1998). Entretanto, infecções têm impacto considerável nos resultados das pesquisas (SILVEIRA et al., 2003). Apesar de não tornarem o animal doente a presença destes patógenos tem demonstrado na prática a possibilidade de interferir nos resultados por meio de contaminação de amostras de órgãos, tumores e outros tecidos, alterar sistema imunológico, padrões bioquímicos, hormônios entre diversos outros e efeitos e desta forma torna os resultados não confiáveis (BAIRD et al., 1982). Estas infecções, quando não levam a mortalidade, podem causar alterações nos resultados experimentais (PINTO et al., 1984; LYTVYNETS et al. 2013), pode aumentar ou diminuir a suscetibilidade do hospedeiro ao estresse experimental e induzir danos em tecidos, pode estimular o crescimento de tecido anormal, competir por nutrientes, diminuir o volume sanguíneo e fluidos corporais e causar interferência mecânica (BAKER, 1998).

Poucos trabalhos avaliaram o padrão sanitário dos animais de laboratório no Brasil (ROSENKRANZ et al., 1978; GILIOLI et al., 2000, 2003). Coletivamente estes trabalhos indicam a dificuldade de encontrar no Brasil instituições que possuem animais livres de patógenos. Recentemente, algumas instituições adequaram suas instalações com barreiras sanitárias e programas de monitoramento para produzir animais livres de patógenos, mas estas estão restritas a grandes centros de pesquisa. Contribui para esta situação a ausência de laboratório que realizam testes diagnósticos de forma rápida e profissional. O Brasil possui poucos laboratórios especializados em animais de laboratório.

## ***Biotérios***

O uso de animais criados sob um sistema de barreiras com controle de condições ambientais e submetidos a controles sanitários periódicos é de extrema importância para a produção de resultados precisos (LYTVYNETS et al. 2013). Nestes animais, a ausência de patógenos elimina uma importante variável na análise dos resultados.

Os biotérios são instalações físicas destinadas a produzir (biotérios de criação) e manter animais (biotérios de experimentação) para os mais diversos ensaios que atendam à pesquisa, ensino e produção/controlar de qualidade para as áreas biomédicas, ciências humanas e tecnologias (ABDALLA, 2001). Seu desenho estrutural deve corresponder à sua finalidade e é o constituinte principal que assegura a eficácia funcional e o bem-estar do animal nela mantido.

Barreiras sanitárias são estratégias que os biotérios utilizam para evitar a entrada de patógenos que podem interferir nos estudos e a saída de organismos que podem contaminar o homem ou o ambiente (ABDALLA, 2001). Esta proteção sanitária pode ser realizada por meio de equipamentos ou por manejos específicos. Barreiras são sistemas que integram aspectos estruturais, equipamentos e métodos de operação, bem como os componentes das edificações, como pisos, paredes, portas “air-locks”, sistema de controle de ar, dentre outros para obter um controle ambiental e minimizar a possibilidade de contaminação (POLITI et al., 2008; GÓRSKA; 2000;).

Estas barreiras ainda podem ser divididas em primárias, quando relacionados aos componentes da edificação (pisos, paredes, portas) e secundárias, quando relacionadas aos componentes de manejo dos animais como: caixas micro ventiladas, autoclaves, sistema de filtração de ar entre outras (GÓRSKA; 2000; ABDALLA, 2001).

### ***Classificação dos modelos biológicos quanto a qualidade sanitária***

A presença de barreiras sanitárias e principalmente o estado sanitário, classificam os animais como (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002):

- **Animais Gnotobióticos** – São todos os animais com microbiota conhecida e definida. Gnotobióticos são obtidos por derivação cesariana estéril ou mais recentemente por transferência de embriões para fêmeas sem patógenos, para

obter nível zero de microbiota. São mantidos com alimento, água e substrato esterilizados.

Os Gnotobióticos se dividem em dois tipos: os “Germfree” e os Animais com microbiota definida

- Animais “Germfree” (**GF**) - São animais totalmente livres de microbiota, sem qualquer tipo de microrganismo e, portanto, isentos de parasitas. São também chamados de animais axênicos. Necessitam de isolamento absoluto em estruturas estéreis e recebem suporte idem para manter seu “status” sanitário.
- Animais com microbiota definida (**FD**) – São obtidos pela inoculação intencional em animais “germfree” de um microrganismo (monoxenos) ou mais (polixenos) através do substrato ou da alimentação/água. Estes animais após constatação positiva e estabilização de microbiota são repassados para isoladores de forma a manter seu “status” sanitário.
- **Animais SPF (“SpecificPathogenFree”)** – São animais mantidos em biotérios protegidos por barreiras sanitárias que impedem a entrada de microrganismos patogênicos. Animais SPF são definidos de acordo com uma lista de exclusão onde são citados com detalhamento todos os organismos excluídos
- **Animais Convencionais** – São animais com microbiota indefinida, criados em ambientes sem barreiras muito rigorosas, com rotinas sanitárias mais simples que nas categorias acima listadas. Todos os animais que não se encaixam em parâmetros Germfree, microbiota definida ou SPF são considerados convencionais. Animais convencionais submetidos a barreiras sanitárias e a técnicas de melhoria da qualidade sanitária, controle de qualidade e eliminação de microrganismos são comumente chamados de convencionais controlados.

Não temos um panorama preciso de como são os biotérios brasileiros em relação ao estado sanitário. Apesar do investimento em racks individualmente ventilados, realizado por muitos biotérios nos últimos anos, há poucos indicativos de uma melhora acentuada na qualidade sanitária dos animais. Devido à dificuldade para a realização de testes sorológicos para detecção de patógenos de animais de laboratório no Brasil, pode-se sugerir que boa parte dos biotérios ainda se encontra classificado como convencional e convencional controlado.

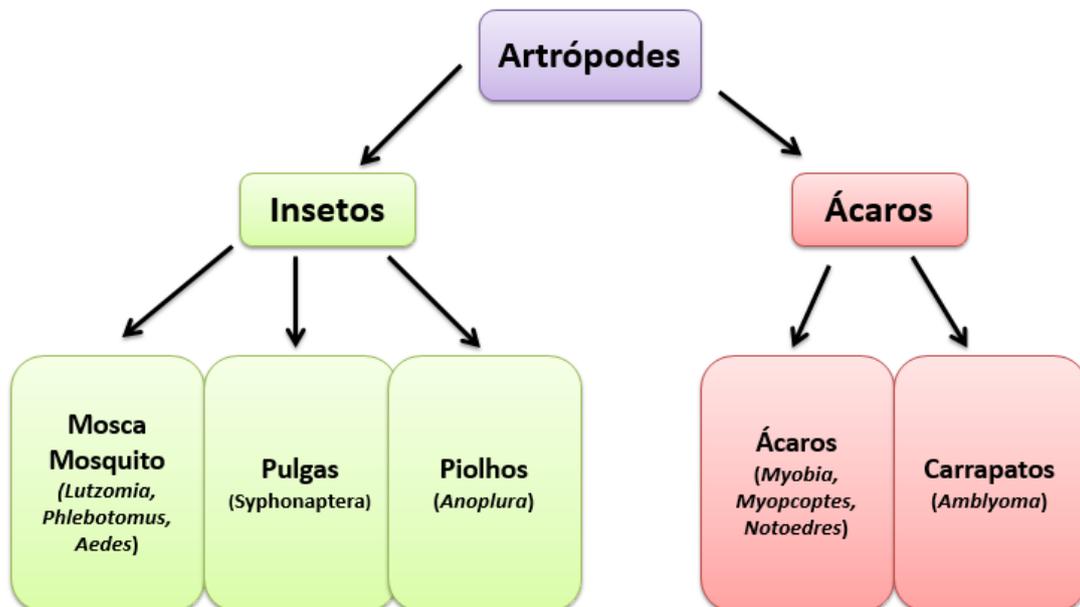
Já em relação a endoparasitas e ectoparasitas, por serem testes mais fáceis de serem realizados, é possível encontrarmos mais relatos sobre a presença destes organismos. Estes trabalhos mostram que ainda temos muitos problemas com estes parasitas.

### ***Endoparasitas e ectoparasitas***

Roedores presentes em laboratórios são comumente infestados por uma vasta quantidade de ectoparasitos de diferentes ordens: pulgas (*Syphonaptera*), piolhos sugadores (*Anoplura*), ácaros e carrapatos (*Acari*), larvas de mosca (*Diptera*) (Figura 1). Vários endoparasitas também são encontrados como: protozoários (*Protozoa*) e helmintos das classes *Trematoda*, *Cestoda* e *Nematoda* (Figura 2).

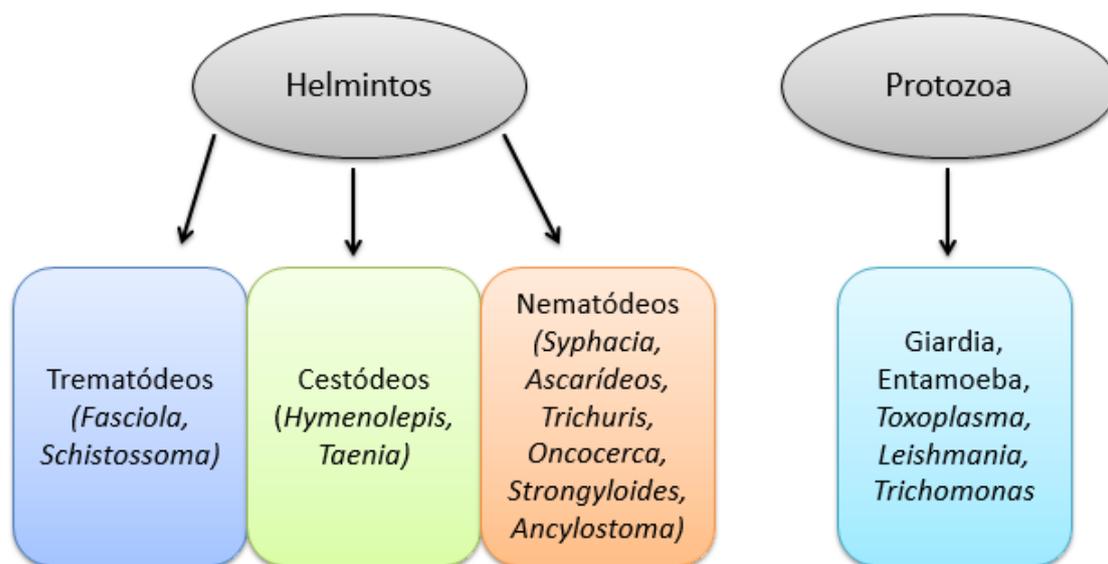
A infecção por estes organismos dependerá de variáveis como o estado de saúde (imunológico) do animal, do manejo zootécnico e da existência e efetividade das barreiras utilizadas na instalação.

A ação destes parasitos promove o desequilíbrio homeostático nos animais afetados e pode levar a quadros clínicos, que tendem a agravar de acordo com o nível de contaminação e com a resistência imunológica do animal (DOYLE et al., 2006)).



**Figura 1:** Classificação dos artrópodes que podem parasitar animais de laboratório.

Os oxiurídeos são helmintos, nematóides, (*Oxyuridae*, *Ascaridorida*) e a espécie alvo deste experimento pertence ao gênero *Syphacia*, parasita de camundongos e ratos (*S. obvelata*). Infestações por endoparasitas podem causar patologias gastrointestinais, como diarreia, desidratação, prolapso retal (HOAG, 1961), colites (MULLINK, 1970) e alterações hidroeletrólíticas (TAFSS, 1976).



**Figura 2:** Helmintos e protozoários que podem parasitar animais de laboratórios.

### ***Prevalência e consequência de infestações parasitárias em animais de laboratório***

A prevalência de infestações parasitárias em animais de laboratório é alta nos biotérios brasileiros (BRESSAN et al., 1997). Em muitos casos a infecção está presente mesmo sem uma observação clínica, o que torna necessária a constatação diagnóstica laboratorial. Taxas de infecção em colônias demonstraram contaminação de determinados parasitas em até 80% dos animais analisados, com graus de contaminação que variam de 1 a 375 parasitas por animal (DOYLE et al., 2006). Um dos parasitas mais comumente encontrados, a *S. obvelata* foi relatada em até 92% dos animais em diversos biotérios brasileiros avaliados (BICALHO et al., 2007; GILIOLI et al., 2000).

As parasitoses em animais de laboratório são causa frequente de doenças nas colônias de roedores, afetam a saúde animal e causam comprometimento nos resultados experimentais (JACOBY; FOX; DAVISIN, 2001). Os sinais clínicos das ectoparasitoses manifestam-se usualmente sob forma de prurido localizado, alopecia, dermatite

ulcerativa, linfadenopatia e perda de peso (WATSON,1961; WHITELEY; HORTON, 1965).

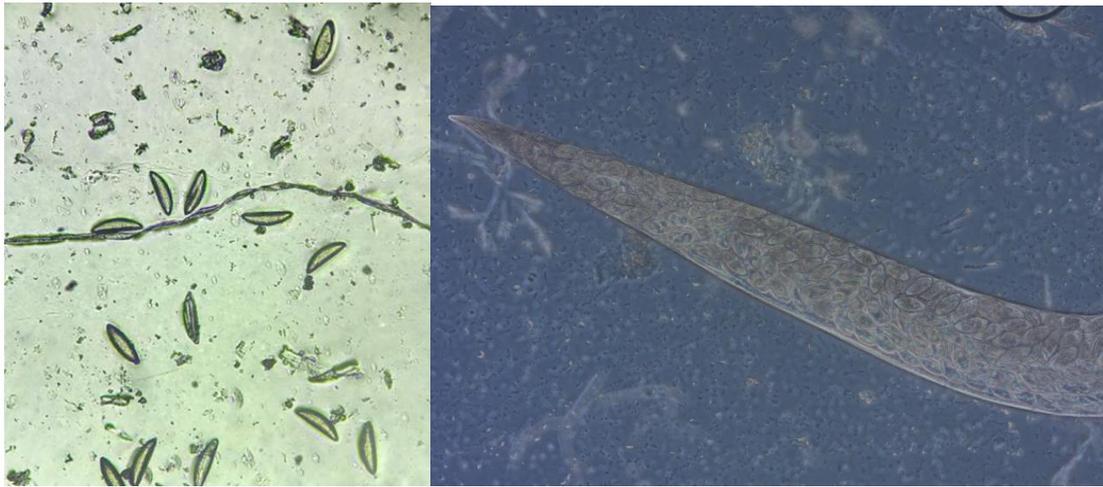
As alterações clínicas ocasionadas por ectoparasitos em camundongos imunocompetentes vão da hipergamaglobulinemia, aumento dos níveis de IgE, linfocitopenia, eosinofilia e alterações em citocinas de caráter inflamatório (JOHNSTON et al., 2009; KLEMENT et al., 1996). Estes desvios e alterações comprometem os resultados de pesquisas, tornando-se necessário o tratamento efetivo de colônias acometidas visando os interesses da pesquisa e dos animais, quanto a seu bem-estar.

Coletivamente, estes resultados sugerem que os biotérios necessitam de medidas preventivas e terapêuticas para melhorar a qualidade sanitária de seus animais de forma a permitir que os experimentos sejam realizados em animais padronizados, sem variáveis sanitárias que podem comprometer os resultados.

### ***Ciclo Biológico da Syphacia obvelata (Rudolphi, 1802)***

Nos trabalhos que investigaram as condições sanitárias de biotérios brasileiros, o parasita *Syphacia sp.* foi um dos mais prevalentes (BICALHO et al., 2007; BAZZANO et al., 2002; GILIOLI et al., 2000, 2003). Este nematódeo com tamanho reduzido, forma cilíndrica e cor branca se estabelece em ceco e cólon de roedores, onde se alimenta de bactérias do lúmen intestinal (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002; TAFFS, 1976). Possui ciclo direto que se fecha em 11-15 dias (MEADE; WATSON, 2014; WHARY; BARTHOLD, 2015). Seus ovos têm fora de letra D, com aspecto alongado e encurvado, medindo entre 72-82 por 25-36µm (DOYLE et al., 2006) (Figura 3).

As fêmeas em estado gravídico se deslocam do ceco em direção ao ânus para depositar ovos larvados na região perianal dos roedores acometidos (Fig. 4). Estes ovos tornam-se infectantes entre 5 a 20 h após a postura, variando com a temperatura ambiente (TAFFS, 1976).



**Figura 3:** Ovos de *Syphacia sp.* aumento de 10x coletados por técnica de Graham (fita adesiva). Ademar Couto.

**Figura 4:** Fotomicrografia em aumento de 40 x da parte posterior de fêmea de *S. obvelata* repleta de ovos larvados. Ademar Couto.

A infecção ocorre por ingestão dos ovos depositados na região perianal por outros animais, pela contaminação da água, alimento ou substrato por ovos depositados, que caem do pelo dos animais infectados no ambiente. Também pode ocorrer por retro infecção através da migração das larvas de volta ao interior do intestino pela via inversa ânus-cólon (TAFFS, 1976). Por serem extremamente leves, os ovos são carreados pelo ar e fixam-se sobre os materiais de trabalho, caixas de animais, superfície corporal dos operadores e no sistema de ventilação e exaustão (LYTVYNETS et al. 2010)

Quando ocorre a ingestão dos ovos, em 2 horas as larvas eclodem, e migram em direção ao ceco, onde após 30 horas após infecção, realizam ecdise. Os machos atingem maturidade sexual após 96 horas. Fêmeas fertilizadas após o quinto dia apresentam gravidez 4 dias pós fecundação e realizam migração cólon - ânus apenas 3 dias após a gravidez (TAFFS, 1976).

#### ***Efeito da presença da Syphacia nos resultados experimentais.***

Como são raros os sinais clínicos na maioria dos animais infestados por *Syphacia*, mesmo os imunodeficientes, a condição corporal e as condições gerais de saúde geralmente não excluem esses animais das pesquisas. Porém, a infecção por *Syphacia* pode levar a sinais mais sutis e geralmente afetar a resposta imunológica e isso sim pode impedir o uso dos animais (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002). Camundongos infestados

por *Syphacia* tem uma maior incidência de doenças autoimunes (SATO et al., 1995). Camundongos de linhagem nude com *Syphacia* tem aumento da prevalência de linfoma. Em uma linhagem de camundongos, a presença de *Syphacia* afetou hematopoiese e linfopoiese. Também foi observado nesses camundongos um aumento de resposta alérgica a antígenos alimentares (MICHELS, 2006), o que ressalta a importância de camundongos livres do parasita para uso em pesquisa.

A presença de nematoides pode ocasionar alterações em resultados de pesquisa, e modificar o comportamento exploratório e a função imune do hospedeiro (SATO et al., 1995), com aumento da eritropoiese e mielopoiese (ILIC et al, 2010). Camundongos infestados por *Syphacia* tem uma maior incidência de doenças autoimunes (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002). Nematoides podem causar redução na manifestação diabética em linhagens de camundongos NOD (nonobese diabetic) (COOKE et al. 1999), e os efeitos podem ser mais extensos, pois dependendo do experimento a ser desenvolvido, a presença destes parasitos será um fator restritivo na obtenção resultados (MEADE; WATSON, 2014)). *Syphacia* também causa baixa reatividade na resposta beta adrenérgica em ratos infestados (SILVEIRA et al., 2003). De forma geral, infecção por *Syphacia* pode ser considerada um sinal de falha no sistema de higienização, barreiras sanitária se biossegurança (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002).

### ***Tratamentos antiparasitários***

Existem diversas estratégias terapêuticas documentadas para o tratamento de parasitoses em roedores de laboratório. Diversos agentes (tabela 1) têm sido utilizados com este objetivo, com variados graus de eficácia (HOAG, 1961). A partir da década de 60, o uso da piperazina e de organofosforados como o diclorvós foram utilizados, bem como o pirantel e o levamisole. Os mais utilizados em animais de laboratório hoje são os benzimidazóis e as avermectinas (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002).

As lactonas macrocíclicas foram descobertas em 1975 e dividem-se em dois grupos: avermectinas e milbemicinas (SILVERS; FUENTEALBA, 2003). As milbemicinas se dividem em milbemicina D e moxidectina.

As avermectinas consistem em lactonas macrocíclicas, produzidas pela fermentação fúngica do *Streptomyces avermitilis*. O grupo é composto pela ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina (BURG et al., 1979). A ivermectina é um derivado sintético da abamectina (SKREBSKY et al., 2010), lançada no mercado em 1980 seguida pela abamectina que chegou ao mercado em 1985. Ambos

compostos têm sido amplamente utilizados como antiparasitários e inseticidas (TAYLOR, 2001; CHABALLA et al., 1980).

O mecanismo de ação das avermectinas consiste no bloqueio neuromuscular dos parasitas pelo aumento da permeabilidade da membrana das células nervosas aos íons de cloro na célula, associado a uma potencialização da ação do ácido gama amino butírico (GABA), um neurotransmissor inibitório das respostas motoras dos parasitos pela interação com os canais de glutamato-cloro independentes de GABA (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996).

A utilização da Ivermectina na dose de 2,0 mg/kg diariamente por via oral (gavagem) se mostrou efetiva contra *S. obvelata* em camundongos, removendo 100% dos parasitas em fêmeas grávidas e 94% em machos (BATTLES et al., 1987). Esta dosagem preconizada no estudo difundiu seu uso e serviu de base e outros trabalhos por demonstrar a erradicação de parasitas com este produto em animais de laboratório (PRITCHET; JOHNSTON, 2002).

**Tabela 1:** Ação farmacológica de antiparasitários utilizados em animais de laboratório (RAIZEN ET AL. 2012, MARTIN, 1997).

<b>Agentes</b>	<b>Princípio Ativo</b>	<b>Efeito</b>
<b>Agonistas de receptores nicotínicos</b>	Levamisole/Pyrantel/Morantel	Paralisia muscular espástica
<b>Inibidores da Acetil Colinesterase</b>	Diclorvós/Haloxone	Paralisia muscular espástica
<b>GABA agonistas</b>	Piperazina	Paralisia Flácida
<b>Potenciadores de canais de cloreto-glutamato associados</b>	Ivermectina/Abamectina/Doramectina/ Moxydectina/Milbemicina	Paralisia faringeal
<b>Estimuladores de permeabilidade de canais de cálcio</b>	Praziquantel	Hiperpolarização
<b>Ácido araquidônico inibidores/potencializadores do S. Imune não específico</b>	Dietilcarbamazina	Bloqueamento enzimático
<b>Beta Tubulina ligantes</b>	Tiabendazol/Albendazol/ Oxibendazol/Fenbendazol/ Mebendazol/ Febantel	Inibição celular estrutural

## Terapias antiparasitárias em animais de laboratório

A literatura apresenta várias abordagens de tratamentos contra endoparasitas e ectoparasitas em animais de laboratório com o uso da ivermectina (Tabela 2). A administração deste antiparasitário pode ser pela água de bebida, via injetável, aplicação tópica ou pela ração.

Tabela 2: Tratamentos com utilização de Ivermectina em animais de laboratório

Referência	Parasito	Espécie	Rota de Administração	Dose	Resultado
(Ostlind, 1985)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	1-Oral (Gavagem) 2-Oral (Dieta)	1- Misturado PEG/400-DMSO; 2 v/v por gavagem a 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/Kg; 2- Misturado à dieta a 0,0005%, 0,00005% ou 0,000005% p/p	1- Negativo 2- Negativo
(Hasslinger,1987)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	Oral (Água)	Fêmeas - 1,6 mg/Kg; Machos - 1,0 mg/Kg; (Baseado no consumo) por 24 h	Negativo
(Flynn, 1989)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	Oral (Gavagem)	Misturado a óleo vegetal (1:9 v/v); 2,0 mg/Kg; 2 tratamentos com intervalo de 10 dias	<b>Erradicação</b>
(Huerkamp, 1990)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	Oral (Gavagem)	Misturado ao óleo de sésamo, 2,0 mg/Kg, 2 tratamentos com intervalo de 10 dias	<b>Erradicação</b>
(West, 1992)	<i>Syphacia obvelata</i> , <i>Aspiculuris tetraptera</i> , <i>Myobia musculi</i> , <i>Radfordia affinis</i>	<i>Mus musculus</i>	Tópico (Micro gota)	1- Administrar 2,0 mg/Kg Inter escapular dose única; 2- Administrar 2,0 mg/Kg Inter escapular, 2 doses com intervalo de 10 dias	1- Apenas ácaros. 2- Ácaros, <i>Syphacia</i> e <i>Aspiculuris</i>
(Le Blanc, 1993)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	Tópico (Spray)	1:10 em 22 oz. spray, 1 aplicação (1-2 ml; 0,9-1,8 mg por caixa), semanalmente, por 3 semanas	<b>Erradicação</b> , mas não após o primeiro tratamento
(Klement,1996)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	Oral (Água)	4,0 mg/Kg (baseado no consumo) 5 tratamentos de 4 dias, com intervalo de 3 dias	<b>Erradicação após 5 tratamentos</b>
(Sueta, 2002)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	Tópico (Spray)	0,1% 1 vez por semana por 3 semanas no animal e caixa	<b>Erradicação</b>
(Arbona, 2010)	<i>Myobia musculi</i> , <i>Myocoptes musculus</i>	<i>Mus musculus</i>	<b>Oral (Ração Comercial)</b>	12 ppm (1,3 mg/Kg <i>Ad libitum</i> dose média ingerida) por 1, 4 e 8 semanas	<b>Erradicação</b> a partir de 7 dias
(Moreira 2013)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	Oral (Água)	2,0 mg/kg e 1,3 mg/kg Administração em bebedouros por 3 semanas seguidas, intervalo de 2 semanas e repetição por 3 semanas	<b>Erradicação</b> 7 dias após início de tratamento
(Chawla, 2015)	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Mus musculus</i>	1-Oral (Água) 2-Tópico (Spray)	1- Administrar 2,0 mg/Kg (baseado no consumo), 3 semanas alternadas 2- Administrar 0,1% 1 vez por semana durante 5 semanas	<b>Erradicação</b>

Adaptação da Tabela do artigo de PRITCHETT et al., 2002.

(PEG – Polietilenoglicol; DMSO – Dimetil sulfóxido; v/v- volume por volume; p/p – peso por peso; mg/Kg – miligramas por quilograma; % - por cento; oz- onças; *Ad libitum* – à vontade)

A concentração de ivermectina no plasma de camundongos, seja em tratamentos diários ou por aplicação única tende a atingir picos nos primeiros dias de tratamento, reduzindo rapidamente nos dias subsequentes (CONOLE et al., 2003). O plasma de animais tratados com ivermectina oral submetido a cromatografia líquida de alta performance utilizando fluorescência constatou detecção possível apenas até o sexto dia/início do sétimo dia, após administração.

Ao repetir a administração, os resultados foram os mesmos e não houve detecção de ivermectina em nenhum animal no fim do sétimo dia (CONOLE et al., 2003).

A estratégia na administração do medicamento é um ponto importante no sucesso do tratamento. Entre os trabalhos relatados na literatura, apenas um usou a ivermectina misturada na ração para o tratamento de ectoparasitas (ARBONA et al., 2010b). A adição do agente terapêutico à ração é uma estratégia discreta, não altera a rotina diária animal, e é a forma mais prática de tratamento da maioria das endoparasitoses e ectoparasitoses em animais de laboratório.

Apesar de facilitar muito o tratamento de endo e ectoparasitas, não temos no Brasil rações comerciais suplementadas com medicamentos. Entre os diversos princípios ativos disponíveis, a ivermectina é um que tem se mostrado eficaz contra a maioria destas infestações e naturalmente se torna um forte candidato a ser utilizado como tratamento para parasitoses em animais de laboratório.

Portanto, o objetivo neste estudo foi produzir uma ração para animais de laboratório suplementada com ivermectina com o objetivo de avaliar a erradicação do endoparasita *S. obvelata*. Dentre todas as estratégias já utilizadas, esta é a que menos altera a rotina de trabalho em um biotério. Existe um interesse de muitos biotérios neste estudo devido à grande prevalência deste parasita nas colônias e o seu difícil controle por outros métodos de tratamento.

## **OBJETIVOS GERAIS**

- Produzir uma ração para camundongos suplementada com ivermectina.
- Avaliar a eficácia da ivermectina associada a ração de roedores de laboratório na erradicação da *Syphacia obvelata*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Testar o uso da ração em colônias de camundongo positivas para *Syphacia obvelata* em biotérios da UFRJ.
- Identificar a possibilidade de reinfecção no período pós tratamento dos animais.
- Elaborar uma recomendação de utilização dessa ração associada para uso em biotérios infestados com *Syphacia obvelata*

## **JUSTIFICATIVA**

A pesquisa biomédica necessita de animais de qualidade sanitária ótima, isentos de patógenos que possam afetar o experimento e comprometer sua reprodutibilidade. A *S. obvelata* é um dos parasitas mais prevalentes nos biotérios brasileiros e seu tratamento é difícil devido seu curto ciclo biológico, facilidade de dispersão dos ovos, levando-os à fixação em diversos locais da sala e durabilidade de até 7 meses em meio ambiente (LYTVYNETS et al., 2010, 2013).

Devido a esta demanda, o presente projeto foi realizado em parceria com a empresa Rhooster para a elaboração de uma ração suplementada com ivermectina.

A escolha da ivermectina se baseou na sua conhecida utilização em controle de parasitas nematoides, seu preço reduzido, facilidade de aquisição, disponibilidade no mercado nacional. A Ivermectina é um endectocida com amplo espectro de ação, e pode ser usado em todas as fases de criação, sendo eficaz no tratamento e controle das principais parasitoses, incluindo nematoides e ectoparasitas.

A utilização da ração como veículo para o tratamento não envolve o estresse manipulativo derivado da modificação do manejo diário, sendo incorporado ao momento da troca de alimentação, bebedouro e caixas com substrato. O manejo continua a ser realizado de mesma forma e sem necessidade de entradas adicionais no recinto. Não há alteração do quantitativo técnico necessário para o manejo de salas, ea totalidade dos animais pode ser tratada.

Portanto, existe uma grande expectativa em relação aos resultados deste estudo devido a prevalência deste parasita. Vários biotérios já demonstraram interesse em usar ração com ivermectina no tratamento de suas parasitoses, sejam elas por endo ou ectoparasitas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado no biotério do Laboratório de Animais Transgênicos - LAT/UFRJ e no biotério do Instituto de Bioquímica da UFRJ. Os camundongos utilizados foram selecionados após o diagnóstico positivo para o parasita *S. obvelata*. Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRJ com o número 120/17. Foram realizados quatro experimentos com o objetivo de testar a eficácia terapêutica da ração associada com ivermectina:

**Experimento 1:** Avaliação da eficácia da ração associada com ivermectina por um período de até 8 semanas com manejo em cabine de segurança biológica para obtenção de maior controle sanitário.

**Experimento 2:** Avaliação de reinfecção parasitária após tratamento de 1 a 8 semanas.

**Experimento 3:** Avaliação da eficácia da ração em uma colônia de animais do Laboratório de Animais Transgênicos.

**Experimento 4:** Avaliação da eficácia da ração em uma colônia de camundongos localizado no Biotério do Instituto de Bioquímica.

### *Diagnóstico parasitológico*

Todos os animais utilizados no presente estudo foram previamente diagnosticados com a presença do endoparasita *S. obvelata*. As técnicas parasitológicas utilizadas foram: 1) técnica de Graham (fita adesiva) 2) técnica de Willis (flutuação), 3) técnica de Hoffman (sedimentação) e 4) avaliação direta do conteúdo do ceco e cólon (necropsia).

Para a seleção dos animais que ingressaram no estudo, a técnica utilizada foi a de Graham com a fita adesiva. A seguir as quatro técnicas são descritas com detalhes.

Para cada experimento, no mínimo 2 métodos de diagnóstico laboratorial foram utilizados (EFFLER et al., 2008; HILL et al.; 2009). A presença de ovos ou larvas nos métodos utilizados, independente da carga parasitária, indicou a positividade do animal.

### *Teste de Graham com fita adesiva*

Este teste é utilizado devido à característica do ciclo biológico do parasita em fixar seus ovos na pele e pelos da região perianal do hospedeiro, onde ficam aderidos e possibilitam o recolhimento dos mesmos sem necessidade de utilização de uma técnica invasiva.

O camundongo foi contido pelo dorso e posicionado de forma ventral para o técnico que fez a coleta. Um pedaço de fita adesiva de cerca de 6-8 cm foi segurado nas extremidades entre os polegares e os indicadores de forma a ficar bem esticado (figura 5). A sua face colante foi colocada em contato com a região perianal do camundongo, previamente contido.

Depois do contato da fita com a região perianal, a mesma foi imediatamente colada na superfície de uma lâmina de microscopia. Esta foi avaliada em microscópio, sem necessidade de cobertura por lamínula e observada a presença ou não dos ovos do nematódeo em aumento de 100 e 400x.



**Figura 5:** Técnica de Graham para diagnóstico de ovos presentes na região perianal. Uma fita adesiva foi colocada na região perianal e rapidamente removida e transferida para uma lâmina e avaliada por microscopia (Foto do autor).

### ***Teste de Willis (flutuação)***

Esta técnica considera o princípio da flutuação dos ovos em meio com densidade elevada. Desta forma os ovos ficam localizados na linha superficial do líquido utilizado, que deve possuir alta concentração de soluto.

As fezes (média de 50 gramas) foram coletadas com pinça e colocadas em tubos cônicos de 50 ml e levadas ao laboratório. Ao chegar foram submetidas a uma solução saturada de Na Cl (5 ml) e realizada uma maceração das fezes dentro de tubo. O volume do tubo foi preenchido até a borda com a solução saturada de Na Cl para formar uma superfície na borda na qual foi colocada a lamínula. Esta lamínula foi mantida por 10

minutos em contato com a solução e imediatamente após sua retirada, foi colocada em uma lâmina de microscopia para ser examinada em objetivas de 10 e 40x.

### ***Técnica de Hoffmann (sedimentação)***

A técnica de Hoffmann se baseia no princípio inverso da flutuação, na qual uma suspensão macerada de fezes em água é submetida à filtração em cálice cônico apropriado. A suspensão foi mantida por 10 minutos, período no qual ocorreu a sedimentação dos ovos. O precipitado foi coletado por pipeta para observação em lâmina de microscopia em objetivas de 10 e 40x.

### ***Necropsia***

Após à eutanásia por dióxido de carbono por 10 minutos, seguido de deslocamento cervical, as carcaças foram abertas na região abdominal e os intestinos foram removidos com tesoura e pinça de dissecação e todo o material fecal a partir do ceco foi coletado.

Este material foi colocado em placa de Petri contendo solução salina (Na Cl 0,85% a 37°C) e submetido a exame em lupa estereoscópica após maceração com tesoura e pinça (MOREIRA et al.,2013).

Para facilitar a visualização e confirmação dos nematoides foi feita observação em fundo claro e escuro. Os parasitos encontrados foram transferidos por meio de uma pipeta de Pasteur para lâminas de microscopia, cobertas com lamínula e levados para visualização em microscópio com objetivas de 10x e 40x.

### ***Ração***

A ração utilizada neste estudo foi a **RH29586 IVERM**, produzida pela empresa Rhoster (Araçoiaba da Serra, SP) especializada em rações manipuladas e preparadas sob protocolos experimentais definidos. A composição da ração base seguiu os padrões descritos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Análise bromatológica da ração base Rhoster para camundongos utilizada no presente estudo. Dados baseados em um kg de ração.

Umidade (Máx.)	103g	10,29%
Proteína Bruta (Mín.)	213g	21,25%
Extrato Etéreo (Máx.)	49g	4,86%
Fibra Bruta (Máx.)	29g	2,9%
Matéria Mineral (Mín.)	84g	8,35%
Cálcio (Mín. /Máx.)	13g	1,23%
Fósforo (Mín.)	1g	1,01%

Na composição da ração base da Rhoster foi introduzida a ivermectina comercial, pronta para adição à ração animal (premix) na concentração de 12 ppm (ARBONA et al., 2010a). O premix utilizado foi da marca Vetanco S.A. (Ivermectina Vetanco Premix), na concentração de 0,6%. Para cada kg de ração foram adicionadas 2 g. de ivermectina. A ração foi produzida em pellets de 30 mm de comprimento, embalada em sacos de 5 kg e enviadas para a instituição.

## EXPERIMENTO 1

### *Animais*

Um total de 60 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, oriundos do biotério do Laboratório de Animais Transgênicos da UFRJ e com idade de 5 semanas foram usados neste experimento. Todos os animais foram previamente identificados como positivos para *S. obvelata* por meio do teste de Graham.

Os animais foram divididos aleatoriamente e alojados em grupos de 5 animais por caixa de policarbonato transparente, com medidas de 200 x 230 x 300 (Largura x Altura x Profundidade em mm) e mantidos em racks ventilados (Alesco).

Todos os animais foram mantidos no mesmo recinto, numa temperatura média de 23°C e umidade de 60%, em ciclos de luz de 12/12 (claro/escuro). Os animais recebiam anteriormente ao experimento ração da marca Labgold (Socil) não esterilizada, *ad libitum* e sua substituição foi total, sem período adaptativo. Os animais foram pesados semanalmente durante a realização do estudo.

A troca de alimento, água e cama destes animais foi realizada em cabine de biossegurança (Tipo 2, classe II). A cabine e as caixas foram sempre higienizadas previamente com solução de Virkon S<sup>®</sup> (Dupont) a 1 %, bem antes de abertas para a troca.

A cama utilizada foi maravalha de pinus previamente irradiada e embalada e mantida em sacos plásticos. Estes sacos permaneceram por 40 minutos em cabine de fluxo laminar antes de serem utilizados. Os sacos foram mantidos em estante ventilada (Alesco, modelo ES1) com circulação de ar filtrado, previamente higienizada com solução de Virkon S<sup>®</sup> a 1 %.

### ***Fornecimento de ração***

Neste experimento, foi utilizada a ração com ivermectina da Rhostrer descrita acima com fornecimento *ad libitum* e trocada semanalmente. Os sacos de ração foram previamente higienizados externamente com Virkon S<sup>®</sup> e foram submetidos à exposição à luz UV em cabine de fluxo por 40 min previamente a sua abertura. Estes sacos foram posteriormente armazenados após abertos em estante ventilada (Alesco, modelo ES1), previamente higienizada com o mesmo produto.

### ***Desenho experimental***

Os camundongos identificados como *Syphacia* positivos foram divididos em 8 grupos (Figura 6):

- **Grupo 1 – Iver 1sem (n=10)** – ração com ivermectina por 1 semana
- **Grupo 2 – Ctrl1 (n=5)** – ração controle por 1 semana
- **Grupo 3 – Iver 2sem (n=10)** – ração com ivermectina por 2 semanas
- **Grupo 4 – Ctrl2 (n=5)** – ração controle por 2 semanas
- **Grupo 5 – Iver 4sem (n=10)** – ração com ivermectina por 4 semana
- **Grupo 6 – Ctrl5 (n=5)** – ração controle por 4 semanas
- **Grupo 7 – Iver 8sem (n=10)** – ração com ivermectina por 8 semanas
- **Grupo 8 – Ctrl8 (n=5)** – ração controle por 8 semanas

Os grupos 1,3,5 e 7 receberam a ração com ivermectina por determinados períodos (1, 2, 4 e 8 semanas) e após este foram submetidos à eutanásia para

diagnóstico parasitológico. Os animais dos grupos controle (2, 4, 6 e 8) receberam a ração sem medicação e foram eutanasiados juntos com os seus respectivos grupos medicados (1,3,5 e 7).

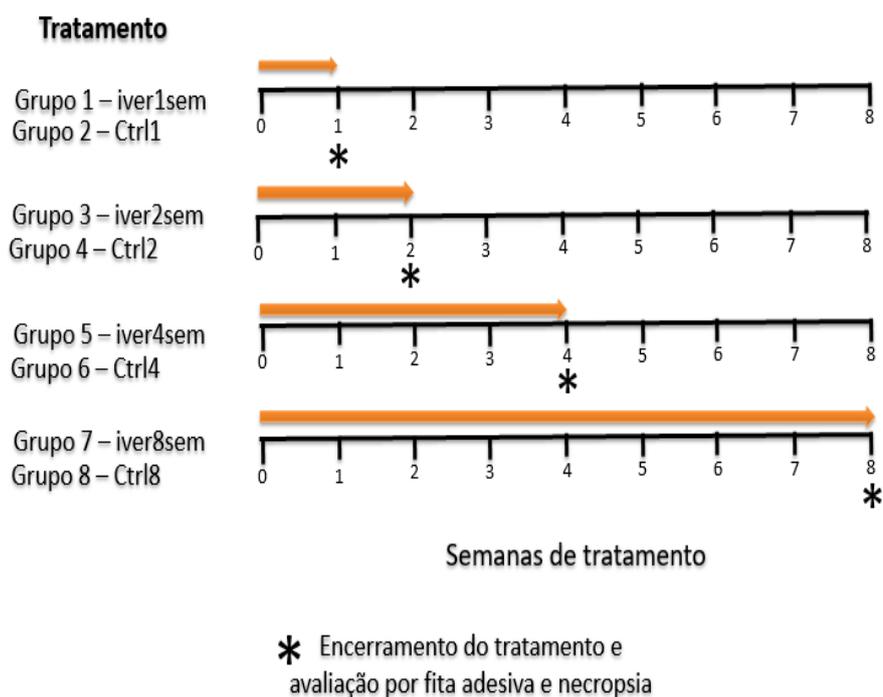
Todos animais foram pesados individualmente. A cada pesagem e troca de material/coleta de amostra, a balança foi higienizada, bem como as luvas do manipulador, com solução de álcool a 70°.

Após o procedimento de troca, as caixas foram devolvidas às estantes micro isoladoras de origem, exceto as caixas dos grupos submetidos à eutanásia, que seguiram para setor específico do biotério e procederam à coleta de material.

O cálculo amostral foi realizado com o uso do programa disponível online <http://powerandsamplesize.com/Calculators/Compare-2-Means/2-Sample-Equality> com poder estatístico escolhido foi de 80%.

### ***Variáveis observadas***

A seguinte variável foi observada e registrada durante o experimento 1: presença de parasitos e ovos após o período de tratamento.



**Figura 6:** Desenho experimental do experimento 1. Animais foram divididos em oito grupos. Quatro grupos receberam a ração com ivermectina por 1, 2, 4 e 8 semanas. Para cada grupo experimental, um grupo controle foi mantido sem ração com ivermectina pelo mesmo período.

## **EXPERIMENTO 2**

### ***Animais***

Foram utilizados 25 camundongos machos da linhagem C57BL/6 oriundos do biotério do Laboratório de Animais Transgênicos da UFRJ com idade de 5 semanas. Todos animais foram previamente identificados como positivos para *S. obvelata* por meio do teste de Graham.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, sendo 4 grupos teste e um grupo controle, na proporção de 5 animais por caixa de policarbonato transparente, com medidas de 200 mm x 230 mm x 300 mm (largura x altura x profundidade) e mantidos em racks ventilados (Alesco).

Todos os animais foram mantidos no mesmo recinto, numa temperatura média de 23°C e umidade média de 60%, em ciclos de luz de 12/12 (claro/escuro). Os animais receberam anteriormente ao experimento ração da marca Labgold (Socil) *ad libitum* e sua substituição foi total, sem período adaptativo.

A troca de alimento, água e cama destes animais foi realizada em cabine de biossegurança (Tipo 2, classe II), e higienizada previamente com solução de Virkon S<sup>®</sup> a 1 %, bem como nas caixas micro isoladoras antes de abertas para a troca.

A cama utilizada foi maravalha de pinus previamente irradiada e fornecida em sacos plásticos. Estes sacos permaneceram por 40 minutos em cabine de fluxo antes de serem utilizadas. Os sacos foram mantidos em estante ventilada (Alesco, modelo ES1) com circulação de ar filtrado, previamente higienizada com solução de Virkon S<sup>®</sup> a 1 %.

### ***Fornecimento de ração***

Neste experimento, foi utilizada a ração com ivermectina da Rhostrer descrita acima com fornecimento *ad libitum* e trocada semanalmente. Os sacos de ração foram previamente higienizados externamente com Virkon e foram submetidos a exposição à luz UV em cabine de fluxo por 40 min previamente a sua abertura. Estes sacos foram posteriormente armazenados após abertos em estante ventilada (Alesco, modelo ES1), previamente higienizada com o mesmo produto e separada apenas para este fim e aberta para acesso ao produto.

### ***Desenho experimental***

Vinte e cinco camundongos machos de 5 semanas foram divididos em 5 grupos (Figura 7):

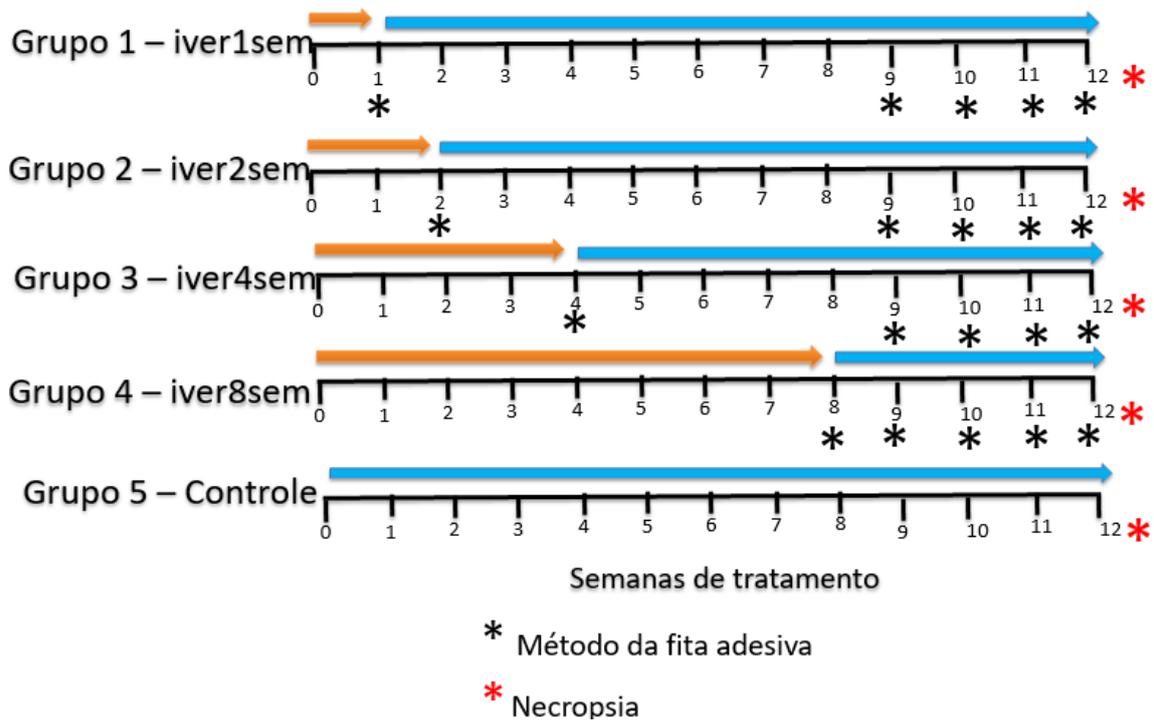
- **Grupo 1 – Iver 1SEM (n=5)**
  - Ração com ivermectina por 1 semana, seguido de ração controle (sem ivermectina) até a 12<sup>o</sup> semana.
- **Grupo 2 – Iver 2SEM (n=5)**
  - Ração com ivermectina por 2 semanas, seguido de ração controle (sem ivermectina) até a 12<sup>o</sup> semana.
- **Grupo 3 – Iver 4SEM (n=5)**
  - Ração com ivermectina por 4 semanas, seguido de ração controle (sem ivermectina) até a 12<sup>o</sup> semana.
- **Grupo 4 – Iver 8SEM (n=5)**
  - Ração associada com ivermectina por 8 semanas, seguido de ração controle (sem ivermectina) até a 12<sup>o</sup> semana.
- **Grupo 5 – Ctrl (n=5) – ração controle por 12 semanas.**

O objetivo deste segundo experimento foi observar a possibilidade de reinfecção dos animais tratados, após suspensão da ração com ivermectina. Os camundongos receberam ração com ivermectina por 1, 2, 4 e 8 semanas, enquanto que os machos controle receberam a ração sem o produto desde o início do experimento. Os animais foram avaliados ao fim de cada período experimental estabelecido para seu grupo para confirmação da presença ou ausência de parasitos.

A partir da nona semana do experimento, todos os grupos passaram a ser avaliados semanalmente por fita adesiva até a semana final (décima segunda semana), quando foram submetidos à necropsia, além da fita adesiva.

O cálculo amostral foi realizado com o uso do programa disponível online <http://powerandsamplesize.com/Calculators/Compare-2-Means/2-Sample-Equality> com poder estatístico escolhido foi de 80%.

## Experimento 2



**Figura 7:** Desenho do experimento 2. Camundongos machos receberam ração com ivermectina por 1, 2, 4, 8 semanas. Após o tratamento eles passaram a receber ração controle. A reinfecção por *Syphacia obvelata* foi avaliada entre as semanas 9-12 do estudo.

### *Variáveis observadas*

As seguintes variáveis foram observadas e registradas durante o experimento 2: presença de ovos após o período de tratamento com ivermectina e a presença de parasitos e ovos em diferentes períodos posteriores ao tratamento.

## EXPERIMENTO 3

O objetivo deste experimento foi testar a ração com ivermectina em colônias de camundongos no biotério do laboratório de animais transgênicos da UFRJ. A proposta foi simular o tratamento de uma colônia, independente da linhagem, sexo ou idade.

### *Animais*

Um total de 84 camundongos foi utilizado neste experimento. Estes animais eram das seguintes linhagens:

1. BALB/c - 33 animais
2. C57BL/6 - 15 animais
3. Híbridos F1 C57BL/6 X BALB/c – 15 animais
4. Swiss Webster (SW) -21 animais

Todos animais foram previamente avaliados para a presença de *Syphacia obvelata* por meio do teste de Graham. Foram utilizados animais acasalados com o protocolo de harém, portanto, eram três animais por gaiola (duas fêmeas e um macho). Os animais foram mantidos em caixa de policarbonato transparente, com medidas de 200 x 230 x 300 (largura x altura x profundidade em mm) e mantidos em racks ventilados (Alesco).

Todos os animais foram mantidos como no experimento 1 e 2. A troca de alimento, água e cama destes animais foi realizada em uma mesa aberta na sala do biotério seguindo a rotina de manejo presente na instalação. Portanto, neste experimento foi mantido exatamente o manejo presente na instalação.

### ***Ração***

A ração utilizada para teste foi a Rhoster **RH29586IVERM**, já utilizada no experimento 1 e 2. A ração foi fornecida do dia inicial e trocada semanalmente por duas semanas. Os sacos de ração foram previamente higienizados externamente com Virkon e posteriormente armazenados após abertos em estante ventilada (Alesco, modelo ES1) como nos experimentos 1 e 2, exceto para a exposição ao UV que não houve neste experimento.

### ***Desenho experimental***

Os animais foram agrupados por linhagem e submetidos ao mesmo protocolo de tratamento (Figura 8). Não houve grupo controle.

**Grupo 1: BALB/c (n=33)** -Ração com associada com ivermectina por 2 semanas.

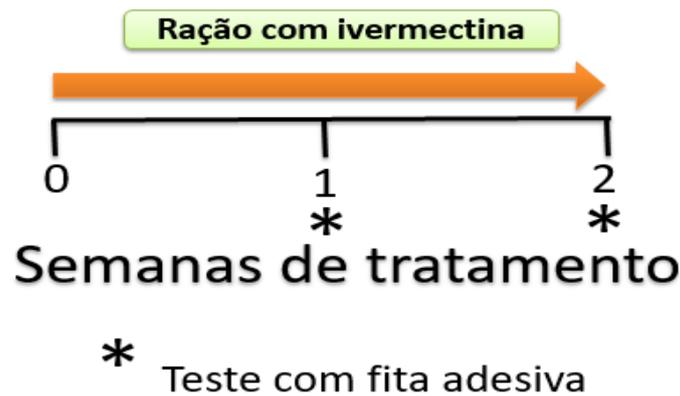
**Grupo 2: C57BL/6 (n=15)** -Ração associada com ivermectina por 2 semanas.

**Grupo 3: Híbridos F1**(n=15) -Ração associada com ivermectina por 2 semanas.

**Grupo 4: Swiss Webster** (n= 21) -Ração associada com ivermectina por 2 semanas.

Os animais foram avaliados previamente ao estudo e a prevalência do parasito foi de 71%. Os animais recebiam a ração Nuvilab (Quimtia) e no dia 1 do experimento passaram a receber a ração associada com ivermectina, da Rhoster.

Nove animais da linhagem BALB/c tiveram que ser utilizados na rotina do laboratório e receberam ração somente por uma semana. Os setenta e cinco animais restantes receberam a ração com ivermectina por duas semanas e o teste de Graham foi realizado com 7 e 14 dias.



**Figura 8:** Desenho experimental do experimento 3. Animais de quatro colônias de camundongos positivas para *Syphacia obvelata*, presentes no Laboratório de Animais Transgênicos foram usados nesse experimento. Estes animais receberam a ração com ivermectina por duas semanas e foram avaliados ao final da primeira e da segunda semana.

#### ***Variáveis observadas***

As seguintes variáveis foram observadas e registradas durante o experimento 3: presença de ovos durante e após o período de tratamento.

## **EXPERIMENTO 4**

O objetivo deste experimento foi testar a ração associada com ivermectina em uma colônia de camundongos positivas para *S. obvelata* em um biotério do Instituto de Bioquímica da UFRJ.

### ***Animais***

Um total de 40 camundongos adultos da linhagem BALB/c foi utilizado neste experimento (10 machos e 30 fêmeas). Em diversas caixas haviam filhotes presentes e estes não foram avaliados.

Todos os 40 animais adultos utilizados no experimento foram previamente identificados como positivos para *S.obvelata* por meio do teste de Graham. Os animais estavam acasalados em sistema de harém com quatro animais por gaiola (três fêmeas e um macho). Os animais foram mantidos em caixa abertas de polipropileno brancas, com medidas de 200 x 120 x 300 (largura x altura x profundidade em mm) e mantidos em estantes de metal.

A troca de alimento, água e cama destes animais foi realizada em uma mesa aberta na sala do biotério seguindo a rotina de manejo presente na instalação. A cama utilizada foi flocos de pinus previamente irradiado.

### ***Ração***

A ração utilizada para teste foi a Rhoster RH29586IVERM, já utilizada nos experimentos anteriores. A ração foi fornecida por uma semana.

### ***Desenho Experimental***

Os animais formaram um único grupo e foram submetidos ao mesmo protocolo de tratamento, ao mesmo tempo, por 1 semana (figura 9):

**Grupo único: BALB/c (n=40) -Ração associada com ivermectina por 1 semana.**

Os 40 animais foram avaliados previamente ao estudo e a prevalência do parasito foi de 100%. Os animais recebiam a ração Nuvilab (Quimtia) e no dia 1 do experimento

passaram a receber a ração associada com ivermectina da Rhoster. Esta ração foi fornecida por uma semana.

Ao fim desta primeira semana os animais foram submetidos ao teste de Graham e as técnicas de Willis e Hoffman.



**Figura 9:** Desenho experimental do experimento 4. Animais de uma colônia de camundongo positivas para *Syphacia obvelata*, presentes no Biotério do Instituto de Bioquímica da UFRJ foram usados nesse experimento. Estes animais receberam a ração com ivermectina por uma semana e foram avaliados ao final desta semana para a presença do parasito.

### *Variáveis observadas*

Apenas a variável presença de ovos de *S. obvelata* após o período de tratamento observado foi analisada e registrada durante o experimento 4:

### *Análise estatística*

A proporção de animais positivos e negativos para *S. obvelata* foi comparada pelo teste de Chi-quadrado. Os resultados foram considerados significativos com o  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### *Experimento 1*

A ração associada com ivermectina foi eficiente na eliminação do parasita *S. obvelata* pelos métodos da fita adesiva e necropsia e todos os animais que receberam o tratamento apresentaram resultados negativos para o parasito (tabela 4).

**Tabela 4:** Tratamento de camundongos infestados por *Syphacia obvelata* por períodos de 1 a 8 semanas. Os camundongos foram testados após o período de tratamento para cada grupo (1, 2, 4 e 8 semanas) pelos métodos de fita e necropsia. Os dados apresentados (x/y) representam o número de animais positivos (x) para o número de animais testados (y).

Ração	Tratamento Por 1 semana Grupo 1 e 2		Tratamento Por 2 semanas Grupo 3 e 4		Tratamento Por 4 semanas Grupo 5 e 6		Tratamento Por 8 semanas Grupo 7 e 8		P
	Fita	Necropsia	Fita	Necropsia	Fita	Necropsia	Fita	Necropsia	
Controle	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	< 0,01
Ivermectina	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	< 0,01

### *Primeira semana pós início do tratamento*

#### **Grupo 1 (Iver 1sem)**

Na primeira avaliação diagnóstica com uma semana, foi realizado o teste de Graham nas dez fêmeas do grupo **Iver 1sem** e em seguida elas foram submetidas à eutanásia, para a realização da necropsia. Os dez animais (100%- 10/10 animais negativos/testados) se apresentaram negativos para a presença de *Syphacia obvelata*, tanto pela técnica de fita adesiva quanto pela necropsia e posterior visualização em lupa (tabela 4).

#### **Grupo 2- controle.**

Os 5 animais do grupo controle que não receberam a ração associada foram avaliados pelo teste da fita adesiva e se apresentaram positivos (5/5- número de animais positivos para número de animais testados) para o parasita *Syphacia obvelata* (tabela 4).

### *Segunda semana pós início do tratamento*

#### **Grupo 3(Iver 2sem)**

Na segunda semana após o início do tratamento com a ração com ivermectina, não foram identificadas a presença de parasitas (tabela 4) nas 10 fêmeas do grupo **Iver 2sem**(10/10 animais negativos/testados).

#### **Grupo 4-controle.**

Os 5 animais do grupo controle que não receberam a ração associada foram avaliados pelo teste da fita adesiva e se apresentaram positivos (5/5 - número de animais

positivos para número de animais testados) para o parasita, porém foi observado que estes mesmos animais controle positivos no teste da fita adesiva estavam negativos à necropsia (tabela 4).

#### ***Quarta semana pós início do tratamento***

##### **a) Grupo 5 (Iver 4sem)**

Na quarta semana após o início do tratamento com a ração com ivermectina, não foram identificadas a presença de parasitas nas 10 fêmeas do grupo **Iver3sem** (10/10 positivos/testados), em ambos procedimentos de diagnóstico utilizados (tabela 4).

##### **b) Grupo 6- controle.**

Os 5 animais do grupo controle que não receberam a ração associada foram avaliados pelo teste da fita adesiva e se apresentaram negativos (5/5 - número de animais positivos para número de animais testados) para o parasita *Syphacia obvelata*. Porém, nestes mesmos animais apresentaram-se positivos na necropsia para a presença do parasita *S. obvelata* (tabela 4).

#### ***Oitava semana pós início do tratamento***

##### **Grupo 7 (Iver 8sem).**

Na oitava semana após o início do tratamento (última coleta) com a ração com ivermectina, as 10 fêmeas do grupo **Iver 8sem** apresentaram-se negativas quanto à presença do parasito (10/10 positivos/testados), em ambos procedimentos de diagnóstico utilizados (tabela 4).

##### **Grupo 8- controle.**

Os 5 animais do grupo controle que não receberam a ração associada foram avaliados e se apresentaram-se positivos em sua totalidade para o parasita *Syphacia*

*obvelata* no procedimento de necropsia. Este grupo apresentou-se negativo na avaliação com fita adesiva em sua totalidade (0/5).

## **Experimento 2**

Este experimento seguiu o desenho do experimento 1 e teve como objetivo principal observar o tempo no qual os animais permanecem negativos após receberem ração com ivermectina. Não foi observada recidiva nos animais medicados por um período até 11 semanas após o fim do tratamento (Grupo 1). Os animais do grupo controle permaneceram positivos por todo o período experimental (tabela 5).

**Tabela 5.** Número de animais positivos que permanecem livres da infecção por *Syphacia obvelata* após tratamento com ração associada com ivermectina. Camundongos receberam a ração com ivermectina por 1,2,4 e 8 semanas e foram observados até o fim da 12ª semana. Os dados apresentados (x/y) representam o número de animais positivos (x) para o número de animais testados (y).

	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12		
	Fita	Fita	Fita	Fita	Fita	Fita	Fita	Fita	Necropsia	P
<b>Iver1sem</b>	0/5	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	< 0,01
<b>Iver2sem</b>	-	0/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	< 0,01
<b>Iver4sem</b>	-	-	0/5	-	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	< 0,01
<b>Iver8sem</b>	-	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	< 0,01
<b>Controle</b>	-	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	< 0,01

### **Grupos tratados com ivermectina**

Ao final do tratamento para cada grupo experimental, os animais foram avaliados por fita adesiva e não foi detectada a presença do parasita *S. obvelata* (0/5- número de animais positivos para número de animais testados) em nenhum dos grupos (tabela 5). A partir desta avaliação, foi interrompida a ração com ivermectina e eles passaram a receber a ração Rhoster sem Ivermectina. Ao final das 12 semanas do experimento os animais de todos os grupos experimentais foram avaliados pela fita e necropsia e apresentaram resultado negativo (tabela 5).

### **Grupo controle**

Os animais do grupo controle estavam positivos para *S.obvelata* (5/5) no início do estudo e receberam somente a ração controle sem ivermectina. Eles permaneceram neste estado por todo o período experimental de 12 semanas (tabela 6).

**Tabela 6.** Período pós tratamento que os animais controle permaneceram negativos para *Syphacia obvelata*. Os dados apresentados (x/y) representam o número de animais positivos (x) para o número de animais testados (y).

<b>Tratamento</b>	<b>Período pós tratamento no qual os animais permaneceram negativos</b>
<b>GrupoIver 1sem</b>	11 semanas (5/5) negativo
<b>GrupoIver 2sem</b>	10 semanas (5/5) negativo
<b>GrupoIver 4sem</b>	8 semanas (5/5) negativo
<b>GrupoIver 8sem</b>	4 semanas (5/5) negativo

### **Experimento 3**

Neste experimento, a ração associada com ivermectina foi testada em uma colônia com 84 camundongos infestados pelo parasita *Syphacia obvelata*. A técnica utilizada foi a da fita adesiva e foi observado 71,4% de positividade para *S.obvelata* (60/84).

Após uma semana de tratamento 100% dos animais (84/84) apresentaram teste de fita adesiva negativo para a presença de ovos do parasita *S. obvelata*. Na segunda semana 9 animais da linhagem BALB/c foram retirados do experimento e os 75 animais restantes foram avaliados mais uma vez 100% (75/75) permaneceu negativo com o teste da fita adesiva. Nove destes animais foram necropsiados e não foram encontrados parasitas (Tab. 7).

**Tabela 7.** Quatro colônias de camundongos positivos para *Syphacia obvelata* receberam a ração com ivermectina por duas semanas. Eles foram avaliados 1 e 2 semanas após o início do fornecimento da ração.

	<b>N</b>	<b>Animais positivos</b>	<b>Semana 1</b>	<b>Semana 2</b>	<b>P</b>
<b>F1B6BALB</b>	15	12/15 (80%)	0/15	0/15	< 0,01

<b>C57BL/6</b>	15	6/15 (40%)	0/15	0/15	< 0,01
<b>BALB/c</b>	33	27/33 (81,8%)	0/33	0/33	< 0,01
<b>Swiss</b>	21	12/21 (57,1%)	0/21	0/21	< 0,01

#### **Experimento 4**

Este experimento também avaliou a eficiência da ração em segunda colônia de camundongos positiva para *S. obvelata* na UFRJ. Quarenta camundongos da linhagem BALB/c participaram do experimento. Na avaliação inicial antes do início do tratamento, 100% (40/40) dos animais estavam positivos para *Syphacia* por meio do teste da fita adesiva. Após uma semana, os 40 animais expostos a ração com ivermectina apresentaram teste da fita adesiva negativo para o parasita avaliado. Neste experimento, as técnicas de sedimentação e flutuação também foram realizadas com fezes coletadas das gaiolas e também apresentaram resultado negativo para ovos de *S. obvelata*.

## **DISCUSSÃO**

*Syphacia obvelata* é um dos mais prevalentes encontrados nos levantamentos parasitários de animais de laboratório (GILIOLI et al., 2000; BICALHO et al., 2007). O uso de uma ração suplementada com ivermectina para tratamento deste parasita foi testada neste projeto. Foram realizados quatro experimentos e coletivamente os resultados sugerem que a ração suplementada com ivermectina foi eficaz no controle da *Syphacia obvelata*.

A utilização da ração como veículo para o tratamento de roedores possui muitas vantagens sobre outros métodos, como o tratamento individual por gavagem, a introdução do princípio ativo na água de bebida, a pipetagem de micro gotas, o uso de spray ou a aspersão no dorso dos animais (“pour on”). A estabilidade do princípio ativo no pellet reduz riscos de alteração físico-química, permite a concentração e distribuição uniforme e o controle de qualidade da fabricação.

O trabalho associado à realização de procedimentos, tais como a gavagem e a aplicação individual repetida por diversos dias são dificuldades de manejo na rotina dos

biotérios que apontam o uso da ração associada como estratégia de tratamento. A realização de tratamento sem nenhuma necessidade de alteração da rotina dos animais facilita o procedimento e reduz consideravelmente o tempo de contato com os animais (ARBONA et al., 2010b).

A ivermectina é um medicamento de baixo custo e encontra-se no mercado sob forma de premix, já adequado para a incorporação na ração industrializada. A utilização comercial de ração com Ivermectina é comum em países da Europa e nos Estados Unidos para tratamento de *Myocoptes musculinus* e *Myobia muscili*, ácaros comuns em roedores de laboratório (ARBONA et al., 2010b). Porém, nenhum estudo foi encontrado sobre uso da ração suplementada com ivermectina para o tratamento da *S. obvelata*.

Não há relatos de ração para roedores suplementada com ivermectina produzida no Brasil. A empresa Nuvital (atual Quimtia) produziu uma ração suplementada com fenbendazole por alguns anos, porém este produto não é mais produzido. A empresa Rhooster, tem experiência no desenvolvimento de rações experimentais para roedores e se prontificou a produzir a ração utilizada neste estudo após entrarmos em contato e manifestarmos nosso interesse e intenção.

Poucos estudos relatam a prevalência de parasitas em animais de laboratório nos biotérios brasileiros. Em um estudo num biotério experimental da Universidade de Santa Maria - RS a prevalência observada de infecção por *S. obvelata* foi de 80% (DOYLE et al., 2006). Uma outra avaliação com 13 biotérios identificou uma taxa de 92% de presença de *S. obvelata*. (BICALHO et al., 2007).

Resultados de pesquisas realizadas em animais de laboratório podem ser afetados por agentes infecciosos presentes nas colônias com diminuição da sensibilidade e precisão destes (BAIRD et al., 1982). Desta forma, modelos animais comprometidos em seus aspectos sanitários podem gerar resultados imprecisos e sujeitos à invalidação.

Os biotérios utilizam preferencialmente tratamentos com ivermectina por via oral seja para *Syphacia* sp. ou outros endoparasitas e ectoparasitas. Vários estudos demonstraram sucesso com tratamentos à base de ivermectina na água de bebida (Tabela 2).

O uso da Ivermectina como terapia anti-helmíntica tem demonstrado eficácia quando aplicada de forma isolada (ARBONA et al., 2010b; KLEMENT et al., 1996;

MOREIRA et al., 2013;) ou em associação com outros medicamentos como piperazina (LIANG et al., 2004) e fenbendazol (ZENNER, 2016). Concentrações de 0,5 a 2,0 mg/Kg e tempos de aplicação de 7 a 10 dias de intervalo foram utilizados nestes trabalhos. Baseado nas observações de (ARBONA et al., 2010a) para erradicação de *Myocoptes musculus* e *Myobia musculi*, a concentração de 12 ppm de ivermectina foi escolhida para a composição da ração associada no presente estudo.

Observando seu uso na ração para o controle de ácaros (ARBONA et al., 2010b), o presente trabalho propôs produzir e testar a utilização de uma ração suplementada com ivermectina no tratamento da *S. obvelata*.

O primeiro experimento do presente estudo observou tratamentos com ivermectina na ração por diferentes períodos para verificar o momento da eficácia terapêutica. O desenho experimental foi baseado em trabalhos da literatura que indicavam períodos de tratamento longos com intervalos sem medicação (ARBONA et al., 2010b, MOREIRA et al., 2013). Desta forma, os períodos de tratamento escolhidos foram 1, 2, 4 e até 8 semanas consecutivas.

Já na primeira semana foi observada a ausência total do parasita por meio dos testes de fita adesiva e necropsia. A ausência dos parasitas também foi observada nas semanas seguintes do estudo, sempre pelos testes de fita adesiva e necropsia. Em todas as semanas avaliadas, o grupo controle não tratado permaneceu positivo para *Syphacia*, portanto, foi observada uma importante diferença entre o presente estudo e a literatura em relação ao tempo de tratamento. Apesar do uso por períodos prolongados, no presente estudo ficou claro que uma semana foi suficiente para a eliminação total destes parasitas.

Observamos que a introdução abrupta de ração terapêutica à base de ivermectina na dieta dos animais supracitados, de forma mesclada à rotina diária de manejo no biotério não ocasionou alteração clínica visível e modificações de comportamento derivadas de estresse manipulativo.

A metodologia aplicada favorece a manutenção da rotina normal que os animais se submetem e dispensa a necessidade de alteração prolongada da agenda de utilização/fornecimento dos animais, mostrando a total adaptabilidade da metodologia à rotina de manejo de roedores de biotério.

Foi observado que na segunda semana do primeiro experimento (relativo portanto, ao grupo **Iver 2sem**), seu grupo controle apresentou-se positivo para ovos de *S. obvelata* na fita adesiva e negativo na necropsia.

Já em observação seguinte na quarta semana houve uma inversão destes resultados com o grupo controle negativo para o parasita na fita adesiva e positivo para necropsia. Na oitava semana, os animais do grupo controle apresentaram-se positivos na necropsia e negativos na observação por fita.

As técnicas mais comumente utilizadas para diagnóstico de *Syphacia sp.* são as de necropsia e visualização de conteúdo fecal (ceco e cólon), método Graham (fita adesiva), swab anal; exame direto de fezes em lâmina e exame histológico (HILL et al.; 2009). Em outro trabalho, vários métodos de detecção de oxiurídeos são indicados, porém o de maior sensibilidade foi a necropsia e exposição do conteúdo em placa de Petri, de forma a visualizar a presença de parasitos (EFFLER et al., 2008).

Nestes dois últimos trabalhos, os autores concordam com a eficácia do método de necropsia e visualização em placa de Petri e o método de Graham para o diagnóstico de *Syphacia muris* e *S. obvelata*. Os dois trabalhos sugerem a utilização de mais de um método diagnóstico nas pesquisas de *Syphacia*.

No entanto, em uma comparação entre duas técnicas parasitológicas para *Syphacia sp.* (fita adesiva e exame direto) realizada em 60 camundongos, a detecção foi superior na primeira técnica (50%) em comparação com a segunda (8,3%; SANTOS et al., 2017). Estes resultados sugerem a necessidade de utilização diagnóstica de, pelo menos, duas técnicas laboratoriais, corroborando recomendações onde a eficácia máxima de um único método de diagnóstico não ultrapassa 85,0% (EFFLER et al., 2008; HILL et al., 2009).

Em uma avaliação de métodos de detecção para *S. obvelata*, foi observado a ineficácia do uso de testes em separado e a recomendação da utilização de 2 ou mais testes foi, mais uma vez ratificada (GERWIN et al., 2017).

Segundo Effler et al., 2008 há pouca informação a respeito das técnicas para detecção de oxiurídeos, disponíveis na literatura. Possíveis falhas no diagnóstico por fita adesiva podem ser causadas por inexperiência na técnica por parte dos operadores, carga parasitária, horário da coleta e idade do hospedeiro (HILL et al., 2009).

Em um estudo onde foi avaliado a viabilidade dos ovos, foi observado que permanecem viáveis por até 7 meses, o sexo do hospedeiro não influi na quantidade de

ovos eclodidos, o índice de eclosão aumenta ao entardecer e os resultados das técnicas de fita e necropsia não são coincidentes (MEADE, 2014).

Alguns fatores como idade, sexo, linhagem e status do hospedeiro podem afetar a taxa infecção de *S. obvelata*, em camundongos (TAFFS, 1976). Esta taxa decai de acordo com a idade do hospedeiro, machos tendem a ser mais infestados que fêmeas, linhagens inbred tendem a ser mais suscetíveis e ter alta prevalência, o que sugere uma implicação genética para a resistência do parasito.

Uma possível interação entre a *Syphacia sp.* e a flora microbiana intestinal do hospedeiro foi observada, em um estudo onde foram isoladas 5 bactérias presentes na flora intestinal de animais parasitados que não foram encontrados em meio ambiente (TAFFS, 1976). Este resultado indica uma possível influência microbiana específica na sobrevivência do parasito. Nesta mesma linha, outro estudo realizado demonstrou a incapacidade do *Aspiculuris sp.* infestar camundongos Germfree (PRZYJALKOWSKI, 1998).

Foi relatada também uma relação entre a infecção por *Syphaciasp.* e o sistema imunológico. Foi observada uma resistência a infecção por *Syphacia obvelata* relacionada com a idade em camundongos entre a quarta e a nona semana de idade. Porém, não foi possível demonstrar anticorpos no soro de animais positivos (PANTER, 1969).

Em ratos, após sucessivas infestações por *S. muris*, alguns animais se tornaram refratários enquanto que outros permaneceram suscetíveis (ROMAN, 1969). Entretanto, os animais do presente estudo se encontravam na faixa de idade relatada e todos os animais estavam positivos, portanto não foi observada a resistência relatada por Panter, em 1969.

O desenho do segundo experimento foi semelhante ao primeiro porém o objetivo foi avaliar quanto tempo os animais permaneceriam sem uma reincidência da infecção. O resultado mais importante deste estudo foi observado nos grupos 1 e 2. Os animais receberam a ração com ivermectina por 1 e 2 semanas respectivamente e após uma semana de tratamento já estavam negativos. Este estado negativo permaneceu até a 12<sup>a</sup> semana quando foram avaliados com o teste da fita adesiva e necropsia. O mesmo ocorreu nos outros grupos, porém para o grupo 1 foram 11 semanas expostos a rotina do biotério sem uma reinfecção.

*Syphacia sp.* tem um ciclo biológico curto e isto facilita infestações em curto período de tempo (BICALHO et al., 2007; FLYNN, 1973). Em um estudo de detecção de

oxiurídeos através da poeira em um biotério foi comprovada a alta transmissibilidade destes parasitas em caixas de coleta, ventilação, sistemas de ventilação, gaiolas e mãos dos operadores (LYTVYNETS et al, 2013) o que ressalta o seu difícil controle.

As possíveis causas de recidiva estão ligadas a um diagnóstico errado, seja por falha do técnico na hora da coleta e exame, posterior manutenção de animais infectados na colônia, tratamento incorreto, com doses abaixo das terapêuticamente utilizadas com eficácia comprovada e falha em quaisquer variáveis envolvidas no programa de manejo sanitário (água, substrato, gaiolas, estantes, materiais, Epi's, estruturas físicas) (HILL et al., 2009).

No experimento 3, as cinco colônias de diferentes linhagens apresentaram-se negativas para o parasita após a primeira semana de tratamento. Os animais foram avaliados mais uma vez na segunda semana de tratamento e permaneceram negativos. No experimento 4 somente uma colônia da linhagem BALB/c foi tratada e também apresentou resultados negativos para *S. obvelata* em uma semana de tratamento.

Os experimentos 3 e 4 tiveram como objetivo simular uma situação usualmente encontrada em biotérios. Colônias de animais positivos para *S. obvelata* foram tratados sem a presença simulando uma situação real sem a presença de um grupo controle. Todos os animais eram positivos para *S. obvelata* e receberam a ração com ivermectina.

Coletivamente, estes dois experimentos reforçam os resultados do primeiro e do segundo experimento nos quais após uma semana de tratamento com a ração associada, não foram encontrados camundongos positivos para *S. obvelata*, independente da linhagem, idade ou sexo.

Observamos que mesmo com a possibilidade de reinfecção pelo ambiente em que estavam alojados, bem como pela maior quantidade de animais infestados pelo parasito, a utilização da ração obteve sucesso neste tipo de desafio, o que nos faz inferir positivamente quanto à efetividade, mesmo em biotérios com pouca proteção e observação quanto aos aspectos sanitários.

São poucos os trabalhos que usaram a ivermectina especificamente para tratamento de *Syphacia sp.* e estes apresentaram tempo de tratamento variado. Sucesso no tratamento da *Syphacia sp.* com 7 dias de exposição a ivermectina foi observado em quando o medicamento foi adicionado na água (MOREIRA et al., 2013).

Outros trabalhos também apresentaram sucesso no tratamento de *Syphacia sp.* com o uso de ivermectina. A aplicação da ivermectina por meio da gavagem por um período de 20 dias obteve um resultado positivo na erradicação (FLYNN ET AL., 1989; HUERKAMP ET AL., 1990). Em dose única não obteve sucesso (OSTLIND ET AL., 1985).

O uso de spray com ivermectina sobre o animal com 1 aplicação semanal por 3 a 5 semanas, teve sucesso na erradicação (LEBLANC ET AL., 1993; SUETA ET AL., 2002; CHAWLA ET AL., 2015). O uso de micro gotas em 2 doses com intervalo de 10 dias obteve sucesso (PRITCHETT; JOHNSTON, 2002). A utilização na água de bebida por 24 horas não obteve sucesso na erradicação (HASSLINGER; WIETHE, 1987), mas seu uso prolongado, trouxe sucesso, embora com tratamentos de 4 dias ininterruptos, com 5 repetições e intervalos de 3 semanas (KLEMENT et al., 1996), ou 2 tratamentos com duração de 3 semanas cada e intervalos de 15 dias (MOREIRA et al., 2013). De forma geral, os períodos de tratamento variaram entre 1 dia e até 7 semanas (HICKMAN et al., 2008), e o sucesso dos tratamentos varia entre 80-100%.

No presente estudo o sucesso do tratamento foi de 100% nos quatro experimentos realizados e sempre em um período mínimo de sete dias. A grande diferença para os trabalhos presentes na literatura foi a apresentação da ivermectina como parte integrante da ração.

Foi observado que o parasita tem um ciclo biológico entre 11 e 15 dias e seu período de eclosão é de 5 a 20 horas (TAFFS, 1976). Desta forma a exposição das larvas recém eclodidas ao princípio ativo é rápida. A ivermectina atinge seu pico plasmático máximo de 90 ng/ml cerca de 24 h após ingestão, com meia vida de 24h (CONOLE et al., 2003). Portanto, é de se esperar que seu mecanismo de ação inicie de forma rápida após o início de sua administração. Considerando o ciclo parasitário curto da *Syphacia sp.*, a constante ingestão da ração associada a ivermectina e a manutenção de níveis plasmáticos terapêuticos nos animais, pode-se inferir que 48 a 96 horas de tratamento continuado levem a uma eficácia na eliminação do parasita de 100%.

Diversos trabalhos que sugerem períodos de tratamento mais longos ou intervalos entre tratamentos (KLEMENT et al., 1996, HICKMAN et al., 2008). É importante entender se essa recomendação é baseada em resultados encontrados ou por uma questão de aumento da margem de segurança do produto.

Não houve óbito decorrente da utilização da ração associada, bem como não foi observado entre os animais submetidos ao experimento distúrbios gastrointestinais pela troca da ração. Da mesma forma não foram observadas quaisquer alterações clínicas quando os animais retornaram à ração original após os testes realizados. Estes resultados sugerem a segurança da ração testada.

Porém, não foram realizados neste estudo experimentos com a ração após a autoclavação ou irradiação. A estabilidade da ivermectina após a autoclavação ou irradiação é uma informação essencial para o seu uso em biotérios que utilizam estes processos de desinfecção da ração. Por outro lado, boa parte dos biotérios positivos para *S. obvelata* são considerados convencionais e não utilizam técnicas de desinfecção da ração. De qualquer forma, novos experimentos serão programados para testar a resistência da ivermectina a estes processos.

## **CONCLUSÃO**

Baseados nos resultados do presente estudo, animais tratados com a ração suplementada com ivermectina a 12 ppm apresentam-se negativos para *S. obvelata* após 7 dias. Os resultados do experimento II indicam que estes animais permanecem negativos por um período não inferior a 11 semanas pós-tratamento.

## **PRODUTO FINAL DO ESTUDO**

O produto deste projeto foi o desenvolvimento de uma ração associada com ivermectina a 12 ppm que se mostrou eficaz no tratamento do parasita *S. obvelata*, prevalente em muitos biotérios brasileiros.

### ***Recomendações quanto ao produto***

Como parte deste produto, foi elaborada uma orientação para utilização desta ração. As orientações propostas são baseadas nos resultados de sua eficácia quando oferecida por um período de 7 dias sem a necessidade de interrupção e repetição do tratamento.

Além do tratamento com a ração é importante que ações de higiene e prevenção sejam seguidas para impedir a reinfecção. Os métodos de controle sanitário em biotérios têm a sua eficácia diretamente atrelada à correta compreensão e observância dos processos relativos à utilização das barreiras primárias e secundárias (instalações, materiais, suprimentos) bem como ao correto manejo técnico do animal.

Seguem, portanto as orientações propostas para o tratamento de uma colônia de camundongos por meio da ração com ivermectina a ser procedida juntamente com medidas de limpeza e prevenção:

1. Avaliação diagnóstica por meio de fita adesiva para estimar a incidência do parasito. Se possível realizar a necropsia por uma amostragem representativa dos animais.
2. Troca completa das caixas, bebedouro, cama e grade por material esterilizado:
3. Após esta troca, fornecimento de ração associada a ivermectina.
4. Todos os animais do biotério devem ser tratados ao mesmo tempo para evitar reinfecção.
5. Limpeza da sala dos animais e do material ali existente com produtos de ação desinfetante e esterilizante adequados a cada situação. Os racks, as estantes, paredes, teto, piso, estações e mesas de trocas e carrinhos. Todos os equipamentos e superfícies do ambiente devem ser higienizados.

6. Esterilização do material utilizado na manutenção das colônias, rouparia e Epi's. Atenção às regras e recomendações em ambientes bioprottegidos. Constante treinamento de pessoal.
7. Manutenção da ração por pelo menos uma semana.
8. Avaliação parasitológica após uma semana de tratamento com utilização dos métodos de fita adesiva, flutuação e sedimentação, bem como uma avaliação parasitológica mensal em uma amostragem dos animais para identificar possível reinfecção.
9. Em caso de reinfecção, medidas de vigilância epidemiológica/sanitária devem ser tomadas e ações de controle colocadas em ação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, T. Fundação Oswaldo Cruz. **Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios**, Bol. Centr. Panam. Fiebre aftosa, 64-67, 1998-2001.

ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, R.S. orgs. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 388 p. ISBN: 85-7541-015-6, 2002.

ARBONA. R. R.J.; LIPMAN N.S.; WOLF F. **Treatment and eradication of murine fur mites: I. Toxicologic evaluation of ivermectin impregnated feed**. J Am. Ass. Lab. Anim. Sci 49, N° 5: 564-570, 2010(a).

ARBONA. R.J.R.; LIPMAN N.S.; WOLF F. **Treatment and eradication of murine fur mites: III. Treatment of a large mouse colony with Ivermectin-compounded feed**. J Am Ass. Lab AnimSci 49, N° 5: 633-637, 2010(b).

BAKER, D.G. **Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research**. Clin. Microbiol. Rev., v.11, p.231-266, 1998.

BAIRD, S.M.; BEATTIE, G.M.; LANNOM, R.A; GILLIAN M.; KNOWLES A.F.; JENSEN F. C.; KAPLAN N.O. **Induction of lymphoma in antigenically stimulated athymic mice**. Cancer Res., v.42, p.198-206, 1982.

BATTLES, A. H.; ADAMS S.W.; COURTNEY C.H; MLADINICH R. . **Efficacy of ivermectin against natural infection of Syphacia muris in rats**. Lab. Anim. Sci.37: 791-792, 1987.

BAZZANO, T.; RESTEL, T.I.; PINTO, R.M.; GOMES, D.C. **Patterns of Infection with the Nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in Conventionally Maintained Laboratory Mice.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(6): 847-853, September, 2002.

BICALHO, K.A.; ARAÚJO, F.T.M.; ROCHA, R.S.; CARVALHO, O.S. **Perfil sanitário de colônias de camundongos e ratos de biotérios de Minas Gerais: I-Endo e ectoparasitos.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., vol.59, n.6, pp.1478-1484. ISSN 1678-4162, 2007.

BLANES S.; ROBERTO, S.C.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L.F.P. **Aspectos fundamentais da experimentação animal – Aplicações em cirurgia experimental.** Revista da Associação Médica Brasileira, v.56, n.1, p.103-111, 2010.

BRESSAN M.; VIEIRA C.R.; CALGARO G.A.; ALEXANDRE S.R.; MARQUES T. **Prevalence of ecto and endoparasites in mice and rats reared in animal houses.** R. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. São Paulo, v.34. n.S. p. 142-146. 1997.

BURG, R.W.; MILLER, B.M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S.A.; HARTMAN, R.; KONG, Y.L.; MONAGHAN, R.L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC J.B.; WALLICK H.; STAPLEY E.O.; OIWA R.; OMURA S. **Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation.** Antimicrob. Agents Chemother., v.15, p. 361-367, 1979.

CHABALLA, J.C.; MROZIK, H.; TOLMAN, R.L.; ESKOLAA, P.; LUSI, A.; PETERSON, L.H.; WOODS, M.F.; FISHER M.H. **Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 23, p.1134-1136, 1980.

CHAWLA, S.; JENA, S.; PRUSTY, B. **Different Treatment Regimen for Eradication of Pinworm (*Syphacia obvelata*) Infection in Mice Colony.** Journal of Animal Research: Vol 56, No 1, 2015.

CHEN, X.M.; LI, X.; LIN, R.Q.; DENG, J.Y.; FANWY, YUAN Z.G.; LIAO, M.; ZHU, X.Q. 2011. **Pinworm infection in laboratory mice in southern China.** Laboratory Animals, 45: 58 –60, 2011.

COATS, M. E. **Muhlbock memorial lecture: man, microbes and models.** Lab Anim Sci. 42:436-438, 1992.

CONOLE, J.; WILKINSON, M.J.; MCKELLAR, Q. A. **Some Observations on the Pharmacological Properties of Ivermectin during Treatment of a Mite Infestation in Mice.** Contemporary Topics. The American Association for Laboratory Animal Science. Volume e 42, No. 4 / July 2003.

COOKE, A.; TONKS, P.; JONES, F.M.; O'SHEA, H.; HUTCHINGS,

P.; ULFORD, A.J.C.; DUNNE, D.W. **Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice.** Parasite Immunol 21:169–176, 1999.

DAVIS J.A.; PAYLOR R.; MCDONALD, M. P.; LIBBEY M.; LIGLER A.; BRYANT K.; CRAWLEY J.N. **Behavioral effects of ivermectin in mice.** Lab Anim Sci Vol 49 N°3, 1999.

DOYLE R.L.; MONTEIRO S.G.; GRAÇA D.L.; SANTURIO J.M.; SILVA A.S.; BERTOLIN K. **Helminthologic Evaluation of mice (*Mus musculus*) Raised in an experimental mouse house.** Revista da FZVA. Uruguaiiana, v.13, n.2, p. 108-115. 2006.

EFFLER, J.C; HICKMAN-DAVIS, J.M.; ERWIN, J.G.; CARTNER, S.C.; R. SCHOEB, T.R. **Comparison of methods for detection of pinworms in mice and rats.** Lab Animal 210, Volume 37, No. 5, May 2008.

ENES, S., em: ANDRADE, A., PINTO, SC., AND OLIVEIRA, RS. **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** 59-64 Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

FLYNN R.J.; HEYNEMAN, D. Nematodes. In: Flynn, R.J. **Parasites of laboratory animals.** 1<sup>st</sup> ed. Iowa state University, 1973.

FLYNN, B.M.; BROWN, P.A.; ECKSTEIN, J.M.; STRONG, D. **Treatment of *Syphacia obvelata* in mice using ivermectin.** Lab Anim Sci. 1989 Sep; 39(5):461-3. Lab Anim. Jul; 32(3):337-42, 1989.

FRAZIER J. M.; GOLDBERG A. M. **Alternatives to and reduction of animal use in biomedical research, education and testing.** Alternatives to laboratory animals: ATLA. Animal Studies Repository. 1990.

GERWIN, P.M.; ARBONA, R.J.R.; RIEDEL, E.R.; LEPHERD, M.L.; HENDERSON, K.S.; LIPMAN, N.S. **Evaluation of Traditional and Contemporary Methods for Detecting *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera* in Laboratory Mice.** Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, January 2017 PP 32–41 v.5 n.2, p. 321-324. 2017.

GILIOLI, R.; SAKURADA, J.K.; ANDRADE, L.A.G. **Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities.** Lab. Anim. Sci., v.46, p.582-584, 1996.

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 of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52(1): 33-37. 2000.

GILIOLI, R. **Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos.** Universidade Estadual de Campinas, SP: 2003.

GIRIDHARAN, N.V.; KUMAR, V.; VASANTHA, M. **Use of Animals in Scientific Research.** Indian Council of Medical Research Ministry of Health & Family Welfare New Delhi, 2002.

GÓRSKA, P. **Principles in laboratory animal research for experimental purposes.** Med SciMonit. 6(1): 171-180, 2000.

GABER, R.A. **Syphacia obvelata (Nematode, Oxyuridae) infecting laboratory mice *Mus musculus* (Rodentia, Muridae): phylogeny and host-parasite relationship.** Parasitol Res 115:975–985, 2016.

GRAHAM, C.F. **A device for the diagnosis of *Enterobius* infection.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Volume s1-21, Issue 1 Jan. p. 159 – 161, 1941.

HASSLINGER, M.A.; WIETHE, T. **Oxyurid infestation of small laboratory animals and its control with ivermectina.** TierarztlPrax. 15(1):93-7, 1987.

HICKMAN, D.; SWAN, M.; HARTMAN, G.P. **A cost-effective and efficacious method of pinworm treatment for large colonies of mice.** www.labanimal.com 308 Volume 37, No. 7, July 2008.

HILL W.A.; RANDOLPH, M.M.; MANDRELL, T.D. 2009. **Sensitivity of perianal tape impressions to diagnose pinworm (*Syphacia spp.*) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*).** Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, Vol 48, No 4 July, pp. 378–380, 2009.

HOAG, W.G. **Oxyuriasis in laboratory mouse colonies.** Am J Vet Res 22: 150-153, 1961.

HOWARD, B.; NEVALAINEN, T.; PERRETTA, G. **The cost Manual of Laboratory Animal Care and Use: Refinement, Reduction, and Research.** October 12 by CRC Press, 2010.

HORNBERGER, F. R.; BOOT, R.; FEINSTEIN, R.; KORNERUP-HANSEN, A.; VAN DER LOGT, J. FELASA. Federation of European Laboratory Animal Science Associations. **FELASA guidance paper for the accreditation of laboratory animal diagnostic laboratories.** Lab Anim. 33(suppl. 1):19-51, 1999.

HUERKAMP, M.J.; BENJAMIN, K.A.; ZITZOW, L.A.; PULLIUM, J.K.; LLOYD, J.A.; THOMPSON, W.D.; WEBB, S.K.; LEHNER, N.D. **Fenbendazole treatment without environmental decontamination**

**eradicates *Syphacia muris* from all rats in a large, complex research institution.** Am. Ass. Lab. Anim. Sci. 39 N° 3: 9-12, 2000.

Ilic, V.; Krstic, A.; Katic-Radivojevic, S.; Jovicic, G.; Milenkovic, P.; Bugarski, D. ***Syphacia obvelata* modifies mitogen-activated protein kinases and nitric oxide synthases expression in murine bone marrow cells.** Parasitol Int 59:82–88 2010.

JACOBY R.O.; FOX J.G.; DAVISSIN M. **Biology and Diseases of Mice.** In: \_\_\_\_\_ **Laboratory animal medicine**, FOX JG, ANDERSON LC, LOEW FM, QUIMBY F.W., editors. 2<sup>nd</sup> ed. Orlando (FL): Academic Press, 2001.

JOHNSTON, N.A.; TRAMMEL, R.A.; BALL-KELL, S.; VERHULST, S.; TOTH, L.A. **Assessment of immune function in mice before and after eradication of mite infestation.** L. Am. Ass. Anim. Sci. 48: 371-377, 2009.

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.** Lab anim Sci 46: 286-290, 1996.

LEBLANC M.; BERRY K.; GRACIANO S.; BECKER B.; REUTER J.D. **False-Positive Results after Environmental Pinworm PCR Testing due to Rhabditid Nematodes in Corncob Bedding.** Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, Vol 53, No 6 Pages 717–724, November 2014.

LIANG, C.T.; LEE, P.C.; WU, S.C.; HUANG, Y.T.; CHANG, W.J.; TA-YU, H.S.C.; LIANG, S.C. **Effective eradication of pinworm infection (*Syphacia muris*, *Syphacia obvelata*) from a large rodent breeder center.** Taiwan vet j 30 (2): 106-115, 2004.

LIMA G.J.M.M.; NONES K. **Determinação do tempo ótimo de mistura de um misturador de rações.** Instrução técnica para o suinocultor. Área de Comunicação Empresarial. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997.

LYTVYNETS, A.; LANGROVÁ, I.; LACHOUT, J.; VADLEJCH, J.; FUCIKOVÁ, A.; JANKOVSKÁ, I. **Drinking water treatment for eradication of pinworm infections from laboratory colonies.** Helminthologia, 47, 4: 233-237, 2010.

LYTVYNETS, A.; LANGROVA, I.; LACHOUT, J.; VADLEJCH, J. **Detection of pinworm eggs in the dust of laboratory animals breeding facility, in the cages and on the hands of the technicians.** Laboratory Animals 47: 71–73, 2013.

MAJEROWICZ, J. **Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do laboratório de experimentação animal (Laean) de Bio-Manguinhos**. 101 pp.. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos). Rio de Janeiro - Instituto Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2005.

MARTIN, R.J. **Modes of Action of Anthelmintic Drugs**. The Vet. Journal 154, 11-34,1997.

MCKELLAR, Q.A.; BENCHAOUI, H. **Avermectins and milbemicyns**. Journal Veterinary Pharmacology Therapy, v.19, p. 331-351, 1996.

MEADE TM.; 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 Vol. 53, No 6, PP 661–667. November 2014.

MÉNEZ C.; SUTRA, J.F; PRICHARD, R.; LESPINE, A. **Relative Neurotoxicity of Ivermectin and Moxidectin in Mdr1ab (2/2) Mice and Effects on Mammalian GABA (A) Channel Activity**. PLOS Neglected Tropical Diseases [www.plosntds.org](http://www.plosntds.org). November, Volume 6 Issue 11.e1883,2012.

MENEZES, R.A.O.L; GOMES, M.S.M; BARBOSA, F. H. F; MACHADO, R. L. D; ANDRADE, R. F; COUTO, A.A.R.D´ALMEIDA. **Sensibilidade de métodos parasitológicos para o diagnóstico das enteroparasitoses em Macapá – Amapá, Brasil**. Revista de Biologia e Ciências da Terra. vol. 13 – Nº 2, pp.66-73.

MICHELS, C.; GOYAL, P.; NIEUWENHUIZEN, N.; BROMBACHER, F. **Infection with *Syphacia obvelata* (pinworm) induces protective Th2 immune responses and influences ovalbumin-induced allergic reactions**. InfectImm. Oct;74(10):5926-32, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa N.º 65**, de 21 de novembro de 2006.

Molinaro, E. M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 5** EPSJV; IOC 476 p.: il., tab., graf. ISBN: 978-85-98768-41-0,2012.

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

MULLINK, J.W.M.A. **Pathological Effects of Oxyuriasis in the laboratory mouse**.LabAnim 4: 197-201, 1970.

NEVES S.M.P. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP** - São Paulo: FCF-IQ/USP 216 p. il. 2013.

Ostlind, D., Nartowicz, M., & Mickle, W. **Efficacy of ivermectin against *Syphacia obvelata* (Nematoda) in mice.** Journal of Helminthology, 59(3), 257-261, 1985.

OSTLIND, D. A.; MICKLE, W.G.; SMITH, S.; EWANCIW, D.V.; CIFELLI, S. **Efficacy of Ivermectin Versus Dual Infections of *Haemonchus contortus* and *Heligmosomoides polygyrus* in the Mouse.** Journal of Parasitology 99(1):168-169. 2013.

PANTER, HC. **Studies on host-parasite relationships. *Syphacia obvelata* in the mouse.** J Parasitol. Feb;55(1):74-8, 1969.

PINTO, R.M.; VICENTE, J.J; NORONHA, D.; GONÇALVES, L.; GOMES, D.C. **Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 89 (1): 33-40, Jan. /Mar. 1984.

POLITI, F.A.S.; MAJEROWICZ, J.; CARDOSO, T.A.O.; PIETRO, R.C.L.R.; SALGADO, H.R.N. **Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança.** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., vol. 29, n.1, p. 17-28, ISSN 1808-4532, 2008.

POOLE, T. **Happy animals make good science.** Lab Anim. Apr: 31(2):116-24, 1997.

PRITCHETT, K. R.; JOHNSTON, N.A. **A Review of Treatments for the Eradication of Pinworm Infections from Laboratory Rodent Colonies.** CONTEMPORARY TOPICS 2002 by the American Association for Laboratory Animal Science Volume 41: 36-46, No. 2 / March 2002.

PRZYJALKOWSKI, Z. **Investigations on the establishment of *Aspicularis tetraptera* Nitzsch, 182/ (Nematoda, Oxyuridae) in germ-free mice.** Acta parasitologica polonica 20, 389-395, 1972.

QUIMBY, F.W. **Twenty-five years of progress in laboratory animal science.** Lab Anim, 1 April 28: 158 – 171, 1994.

RAIZEN, D.; SONG B.; TROJANOWSKI, N.; YOU, Y. **Methods for measuring pharyngeal behaviors.** WormBook, Ed. The C. Elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895 / wormbook.1.154.1, 2012.

ROMAN, E. **Modalités d'infestation et résistance au parasitisme dans l'oxyurose du rat a *Syphacia muris*.** Bulletin de l'Association des diplômés de microbiologie de la Faculté de pharmacie de Nancy No. JJ4, 7 pp. 1969.

ROZENKRANZ, A.; JURKIEWCZ, A.; CORRADO, A. **Situação dos biotérios brasileiros: fator limitante de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos de produtos naturais.** Ciênc. Cult. Vol. 32, p. 156-163, 1978.

SATO, Y.; OOI, H.K.; NONAKA, N.; OKU, Y.; KAMIY, A. M. **Antibody production in *Syphacia obvelata*-infected mice.** J Parasitol 81:559–562. 1995.

SANTOS, I.S.; SILVA, C.S.; SILVA, C.H.; SILVA, T.O.; CARVALHO, L.G. **Análise comparativa entre dois métodos de diagnóstico para detecção de *Syphacia obvelata* no monitoramento sanitário de camundongos (*Mus musculus*) de um biotério de criação.** Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório /Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. – pp 160, v. 5, n. 2 - São Paulo: SBCAL, 2017.

SILVA, H. C. **Parâmetros farmacocinéticos e atividade endectocida de uma nova formulação contendo avermectinas, via tópica (pouros), em bovinos.** 121pp. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) – Unesp Campus de Jaboticabal, fevereiro de 2008.

SILVEIRA, A.C.; GILIOLI, R.; OLIVEIRA, E.S.; BASSANI, R.A. **Subsensitivity to beta-adrenergic stimulation in atria from rats infested with *Syphacia sp.*** Lab Anim. Jan;37(1):63-7, 2003.

SILVERS. G.; FUENTEALBA. C. **Comparación de la efectividad antihelmíntica de seis productos comerciales que contienen lactonas macrocíclicas frente a nematodos gastrointestinales del bovino.** Archivo de Medicina Veterinaria, v.35, n.1, p. 81-88, 2003.

SKREBSKY, A. C.; VOGEL, F.S.F.; SANGIONI, A.; ANTONELLO, A.M.; CAMILLO, G.; TOSCAN, G.; ARAUJO, L.O. **Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos.** Pesq. Vet. Bras. vol.30 no.7. Rio de Janeiro July 2010.

SUETA, T., MIYOSHI I., OKAMURA, T., KASAI, N. **Experimental eradication of pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera*) from mice colonies using ivermectin.** Exp Anim. Jul; 51(4):367-73, 2002.

TAFFS, L.F. **Pinworm infection in laboratory rodents: a review.** Lab Anim 10: 1-13, 1976.

TAYLOR, M.A. **Review: recent developments in ectoparasites.** Veterinary Journal, v. 161, p. 253-268, 2001.

U.S. Congress, Office of Technology Assessment. **Alternatives to Animal Use in Research, Testing, and Education** (Washington, DC: U.S.) Government Printing Office, OTA-BA-273, February 1986.

WATSON, DP. **The effect of the mite *Myocoptes musculinus* (C.L. Koch, 1840) on the skin of the white laboratory mouse and its control.** Parasitology 51:373-378, 1961.

WHARY, M.T.; BARTHOLD, S.W. Chapter 3: **Biology and Diseases of Mice** in Laboratory Animal Medicine (Third Edition), pp 43-149. Academic Press, 2015.

WHITELEY, H.J.; HORTON, D.L. **Further observations on the effect of *Myobia musculi* on the skin of the mouse.** J Patholbacteriol 89: 331-335, 1965.

WILKERSON, J.D.; BROOKS, D.L.; DERBY, M.; GIFFEY, S.M. **Comparison of Practical Treatment Methods to Eradicate Pinworm (*Dentostomellatranslucida*) Infections from Mongolian Gerbils (*Merionesunguiculatus*).** Contemporary Topics 2001 by the American Association for Laboratory Animal Science Volume 40, No. 5 / September 2000.

ZENNER, L.1998. **Effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*, *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera*) from a rodent breeding colony by oral anthelmintic therapy.** Laboratory Animals 32, 337-342, 1998.