

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PATRÍCIA ANDRADE GUIMARÃES MITRE

Padronização da PCR para Detecção de
Mycoplasma pulmonis como Parte do Programa de Monitoramento Sanitário do
Centro de Ciência Animal da UFOP

RIO DE JANEIRO

2021

PATRÍCIA ANDRADE GUIMARÃES MITRE

Padronização da PCR para Detecção de
Mycoplasma pulmonis como Parte do Programa de Monitoramento Sanitário do
Centro de Ciência Animal da UFOP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação - *stricto sensu* - Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica.

Orientadoras: Prof^a. Cláudia Martins Carneiro - UFOP

Prof^a. Mariana Boechat de Abreu - UFRJ

Co-orientadora: Prof^a. Karina Barbosa de Queiroz - UFOP

RIO DE JANEIRO

2021

Mitre, Patrícia Andrade Guimarães.

Padronização da PCR para detecção de mycoplasma pulmonis como parte do programa de monitoramento sanitário do Centro de Ciência Animal da UFOP. Patrícia Andrade Guimarães Mitre. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Filho, 2021.

92 f.: il.; 31 cm.

Orientadoras: Cláudia Martins Carneiro; Mariana Boechat de Abreu.

Coorientadora: Karina Barbosa de Queiroz.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, 2021.

Referências: f. 58-66.

1. Reação em Cadeia da Polimerase- métodos. 2. Animais de Laboratório- microbiologia. 3. Mycoplasma pulmonis. 4. Bem-Estar do Animal- normas. 5. Vigilância Sanitária. 6. Pesquisa Biomédica - Tese. I. Carneiro, Cláudia Martins. II. Abreu, Mariana Boechat de. III. Queiroz, Karina Barbosa de. V. UFRJ, CCS, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe de Referência da Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

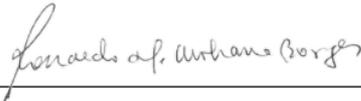
“Padronização da PCR para Detecção de *Mycoplasma pulmonis* como Parte do Programa de Monitoramento Sanitário do Centro de Ciência Animal da UFOP”

PATRÍCIA ANDRADE GUIMARÃES MITRE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2021.



RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



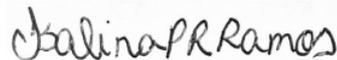
DRA. CLÁUDIA MARTINS CARNEIRO (DOUTORA – UFOP) – ORIENTADORA



DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTORA – UFRJ) – 2ª ORIENTADORA



DRA. KARINA BARBOSA DE QUEIROZ (DOUTORA – UFOP) – COORIENTADORA



DRA. ISALIRA PEROBA REZENDE RAMOS (DOUTORA – UFRJ) – REVISOR



DR. MARCEL FRAJBLAT (DOUTOR – UFRJ)



DRA. MARIA LÚCIA BARRETO (DOUTOR – UFF)



DRA. PAULA ROBERTA GIARETTA (DOUTORA – UFMG)

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos animais de laboratório que através de suas vidas permitiram avanços incalculáveis às medicinas humana e veterinária.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me abençoado com saúde e força para concretização de mais essa etapa apesar de tantos obstáculos!

Aos meus pais, Lídia e Mori pelo amor e cuidado e por sempre terem investido na minha educação e pelo incentivo constante à busca pelo conhecimento!

Ao meu marido e AG Cesar Augusto, por todo amor, suporte, cuidado, auxílio e paciência durante a realização desse trabalho e pelo constante incentivo!!! Aishiteiru de montão!!

À minha irmã Priscila pela torcida, preocupação e orações!

Ao meu trio de orientadoras!!! Mulheres fortes que me acolheram com carinho e amizade doando seu tempo e conhecimento, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao professor Ricardo Fujiwara, meu atual chefe, que me recebeu de forma tão gentil e abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse terminar meus experimentos na UFMG. Agradeço ainda à toda a equipe do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos e em especial à Vanessa Fraga, Michele Matos e Mariana Cardoso pelo apoio nos experimentos e por terem esclarecido tantas dúvidas!

Ao Programa de Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica e toda equipe envolvida pelo suporte durante o curso.

À equipe do CEMIB por todo o carinho de sempre e por ter cedido de forma tão gentil alíquotas de *Mycoplasma pulmonis* que possibilitaram a obtenção do controle positivo utilizado nesse trabalho! Um grande abraço ao Luiz Augusto, Marcos Zanfolin, Daniele Demolin e Josélia Oliveira!

À equipe do Centro de Ciência Animal da UFOP, em especial às Luluzinhas por todo carinho e apoio nos quatro anos de convivência. A vocês deixo este trabalho e minha amizade!

À equipe do Biotério Central da UFMG pela re-acolhida e companheirismo! Em especial às garotas Camilla, Elizângela, Heliana, Patrícia, Laura, Danielle, Lília e Vívian por terem me escutado e dado sugestões!

À equipe do Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP em especial à Luciana e João Pedro pelo apoio técnico e Kátia, Rory, Thaís Ostolin, Jamille, Carol, Eloan, Lorena, Miriã e prof. Bruno Roatt por toda a disponibilidade em auxiliar quanto ao uso dos equipamentos, por ceder reagentes e por compartilhar da experiência de vocês comigo!

Ao Levi Soares pelo apoio e disponibilidade nos testes com o QIAxcel!

Ao Aureliano Cunha pelas verdadeiras aulas durante os primeiros testes da PCR!

À Equipe do Laboratório de Imunoparasitologia do NUPEB/UFOP, em especial ao prof. Luis Carlos Crocco Afonso por ter cedido reagentes e conhecimentos, à Amanda pelas lições de desenho de primer e à prof. Samantha Béla por toda atenção e disponibilidade, contatos com o pessoal da microbiologia e protocolos!

À Equipe do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos, principalmente aos prof. Breno, profa. Cíntia, Rafaela e Camila que tanto me ajudaram na época de obtenção de controle positivo e vários testes de PCR! Obrigada por abrirem as portas do laboratório e por tantas dicas!

À Marlene Miranda do Departamento de Genética do ICB/UFMG por tirar tantas dúvidas e ouvir meus apelos desesperados durante os testes de extração de DNA!

A todos os professores das disciplinas cursadas nesse período, tanto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ como dos Programas de Biologia e Biotecnologia do NUPEB/UFOP bem como aos colegas, foram momentos de construtivos e agradáveis. No meio dessa pandemia bate a saudade da convivência dentro das salas de aula!

Agradeço aos docentes que aceitaram participar das bancas de qualificação do projeto, prévia e defesa que tanto contribuíram para o aperfeiçoamento desse trabalho!

Agradeço às queridas amigas e madrinhas Juliana e Fernanda, da vet para a vida, por todo o carinho e incentivo!

Deixo ainda meu muito obrigada a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui e que porventura não tenha mencionado nominalmente!

RESUMO

MITRE, Patrícia Andrade Guimarães. **Padronização de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para Detecção de *Mycoplasma pulmonis* como Parte do Programa de Monitoramento Sanitário do Centro de Ciência Animal da UFOP** Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Introdução: A caracterização do estado sanitário dos animais de laboratório permite conhecer as particularidades do modelo biológico utilizado e compor base de dados para auxiliar no desenho e interpretação experimental dos pesquisadores além de subsidiar a elaboração do Programa de Monitoramento Sanitário (PMS) de biotérios. Entre os agentes microbiológicos que acometem o sistema respiratório de camundongos e ratos encontra-se o *Mycoplasma pulmonis*, bactéria muito prevalente em biotérios convencionais. As infecções são subclínicas na maioria dos casos e a interferência nas pesquisas é bastante documentada na literatura. **Objetivo:** Padronizar a detecção de *M. pulmonis* em colônias de ratos e camundongos criados e mantidos no Centro de Ciência Animal da UFOP como parte de seu PMS e produzir um Procedimento Operacional Padrão (POP). **Métodos:** Foram obtidas amostras de animais (*swab* oral, lavado traqueobrônquico - BAL e tecido pulmonar) e amostras ambientais dos racks onde os animais eram mantidos (*swab* do ducto central de exaustão e papel filtro aderido ao filtro de exaustão). Foram coletadas amostras de 10 animais de cada colônia mantida no biotério (camundongos Balb/C, C57BL/6 e Swiss e ratos Fischer e Wistar) e amostra de filtro e *swab* de exaustão de cada um dos 5 racks presentes no biotério. O DNA foi extraído das amostras através da utilização de kits comerciais ou técnicas *in house*. O par de *primers* foi desenhado a partir da sequência gênica que codifica para a unidade 16S rRNA da bactéria. Alíquotas de cultivo de *M. pulmonis* foram doadas pelo CEMIB/UNICAMP e utilizadas como controle positivo após extração de DNA pelo método da fervura (FAN et al, 1995) Os testes de PCR foram padronizados para um volume final de 20µL. As temperaturas de desnaturação, de anelamento e de extensão foram respectivamente 94°C, 57°C e 72°C e o termociclador foi programado para 30 ciclos. **Resultados:** O DNA extraído a partir de tecido pulmonar e BAL de ratos Fischer e Wistar apresentou alto grau de pureza e rendimento enquanto aquele proveniente dos demais espécimes demonstrou qualidade inferior. Dentre as amostras de todos os animais utilizados, foram positivas

01/50 em *swabs* orais, 22/50 em BAL e 45/50 em tecido pulmonar. Nenhuma das amostras obtidas a partir das racks ventiladas foi positiva. **Conclusão:** O presente trabalho permitiu a padronização da PCR e construção de um POP para detecção de *M. pulmonis* a partir de amostras de tecido pulmonar, espécime mais sensível para detecção do patógeno, garantindo o menor número de falso-negativos. O documento gerado permitirá a implantação do monitoramento periódico das colônias de roedores do CCA como parte de seu PMS.

Palavras-chave: *Mycoplasma pulmonis*. PCR. Programa de Monitoramento Sanitário.

ABSTRACT

MITRE, Patrícia Andrade Guimarães. **Padronização de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para Detecção de *Mycoplasma pulmonis* como Parte do Programa de Monitoramento Sanitário do Centro de Ciência Animal da UFOP** Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Introduction: The characterization of the health status of laboratory animals allows to know the particularities of the biological model used and to compose a database to help in the design and experimental interpretation of researchers, besides subsidizing the elaboration of the Animal Health Monitoring Program (PMS). Among the microbiological agents that affect the respiratory system of mice and rats is *Mycoplasma pulmonis*, a bacteria very prevalent in conventional facilities. Infections are subclinical in most cases and interference in research is well documented in the literature. **Objective:** to standardize the detection of *M. pulmonis* in colonies of rats and mice bred and kept at the UFOP Animal Science Center as part of their PMS. **Methods:** Animal samples (oral swab, tracheobronchial lavage - BAL and lung tissue) and environmental samples were obtained from the racks where the animals were kept (central exhaust duct swab and filter paper attached to the exhaust filter). Samples were collected from 10 animals from each colony maintained in the facility (Balb/C, C57BL/6 and Swiss mice and Fischer and Wistar rats) and filter swab and exhaust swab from each of the 5 racks in the facility. DNA was extracted from the samples using commercial kits or in-house techniques. The pair of primers was designed from the gene sequence which codes for the 16S rRNA unit of the bacteria. Aliquots of *M. pulmonis* culture were donated by CEMIB/UNICAMP and used as positive control after DNA extraction. PCR reactions were standardised to a final volume of 20uL. Denaturation, annealing and extension temperatures were respectively 94°C, 57°C and 72°C and 30 cycles were used. **Results:** The quality of DNA extracted from lung tissue and BAL from Fischer and Wistar rats was very good while the same performance was not obtained for the other specimens. Among the animal samples, 01/50 in oral swabs, 22/50 in BAL and 45/50 in lung tissue were positive. None of the samples obtained from the ventilated racks were positive. **Conclusion:** The present work allowed the standardization of PCR for detection of *M. pulmonis* from lung tissue samples, the most sensitive specimen for pathogen detection, ensuring the lowest

number of false negatives. The results will subsidize the implementation of periodic monitoring of the CCA rodent colonies as part of their PMS.

Keywords: Mycoplasma pulmonis. PCR. Health Monitoring Programme.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento experimental para padronização da PCR para detecção de <i>Mycoplasma pulmonis</i> no CCA/UFOP. -----	35
Figura 2. Esquema de circulação de ar na rack ventilada. Fonte: Manual Rack AL21 inteligente 3 – 2019 Alesco.-----	39
Figura 3. Ilustração representativa dos pontos de coleta de amostras em racks ventiladas.-----	39
Figura 4. Determinação de <i>primers</i> para detecção de <i>Mycoplasma pulmonis</i> .-----	42
Figura 5. Quantificação de DNA extraído a partir de amostras de BAL e pulmão expressa em ng/uL. -----	46
Figura 6. Avaliação da qualidade de DNA extraído de BAL e pulmão. -----	47
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2%.-----	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da qualidade de DNA em papel-filtro aderido à exaustão de racks ventiladas. -----47

Tabela 2: Reações positivas na PCR para detecção de *Mycoplasma pulmonis* em amostras animais. -----48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Bronchoalveolar lavage (Lavado bronco alveolar)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local)
CCA	Centro de Ciência Animal
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Anima
CN	Controle Negativo
CO₂	Dióxido de Carbono
CP	Controle Positivo
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide (Brometo de Cetrimônio)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations (Federação das Associações Europeias de Ciência em Animais de Laboratório)
G	Força G
LIMP	Laboratório de Imunopatologia
MG	Minas Gerais
mg	miligrama
Mb	mega pares de bases
MRM	Micoplasmose Respiratória Murina
mL	Mililitro
ng	Nanograma
nm	Nanometro

PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
POP	Procedimento Operacional Padrão
PMS	Programa de Monitoramento Sanitário
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
Pb	Pares de bases
PPM	Parte por milhão
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotação Por Minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Lauril Sulfato de sódio)
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> (Livre de Patógenos Específicos)
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Interferência de microrganismos em resultados de pesquisa.....	20
1.2 Patógenos que acometem o trato respiratório.....	22
1.2.1 <i>Mycoplasma pulmonis</i>	24
1.3 Programas de Monitoramento Sanitário (PMS).....	27
1.3.1 A utilização da PCR no diagnóstico de patógenos.....	31
2.OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. Animais utilizados no estudo.....	34
3.2. Delineamento experimental.....	34
3.3. Coleta de amostras.....	35
3.3.1. <i>Swab</i> da cavidade oral.....	36
3.3.2. BAL.....	36
3.3.3. Tecido pulmonar.....	37
3.3.4. <i>Swab</i> de ducto central de exaustão de <i>racks</i> ventiladas.....	37
3.3.5. Adesão de papel filtro aos filtros de saída de <i>racks</i> ventiladas.....	38
3.4. Extração de DNA das amostras.....	40
3.4.1. BAL.....	40
3.4.2. Tecido pulmonar.....	40
3.4.3. Papel filtro aderido à exaustão de <i>racks</i> ventiladas.....	41
3.4.4. <i>Swab</i> da cavidade oral e de ducto central de exaustão de <i>racks</i> ventiladas.....	41
3.5. Quantificação e avaliação da qualidade de DNA genômico.....	41
3.6. Padronização da PCR.....	42
3.6.1. Determinação dos <i>primers</i>	42
3.6.2. Obtenção de controle positivo.....	42
3.6.3. PCR, Eletroforese e Fotodocumentação.....	43
3.6.4 Aplicabilidade das Técnicas de PCR no CCA/UFOP.....	44
3.7 Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46

4.1. Quantificação e qualidade do DNA.....	46
4.2. Detecção de <i>M. pulmonis</i> nas amostras.....	48
4.3. Procedimento Operacional Padrão.....	49
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7. PERSPECTIVAS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
APÊNDICES.....	67
ANEXO - APROVAÇÃO DO PROJETO NA CEUA/UFOP.....	91

1. INTRODUÇÃO

Ao longo do desenvolvimento da Ciência de Animais de Laboratório, observa-se progressiva melhoria das condições de criação e manutenção de roedores para a pesquisa científica. Entre os anos de 1880 e 1950, os roedores começaram a ser utilizados, de fato, na pesquisa. Entretanto, esses animais possuíam patógenos associados à sua microbiota natural. À medida em que foram introduzidas melhorias nos aspectos de sanidade, nutrição e controle ambiental, dentre outros, observou-se redução na prevalência destes patógenos (WEISBROTH, 1996; BAKER, 1998).

Entre os anos de 1960 e 1985, técnicas como a rederivação cesariana foram introduzidas na Ciência de Animais de Laboratório de forma que diversos microrganismos que poderiam ser transmitidos de forma vertical (aleitamento) ou horizontal foram eliminados tornando as colônias de roedores mais refinadas do ponto de vista microbiológico (WEISBROTH, 1996; BAKER, 1998).

Ocorreu ainda um terceiro período, entre os anos de 1980 e 1996, no qual observou-se expressivo avanço na qualidade sanitária dos roedores de laboratório, viabilizado pela introdução de testes sorológicos dos animais como rotina, em alguns biotérios, acompanhados pela aplicação das técnicas de rederivação cesariana. Isso possibilitou a redução na prevalência de patógenos e até mesmo a erradicação de vírus murinos nos locais onde tais inovações foram implementadas. Melhorias das condições de manejo foram continuamente empregadas e, ao longo de décadas, torna-se perceptível a crescente melhoria da qualidade sanitária dos animais empregados na pesquisa biomédica (WEISBROTH, 1996; BAKER, 1998). Certamente, houve um aumento exponencial na consciência dos efeitos variados e geralmente indesejáveis de patógenos naturais em animais de laboratório e foram envidados esforços cada vez maiores para excluí-los (BAKER, 1998).

Toda essa evolução observada ao longo das décadas na qualidade sanitária permite, hoje, dividir os roedores de laboratório em três categorias: gnotobióticos, que possuem microbiota associada conhecida (podendo até mesmo ser inexistente); Livres de Patógenos Específicos (SPF) que são animais livres de microrganismos que poderiam ocasionar doenças, zoonoses ou interferir na pesquisa e finalmente os animais convencionais, estes últimos possuem microbiota desconhecida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas (COUTO, 2002). É melhor prevenir a introdução de patógenos do que considerar sua presença quando

da interpretação de resultados experimentais. Neste ponto, é apropriado mencionar outra razão válida para prevenir a entrada de patógenos em um biotério: em alguns casos, as drogas utilizadas para combater os patógenos podem alterar a fisiologia do hospedeiro e interferir com os experimentos em andamento (BAKER, 1998).

A caracterização do estado sanitário dos animais de laboratório permite conhecer as particularidades do modelo biológico utilizado e compor base de dados para auxiliar no desenho e na interpretação experimental dos pesquisadores, uma vez que patógenos não detectados podem acarretar uma outra variável ao estudo (BAKER, 1998; PAIVA, 2015). Por essa razão, é importante que biotérios de criação e experimentação estabeleçam um Programa de Monitoramento Sanitário (PMS) como parte integrada do sistema de qualidade (MÄHLER et al, 2014).

O Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) localiza-se no Campus Universitário Morro do Cruzeiro, na cidade de Ouro Preto/MG, sendo constituído pelo prédio central que abriga a criação de roedores em sistema convencional, salas de manutenção de roedores em experimentação, salas para procedimentos experimentais, área de apoio e administrativa. Em construções anexas encontra-se os canis de criação e experimentação e o Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental. O CCA supre as necessidades dos pesquisadores e colaboradores da UFOP com o fornecimento de camundongos das linhagens Balb/c, C57BL/6, estoque Swiss; ratos da linhagem Fisher e do estoque Wistar; hamsters sírios dourados e cães sem raça definida. Neste contexto, o CCA/UFOP dá suporte a 25 laboratórios de pesquisa com o fornecimento e a manutenção de animais de laboratório, mantendo em sua estrutura ambientes apropriados para a realização de experimentos com esses animais.

O diagnóstico adequado é o primeiro passo para a determinação de eficientes medidas de combate às infecções. Atualmente, no Brasil, poucos laboratórios fazem exames específicos para agentes microbiológicos que acometem roedores. Estes laboratórios, que em sua maioria estão ligados a grandes biotérios nacionais, foram criados inicialmente para atendimento de demandas internas. Porém, devido ao interesse externo crescente para a realização deste tipo de serviço, têm abarcado estas demandas suplementares, sem, contudo, supri-las integralmente. São laboratórios localizados fora do Estado de Minas Gerais, agregando um ônus de logística considerável ao envio de animais e amostras. Portanto, torna-se necessário a criação de alternativas para a resolução dessa demanda. Nesse sentido, justifica-se

a implantação de testes de diagnóstico para o monitoramento da colônia de roedores do CCA com possibilidade futura de atendimento a outros biotérios do Estado.

A escolha do agente *Mycoplasma pulmonis* se deve ao fato de que essas bactérias são comumente encontradas em biotérios de criação e experimentação espalhados pelo Brasil (BARRETO et al, 2002; FERREIRA, 2005; CEOLA et al, 2016) e pelo mundo (HAYASHIMOTO, 2013; PRITCHETT-CORNING, 2009) constituindo-se em grande desafio à condução de procedimentos experimentais, devendo ser investigadas periodicamente de acordo com as recomendações da FELASA (MÄHLER et al, 2014).

O *M. pulmonis* afeta comumente o trato respiratório de roedores, no entanto, a infecção do trato reprodutor também é observada em alguns animais. Nas fêmeas pode ocorrer endometrite e periooforite, levando à diminuição da fertilidade (CHAWLA, et al, 2017). Esse patógeno pode causar uma significativa morbidade e mortalidade sobretudo em animais destinados a experimentos crônicos, mesmo naqueles em que ocorre infecções subclínicas, pode haver um recrudescimento gerado pelo estresse decorrente de manipulação. Além dos efeitos patogênicos diretos, sua presença pode interferir na análise dos dados experimentais (SIMEKA et al, 1992). Estes microrganismos podem alterar a função ciliar, a cinética celular, a inflamação neurogênica, a ativação das células *Natural Killer*, a resposta imune local e sistêmica com indução da produção de várias interleucinas levando a alterações no perfil de resposta a imunizações, medicamentos e terapias e à indução de patologias experimentais (KAMIYAMA et al, 1991; MCDONALD et al, 1991; SIMEKA et al, 1992; STEFFEN, et al, 1992; SWING et al, 1995; NORLANDER et al, 1997; LAMBERT et al, 1998; TEDESCO et al, 2011; SILVA, 2015). A bactéria já foi detectada em técnicos responsáveis por colônias infectadas, mas não foi documentada a ocorrência de sintomatologia em humanos causada por esse patógeno (FERREIRA, 2005; PIASECKI, 2017).

1.1 Interferência de microrganismos em resultados de pesquisa

A maioria das infecções em animais de laboratório não desencadeiam sinais clínicos. Infecções latentes ou inaparentes podem, entretanto, afetar substancialmente a experimentação animal. Há casos em que infecções silenciosas

na colônia de criação podem ser evidenciadas quando os animais se encontram sob procedimentos experimentais em virtude de estresse, imunossupressão, ação de substâncias tóxicas e de tumores. Influências ambientais como transporte ou temperatura e umidade, fora dos limites recomendados, também podem contribuir para o surgimento de sinais clínicos evidentes. Frequentemente, certas linhagens ou estoques de uma determinada espécie animal são mais sensíveis a uma infecção que outros. Dessa forma, um mesmo agente patogênico pode induzir o aparecimento de sintomas mais discretos em determinadas linhagens, mais evidentes em algumas e até mesmo assintomáticos em outras. Sinais clínicos costumam ser mais graves em animais imunodeficientes (NICKLAS et al, 1999).

Há numerosos exemplos na literatura sobre a influência de microrganismos, independente da manifestação de sinais clínicos, na fisiologia dos animais de laboratório. Eles alteram parâmetros como resposta do sistema imune, comportamento, taxa de crescimento, reprodução, entre outros. Essas alterações confundem os resultados experimentais e são perniciosas, já que podem permanecer indetectáveis. Também aumentam a variabilidade entre os indivíduos nos estudos gerando a necessidade de um número maior de animais por experimento para a obtenção de resultados significativos. (NICKLAS et al, 1999; CLIFFORD et al, 2014; MÄHLER et al, 2014).

Observa-se na atualidade, mundialmente, uma crise na reprodutibilidade de experimentos na qual a interferência de microrganismos infecciosos tem importante participação. Nesse contexto, o uso de animais de laboratório isentos de microrganismos indesejados é um pré-requisito necessário para alcançar resultados confiáveis e reprodutíveis com um mínimo de animais e dessa maneira contribui-se para o bem-estar animal (NICKLAS et al, 1999).

Mais recentemente, discute-se até mesmo sobre a composição da microbiota dos animais de laboratório. Alterações dessa população microbiana podem ter efeitos significativos nos modelos animais e seus fenótipos expressos, adicionando uma variável complexa e importante em pesquisas básicas e estudos pré-clínicos como fator capaz de alterar a reprodutibilidade experimental. Muitos fatores ambientais podem ocasionar alterações na composição dessa microbiota. Entre os mais comuns pode-se citar o tipo de alojamento, forração das gaiolas, frequência de trocas, dietas e método de tratamento (autoclavação ou irradiação), fonte e processamento da água

de bebida e utilização de antibióticos em procedimentos experimentais (SERVICK, 2016; FRANKLIN & ERICSSON, 2017).

1.2 Patógenos que acometem o trato respiratório

Quando temos em mente os agentes microbiológicos que acometem o trato respiratório de animais de laboratório, devemos analisar também as condições ambientais nas quais os animais se encontram uma vez que estas podem determinar aumento da transmissibilidade dos patógenos e ainda exacerbar manifestações clínicas provocadas por eles. Fatores como temperatura, umidade e ventilação interferem diretamente na modulação das enfermidades respiratórias e dinâmica dos patógenos envolvidos.

Quanto ao parâmetro temperatura, HARKNESS e colaboradores (2010) recomendam uma faixa entre 26 e 28°C, enquanto MAJEROVICZ (2008) recomenda 22±2°C e o NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2014) aponta margem entre 20 e 26°C como ideal para ratos, camundongos, hamsters e cobaias. De forma semelhante, a Resolução Normativa n° 15 do CONCEA também recomenda que as temperaturas de bulbo seco no macroambiente se concentrem entre 20 e 26°C para camundongos, ratos, hamsters e cobaias. Reitera ainda que se devem evitar flutuações diárias para que não haja maior demanda nos processos metabólicos e comportamentais dos animais. (BRASIL, 2013).

A maioria dos animais tolera bem a faixa entre 40 e 60% de umidade relativa do ar, começando a ter problemas quando esta chega a 30% ou quando é superior a 70% (BRASIL, 2013). Temperatura e umidade devem ser monitoradas de forma cuidadosa. Extremos ao recomendado e variações abruptas podem causar estresse e contribuir significativamente para a susceptibilidade às doenças (KLING, 2011).

A ventilação é outro fator importante, uma vez que, ambientes com circulação de ar deficiente podem contribuir para a ocorrência de níveis tóxicos de amônia e dióxido de carbono. O gás de amônia reduz a capacidade de resistência às doenças do sistema respiratório. Os efeitos inibitórios às atividades ciliares e metaplásicas podem transformar uma infecção respiratória inócua em uma broncopneumonia. Há controvérsias sobre a concentração mínima nociva de amônia, mas sabe-se que concentrações tão baixas quanto 25ppm podem aumentar a gravidade de lesões

causadas por *Mycoplasma* (BRODERSON, 1976; KING & RUSSELL, 2005; BOOTH et al, 2014).

Há outros fatores que também interferem com a qualidade do ar como poeira, material particulado, esporos fúngicos, vapores de desinfetantes e poluentes ambientais. Ainda, fatores estressantes como transportes a longas distâncias, doenças concorrentes, contenção para exames físicos ou procedimentos de diagnóstico, alterações no ritmo circadiano, interferências na intensidade e ciclo de luz, atividades gerais na sala de alojamento, superpopulação e ruídos excessivos podem exacerbar sintomas, tornar aparentes infecções outrora consideradas como subclínicas e até mesmo alterar a microbiota presente no pulmão (KLING, 2011; LI et al, 2017)

A manifestação de sinais clínicos depende do local e da forma em que o sistema respiratório é afetado e da gravidade de expressão da doença. Contudo, muitas infecções respiratórias são subclínicas e sinais podem estar ausentes ou animais podem ser encontrados mortos sem sintomatologia previamente detectada. Somente sintomas não definem diagnóstico, mas, quando analisados conjuntamente ao histórico ou anamnese podem fornecer importantes indícios. Sintomas comuns em doenças respiratórias incluem descargas nasais e oculares, espirros, ruídos respiratórios, dispneia, cianose e inclinação da cabeça ou outro envolvimento vestibular. Sintomas gerais também costumam estar presentes tais como diminuição do apetite, anorexia, letargia, postura encurvada, pelos arrepiados e desidratação. Sinais respiratórios também podem ocorrer secundariamente a outras doenças sistêmicas ou cardíacas (KLING, 2011; BURKHOLDER, 2012).

Muitas doenças respiratórias são multifatoriais e necessitam de uma investigação bastante apurada. A situação deve ser avaliada considerando os riscos para outros roedores alojados no mesmo ambiente quando tratamos de doenças infecciosas e contagiosas. Considerações especiais devem ser feitas em relação a microrganismos carreados por bioteristas e pesquisadores como por exemplo *Streptococcus* spp. e *Klebsiella* spp. que comumente colonizam humanos e podem acometer os roedores. Para criações comerciais ou de pesquisa, frequentemente são indicados vazios sanitários do biotério acompanhado de sanitização rigorosa antes de introduzir novos animais ou procedimentos de rederivação cesariana ou transferência de embriões (NRC, 1991; KLING, 2011)

Entre os agentes microbiológicos que acometem o sistema respiratório de camundongos e ratos encontram-se as bactérias *Bordetella bronchiseptica*, *CAR bacillus*, *Corynebacterium kutscheri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pulmonis*, *Pasteurella pneumotropica*, *Proteus mirabilis*, *Streptobacillus moniliformis* e *Streptococcus pneumoniae*, fungos (*Pneumocystis murina*) e vírus (Coronavírus do rato ou vírus da sialodocriadenite, Hantavirus, Kilham rat vírus, Norovirus, Sendai vírus e Vírus da pneumonia do camundongo) (LANGAN et al, 2000; SCHOEB, 2000; MÄHLER et al., 2014).

1.2.1 *Mycoplasma pulmonis*

A Classe dos Mollicutes abrange bem mais de 100 espécies de micoplasmas associados a plantas, vertebrados e insetos. Como regra geral são espécie-específicos. Entre os micoplasmas que acometem ratos e camundongos estão: *Mycoplasma neurolyticum*, *Mycoplasma collis*, *Mycoplasma muris*, *Mycoplasma arthritidis* e *Mycoplasma pulmonis*, sendo essa última a mais prevalente entre estes animais (MASOUMALINEJAD et al, 2018)

Mycoplasma pulmonis é uma bactéria desprovida de parede celular que afeta ratos e camundongos. Sua transmissão ocorre por contato direto, aerossol e via transplacentária (CHARLES RIVER, 2009). Os micoplasmas são os menores e mais simples procariontes capazes de autorreplicar-se, com informações fornecidas por um genoma entre 0,5 e 2,0 Mp (RAZIN, 1998; CITII et al, 2018).

Não possuem flagelos, mas algumas espécies encontradas em mamíferos deslizam sobre superfícies líquidas ou realizam contração celular. *M. pulmonis*, entre outras espécies, apresentam prolongamento polar, concentrando proteínas interdependentes e conferindo adesão às células do hospedeiro. A aquisição de nutrientes é feita através de contato direto com a superfície celular, entretanto, substâncias lipídicas, colesterol e precursores de ácidos nucleicos não são prontamente difundidos, deste modo, o micoplasma precisa manter uma íntima associação com a membrana celular a fim de absorvê-los. Podem ser classificados então como parasitas de membranas, praticando ainda um parasitismo considerado ideal no qual vivem em harmonia com o hospedeiro, sem matá-lo, causando geralmente infecções crônicas de difícil erradicação (RAZIN, 1998).

Infecções por micoplasmas podem induzir a uma variedade de problemas em organismos vivos e culturas de células *in vitro*. Infecções naturais por micoplasmas frequentemente são subclínicas e o microrganismo tem sido isolado dos tratos respiratório e urogenital de ratos e camundongos (SUNG et al, 2006; CEOLA et al, 2016). A micoplasmose respiratória murina, causada por este microrganismo, tem sua severidade influenciada por uma variedade de fatores inerentes ao ambiente, hospedeiro e microrganismo (TEDESCO et al, 2011). Quando presentes, os sinais clínicos são manifestos em infecções crônicas, podendo estar associados a outros agentes como *CAR bacillus* ou Sendai vírus. Dispneia, perda de peso, postura encurvada, letargia, ruídos respiratórios, movimentos circulares quando erguidos pela cauda, otite média e, nos ratos, acúmulo de hemoporfirina ao redor de olhos e focinhos são sintomas reportados na literatura (BAKER, 1998; FERREIRA, 2005). A bactéria pode ser transmitida de forma vertical por intermédio da placenta ou de maneira horizontal através do contato direto ou dispersão de gotículas e aerossóis de secreções nasofaríngeas (CHAWLA et al. 2017; BOONYARATTANASOONTHORN et al, 2019).

Animais deficientes podem apresentar artrite embora menos supurativa que aquela causada por *Mycoplasma arthritidis* (EVENGARD et al, 1994; CEOLA et al, 2016). Camundongos machos também são mais sensíveis e apresentam sintomas mais exacerbados que fêmeas (YANCEY et al, 2001). Efeitos reprodutivos também podem ser notados, tais como infertilidade, infecções em filhotes, baixo peso ao nascimento, aborto, morte fetal ou neonatal (REYES et al, 2004).

As principais alterações histopatológicas observadas em infecções por micoplasmas são a presença de infiltrado linfóide ao longo de todo o trato respiratório, perda de cílios na traqueia e hiperplasia do tecido linfóide peribronquial associada a infiltrado linfóide perivascular no tecido pulmonar (SOUZA et al, 2016; BOONYARATTANASOONTHORN et al, 2019).

Essas bactérias apresentam efeito mitogênico em linfócitos de ratos e induzem hiperplasia de tecido linfóide associado aos brônquios. Infecções naturais por *Mycoplasma* podem afetar seriamente a pesquisa interferindo principalmente nos sistemas respiratório, reprodutor e imunológico, alterando a cinética celular, função ciliar, atividade de células natural killer, inflamação neurogênica, resposta imune local e sistêmica induzindo a produção de muitas citocinas. A ativação do sistema imune

por micoplasmas induz a liberação de substâncias pré-inflamatórias e proliferação policlonal de linfócitos T e B (BAKER, 1998; CEOLA, 2016).

O diagnóstico laboratorial pode ser feito através de cultivo, sorologia ou métodos moleculares como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O cultivo em meios sólidos possibilita o surgimento de colônias bacterianas que apresentam morfologia semelhante a ovo frito. Essa metodologia, ao utilizar meios altamente enriquecidos, possibilita o surgimento e desenvolvimento de contaminantes exaurindo os nutrientes e inviabilizando o crescimento de micoplasmas (que é muito mais lento que o de outros microrganismos), dessa forma, compromete a avaliação dos resultados (TEDESCO et al, 2011).

Enquanto o cultivo é lento e fastidioso, os procedimentos sorológicos são frequentemente dificultados por reações cruzadas inespecíficas. Além disso, há que se considerar tempo suficiente entre a infecção e produção de anticorpos detectáveis por esse tipo de metodologia (KUPPEVELD et al, 1992). A PCR por sua vez, apresenta-se como método mais sensível e específico podendo detectar a presença do DNA do microrganismo independente da resposta do hospedeiro à infecção. (TEDESCO et al, 2011).

A prevenção se dá através da interposição de barreiras sanitárias. Não há tratamento eficaz para a micoplasmose murina. Contudo, a eliminação dos microrganismos, apesar de bastante difícil, pode ser alcançada. A eliminação da colônia acometida seguida por desinfecção ambiental e repovoamento com animais livres do patógenos é uma opção, assim como a rederivação cesariana e a transferência de embriões. *M. pulmonis* pode ser encontrado no tecido reprodutivo de machos e fêmeas. Dessa forma, um pré-tratamento dos animais doadores com antibioticoterapia pode ser útil na redução da chance de contaminação vertical através da transferência de embriões. Portanto, esta metodologia tende a ser mais eficaz que a rederivação cesariana. (GLENISTER & THORNTON, 2000; CHARLES RIVER, 2009; MANSFIELD et al, 2010; MÄHLER et al, 2014).

Este importante patógeno de roedores é encontrado em muitos biotérios bem estruturados, até mesmo em instalações mantidas sob elevado grau de bioexclusão. (CHAWLA et al, 2017). Em 2009, PRITCHETT-CORNING e colaboradores compilaram dados de exames microbiológicos de ratos e camundongos provenientes de instituições de pesquisa e ensino da América do Norte e Europa, ao longo de cinco e três anos respectivamente. Quanto aos dados de camundongos, foram detectadas

0,01% de amostras positivas para *M. pulmonis* em amostras da América do Norte e 0,16% para amostras provenientes da Europa. Já para ratos, 0,29% das amostras da América do Norte eram positivas para o micoplasma e 2,57% das amostras europeias se mostraram positivas para esse agente. Ainda em relação à Europa, porção ocidental do continente, mais de 100 instituições foram monitoradas por MÄHLER & KÖHL (2009) que encontraram prevalência de 0,08% em camundongos e 3,56% em ratos entre os meses de janeiro de 2007 e junho de 2008.

MCINNES e colaboradores (2011) reportaram os resultados de monitoramento microbiológico, molecular, sorológico e parasitológico de biotérios da Austrália, Nova Zelândia e Singapura entre os anos de 2004 e 2009. Para camundongos foi observada prevalência de *M. pulmonis* de 0,47% e para ratos 7,0%. Em 2013 foi publicado um estudo que reflete o monitoramento microbiológico de instalações de camundongos japonesas no qual o *M. pulmonis* apresentou 0,1% de prevalência (HAYASHIMOTO et al., 2013). Manjunath e colaboradores (2015) realizaram um trabalho semelhante na Índia no qual monitoraram vinte e seis instalações públicas e privadas. O *M. pulmonis* foi detectado em 22,3% das amostras e apresentou maior prevalência em biotérios mantidos por instituições públicas.

De modo geral *M. pulmonis* ainda é muito presente nos biotérios brasileiros, sobretudo nas instalações com menos barreiras sanitárias. Em 2002, Barreto e colaboradores, ao utilizar a sorologia, detectou 100% de contaminação em animais provenientes de um biotério convencional e 93% em um biotério convencional controlado, ambos no Estado do Rio de Janeiro. Em 2005, Ferreira isolou a bactéria a partir de 65% dos animais testados na cidade de São Paulo. CEOLA e colaboradores em 2016 observaram 80% de positividade para *M. pulmonis* ao utilizar as técnicas de cultura e PCR na cidade de Blumenau em Santa Catarina.

1.3 Programas de Monitoramento Sanitário (PMS)

Os PMS são ferramentas adotadas para assegurar a manutenção do *status* sanitário da instalação animal para a qual foi elaborado. Nele está inclusa a lista de microrganismos patogênicos de exclusão das colônias; a frequência de monitoramento; o conceito de unidade microbiológica; as características e amostragem de animais (residentes e sentinelas) para os exames; amostras biológicas e métodos de diagnóstico de agentes patogênicos. Em caso de detecção

de microrganismos indesejáveis nos animais, um plano de ações corretivas deverá ser adotado (CLIFFORD et al, 2014; MAHLER et al, 2014).

O programa deve ser adaptado às necessidades individuais do biotério, e levar em consideração fatores como: objetivos de pesquisa, prevalência local de patógenos, espécies animais mantidas, *status* imune, número de animais, frequência de monitoramento entre outros. O *status* microbiológico deve ser claramente definido e sistemas adequados de medidas preventivas devem ser desenvolvidos de forma a manter este *status*. Além disso, é importante que todos os indivíduos que trabalham direta ou indiretamente com os animais tenham a compreensão da logística da gestão e monitoramento sanitário do local (MÄHLER et al., 2014).

As recomendações para monitoramento sanitário de roedores e coelhos publicadas pela Federação das Associações Europeias de Ciência em Animais de Laboratório (FELASA), objetivam a harmonização dos PMS dos países membros da Federação. No entanto, este documento é utilizado como referência para países em todo o mundo. Uma lista de agentes infecciosos, bem como sugestão de frequência de monitoramento é apresentada. Ressalta-se que a lista de agentes monitorados pode variar em relação à localização da instalação animal, uma vez que a prevalência dos microrganismos é diferente em cada região. O mais indicado seria monitorar aqueles agentes que poderiam interferir nas pesquisas conduzidas na instalação ou comunidade científica atendida. Deve-se refletir sobre a razão por trás da inclusão de agentes específicos em uma lista de triagem, principalmente se há microrganismos muito raros ou de pouco impacto para a saúde animal ou humana (CLIFFORD et al, 2014; MAHLER et al, 2014).

No Brasil, os poucos laboratórios que realizam os exames costumam oferecer o diagnóstico para todos os agentes listados, alguns microrganismos como o *Proteus mirabilis* também são diagnosticados embora não figurem na publicação da FELASA (MOTTA et al, 2012).

A escolha do animal é crucial para o bom desempenho do PMS. A utilização de animais residentes da colônia é ideal e deve ser praticada sempre que possível. Recomenda-se a utilização de todas as espécies de animais presentes no biotério e ambos os sexos, devido a susceptibilidade diferencial aos agentes patogênicos (MAHLER et al, 2014). Considerando o uso de métodos de diagnóstico diretos, como PCR, a obtenção de animais mais jovens aumenta a probabilidade de detecção de agentes patogênicos; animais mais velhos desenvolvem uma resposta que pode

eliminar parcialmente ou totalmente muitas infecções parasitárias e virais (CLIFFORD et al, 2014). Quanto ao número de animais a serem testados no monitoramento sanitário de um biotério, sugere-se a fórmula proposta pelo ILAR (1976), que calcula o número amostral para monitoramento de colônias de animais residentes, onde eventuais infecções se propagam e distribuem livremente:

$$\text{Número de animais amostrados} = \frac{\log 0,05}{\log N}$$

Na fórmula mencionada, 0,05 corresponde a noventa e cinco por cento de confiabilidade do teste. N equivale à estimativa em porcentagem da população livre do patógeno a ser investigado. Em outras palavras, se a prevalência para dado microrganismo é dez por cento, N será noventa por cento. Logo, quanto menor a prevalência conhecida do agente, mais animais a amostrar serão necessários para garantir a precisão do teste (NRC, 1991). Ela considera a prevalência dos agentes patogênicos na colônia, mas tem como pré-requisito para seu uso, a necessidade de uma população residente de no mínimo 100 animais na unidade microbiológica (NICKLAS, 2008; MAHLER et al, 2014).

Ao longo dos anos, o uso de *racks* com sistema de ventilação individual em biotérios de roedores tem aumentado. Uma vez que cada um dos minis isoladores da *rack* pode ser considerado uma única unidade microbiológica, o monitoramento microbiológico de toda a colônia tornou-se uma tarefa desafiadora. (BRIELMEIER et al, 2006; MAHLER et al, 2014). Dessa forma o monitoramento direto de animais residentes não tem viabilidade prática e econômica, nesse caso, seria necessário testar amostras numerosas de animais para que infecções pouco prevalentes sejam detectadas. A estratégia padrão para monitoramento sanitário de animais criados em mini isoladores com ventilação individual é o uso de sentinelas (MAHLER et al, 2014).

Sentinelas são animais expostos diretamente ou indiretamente aos animais residentes, por determinado período, a fim de se infectarem por eventuais agentes patogênicos presentes na colônia monitorada. Ao final do período de exposição, as sentinelas são examinadas por testes parasitológicos, microbiológicos, sorológicos e moleculares. (MAHLER et al, 2014). As sentinelas precisam ser comprovadamente livres dos agentes infecciosos considerados no monitoramento sanitário, sendo recomendado o uso de animais criados em isoladores de perfil sanitário conhecido (PRITCHETT-CORNING et al, 2009).

A cama suja das caixas dos animais residentes é a via de exposição indireta mais recomendada às sentinelas e a reposição desse insumo deve ser realizada semanalmente, utilizando-se de no mínimo 50% de cama suja. (MAHLHER et al, 2014). Essa então foi proposta como solução para a amostragem dos PMS. Mais recentemente, a exposição dessas sentinelas ao ar de exaustão da *rack* também foi considerado (BRIELMEIER et al, 2006).

Atualmente a utilização das sentinelas em PMS vem sendo duramente criticada pela literatura científica. Alguns estudos demonstraram que agentes como Sendai vírus (ARTWOHL et al, 1994), *CAR bacillus* (CUNDIFF et al, 1995) e *Pasteurella pneumotropica* (MILLER et al, 2016) não foram detectados através da utilização de sentinelas expostas a cama suja. Tal achado é justificável se considerarmos a natureza da transmissão aerógena desses agentes que acometem o trato respiratório de roedores. No entanto, ZORN e colaboradores (2016) também não conseguiram detectar o Norovírus murino, microrganismo de transmissão fecal-oral utilizando este modelo. Sendo assim esta estratégia de amostragem evidencia suas limitações levando ao uso desnecessário de animais para fins de detecção de determinados patógenos. Em contraste, o monitoramento a partir de elementos do ambiente fornece uma abordagem mais promissora para identificar microrganismos em colônias de roedores. Estudos recentes sugerem que a análise da PCR a partir de um elemento filtrante exposto à exaustão de racks ventiladas é superior à utilização de sentinelas expostas a cama suja para diferentes agentes. A análise de amostras ambientais de *racks* com sistema de ventilação individual é uma abordagem relativamente nova e tem se mostrado confiável e promissora para melhorar o monitoramento sanitário em instalações de animais de laboratório (MILLER & BRIELMEIER, 2017).

A utilização da PCR para análise de partículas provenientes da exaustão de racks ventiladas já foi capaz de detectar patógenos como norovírus murino (ZORN et al, 2016), *P. pneumotropica* (MILLER et al, 2016), *Helicobacter hepaticus* mesmo em baixa prevalência (MILLER et al, 2016), Astrovírus murino e *Myocoptes musculus* (KÖRNER et al, 2019).

A PCR de partículas provenientes da exaustão das racks não é prejudicada por fatores como a idade das sentinelas ou a sobrevivência dos agentes na cama suja, uma vez que não depende da infecção desses animais. Ela depende exclusivamente do transporte e do acúmulo de ácidos nucleicos dos patógenos nos elementos de exaustão da *rack*, como os pré-filtros. Além do monitoramento ambiental de rotina, o

exame de roedores que demonstram sinais clínicos de doenças continua a ser um componente fixo dos PMS. Esta mudança de paradigma no monitoramento microbiológico de roedores contribui muito para os Princípios dos 3R's de RUSSELL & BURCH (1959). Principalmente quanto ao princípio da substituição eliminando a necessidade da utilização de animais saudáveis para o monitoramento de todas as colônias (MILLER & BRIELMEIER, 2017).

1.3.1 A utilização da PCR no diagnóstico de patógenos

Os métodos moleculares de diagnóstico se baseiam na detecção de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) dos agentes infecciosos de interesse. Dentre esses métodos o mais comum é a PCR. Esta técnica permite uma rápida e específica amplificação de ácidos nucleicos. Após o isolamento do material genético das amostras a serem avaliadas pode-se executar a reação. A técnica de PCR ocorre em um equipamento denominado termociclador e envolve etapas sequenciais. Primeiramente as fitas complementares do DNA isolado são desnaturadas por aquecimento entre 92 e 95°C. Depois os *primers* ou iniciadores, pequenos fragmentos de fita simples de DNA desenvolvidos especificamente para se complementarem à fita de DNA de interesse, se anelam a esta sequência quando submetidos a temperaturas entre 50 e 60°C. Após o anelamento, a temperatura no termociclador sobe para 72°C e inicia-se a fase de síntese na qual a enzima Taq polimerase sintetiza uma nova fita de DNA por adição de nucleotídeos ao final do *primer*. Essas etapas se repetem nessa sequência cerca de 30 a 40 vezes amplificando de forma exponencial a sequência de interesse. O produto da PCR pode ser visualizado sob iluminação ultravioleta após eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio ou outros agentes intercalantes mais modernos (COMPTON & RILEY, 2001).

A sensibilidade da PCR permite a detecção de apenas uma única cópia da sequência gênica alvo em condições ideais. Resultados positivos podem ser obtidos não apenas em organismos intactos, viáveis ou não, mas também em fragmentos de organismos ou até mesmo, fragmentos de DNA. Ou seja, agentes infecciosos não são detectados somente em animais infectados, mas também em seus excrementos e até mesmo na poeira que se acumula no ambiente. Animais infectados com praticamente qualquer agente infeccioso contaminam todo o ambiente ao seu redor permitindo a detecção de ácidos nucleicos. Como discutido anteriormente testes de amostras

ambientais, como a poeira acumulada em sistemas de exaustão de *racks* podem diminuir ou mesmo eliminar a necessidade de testes diretos em animais. Além disso, é possível ainda mesclar amostras (provenientes ou não de animais) e diminuir seu número em ensaios reduzindo sobremaneira o custo das análises (CLIFFORD, HENDERSON & CHUNGU, 2014).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Padronizar a técnica de PCR para detecção de *Mycoplasma pulmonis* em ratos e camundongos mantidos no Centro de Ciência Animal da UFOP e desenvolver Protocolo Operacional Padrão para aplicação da técnica como parte de seu Programa de Monitoramento Sanitário.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar métodos de coletas de amostras.
- Padronizar métodos de extração de DNA de amostras.
- Padronizar a reação de PCR para a detecção de *M. pulmonis* para cada tipo de amostra.
 - Comparar a quantidade e qualidade de DNA em amostras de pulmão e Lavado Traqueobrônquico (BAL).
 - Comparar a detecção deste patógeno nos diferentes tipos de amostras.
 - Elaborar Procedimento Operacional Padrão (POP) para monitoramento sanitário para *M. pulmonis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais utilizados no estudo

Os animais utilizados eram mantidos no setor de Criação de Roedores do CCA. As linhagens e estoques estudados foram Balb/c, C57BL/6, Swiss, Fischer e Wistar. Todos os animais estavam alojados em racks ventilados e mantidos sob temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). O fotoperíodo adotado no setor é 12:12 (luzes acesas às 07h e apagadas às 19h) e os roedores recebiam água autoclavada e ração comercial *ad libitum*. A forração utilizada era de maravalha de *Pinus sp.* autoclavada e as trocas de caixas eram realizadas duas vezes por semana. Os animais utilizados no estudo eram mantidos em 5 salas: camundongos isogênicos (Balb/c e C57BL/6), Swiss, Fischer e Wistar (este estoque é mantido em duas salas). O padrão sanitário da instalação é convencional e as colônias são submetidas mensalmente a monitoramento parasitológico. Todos os procedimentos realizados tiveram aprovação prévia pela CEUA-UFOP (Protocolo 1756060618) e o certificado encontra-se no ANEXO. Todos os ratos e camundongos eram provenientes de descarte zootécnico (matrizes descartadas, animais abaixo do peso solicitado para pesquisa, entre outros) do CCA e dados de todos os 94 animais utilizados tais como: linhagem/estoque, sexo, idade, dentre outros podem ser consultados no Apêndice A. Todas as coletas de amostras ocorreram entre os meses de junho e dezembro de 2018.

3.2. Delineamento experimental

Na figura 1, encontra-se de forma bem resumida todas as etapas de desenvolvimento do presente trabalho. Primeiramente as amostras foram obtidas nas quantidades indicadas entre parênteses. Em seguida procedeu-se a extração de DNA e avaliação de quantidade e qualidade desse ácido nucleico. a reação de PCR foi padronizada utilizando-se um *primer* desenvolvido para este projeto e controle positivo doado pelo CEMIB/UNICAMP. Após essa etapa, o DNA extraído a partir das amostras foi submetido ao protocolo de PCR padronizado e então o POP foi escrito.

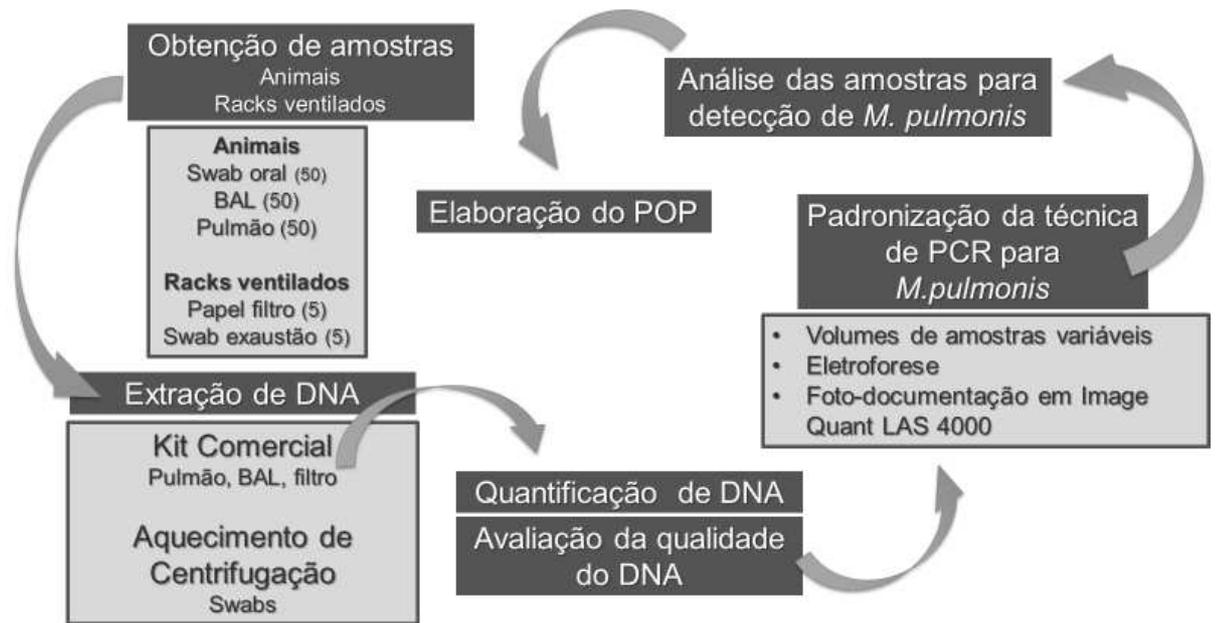


Figura 1. Delineamento experimental para padronização da PCR para detecção de *Mycoplasma pulmonis* no CCA/UFOP.

3.3. Coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ conforme procedimento operacional adotado pelo CCA para animais de descarte. Em seguida as carcaças foram encaminhadas para a coleta de amostras. Três tipos de amostras foram obtidas a partir dos animais: *swab* de cavidade oral, BAL e tecido pulmonar. Apesar de terem sido utilizados 94 animais no estudo foram selecionadas 50 amostras de *swab* de cavidade oral, 50 amostras de BAL e 50 amostras de tecido pulmonar (10 de Balb/c, 10 de C57BL/6, 10 de Swiss, 10 de Fischer e 10 de Wistar para cada tipo de amostra). E dentre as amostras estudadas, nem sempre os três tipos eram obtidos a partir do mesmo animal. Isso se deve a perdas de amostras ocorridas no processo de coleta ou durante a etapa de extração de DNA.

Além das amostras coletadas a partir dos animais, foram coletados dois tipos de amostras do ambiente: *swabs* dos ductos de exaustão das *racks* ventiladas e fragmentos de papel filtro aderidos ao pré-filtro de exaustão das *racks* ventiladas. Foram amostradas 5 *racks* ventiladas que se localizam no setor de Criação de Roedores e abrigavam os animais utilizados no experimento. Destas *racks*, 2

abrigavam camundongos (isogênicos e Swiss) e as outras três eram utilizadas para manutenção de ratos (Fischer e 2 racks de Wistar).

A seguir são descritos os procedimentos adotados para a coleta de cada um dos tipos de amostras utilizados.

3.3.1. Swab da cavidade oral

As carcaças foram dispostas em decúbito dorsal e introduziu-se a ponta de um *swab* estéril na cavidade oral. Toda a superfície envolta em algodão foi friccionada com delicadeza contra as paredes internas das bochechas bem como partes posteriores e inferiores da língua. Tomou-se o cuidado de promover o contato de toda a superfície do *swab* com a mucosa oral para garantir uma boa coleta. Após a coleta, as hastes foram rompidas com o auxílio de uma tesoura e as pontas depositadas em tubos tipo eppendorf com capacidade de 2,0 mL previamente esterilizados contendo 1mL de solução salina também estéril. A conservação imediata foi feita em nitrogênio líquido. Após todo o término das coletas, as amostras de *swab* foram armazenadas em freezer a -80°C.

3.3.2. BAL

As carcaças foram fixadas em superfície de cortiça em decúbito dorsal. As patas presas com alfinetes e o animal posicionado de forma que a parte cranial ficasse voltada para o operador. Todos os procedimentos de coleta desse espécime foram realizados próximo ao bico de Bunsen. Antes de iniciar a coleta realizou-se a assepsia da região do pescoço e parede cranial do tórax com álcool 70 %. Utilizando-se tesouras e pinças sanitizadas a região ventral do pescoço foi aberta, as glândulas salivares e a musculatura rebatidas até a exposição da traqueia. Em seguida, uma pinça hemostática curva fechada foi posicionada abaixo dessa estrutura de forma a permitir seu isolamento das regiões vizinhas. Um fragmento de fio de algodão de cerca de 15 cm foi preso à ponta da pinça hemostática e delicadamente tracionado pela pinça e posicionado por baixo da traqueia. Cânulas constituídas a partir de agulhas 18G (camundongos) e 21G (ratos) foram então inseridas na luz da traqueia, através

de pequeno orifício feito com a tesoura, na posição horizontal (ângulo de 15°), com cuidado para não perfurar outras porções da parede. As cânulas foram acopladas em seringas de 3,0 mL contendo solução salina esterilizada. O fio de algodão foi utilizado para fixação da cânula através da realização de um nó de forma que não permitisse espaço para refluxo entre a cânula e a luz da traqueia. Delicadamente, a salina esterilizada foi injetada no canal, percorrendo também os brônquios. Em seguida, a salina foi aspirada com o auxílio do êmbolo. Essa manobra era repetida mais duas vezes e o líquido recuperado depositado em um tubo tipo eppendorf de 2,0 mL esterilizado e devidamente identificado com data e os dados do animal. A conservação imediata ocorreu em nitrogênio líquido. Após todo o término das coletas, as amostras de lavado traqueobrônquico foram armazenadas em freezer a – 80 °C.

3.3.3. Tecido pulmonar

Após a coleta de BAL, realizou-se a coleta de fragmentos dos lobos dos pulmões direito e esquerdo. Esse procedimento também foi realizado em proximidade à chama do Bico de Bunsen. Os fragmentos foram coletados com o auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas previamente sanitizadas. A cada uso dos instrumentos cirúrgicos, estes eram inseridos em béquer contendo álcool 70 % próximo à superfície de trabalho. Os fragmentos coletados tinham cerca de 0,5 a 1,0 cm de comprimento e foram retirados dos diversos lobos pulmonares. O material coletado foi acondicionado em tubos tipo eppendorf de 2,0 mL previamente esterilizados e identificados com a data de coleta e a identificação do animal. A conservação imediata era feita em nitrogênio líquido. Após todo o término das coletas, as amostras de pulmão foram armazenadas em freezer a -80°C.

3.3.4. Swab de ducto central de exaustão de racks ventiladas

Através da utilização de *swab* para microbiologia, as superfícies internas dos ductos centrais de exaustão de cada *rack* ventilada do setor de criação de roedores do CCA foram amostradas. As figuras 2 e 3 permitem uma melhor compreensão do fluxo de ar nas racks ventiladas e das estratégias adotadas para a coleta de amostras

do equipamento. Para proceder a coleta do *swab*, os tubos tipo traqueia que fazem a ligação dos ductos centrais de exaustão ao pré-filtro de exaustão da *rack* foram removidos. Após a desconexão deslizou-se a extremidade do *swab* pelas paredes internas do ducto de forma delicada e certificando-se de que toda a ponta do objeto de coleta tivesse contato com a superfície amostrada. Após a coleta, a haste foi rompida com o auxílio de uma tesoura e a ponta depositada em um tubo tipo *ependorf* com capacidade de 2,0 mL previamente esterilizado preenchido por 1mL de salina estéril. A conservação das amostras foi feita em freezer a -80 °C até o momento da extração do DNA.

3.3.5. Adesão de papel filtro aos filtros de saída de *racks* ventiladas

Fragmentos de papel filtro com dimensões de 2 cm de comprimento e 2 cm de largura foram fixados com o auxílio de fita dupla-face a face externa do filtro de saída que recebe todo o ar advindo da exaustão de cada uma das caixas de animais alojadas nas *racks* ventiladas. A figura 3 ilustra o local em que os fragmentos de papel filtro foram aderidos. Estes elementos permaneceram fixados por três semanas e recebiam todo o ar exaurido das caixas, dessa forma, pressupôs-se que os micro-organismos foram transportados nessa corrente de ar permanecendo retidos nas tramas do papel filtro. Após o período de exposição os fragmentos de papel foram coletados e acondicionados em tubos tipo Falcon previamente esterilizados e identificados e conservados em freezer -80°C até o momento da extração de DNA.

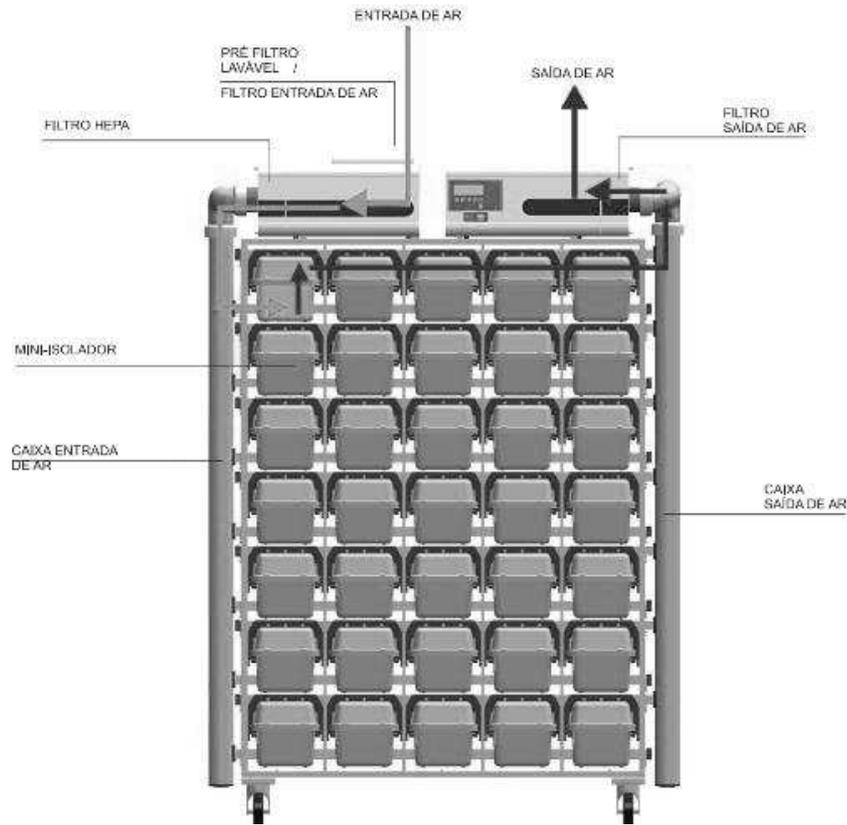


Figura 2. Esquema de circulação de ar na rack ventilada. Fonte: Manual Rack AL21 inteligente 3 – 2019 Alesco.



Figura 3. Ilustração representativa dos pontos de coleta de amostras em racks ventiladas. Fotos retiradas do catálogo de produtos da empresa Alesco Indústria e Comércio LTDA.

3.4. Extração de DNA das amostras

A extração do DNA genômico das amostras BAL, Tecido pulmonar e Papel filtro aderido à exaustão de racks ventiladas foi realizada com o kit Wizard™ Genomic DNA Purification Kit A1120 (Promega, Madison, WI,) com algumas modificações. As etapas iniciais do processamento dessas amostras são apresentadas nos itens 3.4.1; 3.4.2 e 3.4.3. Em seguida os tubos contendo as amostras em tampão TrisHCl 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0; 1 % de N-lauril sarcosina eram homogeneizados e adicionava-se 25 µL de solução de proteinase K 20 mg / mL e procedia-se a incubação *overnight* a 37 °C. Em seguida o restante dos procedimentos para extração foram executados conforme instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado em geladeira a uma temperatura dentro da faixa de 1 a 7° C até o momento da utilização.

3.4.1. BAL

As amostras de BAL foram descongeladas em gelo e então centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensos em 250 µL do tampão TrisHCl 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0; 1 % de N-lauril sarcosina.

3.4.2. Tecido pulmonar

As amostras foram descongeladas em gelo e então pesava-se cerca de 50 mg de fragmentos de pulmão. Com o auxílio da tesoura, cortava-se a amostra em fragmentos bem pequenos para possibilitar a ação das soluções de lise a serem empregadas nas etapas subsequentes. Adicionava-se 250 µL do tampão TrisHCl 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0; 1 % de N-lauril sarcosina aos tubos contendo amostras.

3.4.3. Papel filtro aderido à exaustão de *racks* ventiladas

As amostras foram descongeladas em gelo. O papel filtro de 2 cm de largura e 2 cm de comprimento foi seccionado em pequenos fragmentos para possibilitar melhor atuação das soluções de lise empregadas em etapas posteriores. O conteúdo de papel filtro era dividido em dois tubos tipo eppendorf de 2,0 ml e 600 µL do tampão TrisHCl 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0; 1 % de N-lauril sarcosina foram adicionados a esses tubos.

3.4.4. *Swab* da cavidade oral e de ducto central de exaustão de *racks* ventiladas

Diversos protocolos para extração de DNA a partir de *swabs* foram testados sem sucesso. Finalmente optou-se por utilizar adaptações à técnica descrita por CRISTO & SANTOS (2009). As amostras foram descongeladas e as pontas dos *swabs* removidos dos tubos. Em um primeiro momento procurou-se aumentar a concentração de DNA das amostras, para tanto todas as amostras foram centrifugadas a 17760 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi então descartado de forma que fosse preservado nos tubos cerca de 1 mL do sobrenadante e *pellet*.

Imediatamente antes de realizar as reações de PCR, 50 uL de cada amostra eram transferidos para microtubos estéreis. Os tubos então eram acondicionados em termociclador e mantidos por 30 minutos a 70 °C. Em seguida os microtubos eram centrifugados a 905,58 x g (3000 RPM) por 5 minutos. Após esse processo as amostras estavam prontas para a realização da PCR onde somente o sobrenadante era utilizado.

3.5. Quantificação e avaliação da qualidade de DNA genômico

Após os procedimentos de extração de DNA genômico das amostras de BAL, tecido pulmonar e papel filtro aderido à exaustão de *racks* ventiladas, foi feita a dosagem do DNA em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific,

EUA). Além da quantificação, dada em ng / uL foi avaliada a qualidade do DNA coletado através das razões 260 nm / 280 nm que foram considerados de boa qualidade, quando maiores que 1,8 e 260 nm / 230 nm da qual se espera valores entre 2,0 e 2,2 aproximadamente. Valores fora desse intervalo podem indicar contaminação por fenol / trizol ou algum componente proteico. Para a mensuração foi necessária a utilização de 2 µL de alíquota de cada amostra. As razões 260 nm / 280 nm e 260nm/230nm, sempre devem ser analisadas em conjunto com a quantidade de DNA obtido. Após a dosagem as amostras foram armazenadas em geladeira a uma temperatura dentro da faixa de 1 a 7° C até o momento da utilização.

3.6. Padronização da PCR

3.6.1. Determinação dos primers

O par de primers foi desenhado a partir da sequência gênica que codifica para a unidade 16S rRNA de *Mycoplasma pulmonis* conforme depositado no banco online de dados GenBank® (Basic Local Alignment Search Tool- NCBI©). Utilizou-se como ferramenta para o desenho do par de primers o Pick Primer (NCBI©). Os iniciadores desenhados foram submetidos ao teste *in silico* de especificidade com o auxílio da ferramenta BLAST (NCBI©). A sequência nucleotídica do par gera um fragmento com as características especificadas abaixo.

Espécie alvo	Sequência	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento	Referência
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Forward: 5'ACG CGT AGA ACC TTA CCC AC 3'	93 pb	60° C	NR_041744.1 (GenBank)
	Reverse: 5'ACG ACA ACC ATG CAC CAT CT 3'			

Figura 4. Dados sobre primers para detecção de *Mycoplasma pulmonis*.

3.6.2. Obtenção de controle positivo

Uma alíquota de cultura de *Mycoplasma pulmonis* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica/UNICAMP). A cultura foi subdividida em tubos tipo eppendorf e congelados em freezer -80 °C. A extração do DNA genômico foi realizada

através do método da fervura conforme descrito por FAN e colaboradores em 1995 e modificado por FERREIRA em 2005. Para tanto, 1 mL da alíquota foi submetida a um processo de centrifugação por 10 minutos a 17760 x g. Em seguida o sobrenadante foi descartado e 100 uL de tampão PBS (2,6 mM NaH₂PO₄; 7,4 mM NaHPO₄; 10 mM NaCl; pH 7,2) foi adicionado. Esse processo foi repetido por mais duas vezes e, então 20uL de PBS foram adicionados. O sistema foi submetido a 100 °C em banho-maria e em seguida mantido em gelo por 5 minutos. Novo processo de centrifugação a 17760 x g foi realizado e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo estéril. Após o procedimento de extração de DNA realizou-se a dosagem em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA). O material foi mantido a 4 °C até o momento da utilização.

3.6.3. PCR, Eletroforese e Fotodocumentação

Protocolos de PCR foram testados variando-se as temperaturas de anelamento e concentrações de DNA de controle positivos de forma que o melhor desempenho fosse obtido. A padronização ocorreu tendo como volume final de 20 µL. Foram utilizados 0,4 µL de DNTP mix N9013 (SINAPSE INC; SÃO PAULO, BRASIL) a 2,0 mM; 1,0 µL dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (*forward* e *reverse*) sintetizados pela IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES; BERKELEY, CA, USA) a 10,0 µM; 0,25 µL da enzima Taq DNA polimerase PHT (PHONEUTRIA; MINAS GERAIS, BRASIL) 5 U / µL; 4,0 µL do tampão da enzima GOtaq 5x Buffer M7911 (PROMEGA); 12,35 µL de água milli-Q e 1 µL de amostra. As amplificações ocorreram no aparelho termociclador APPLIED BIOSYSTEMS™ SIMPLIAMP™ THERMAL CYCLER (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER CITY, CA). O mix era aquecido por 5 min a 94 °C, e executados 30 ciclos de 1) desnaturação a 94 °C por 30 segundos; 2) anelamento a 57 °C por 30 segundos e 3) extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final era feita a 72 °C por 7 minutos.

Após a amplificação de DNA, os produtos da reação de PCR eram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). O brometo de etídio foi utilizado como corante e era acrescentado na solução ainda quente de agarose na proporção de 2,5 µL para cada

60 mL do tampão TAE 1X. A corrida durava cerca de 40 minutos a uma voltagem de 90 a 100 V. Após esse período o gel era levado ao Image Quant LAS 4000 (GE HEALTHCARE, UPPSALA, SUÉCIA) para fotodocumentação e análise.

3.6.4 Aplicabilidade das Técnicas de PCR no CCA/UFOP

Foram realizados testes dos *primers* desenvolvidos para o presente estudo utilizando-se temperaturas diversas de anelamento em uma faixa de 50 a 64 °C. Além disso, utilizou-se concentrações de controle positivo de 0,25 ng; 0,5 ng; 1,0 ng e 2,0 ng de DNA por microtubo. Tais ensaios demonstraram sensibilidade da reação para detecção de 0,25 ng de DNA, dessa forma, passou-se a adotar essa concentração como padrão de controle positivo para as reações a serem executadas utilizando-se as diversas amostras previstas no projeto. A temperatura de anelamento de 57 °C também foi a que possibilitou melhores resultados nos testes executados.

Os dados de quantificação e qualidade do DNA extraído a partir das amostras permitiram a realização de testes para determinação das melhores concentrações de DNA por tipo de amostra. Para a execução destes testes foram utilizadas amostras de um dos animais utilizados no estudo que apresentava sinais clínicos compatíveis com a micoplasmose, o animal de número 77 da linhagem Fischer. Para o tecido pulmonar foram testados 100, 50, 25, 10, 5 e 1 ng de DNA e a concentração de 50 ng por amostra foi considerada a mais sensível para a execução da reação passando a ser adotada como padrão para esse tipo de amostra. As amostras de lavado traqueobrônquico também foram testadas nas concentrações de 35, 20, 10, 5 e 2,5 ng de DNA e a concentração de 35 ng de DNA por amostra foi a que apresentou melhor desempenho.

Para as amostras de filtro aderido à exaustão de racks ventiladas, bem como *swabs* orais e de ducto central de exaustão, adotou-se a utilização de 10 µL de amostra, uma vez que volumes menores não apresentaram bom desempenho nos testes anteriores.

3.7 Análise estatística

Os dados obtidos a partir das avaliações de quantificação das amostras de DNA extraído de pulmão e lavado traqueobrônquico foram analisadas estatisticamente. Foi utilizado o teste de Shapiro-wilk para verificar a normalidade dos dados. Como não foi verificada distribuição normal, foi utilizado o teste de Wilcoxon - Mann-Whitney para comparar os dados de BAL e Tecido Pulmonar e o teste Kruskal-Wallis para verificar as diferenças obtidas entre as linhagens e estoques testados com cada um dos tipos de amostra (tecido pulmonar e BAL). O tratamento estatístico foi conduzido com intervalo de confiança de 95 %, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R v. 3.5.1 (R Core Team, EUA, 2018).

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação e qualidade do DNA

Através da padronização dos protocolos de extração testados foi possível o isolamento de DNA a partir de amostras de tecido pulmonar, BAL e papel filtro aderido à exaustão de *racks* ventiladas. Os dados brutos de quantificação e qualidade para cada uma das amostras tecido pulmonar e BAL podem ser consultados nos apêndices B e C desse trabalho. As figuras 5 e 6 permitem uma análise desses dois parâmetros para as amostras em questão.

A análise da figura 5 e apêndices B e C permite observar que as amostras de BAL, geraram significativamente menor quantidade de DNA que as amostras de pulmão. Para as amostras de pulmão, não houve diferenças entre a quantidade de DNA obtido nas diferentes linhagens e estoques, demonstrando maior homogeneidade. Em contrapartida, dentro do grupo das amostras de BAL, observa-se uma heterogeneidade entre a quantidade de DNA proveniente de camundongos daquele obtido a partir de ratos. A primeira espécie animal forneceu quantidade de DNA significativamente menor que o ácido nucleico extraído da mesma amostra coletada a partir de ratos.

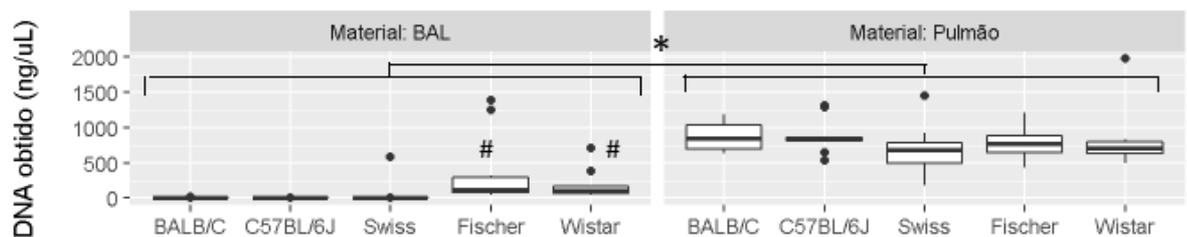


Figura 5. Quantificação de DNA extraído a partir de amostras de BAL e pulmão expressa em ng/uL. O asterisco representa diferença significativa entre os grupos pulmão e BAL e # representa diferença com relação às linhagens BalbC, C57B6 e Swiss nas amostras de BAL.

Com relação a avaliação da qualidade das amostras de DNA, avaliada a partir das razões 260 nm / 280 nm e 260 nm / 230 nm, as amostras de pulmão foram bastante homogêneas e dentro da estimativa ideal, assim como as amostras de BAL de ratos. Já as amostras de BAL de camundongos não geraram bons índices e apresentaram maior heterogenicidade.

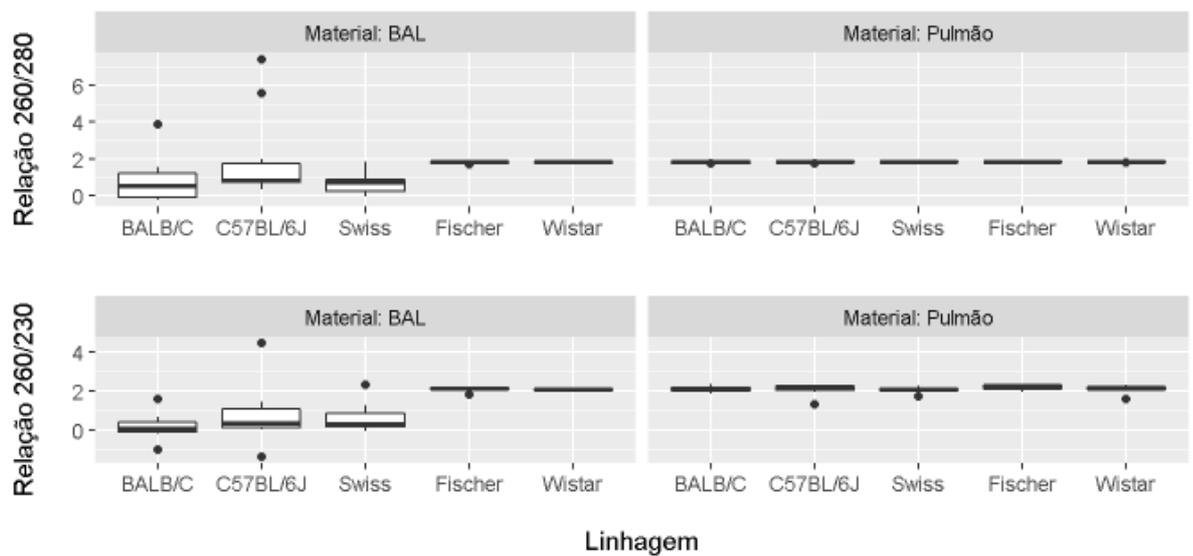


Figura 6. Avaliação da qualidade de DNA extraído de BAL e Pulmão. As razões 260/280 e 260/230 são parâmetros para avaliação da qualidade do DNA obtido a partir das duas amostras. Os valores ideais para as razões se encontram entre 1,8 e 2,0 para 260/280 e entre 2,0 e 2,2 para 260/230.

A tabela 1 expressa os dados obtidos em Nanodrop para as amostras de papel filtro aderido à exaustão de *racks* ventiladas. Como se pode observar, as amostras geraram pouco DNA e relações 260/280 e 260/230 insatisfatórias.

Tabela 1 - Avaliação da qualidade de DNA em papel filtro aderido à exaustão de *racks* ventiladas

Amostra	Espécie	Linhagem/estoque	[] DNA ng / μ L	260/280nm	260/230nm
AF	rato	Wistar	0,9	0,93	0,27
BF	rato	Wistar	1,9	1,04	0,44
CF	rato	Fischer	5,9	1,57	0,69
DF	camundongo	Balb/c e C57BL/6J	3,4	1,17	0,34
EF	camundongo	Swiss	7,1	1,62	0,69

As amostras de *swab* oral e de ducto central de exaustão de *racks* ventiladas não passaram pela avaliação espectrofotométrica de DNA uma vez que o seu processo de extração ocorreu em etapa imediatamente anterior à reação de PCR.

4.2. Detecção de *M. pulmonis* nas amostras

A tabela 2 mostra os resultados obtidos nas reações de PCR para as amostras coletadas a partir dos animais. Como pode ser observado, as amostras de tecido pulmonar foram as que apresentaram mais resultados positivos, em seguida estão as amostras de BAL e finalmente as amostras de *swab* oral que revelaram somente um resultado positivo. Vale ressaltar que as amostras de BAL provenientes de ratos foram todas positivas enquanto para camundongos observa-se apenas duas amostras positivas sendo de animais do estoque Swiss.

Tabela 2 – Reações positivas na PCR para detecção de *Mycoplasma pulmonis* em amostras animais

Linhasgens/estoque	Tipo de amostra		
	Swab Oral	BAL	Pulmão
Balb/c	0/10	0/10	06/10
C57BL/6	0/10	0/10	10/10
Swiss	01/10	02/10	10/10
Fischer	0/10	10/10	09/10
Wistar	0/10	10/10	10/10
TOTAL	01/50	22/50	45/50

A figura 7 corresponde a uma imagem de eletroforese em gel de agarose, representa os resultados obtidos em uma das reações de PCR. As amostras observadas correspondem a BAL de ratos Fischer e Wistar.

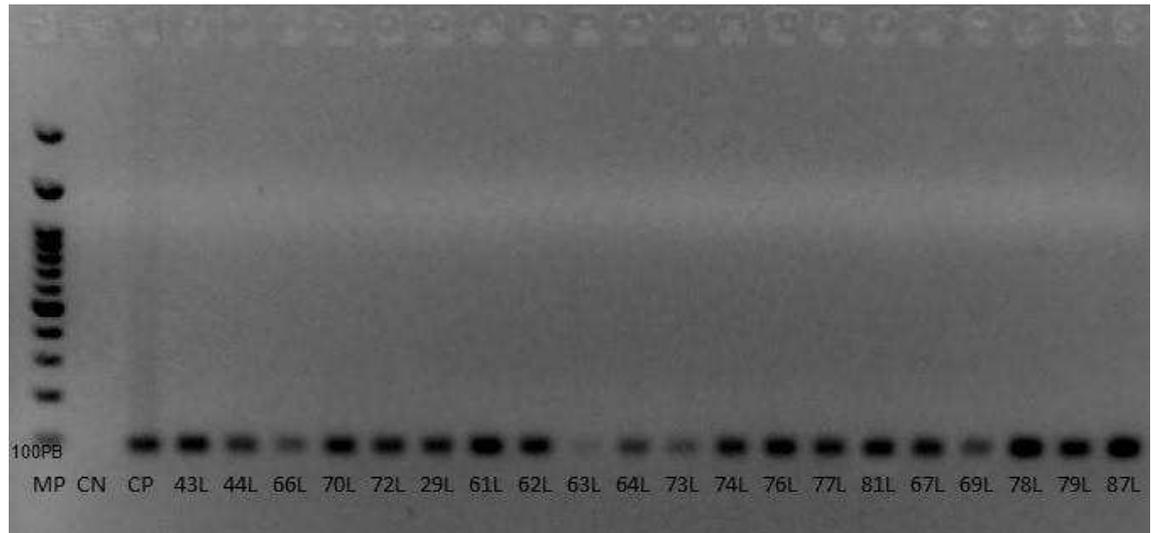


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2%. Produto amplificado com tamanho de 93 pb provenientes de amostras de lavado traqueobrônquico de ratos. MP: Marcador de peso molecular de 100 pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Nenhuma das amostras de origem ambiental apresentou resultado positivo para as reações de PCR.

4.3. Procedimento Operacional Padrão

Tendo em vista que o tecido pulmonar foi a amostra que apresentou DNA de melhor qualidade para todas as linhagens/estoques utilizados e demonstrou boa eficiência na detecção de *M. pulmonis*, foi elaborado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que descreve desde a coleta da amostra até a foto documentação em gel de agarose. Dessa forma sugere-se que este POP seja aplicado dentro do PMS no CCA/UFOP. O documento pode ser consultado no Apêndice D desse trabalho.

5. DISCUSSÃO

A qualidade microbiológica de animais de experimentação pode influenciar de forma crítica o bem-estar e a validade e reprodutibilidade dos dados experimentais. É importante que as instalações animais de criação e experimentação estabeleçam PMS como parte integrante de seu sistema de qualidade. Uma eficiente gestão sanitária requer bons hábitos de comunicação entre todos os envolvidos no cuidado e utilização de animais, o resultado do PMS depende de testes de investigação de saúde bem conduzidos, adequada interpretação dos resultados e ações subsequentes apropriadas (MÄHLER et al, 2014)

Sabe-se que há diferenças na susceptibilidade ao *M. pulmonis* e desenvolvimento de micoplasmose entre as diferentes linhagens de ratos e camundongos. Animais Balb/c são mais sensíveis que C57BL/6 (CARTNER et al, 1996; BAKER, 1998; MIZE et al, 2018; WAWEGAMA et al, 2018). Entre os ratos, sabe-se há mais de trinta anos que animais da linhagem Lewis são mais susceptíveis que animais da linhagem Fischer F344 (DAVIS et al, 1985). Somente dois dos animais utilizados no presente trabalho manifestavam sinais clínicos de micoplasmose. Estavam magros, apresentavam hemoporfirina ao redor dos olhos e se movimentavam de forma circular ao serem erguidos pela cauda. Tratava-se de dois ratos da linhagem Fischer. As amostras coletadas a partir de um desses animais foram utilizadas nos testes para determinação e padronização da melhor concentração de DNA das amostras para a realização da PCR. Não foram encontrados dados que comparassem a suscetibilidade ao patógeno entre animais Fischer e Wistar. Em nossos resultados, observou-se o mesmo número de amostras positivas para os dois animais e, apesar da sintomatologia ter sido observada somente em Fischer, seria arriscado inferir sobre diferenças de susceptibilidade entre essas linhagens visto que o número de animais estudados foi pequeno, além disso, a severidade da micoplasmose pode ser influenciada por fatores ambientais e bacterianos além do organismo hospedeiro (TEDESCO et al, 2011).

As amostras de pulmão obtidas no presente estudo foram consideradas satisfatórias nos quesitos quantidade e qualidade do DNA. A extração de DNA de amostras de BAL de camundongos, por sua vez, não gerou DNA de boa quantidade e qualidade, apesar da técnica utilizada ter sido semelhante para as duas amostras. Isso pode indicar contaminação do ácido nucleico por proteínas e/ou resíduos de

reagentes e esse grau de impureza pode comprometer a eficácia da PCR. SCHOEB e colaboradores (1997), assim como LOGANBILL e colaboradores (2005) utilizaram amostras semelhantes de camundongos, para detecção de *M. pulmonis* através da PCR, mas resultados quanto à qualidade do DNA extraído não foram descritos. FERREIRA (2005), CEOLA e colaboradores (2016) também utilizaram BAL em seus estudos ao estudar ratos. Dados quanto à qualidade do DNA extraído também não foram descritos por estes autores.

CHAWLA e colaboradores (2017) observaram que amostras de tecido pulmonar apresentaram 8,2ng / μ L de DNA enquanto amostras de BAL apresentaram 2,1ng / μ L, estes dados foram obtidos através de análise por espectrofotometria. Apesar da baixa quantidade de DNA genômico detectada em tecido pulmonar no trabalho de CHAWLA (2017), percebe-se a mesma tendência que a observada no presente trabalho, evidenciando a superioridade do tecido pulmonar frente ao BAL no quesito quantificação do material genético. De fato, esse achado já era esperado, uma vez que o parênquima pulmonar apresenta maior densidade celular que o BAL, conseqüentemente, mais DNA total será extraído a partir dessa amostra. Para as amostras de BAL de camundongo, a quantidade de DNA foi bem mais baixa, com exceção em uma amostra de Swiss que gerou 590ng de DNA por microlitro. Em Fischer houve variação entre 44 e 1300 ng / μ L enquanto Wistar variou entre 45 e 700 ng / μ L. Para as amostras de pulmão observou-se boa quantificação de DNA para todos os animais estudados. Houve variação entre 186 (Swiss) e 1970 ng / μ L (Wistar). Mas no geral se mantiveram entre 500 e 1000 ng / μ L de DNA. Os resultados aqui obtidos bem como a análise estatística realizada demonstram que o BAL obtido a partir de ratos geram amostras de boa qualidade, mas para camundongos, o desempenho ficou aquém do esperado.

Diversos protocolos de extração de DNA foram testados para as amostras de *swab* (oral e de racks), inclusive os métodos adotados para os demais tipos de amostras como tecido pulmonar e BAL, no entanto, a quantidade de DNA extraído bem como a qualidade foram insatisfatórias. O mesmo kit comercial utilizado para extração de DNA de tecido pulmonar, BAL e filtros foi testado diversas vezes com introdução de modificações que pudessem favorecer a obtenção do ácido nucleico, mas sem sucesso. Protocolos *in house* também foram utilizados, tais como o CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) e técnicas adaptadas a partir de SAMBROOKS

(2001) utilizando-se SDS, acetato de sódio e isopropanol, dentre outros reagentes e ainda assim não se obteve êxito. Finalmente, optou-se por um método mais simples que consistia basicamente no aquecimento (rompimento da membrana celular) seguido por centrifugação das amostras, tal como feito para culturas celulares contaminadas por micoplasmas (CRISTO & SANTOS, 2009). Tal metodologia também foi utilizada por GOTO e colaboradores (1994) para detecção de *M. pulmonis* em *swabs* nasal, traqueal e de cavidade oral de ratos.

O papel filtro aderido ao pré-filtro de exaustão das racks também não gerou amostras de DNA em quantidade e qualidade desejadas. ZORN e colaboradores (2016) ao executar uma estratégia semelhante, utilizaram como elemento filtrante para a detecção de Norovírus murino, fragmentos de gaze e do próprio pré-filtro de exaustão da rack ventilada. Embora os resultados obtidos por meio dessa técnica tenham sido superiores quando comparados à detecção de anticorpos virais em animais sentinelas (também descritos no mesmo trabalho) nenhum dado foi mencionado em relação à qualidade do RNA viral obtido. MILLER e colaboradores (2016) também utilizaram fragmentos de gaze e pré-filtro de exaustão para detecção de *Pasteurella pneumotropica* através da técnica de PCR em tempo real. Mais uma vez, nada foi mencionado em relação à qualidade do DNA extraído. Estes estudos publicados em 2016 foram utilizados como referência para comparação com o presente trabalho apesar de retratarem microrganismos diferentes. Isso ocorreu pois não foram encontrados na literatura estudos semelhantes que utilizassem o *M. pulmonis* como alvo.

O tecido pulmonar de camundongos e ratos se mostrou efetivo para detecção de *M. pulmonis*. SANCHEZ e colaboradores (1994) relataram identificação da bactéria através da técnica de PCR a partir de pulmões, útero e uretra de ratos infectados e que apresentavam sintomatologia clínica. Os resultados obtidos nessa publicação para PCR foram comparados à detecção do patógeno através das técnicas de cultivo e sorologia (ELISA) validando a utilização da técnica. CHAWLA e colaboradores (2017) também utilizaram tecido pulmonar para detecção de *M. pulmonis* através da PCR e compararam os resultados com a avaliação histopatológica do órgão. Ambos concluíram que a PCR a partir desse tipo de amostra permite a confirmação do diagnóstico mesmo em estágios iniciais da infecção. O presente trabalho também logrou êxito na detecção do patógeno ao utilizar esse tipo de amostra. Isso reforça a

importância da escolha do tecido pulmonar como amostra padrão do POP para Monitoramento Sanitário do micoplasma no CCA/UFOP.

FERREIRA (2005) descreve sucesso ao detectar *M. pulmonis* em BAL de ratos Wistar. O trabalho estudou 240 amostras provenientes de 8 biotérios convencionais da cidade de São Paulo. Dessas amostras 155 (64,58 %) foram positivas para a bactéria e a infecção foi observada em 100% dos biotérios avaliados. CEOLA e colaboradores (2016) também obtiveram bons resultados ao testar esse mesmo material coletado a partir de 20 ratos Wistar. Em nossos resultados, 80 % das amostras apresentaram positividade para o patógeno (8 em 10 amostras para Fischer e Wistar). Estes resultados corroboram com aqueles obtidos nesses dois estudos citados para a espécie *Rattus norvegicus*.

A baixa qualidade do DNA extraído a partir de amostras de BAL de camundongos pode ter contribuído para a não detecção de *M. pulmonis* na PCR. LOGANBILL e colaboradores (2005) conseguiram detectar a bactéria em lavado nasofaríngeo de camundongo utilizando uma técnica semelhante ao PCR em Tempo Real (Fluorogenic nuclease PCR). SCHOEB e colaboradores (1997), descreveram a técnica de Nested PCR para *M. pulmonis* como forma de melhorar o desempenho do diagnóstico para a bactéria, uma vez que a infecção concomitante (e, muito comum) com *CAR bacillus* pode inibir a detecção do micoplasma. Segundo o autor, entre as amostras mais inibidas na reação, está o BAL, mas amostras de traqueia e pulmão também foram inibidas embora tenham sofrido menor interferência.

Outro fator que deve ser considerado é a dificuldade na coleta de BAL em camundongos, sobretudo em animais isogênicos que apresentam menor porte. No presente trabalho houve perda da amostra devido ao rompimento da traqueia durante a coleta. Além disso, a necessidade de eutanasiar o animal para sua obtenção, reforça a ideia de que o BAL não apresenta vantagem metodológica sobre o tecido pulmonar. Consequentemente, entre pulmão e BAL, torna-se pertinente a opção pelo tecido pulmonar para utilização em uma rotina de monitoramento sanitário.

GOTO e colaboradores (1994) compararam a eficiência da detecção de *M. pulmonis* a partir de *swabs* traqueais, nasais e de cavidade oral de ratos utilizando-se as técnicas de cultivo e PCR. As duas técnicas apresentaram bom desempenho para amostras traqueais e nasais, no entanto, a PCR de *swab* oral se mostrou bem menos

sensível que o cultivo. Em um total de 54 animais, 34 amostras de *swab* nasal foram positivas para PCR, enquanto 31 amostras de *swab* traqueal e 12 amostras de *swab* oral foram positivas. Os autores apontam como possível explicação para os resultados a existência de substâncias inibidoras nas amostras de *swab* oral. Os resultados do presente estudo revelaram positividade em apenas uma amostra de *swab* oral proveniente de camundongo Swiss. Nesse caso, acredita-se que não se trata de resultado falso positivo uma vez que o tecido pulmonar e lavado traqueobrônquico desse mesmo animal também acusaram a presença de material genético do patógeno pesquisado. No entanto, a obtenção de apenas um resultado positivo em cinquenta amostras quando comparado aos resultados obtidos para tecido pulmonar e lavado traqueobrônquico (de ratos), indica que apesar dos esforços em determinar um tipo de amostra menos invasivo, o *swab* oral não cumpre os critérios para ser adotado como escolha. *Swabs* traqueais e nasais poderiam ser investigados como outras opções, o que é factível para ratos, mas para camundongos, a coleta a partir de animais vivos e com o mínimo de invasividade, torna-se desafiadora.

Biotérios que mantêm roedores alojados em racks ventiladas, têm maior dificuldade na detecção de patógenos de baixa prevalência. Uma amostragem que aborde maior número de animais deveria ser adotada, no entanto isso é inviável do ponto de vista ético e econômico. Felizmente a utilização de animais sentinelas surge como uma atraente alternativa nesse contexto. Porém diversos estudos têm demonstrado que o modelo de sentinelas por exposição à maravalha suja tem sido ineficiente para a transmissão de alguns agentes patogênicos de roedores, dentre eles: Sendai vírus (DILLEHAY et al, 1990; COMPTON et al, 2004); *Pasteurella pneumotropica* (HENDERSON et al, 2013); *CAR bacillus* (CUNDIFF et al., 1995) e Rotavirus murino “EDIM” (COMPTON et al, 2004).

Uma estratégia que vem sendo desenvolvida por muitos grupos de pesquisa para a detecção de microrganismos que não são detectados através do método de sentinelas expostas à cama suja, é a detecção destes pela técnica de PCR nos sistemas de exaustão de racks ventiladas. O presente trabalho propôs a detecção de *M. pulmonis* no sistema de exaustão das racks, através da utilização de *swab* de ducto central e adesão de papel filtro ao pré-filtro de exaustão. A qualidade do DNA obtido através do *swab* do ducto central de exaustão e papel filtro aderido ao pré-filtro foi ruim, indicando possível presença de substâncias contaminantes. Dessa forma

acredita-se que essa tenha sido a razão da impossibilidade/inibição de detecção do agente através da metodologia aqui apresentada.

Não foram encontrados na literatura publicações que descrevam a utilização dessa estratégia para os micoplasmas. Agentes como *Pasteurella pneumotropica* (BAUER et al, 2016; MILLER et al, 2016), Norovirus murino (ZORN et al., 2016), Astrovirus murino e *Myocoptes musculinus* (KÖRNER et al, 2019), Vírus da hepatite do camundongo, *Helicobacter* spp., *Entamoeba muris* e *Tritrichomonas muris* (BAUER, et al,2016) dentre outros são detectados através da PCR de partículas depositadas no sistema de exaustão de racks. Todos os trabalhos consultados utilizaram fragmentos de gaze que permaneceram aderidos ao pré-filtro de exaustão por cerca de três semanas. Dois destes trabalhos utilizaram além da gaze, fragmentos do próprio pré-filtro de exaustão.

Em todos os trabalhos aqui mencionados a amostragem da *rack* proporcionou melhores resultados de detecção de patógenos quando comparado à utilização de sentinelas. De forma complementar ao que foi executado no presente estudo, seria interessante a utilização de outro elemento filtrante como a gaze em lugar do papel filtro bem como a coleta de *swab* de pontos adicionais da *rack* ventilada para a detecção de *M. pulmonis*. O aperfeiçoamento das técnicas de detecção a partir de elementos ambientais deve ser constante para que se possa, de maneira confiável, reduzir ou mesmo substituir a utilização de animais para fins de monitoramento sanitário. Dessa forma, além da satisfação de preceitos éticos, torna-se mais viável o transporte desse tipo de amostras a longas distâncias e cria-se a possibilidade de atendimento de outros biotérios parceiros.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu a padronização de protocolo para diagnóstico de *Mycoplasma pulmonis* através da técnica de PCR. Além disso foi possível padronizar métodos de coleta de amostras, extração de DNA e a própria reação de PCR considerando as particularidades de cada espécime. A comparação entre os resultados obtidos entre os diferentes tipos de amostras permitiu a elaboração de um POP para detecção do *M. pulmonis* a partir de amostras de tecido pulmonar de roedores e este documento permitirá a execução do monitoramento sanitário para essa bactéria no CCA.

Além da implantação do POP na rotina de monitoramento sanitário recomenda-se também:

- Realização de diagnóstico de animais sintomáticos através de PCR a partir de amostras de pulmões.
- Utilização de pulmões provenientes de sentinelas que já são utilizadas para monitoramento parasitológico periódico para diagnóstico de *Mycoplasma pulmonis*.
- Alerta à comunidade científica local sobre a presença do microrganismo nas colônias e a necessidade de considerá-lo na interpretação de resultados experimentais.
- Finalmente, esforços deverão ser envidados no sentido de controlar/eliminar o agente das instalações animais.

7. PERSPECTIVAS

Realização de sequenciamento genético dos amplicons para validação da técnica de PCR padronizada neste estudo;

Implantação do POP elaborado;

Autonomia do CCA na realização de seu monitoramento sanitário periódico com possibilidade de atendimentos a demandas de outros biotérios;

Desenvolvimento de testes multiplex para detecção de mais agentes em uma única reação de PCR;

Aperfeiçoamento da técnica para detecção de *M. pulmonis* em amostras não invasivas (*swab* oral) e ambientais;

Ampliação de painel molecular para diagnóstico de patógenos que acometem roedores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTWOHL, J. E.; CERA L. M.; WRIGHT M. F., MEDINA, L. V.; KIM L. J. The efficacy of a dirty bedding sentinel system for detecting Sendai virus infection in mice: a comparison of clinical signs and seroconversion. **Laboratory Animal Science**, v.44, p.73–75. 1994.

BAUER, B. A.; BESCH-WILLIFORD, C.; LIVINGSTON, R. S.; CRIM, M. J.; RILEY, L. K.; MYLES, M. H. Influence of rack design and disease prevalence on detection of rodent pathogens in exhaust debris samples from individually ventilated caging systems. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.55, p.782–788. 2016.

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

BARRETO, M. L.; NASCIMENTO, E. R; CAMPOS, C. A. M.; NASCIMENTO, M. G. F.; LIGNON, G. B.; LIRA, M. L., SILVA, R.G. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in Laboratory Rats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.260-264. 2002.

BOONYARATTANASOONTHORN, T.; ELEWA, Y. H. A.; TAG-EL-DIN-HASSAN, H.T.; MORIMATSU, M.; AGUI, T. Profiling of cellular immune responses to *Mycoplasma pulmonis* infection in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v.73, p.55–65. 2019.

BOOTH, J. L.; UMSTEAD, T. M.; HU, S.; DYBVIG, K. F.; COOPER, T. K.; WILSON, R. P.; CHRONEOS, Z. C. Housing conditions modulate the severity of *Mycoplasma pulmonis* infection in mice deficient in class A scavenger receptor. **Comparative Medicine**, v.64, n.6, p.424–439. 2014.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa no 15, de 16 de dezembro de 2013. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. do Con-selho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 dez. 2013. Disponível em: <
https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_15_de_16122013.html>. Acesso em 03 abr. 2021.

- BRIELMEIER, M.; MAHABIR, E.; NEEDHAM, J. R.; LENGGER, C. C.; WIHELM, P.; SCHMIDT, J. Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: a field study. **Laboratory Animals**, v.40, p. 247–260. 2006.
- BRODERSON, J. R.; LINDSEY, J. R.; CRAWFORD, J. E. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. **American Journal of Pathology**, v.85 n.1. p.115-128. 1976.
- BURKHOLDER, T.; FOLTZ, C.; KARLSSON, C.; LINTON, G; SMITH, J. M. Health evaluation of experimental laboratory mice. **Current Protocols in Mouse Biology**, p.145-165. 2012.
- CARTNER, S. C.; SIMECKA, J. W.; BRILES, D. E.; CASSELL, G. H.; LINDSEY, J. R. Resistance to mycoplasmal lung disease in mice is a complex genetic trait. **Infection and Immunity**, v.64, n.12, p.5326-5331. 1996.
- CEOLA, C. F.; SAMPAIO, J.; BLATT, S. L.; CORDOVA, C. M. M. Mycoplasma infection and inflammatory effects on laboratory rats bred for experimental research. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** [online]., v.7, n.2, p.59-66. 2016.
- CHARLES RIVER, *Mycoplasma pulmonis*. 2009. **Technical Sheet**. Disponível em:<<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/MycoplasmapulmonisTechnicalSheet.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- CHAWLA, S.; JENA, S.; VENKATSAN, B.; MAHARA, K.; SAHU, N. Clinical, pathological, and molecular investigation of *Mycoplasma pulmonis*-induced murine respiratory mycoplasmosis in a rat (*Rattus norvegicus*) colony. **Veterinary World**, v.10, n.11, p.1378-1382. 2017.
- CITTI, C.; DORDET-FRISONI, E.; NOUVEL, L. X.; KUO, C. H.; BARANOWSKI, E. Horizontal Gene Transfers in Mycoplasmas (Mollicutes). **Current Issues in Molecular Biology**, v. 29, p. 3–22. 2018.
- CLIFFORD, C. B.; HENDERSON, K. S.; CHUNGU, C. **A Guide to Modern Strategies for Infection Surveillance of Rodent Populations: Beyond Sentinels**. Charles River Laboratories, 2014.
- COMPTON, S. R.; HOMBERGER, F. R.; PATURZO, F. X.; CLARCK, J. M. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack. **Comparative Medicine**, v.54, p.382–392. 2004.

COMPTON, S. R.; RILEY, L. K. Detection of infectious agents in laboratory rodents: traditional and molecular techniques. **Comparative Medicine**, v.51, p.113-119. 2001.

COUTO, S.E.R. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Sanitário. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C., OLIVEIRA, R. S. (organizadores). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2002. p. 59-64.

CRISTO, G. S. P; SANTOS, S. L. Utilização da PCR na detecção de *Mycoplasma* sp. em culturas de células contínuas e de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 9, n. 1, p. 72-76. 2009.

CUNDIFF, D. D., RILEY, L. K.; FRANKLIN, C. L., HOOK, J. R. R. R.; BESCH-WILLIFORD, C. Failure of a soiled bedding sentinel system to detect cilia-associated respiratory bacillus infection in rats. **Laboratory Animal Science**, v.45, p.219–221. 1995.

DAVIS, J. K.; SIMECKA, J. W.; WILLIAMSON, J. S.; ROSS, S. E.; JULIANA, M. M.; THORP, R. B; CASSELL, G. H. Nonspecific lymphocyte responses in F344 and LEW rats: susceptibility to murine respiratory mycoplasmosis and examination of cellular basis for strain differences. **Infection and Immunity**, v.49, p152–158. 1985.

DILLEHAY, D. L.; LEHNER, N. D.; HUERKAMP, M. J. The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Sendai virus infections. **Laboratory Animal Science**, v.40, n.4, p. 367 –370. 1990.

EVENGARD, B. K.; SANDSTEDT, G.; BOLSKE, R.; FEINSTEIN, I.; RIESENFELT-ORN; SMITH, C.I. Intranasal inoculation of *Mycoplasma pulmonis* in mice with severe combined immunodeficiency (SCID) causes a wasting disease with grave arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.98, p.388-394. 1994.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v.39 n.4 p.729-735. 1995.

FERREIRA. J. B. **Detecção de *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritis* no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.2005.

FRANKLIN, C. L.; ERICSSON, A. C. Microbiota and reproducibility of rodent models. **Laboratory Animals**, p.114-122. 2017.

GLENISTER, P. H.; THORNTON, C. E. Cryoconservation--archiving for the future. **Mammalian Genome**, v. 11, n. 7, p. 565–571. 2000.

GOTO, K.; KUNITA, S.; TERADA, E.; ITOH, T. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Mycoplasma pulmonis* from nasal, tracheal and oral swab samples of rats. **Jikken Dobutsu**, v.43, n.3, p. 413-415. 1994.

HARKNESS J.E.; TURNER, P.V.; VANDEWOUDE S.;et al. Introduction, general husbandry, and disease prevention. In: GREENACE, C.B. **Harkness and Wagner's biology and medicine for rabbits and rodents**. 5th edition, Ames: Wiley Blackwellp editor. 2010. p.11-17.

HAYASHIMOTO, N.; MORITA, H.; ISHIDA, T.; YASUDA, M.; KAMEDA, S.; UCHIDA, R.; TANAKA, M.; OZAWA, M.; SATO, A.; TAKAKURA, A.; ITOH, T., KAGIYAMA, N. Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan. **Experimental Animals**, v.62. p.41-48. 2013.

HENDERSON, K. S.; PERKINS, C.L.; HAVENS, R. B.; KELLY, M.J.; FRANCIS, B.C.; DOLE, V.S.; SHEK, W.R. Efficacy of direct detection of pathogens in naturally infected mice by using a high-density PCR array. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.52, n.6, p.763–772. 2013.

ILAR. Committee on Long-Term Holding of Laboratory Rodents. Long-term holding of laboratory rodents. **ILAR News**, v.19, p.L1–25. 1976.

KAMIYAMA, T.; SAITO, M.; NAKAGAWA, M. Effects of *Mycoplasma pulmonis* infection and exposure to nitrogen dioxide on activities of natural killer cells and macrophages of the mouse. **Jikken Dobutsu** v.40, p.255-257, 1991.

KING, W. W.; RUSSEL, S. P. Metabolic, traumatic, and miscellaneous diseases. In: SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S.H.; FRANKLIN, C. L. editors. **The laboratory rat**. 2nd edition. Orlando: Academic Press. 2005. p.521.

KLING, M. A. A. Review of Respiratory System Anatomy, Physiology and Disease in the Mouse, Rat, Hamster and Gerbil. **Veterinary Clinical Exotic Animal**, v.14. p.287–337. 2011.

KÖRNER, C.; MILLER, M.; BRIELMEIER, M. Detection of Murine Astrovirus and *Mycoplasma musculus* in individually ventilated caging systems: Investigations to expose suitable detection methods for routine hygienic monitoring. **PLoS ONE**, v.14, n.8, p.1-12. 2019.

LAMBERT, L.C.; TRUMMELL, H.Q.; SINGH, A.; CASSELL, G.H.; BRIDGES, R.J. *Mycoplasma pulmonis* inhibits electrogenic ion transport across murine tracheal epithelial cell monolayers. **Infection and Immunity**, v.66, n.1, p. 272-279, 1998.
LANGAN, G. Respiratory diseases of rodents and rabbits. **Respiratory Medicine and Surgery**, v.30, n.6, p.1309-1336. 2000.

LI, N.; HE, F.; LIAO, B.; ZHOU, Y.; LI, B.; PAN, P. Exposure to ambient particulate matter alters the microbial composition and induces immune changes in rat lung. **Respiratory Research**, v.18, n.1, p. 1–10. 2017.

LOGANBILL, J. K.; WAGNER, A. M.; BESSELSSEN, D. G. Detection of *Mycoplasma pulmonis* by fluorogenic nuclease polymerase chain reaction analysis. **Comparative medicine**, v.55, n.5, p.419–424. 2005.

MÄHLER, M.; KÖHL, W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in western Europe. **Lab Animal (NY)**, v.38, p.161–165. 2009.

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

MAJEROWICZ, J. **Boas práticas em biotérios e biossegurança**. Rio de Janeiro. Interciência, 2008.

MANJUNATH, S.; KULKARNI, P. G.; NAGAVELU, K.; SAMUEL, R. J.; SRINIVASAN, S.; RAMASAMY, N.; HEGDE, N. R.; GUDDE, R. S. Sero-Prevalence of Rodent Pathogens in India. **PLoS ONE**, v.10, n.7, p.1-11. 2015.

MANSFIELD, K. G.; RILEY, L. K.; KENT, M. L. Workshop Summary: Detection, Impact, and Control of Specific Pathogens in Animal Resource Facilities. **ILAR Journal**, v. 51, n. 2, p. 171–179, 2010.

MASOUMALINEJAD, Z.; ZINATIZADEH, M.R.; TAHMASEBIABDAR, N. A Review of *Mycoplasma* in Laboratory Mice **Modern Medical Laboratory Journal**, v.2, n.2, p.127-131. 2018.

MCDONALD, D.M.; SCHOEB, T.R.; LINDSEY, J.R. *Mycoplasma pulmonis* infections cause long-lasting potentiation of neurogenic inflammation in the respiratory tract of the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v.87, n.3, p. 787-799, 1991.

MCINESS, E. F.; RASMUSSEN, L.; FUNG, P.; AULD, A. M.; ALVAREZ, L.; LAWRENCE, D. A.; QUINN, M. E.; UTTERIDGE, T. D.; DELFIERRO, G. M.; VASSALLO, B. A.; STEVENSON, R. Prevalence of viral, bacterial and parasitological diseases in rats and mice used in research environments in Australasia over a 5-y period. **Lab Animal (NY)**, v.40, p.341–350. 2011.

MILLER, M; BRIELMER, M. Environmental samples make soiled bedding sentinels dispensable for hygienic monitoring of IVC-reared mouse colonies. **Laboratory Animals**, v.52, n.3, p.233–239. 2017.

MILLER, M; RITTER, B.; ZORN, J.; BRIELMER, M. Exhaust air dust monitoring is superior to soiled bedding sentinels for the detection of *Pasteurella pneumotropica* in individually ventilated cage systems. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 55, n.6, p. 775-781. 2016.

MILLER, M.; RITTER, B.; ZORN, J.; BRIELMEIER, M. et al. Exhaust air particle PCR detects *Helicobacter hepaticus* infections at low prevalence. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v.7, n.4, p.1-2. 2016.

MIZE, M. T.; SUN, X. L.; SIMECKA, J. W. Interleukin-17A exacerbates disease severity in BALB/c mice susceptible to lung infection with *Mycoplasma pulmonis*. **Infection and Immunity**, v.86 n.9 p.1-14. 2018.

MOTTA, M. C.; SPINELLI, M. O.; GODOY, C. M. S. C.; CRUZ, R. J., BORTOLATTO, J. Detecção de *Proteus mirabilis* nas fezes de camundongos SPF. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v.1, n.3, p. 246-250. 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Infectious diseases of mice and rats**. Washington (DC): The National Academies Press. 1991.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório**. 8ª Edição. Editora EDIPUCRS. 2014.

NICKLAS, W., HOMBERGER, F. R.; ILLGEN-WILCKE, B.; JACOBI, K.; KRAFT, V.; KUNSTYR, I.; MÄHLER, M.; MEYER, H.; POHLMAYER-ESCH, G. Implications of infectious agents on results of animal experiments. **Laboratory Animals**, v. 33, n.4, p.39–87. 1999.

NICKLAS, W. International Harmonization of Health monitoring. **ILAR JOURNAL**, v.49, n.3, p. 338-346. 2008.

NORLANDER, T.; NILSSON, L.; RIVERO, C.; MIDVEDT, T.; LIDEGREN, M.; CARLSOO, B.; STIERNNA, P. Effects of experimental *Mycoplasma pulmonis* infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat. **European Respiratory Journal**, v.10, n.10, p.2334-2342. 1997.

PAIVA, V.L.G.S. **Caracterização anatomopatológica, microbiológica e parasitológica de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes idades**. 2015. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2015.

PIASECKI, T.; CHRZASTEK, K.; KASPRZYKOWSKA, U. Mycoplasma pulmonis of Rodents as a Possible Human Pathogen. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.17, n.7, p. 475-477. 2017.

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

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 62, n. 4 p.1094–1156. 1998.

REYES, L; SHELTON, M.; RIGGS, M.; BROWN, M.B. Rat strains differ in susceptibility to maternal and fetal infection with *Mycoplasma pulmonis*. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.51 n.3. p. 211-219. 2004.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R.L. The principles of humane experimental technique. **Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare**.1959.

SAMBROOKS, J.; Russel, D. W. **Molecular Cloning.A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 3ª edição, 2001.

SANCHEZ, S; TYLER, K.; ROZENGURT, N.; LIDA, J. Comparison of a PCR-based Diagnostic Assay for *Mycoplasma pulmonis* with Traditional Detection Techniques. **Laboratory Animals**, v. 28, n.3, p. 249-256. 1994.

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

SCHOEB, T.R. Respiratory diseases of rodents. **Veterinary Clinical North American Exotic Animal Practice**, v.3 n.2. p.487-488. 2000.

SERVICK, K. Of mice and microbes. **Science** v.353, p.741-743. 2016.

SILVA, M.T.O. **Desenvolvimento de um ELISA misto para detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma pulmonis* e/ou *M. arthritidis* em roedores.** 2015. Dissertação. (Mestrado em Ciências e Biotecnologia) Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro.2015.

SIMEKA, J. W.; DAVIS, J. K.; DAVIDSON, M. K.; ROSS, S. E.; STADLANDER, C. T. K. H.; CASSEL, G. H.; *Mycoplasma* diseases of animals. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. eds. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis.** ASM Press. Washington. 1992. v.1, p.391-416.

SOUZA, J. B.; OLIVEIRA, M. T.; NASCIMENTO, E. R.; VERICIMO, M. A.; BARRETO, M. L. *Mycoplasma pulmonis*, agente da micoplasmose respiratória murina: revisão. **Archives of Veterinary Science**, v.21. n.4 p.08-25. 2016.

SUNG, H.; KANG, S. H.; BAE, Y. J.; HONG, J. Y.; CHUNG, Y. B., LEE, C.; SONG, S. PCR-based detection of *Mycoplasma* species. **The Journal of Microbiology**, v.44, n.1. p.42-49. 2006.

STEFFEN, M. J.; EBERSOLE, J.L. Secretory immune responses to *Mycoplasma pulmonis*. **Infection and Immunity**, v.60, n.2, p. 337- 344, 1992.

SWING, S.P.; DAVIS, J.K.; EGAN, M.L. In vitro effects of *Mycoplasma pulmonis* on murine natural killer cell activity. **Laboratory Animal Science**, v.45, n.3, p. 352-356, 1995.

TEDESCO, J. T. G.; BLATT, S. L.; CORDOVA, C. M. M. Infecção por *Mycoplasma pulmonis* em ratos wistar provenientes de biotério. **Revista de Patologia Tropical**, v.40, n.4, p. 279-86. 2011.

VAN KUPPEVELD, F. J.; VAN DER LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; QUINT, W. G.; NIESTERS, H. G.; GALAMA, J. M.; MELCHERS, W. J. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2606-2615, 1992.

WAWEGAMA, N. K.; MARKHAM, P. F.; ELSON, C. M.; KANCI, A.; MARENDA, M. S.; BROWNING, G. F.; BRODNICKI, T. C. Autoimmune-Disease-Prone NOD Mice Help To Reveal a New Genetic Locus for Reducing Pulmonary Disease Caused by *Mycoplasma pulmonis*. **Infection and Immunity**, v.86, n.3, p.2-17. 2018.

WEISBROTH, S. H. Post-indigenous disease: changing concepts of disease in laboratory rodents. **Laboratory Animals**, v.25, p.25-33. 1996.

YANCEY, A. L.; WATSON, H. L.; CARTNER, S. C.; SIMECKA, J. W. Gender is a major factor in determining the severity of *Mycoplasma* respiratory disease in mice. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 2865 - 2871. 2001.

ZORN, J.; RITTER, B.; MILLER, M.; KRAUS, M.; NORTHRUP, E.; BRIELMEIER, M. Murine norovirus detection in the exhaust air of IVCs is more sensitive than serological analysis of soiled bedding sentinels. **Laboratory Animals**, v. 51, n.3 p.301–310. 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – INFORMAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS UTILIZADOS (continua)

Animal	Identificação	Motivo do descarte	Alteração clínica	Sexo	Idade (semanas)
Balb/c	1	Problemas reprodutivos	não	F	20
Balb/c	2	Matriz em idade avançada	não	F	32
Balb/c	3	Matriz em idade avançada	não	F	28
Balb/c	4	Matriz em idade avançada	não	F	41
Balb/c	5	Matriz em idade avançada	não	F	41
Balb/c	6	Problemas reprodutivos	não	F	22
Balb/c	7	Problemas reprodutivos	não	F	22
Balb/c	8	Matriz em idade avançada	não	F	28
Balb/c	9	Matriz em idade avançada	não	F	28
Balb/c	10	Matriz em idade avançada	não	M	60
Balb/c	11	Matriz em idade avançada	não	M	60
Balb/c	12	Matriz em idade avançada	não	M	60
C57BL/6	13	Matriz em idade avançada	não	M	40
C57BL/6	14	Matriz em idade avançada	não	M	40
C57BL/6	15	Matriz em idade avançada	não	M	40
Swiss	16	Matriz em idade avançada	não	M	38
Swiss	17	Matriz em idade avançada	não	M	38
Swiss	18	Matriz em idade avançada	não	M	38
C57BL/6	19	Matriz em idade avançada	não	F	39
C57BL/6	20	Matriz em idade avançada	não	F	39
C57BL/6	21	Matriz em idade avançada	não	F	39
C57BL/6	22	Matriz em idade avançada	não	F	39
Swiss	23	Matriz em idade avançada	não	M	37
Swiss	24	Matriz em idade avançada	não	M	37
Swiss	25	Matriz em idade avançada	não	M	37
Swiss	26	Matriz em idade avançada	não	F	39
Swiss	27	Matriz em idade avançada	não	M	37
Wistar	28	Matriz em idade avançada	não	M	28
Wistar	29	Problemas reprodutivos	não	M	20
Wistar	30	Matriz em idade avançada	não	F	28
Balb/c	31	Alteração clínica	pelos arrepiados	M	18
C57BL/6	32	Matriz em idade avançada	não	M	32
C57BL/6	33	Matriz em idade avançada	não	F	32
Balb/c	34	Matriz em idade avançada	não	M	34
C57BL/6	35	Matriz em idade avançada	não	M	35
Balb/c	36	Matriz em idade avançada	não	M	35
Balb/c	37	Matriz em idade avançada	não	M	34
Balb/c	38	Matriz em idade avançada	não	M	36
Fischer	39	Animal não utilizado (reprodutor)	não	M	12
Wistar	40	Matriz em idade avançada	não	M	60

Wistar	41	Morte de companheiro de caixa	não	M	28
Wistar	42	Morte de companheiro de caixa	não	F	12
Fischer	43	Matriz em idade avançada	não	M	28
Fischer	44	Matriz em idade avançada	não	F	28
Swiss	45	Matriz em idade avançada	não	M	30
C57BL/6	46	Matriz em idade avançada	não	M	30
C57BL/6	47	Matriz em idade avançada	não	F	31
Balb/c	48	Movimentos estereotipados	estereotipias	F	11
Balb/c	49	Matriz em idade avançada	não	M	29
Swiss	50	Matriz em idade avançada	não	F	30
Swiss	51	Matriz em idade avançada	não	F	30
Swiss	52	Matriz em idade avançada	não	M	28
Swiss	53	Matriz em idade avançada	não	M	29
Swiss	54	Matriz em idade avançada	não	M	30
Swiss	55	Matriz em idade avançada	não	M	29
Swiss	56	Matriz em idade avançada	não	M	29
Swiss	57	Matriz em idade avançada	não	M	28
Swiss	58	Matriz em idade avançada	não	M	29
Swiss	59	Feridas no dorso (briga)	feridas	F	13
Swiss	60	Matriz em idade avançada	não	M	28
Wistar	61	Matriz em idade avançada	não	M	60
Wistar	62	Matriz em idade avançada	não	F	60
Wistar	63	Problemas reprodutivos	não	M	20
Wistar	64	Problemas reprodutivos	não	F	24
Fischer	65	Otite (suspeita micoplasmose)	otite	F	32
Fischer	66	Morte de companheiro de caixa	não	M	32
Wistar	67	Matriz em idade avançada	não	M	32
Fischer	68	Matriz em idade avançada	não	M	28
Wistar	69	Matriz em idade avançada Companheiro de animal 65	não	M	36
Fischer	70	(otite)	não	M	32
Wistar	71	Matriz em idade avançada	não	M	30
Fischer	72	Morte de companheiro de caixa	não	M	32
Fischer	73	Matriz em idade avançada	não	F	32
Fischer	74	Morte de companheiro de caixa	não	M	24
Wistar	75	Matriz em idade avançada Companheiro de animal 77	não	F	36
Fischer	76	(otite)	não	M	40
Fischer	77	Otite (suspeita micoplasmose)	otite	F	36
Wistar	78	Matriz em idade avançada	não	F	44
Wistar	79	Matriz em idade avançada	não	F	44
Wistar	80	Matriz em idade avançada	não	F	40
Fischer	81	Matriz em idade avançada	não	F	40
Wistar	82	Matriz em idade avançada	não	F	40
C57BL/6	83	Matriz em idade avançada	não	M	37
C57BL/6	84	Matriz em idade avançada	não	F	54
C57BL/6	85	Matriz em idade avançada	não	F	44

Wistar	86	Matriz em idade avançada	não	F	28
Wistar	87	Matriz em idade avançada	não	F	28
C57BL/6	88	Matriz em idade avançada	não	F	33
C57BL/6	89	Matriz em idade avançada	não	F	33
C57BL/6	90	Matriz em idade avançada	não	F	35
C57BL/6	91	Matriz em idade avançada	não	F	35
C57BL/6	92	Matriz em idade avançada	não	F	36
Fischer	93	Matriz em idade avançada	não	F	30
Fischer	94	Matriz em idade avançada	não	F	30

APÊNDICE B – AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA DE PULMÃO

(continua)

Amostra	Espécie	Linhagem/estoque	[] DNA ng/ μ L	260/280nm	260/230nm
2P	camundongo	Balb/c	770,2	1,79	2,05
3P	camundongo	Balb/c	932,4	1,84	2,37
4P	camundongo	Balb/c	1017,1	1,85	2,33
5P	camundongo	Balb/c	1049,4	1,81	2,08
6P	camundongo	Balb/c	762,7	1,8	2,02
7P	camundongo	Balb/c	636,4	1,83	2,14
8P	camundongo	Balb/c	678,4	1,82	2,14
9P	camundongo	Balb/c	1134,5	1,74	1,87
38P	camundongo	Balb/c	1186,5	1,88	2,2
49P	camundongo	Balb/c	669	1,84	1,97
14P	camundongo	C57BL/6J	821,8	1,86	2,21
15P	camundongo	C57BL/6J	850,4	1,85	2,26
19P	camundongo	C57BL/6J	641,6	1,82	1,96
21P	camundongo	C57BL/6J	538,8	1,85	2,11
22P	camundongo	C57BL/6J	864	1,84	2,27
32P	camundongo	C57BL/6J	825,7	1,86	2,29
33P	camundongo	C57BL/6J	1285,1	1,84	2,21
46P	camundongo	C57BL/6J	824,1	1,83	2,22
47P	camundongo	C57BL/6J	848,1	1,82	2,05
84P	camundongo	C57BL/6J	1318,5	1,74	1,31
16P	camundongo	Swiss	525,9	1,86	2,11
17P	camundongo	Swiss	920	1,84	2,28
18P	camundongo	Swiss	677,9	1,82	2,12
23P	camundongo	Swiss	680,4	1,82	2,11
25P	camundongo	Swiss	1447,3	1,83	2,16
26P	camundongo	Swiss	186,4	1,86	2,26
27P	camundongo	Swiss	682,9	1,81	1,96
45P	camundongo	Swiss	818,2	1,84	2,02
51P	camundongo	Swiss	484,7	1,88	2,09
53P	camundongo	Swiss	460	1,84	1,73
43P	rato	Fischer	933,2	1,85	2,36
44P	rato	Fischer	694,9	1,82	2,1
66P	rato	Fischer	565	1,85	2,13

68P	rato	Fischer	633,2	1,84	2,15
70P	rato	Fischer	431	1,83	1,94
72P	rato	Fischer	1216,7	1,84	2,33
73P	rato	Fischer	691,2	1,82	2,14
74P	rato	Fischer	877,4	1,85	2,32
76P	rato	Fischer	882,1	1,86	2,23
77P	rato	Fischer	841,1	1,85	2,24
29P	rato	Wistar	1976,5	1,86	2,27
30P	rato	Wistar	592,1	1,87	2,21
40P	rato	Wistar	841,7	1,86	2,3
41P	rato	Wistar	492,1	1,78	1,59
42P	rato	Wistar	639,7	1,83	2,09
61P	rato	Wistar	648,4	1,83	2,07
62P	rato	Wistar	798,3	1,84	2,21
63P	rato	Wistar	635,8	1,88	2,15
64P	rato	Wistar	771,1	1,85	2,16
67P	rato	Wistar	803,1	1,86	2,13

APÊNDICE C – AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE DNA DE BAL

(continua)

Amostra	Espécie	Linhagem/estoque	[] DNA ng/μL	260/280nm	260/230nm
2L	camundongo	Balb/c	0,5	0,3	0,43
3L	camundongo	Balb/c	15,8	1,47	1,59
5L	camundongo	Balb/c	-0,3	-0,19	-0,11
6L	camundongo	Balb/c	-0,1	-0,19	-0,1
7L	camundongo	Balb/c	0,3	0,53	0,08
8L	camundongo	Balb/c	0,2	0,52	0,1
9L	camundongo	Balb/c	3,7	1,57	0,68
12L	camundongo	Balb/c	-1,2	3,88	-1,02
37L	camundongo	Balb/c	0,9	0,55	0,32
49L	camundongo	Balb/c	-0,2	-0,21	-0,2
19L	camundongo	C57BL/6J	2,4	0,71	0,71
21L	camundongo	C57BL/6J	4,9	1,16	1,47
33L	camundongo	C57BL/6J	0,1	0,37	0,04
84L	camundongo	C57BL/6J	1,9	0,8	0,23
85L	camundongo	C57BL/6J	0,9	0,83	0,3
88L	camundongo	C57BL/6J	9,1	1,97	1,22
89L	camundongo	C57BL/6J	0,3	0,83	0,06
90L	camundongo	C57BL/6J	-1,3	5,56	-1,4
91L	camundongo	C57BL/6J	0,6	0,43	0,37
94L	camundongo	C57BL/6J	-1,7	7,38	4,47
16L	camundongo	Swiss	0,2	0,12	0,13
17L	camundongo	Swiss	0,4	0,2	0,8
18L	camundongo	Swiss	1,9	0,72	0,88
23L	camundongo	Swiss	1,2	0,86	0,35
25L	camundongo	Swiss	4,5	0,98	1,28
26L	camundongo	Swiss	1,1	0,89	0,27
45L	camundongo	Swiss	590,3	1,83	2,3
51L	camundongo	Swiss	1,1	0,78	0,2
53L	camundongo	Swiss	-0,1	-0,05	-0,05
58L	camundongo	Swiss	0,3	0,4	0,13
43L	rato	Fischer	44	1,69	1,8
44L	rato	Fischer	227,9	1,79	2,1
66L	rato	Fischer	105,3	1,87	2,23
70L	rato	Fischer	1389,7	1,85	2,2
72L	rato	Fischer	76,9	1,8	2,07
73L	rato	Fischer	59,7	1,9	2,16
74L	rato	Fischer	318,9	1,86	2,13
76L	rato	Fischer	139,2	1,88	(conclusão)

					2,15
77L	rato	Fischer	79,3	1,85	2,17
81L	rato	Fischer	1253,2	1,83	1,99
29L	rato	Wistar	77,5	1,81	2,14
61L	rato	Wistar	161,6	1,79	2,05
62L	rato	Wistar	90,2	1,75	2,1
63L	rato	Wistar	163,4	1,86	2,14
64L	rato	Wistar	68,5	1,87	2,1
67L	rato	Wistar	385,4	1,84	2,11
69L	rato	Wistar	114	1,84	2,05
78L	rato	Wistar	59,4	1,85	2,13
79L	rato	Wistar	712,7	1,82	2,05
87L	rato	Wistar	45,4	1,87	2,1

APÊNDICE D – POP PARA MONITORAMENTO DE *M. pulmonis*

		Procedimento Operacional Padrão (POP)			
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.				Código: CR-4	
Data da Emissão: 08/08/2020		Número do POP: 01/2020		Página 1 de 17	
Histórico de Elaboração e Revisões:					
Versão - Data	Atividades	Nome	Cargo	Rubrica	
08.08.2020	Elaborado por	Patrícia Mitre	Medica Veterinária		
	Avaliado por				
	Aprovado por				
	Validado por				
Sumário <ol style="list-style-type: none"> 1. Objetivo 2. Executores 3. Campos de Aplicação 4. Definições 5. Siglas 6. Condições gerais 7. Frequência 8. Materiais 9. Procedimento 10. Responsabilidades 11. Referências Bibliográficas <p>1. Objetivo Execução da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) para detecção de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em ratos e camundongos criados e mantidos no Centro de Ciência Animal da UFOP como parte de seu Programa de Monitoramento Sanitário.</p> <p>2. Executores: Médicos veterinários, técnicos de laboratório e auxiliares.</p>					

	Procedimento Operacional Padrão (POP)															
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4														
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 2 de 17														
<p style="text-align: center;">3. Campos de Aplicação</p> <p>Este procedimento aplica-se a todos os ratos e camundongos mantidos no Setor de Criação do CCA.</p> <p style="text-align: center;">4. Definições</p> <ul style="list-style-type: none"> • Milli-Q – água ultra pura • PCR - reação em cadeia da polimerase que emprega enzimas termoativas em ciclos de desnaturação, polimerização e extensão de filamentos de DNA. • PROTEINASE K - enzima, utilizada para degradar proteínas contaminantes • TAQ DNA POLIMERASE - enzima que sintetiza novos filamentos de DNA a partir de um molde de DNA (alvo) e de um par de oligonucleotídeos iniciadores. <p style="text-align: center;">5. Siglas</p> <table border="1" data-bbox="421 1451 1437 1776"> <tr> <td>UFOP</td> <td>Universidade Federal de Ouro Preto</td> </tr> <tr> <td>CCA</td> <td>Centro de Ciência Animal</td> </tr> <tr> <td>EPC</td> <td>Equipamento de Proteção Coletiva</td> </tr> <tr> <td>EPI</td> <td>Equipamento de Proteção Individual</td> </tr> <tr> <td>PCR</td> <td>Reação em Cadeia de Polimerase</td> </tr> <tr> <td>DNA</td> <td>Ácido Desoxiribonucléico (sigla em português = ADN)</td> </tr> <tr> <td>PBS</td> <td>Phosphate Buffered Saline (Tampão Salina Fosfato)</td> </tr> </table>			UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto	CCA	Centro de Ciência Animal	EPC	Equipamento de Proteção Coletiva	EPI	Equipamento de Proteção Individual	PCR	Reação em Cadeia de Polimerase	DNA	Ácido Desoxiribonucléico (sigla em português = ADN)	PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Salina Fosfato)
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto															
CCA	Centro de Ciência Animal															
EPC	Equipamento de Proteção Coletiva															
EPI	Equipamento de Proteção Individual															
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase															
DNA	Ácido Desoxiribonucléico (sigla em português = ADN)															
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Salina Fosfato)															

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 3 de 17
<p>6. Condições gerais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Treinamento das boas práticas de biossegurança; • Treinamento de recursos humanos quanto à amostragem de animais e execução dos testes laboratoriais • Uso regular de equipamento de proteção coletiva (EPC) e equipamento de proteção individual (EPI); • Treinamento de toda a equipe envolvida; <p>7. Frequência Bimestral</p> <p>8. Materiais e equipamentos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Provetas de 10mL; • Provetas de 100mL; • Ponteiras autoclavadas • Caneta para identificar tubos • Tubos novos de 1,5mL livres de nucleases • Ponteiras novas livres de nucleases • Micropipetas automáticas de 20µl, 200µl e 1000µl • Vortex • Bloco térmico aquecido (à 100°C) • Banho-maria (à 37°C) • Microcentrifuga para tubos de 1,5mL • Suporte para tubos de 1,5mL • Caneta para identificação 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 4 de 17
<ul style="list-style-type: none"> • Descarte para material contaminado • Autoclave • Isopor contendo gelo • Água Milli-Q livre de nucleases • PBS estéril • Luvas descartáveis • Congelador -20°C • Tubos novos de 0,2mL de parede fina, livres de nucleases • Suporte para tubos de 0,2mL • Termociclador • Solução tampão da reação de PCR • Taq DNA polimerase • Proteinase K • Cuba, forma e pente para eletroforese de DNA • Balança de precisão • Agarose • Tampão TBE • Marcador de peso molecular • Brometo de etídio • Transiluminador ultra-violeta • Parafilme • Tesoura • Forno de microondas • Máscara de proteção contra raios ultra-violeta 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 5 de 17
<p style="text-align: center;">9. Procedimento</p> <p style="text-align: center;">9.1 Preparo de Soluções</p> <p><u>Soluções Estoque</u></p> <p>TRIS HCl 1M pH 7,5 Volume : 100mL Tris-HCL: 15,76g Ajustar pH / 7,5 c/ HCl. q.s.p. 100 ml c/ água mili-Q. Filtrar a solução em filtro de 0,45µm e autoclavar.</p> <p>EDTA 0,5M pH 8,0 (Obs.: Para DNA) Volume: 50 ml EDTA: 9,305g (PM = 372,22) Ajustar pH = 8,0 com NaOH pellet ou concentrado até dissolver. Após dissolução, terminar de ajustar com NaOH conc. até pH 8,0. q.s.p. 50 ml c/ água mili-Q. Filtrar a solução em filtro de 0,45µm e autoclavar.</p> <p>N-LAURIL SARCOSINA 2% Volume 100mL N-lauril sarcosina: 2g Diluir em 100mL de água mili-Q. Filtrar a solução em filtro de 0,45µm e autoclavar.</p>		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 6 de 17
<p>TBE 5X (TAMPÃO DE CORRIDA) Volume: 2 litros Tris base: 108g Ácido bórico: 55g EDTA 0,5M pH 8,0: 40 ml (pesar 7,444g) q.s.p. com água mili-Q. 2000 ml Dissolver, filtrar e autoclavar.</p> <p>Solução de lise nuclear Preparo de 250 µL por amostra, preparar sempre 10mL TrisHCl 50mM pH7,5 EDTA 1mM pH8,0 1% de N-lauril sarcosina</p> <ul style="list-style-type: none"> • $\text{TrisHCl } 1\text{M} \times X = \text{Tris HCl } 0,05\text{M} \times 10\text{mL}$ TrisHcl = 0,5mL ou 500 µL • $\text{EDTA } 0,5\text{M} \times X = \text{EDTA } 0,001\text{M} \times 10\text{mL}$ EDTA = 0,02mL ou 20 µL • $\text{N-lauril sarcosina } 2\% \times X = \text{N-lauril sarcosina } 1\% \times 10\text{mL}$ N-lauril sarcosina = 5mL <p>Portanto, pipetar: - 500 µL de TrisHcl 1M pH 7,5 - 20 µL de EDTA 0,5M pH 8,0</p>		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 7 de 17
<p>- 5mL de N-lauril sarcosina 2%</p> <p>Adicionar esses volumes em um balão de 10mL e completar com água mili-Q autoclavada Transferir em seguida para um tubo falcon de 10mL autoclavado</p> <p style="text-align: center;">9.2 Extração de DNA</p> <p>DIA 1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Descongelar as amostras acondicionadas a -80°C em gelo. Selecionar até 18 amostras por procedimento de extração (o limitante será a segurança em realizar o procedimento e a quantidade de reagentes); • Pesar o tecido em eppendorf de 1,5mL (+ou- 0,05g). Anotar o peso exato; • Enumerar os tubos eppendorfs 1,5mL estéreis e colocar na capela para radiação UV (15min); • Ligar o banho-maria a 37°C; • Colocar na capela pedaços de gaze autoclavados e adicionar água sanitária (para limpeza dos dedos entre a manipulação de um tubo e outro); 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 8 de 17
<ul style="list-style-type: none"> • No caso de tecido, fazer cortes bem finos com tesoura pequena (utilizar uma tesoura diferente para cada amostra, se não for possível ter o cuidado de limpá-la com álcool 70% entre um tecido e outro); • Adicionar 250 µL do tampão TrisHCl 50mM pH7,5; EDTA 1mM pH8,0; 1% de N-lauril sarcosina aos tubos contendo amostras. Pode ser com a mesma ponteira para todos os tubos tendo-se o cuidado de não a encostar nas paredes. • Fechar os tubos e homogeneizar por inversão 10 vezes; • Adicionar pela parede do tubo 25 µL de solução de proteinase K 20mg/mL. Utilizar uma ponteira para cada tubo; • Incubar overnight no banho-maria a 37°. <p>DIA 2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ligar a capela e acender a luz UV por 15 minutos. Colocar pedaços de gaze autoclavados e adicionar água sanitária; • Checar se toda amostra foi digerida corretamente (homogeneizar num vortex e visualizar um homogenato); • Ajustar a temperatura do banho-maria para 55°C; 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 9 de 17
<ul style="list-style-type: none"> • Dentro da capela, adicionar 600µL de Solução de Lise Nuclear (SLN – kit), dispensar o líquido da pipeta fazendo pressão, para auxiliar no processo de digestão, e deixar por 30 min. no banho-maria a 55°C; • Vortexar os tubos e adicionar pela parede 3 µL da Solução de RNase ao lisado nuclear, vertendo o tubo 5 vezes para homogeneização. Utilizar uma ponteira por tubo; • Incubar a mistura a 37°C por 30 minutos (no banho seco); • Resfriar à temperatura ambiente por 5 minutos antes de continuar a extração • À temperatura ambiente, adicionar 200 µL de Solução de Precipitação Proteica (SPP), dispensar o líquido da pipeta com pressão e homogeneizar vigorosamente no vortex por 20 segundos; • Deixar as amostras no gelo por 5 minutos; • Centrifugar por 4 minutos a 13.000 x g. O precipitado proteico formará um pellet claro; • Cortar as pontas das ponteiras com cuidado e limpando a tesoura a cada ponteira; • Remover cuidadosamente com a pipetadora automática o sobrenadante contendo o DNA e transferi-lo a um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol à temperatura ambiente; 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 10 de 17
<ul style="list-style-type: none"> • Homogeneizar a solução por inversão por 1 a 2 minutos. Procurar observar uma massa visível turva de DNA; • Centrifugar por 2 minutos a 13000G à temperatura ambiente. O DNA ficará visível como um pellet claro; • Retirar o sobrenadante com pipetadora automática tendo muito cuidado; • Adicionar aos tubos 600 µL de álcool 70%; • Centrifugar por 2 minutos a 13000 x g à temperatura ambiente; • Aspirar cuidadosamente o etanol com pipetadora automática; • Dobrar um quarto de folha de papel toalha absorvente, formado um "caldinho" Inverter os tubos em cuidadosamente para retirar o álcool. Deixar os tubos abertos dentro do fluxo laminar para secar os pellets por 15 minutos; • Adicionar 100 µL de Solução de Reidratação de DNA e incubar overnight à temperatura ambiente; <p style="text-align: center;">9.3 Avaliação de Qualidade do DNA</p> <p>Leitura em Nanodrop</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ligar o computador; 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 11 de 17
<ul style="list-style-type: none"> • Limpar a bancada e pipeta de 10 µL com hipoclorito e álcool 70%; • Homogeneizar as amostras levemente no vortex; • Abrir o programa “Nanodrop” na área de trabalho; • Selecionar “Nucleic Acid”; • Criar uma nova pasta; • O programa pede verificação de rotina (o braço do nanodrop deve estar abaixado); • Pipetar 2 µL de água de reidratação e selecionar “Blank”; • Pipetar 2 µL da primeira amostra e requisitar a dosagem; • Limpar bem e delicadamente o local onde se aplica a amostra com um lenço de papel macio; • Repetir os passos 9 e 10 até que todas as amostras sejam mensuradas. • Registrar em planilha própria a caneta e depois colar o documento no caderno do mestrado para registro. 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)																									
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -																								
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 12 de 17																								
<p style="text-align: center;">9.4 PCR</p> <p style="text-align: center;">9.4.1 Preparo do mix de reagentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ligar o DNA Workstation, limpar com álcool 70%, colocar a quantidade de tubos necessários, as ponteiras e caneta de identificação e acender a luz UV por 15 minutos. • Colocar dentro da Workstation os reagentes que compõe o mix; • Identificar os tubos de acordo com as amostras que serão testadas, reservar um tubo para controle positivo e outro para controle negativo. • Fazer o cálculo de preparo do mix suficiente para o número de amostras, tubos de controle positivo e negativo e três tubos de reserva (margem de segurança) respeitando a seguinte proporção: <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tbody> <tr> <td style="padding-right: 20px;">Go taq buffer</td> <td style="padding-right: 20px;">5x</td> <td>4ul</td> </tr> <tr> <td>Primer F</td> <td>10uM</td> <td>1ul</td> </tr> <tr> <td>PrimerR</td> <td>10uM</td> <td>1ul</td> </tr> <tr> <td>DNTPs</td> <td>2uM</td> <td>0,4ul</td> </tr> <tr> <td>Taq</td> <td>5U/ µL</td> <td>0,25ul</td> </tr> <tr> <td>H2O</td> <td></td> <td>12,35ul</td> </tr> <tr> <td>Template</td> <td></td> <td>1ul</td> </tr> <tr> <td>TOTAL</td> <td></td> <td>20µL por tubo</td> </tr> </tbody> </table>			Go taq buffer	5x	4ul	Primer F	10uM	1ul	PrimerR	10uM	1ul	DNTPs	2uM	0,4ul	Taq	5U/ µL	0,25ul	H2O		12,35ul	Template		1ul	TOTAL		20µL por tubo
Go taq buffer	5x	4ul																								
Primer F	10uM	1ul																								
PrimerR	10uM	1ul																								
DNTPs	2uM	0,4ul																								
Taq	5U/ µL	0,25ul																								
H2O		12,35ul																								
Template		1ul																								
TOTAL		20µL por tubo																								

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 13 de 17
<ul style="list-style-type: none"> • Distribuir 19 µL do mix em cada um dos tubos previamente identificados. <p style="text-align: center;">9.4.1 Adição de amostras aos tubos de PCR</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pipetar 1 µL de cada amostra nos tubos previamente identificados e contendo o mix, não esquecer de pipetar; • Pipetar 1 µL do controle positivo no tubo correspondente e 1 µL de água ultrapura no tubo de controle negativo <p style="text-align: center;">9.4.2. Programação do termociclador</p> <ul style="list-style-type: none"> • A programação do termociclador deve obedecer aos seguintes parâmetros: <ul style="list-style-type: none"> 94°C 5 minutos 94°C 30 segundos 57°C 30 segundos 30 ciclos 72°C 30 segundos 72°C 7 minutos 4°C infinito 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 14 de 17
<p style="text-align: center;">9.5 Eletroforese</p> <ul style="list-style-type: none"> • Preparo do gel de agarose 2,0 % com o volume adequado à cuba de corrida utilizada; • O brometo de etídio foi utilizado como corante e era acrescentado na solução ainda quente de agarose na proporção de 2,5 µL para cada 60 mL do tampão TBE 1X • Colocar a solução ainda quente na cuba adequada com o pente. Aguardar até o gel endurecer; • Remover o pente, colocar a cubeta na cuba de eletroforese e preenchê-la com TBE 1x até submergir o gel; • Se o tampão GoTaq não tiver sido utilizado na reação de PCR, deve-se utilizar um agente para dar cor às amostras e facilitar a aplicação no gel. Neste caso, proceder da seguinte forma: Com o auxílio de uma caixinha de pipetas vazias e um pedaço de parafilme colocar 1 - 2 µL do Safer Dye – Loading Buffer para cada 5 - 10 µL de cada amostra, inclusive para o padrão de peso molecular (lader). Homogeneizar no momento de transferir para o gel; • Colocar 2 µL do lader (preferencialmente o de 100 pb) na primeira canaleta; • Colocar cada amostra em uma canaleta bem como o controle positivo e o controle negativo, não esquecer de fazer um mapa com as posições de cada amostra no gel para posterior referência; 		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4 -
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 15 de 17
<ul style="list-style-type: none"> • Fechar a ligar a cuba à fonte com uma voltagem de 90-100V por aproximadamente 30 minutos; • Após o tempo estipulado, parar a corrida, desligar a fonte e levar a amostra ao transluminador UV. Tirar uma foto do gel com celular. Caso as bandas não estejam separadas o suficiente, retornar o gel à cuba e ligar novamente a fonte pelo tempo necessário; • Após o término da revelação, descartar o gel e as pipetas utilizadas em local adequado, transferir a solução de TBE no frasco identificado como TBE 1X reuso, lavar as cubas com água corrente, colocar para secar e limpar as bancadas com álcool e papel toalha. <p style="text-align: center;">10. Responsabilidades</p> <p>Os colaboradores, após treinamento, verificarão e garantirão o cumprimento das normas estabelecidas neste procedimento.</p>		

	Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Título: Monitoramento de <i>Mycoplasma pulmonis</i> em amostras de tecido pulmonar de ratos e camundongos.		Código: CR-4
Data da Emissão: 08/08/2020	Número do POP: 01/2020	Página 16 de 17
<p style="text-align: center;">11. Referências Bibliográficas</p> <p>MÄHLER M.; BERARD M.; FEINSTEIN R.; GALLAGHER A.; ILLGEN-WILCKE B.; PRITCHETT-CORNING, K.; RASPA, M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig, and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Animal 48:178–192. 2014.</p> <p>MITRE, Patrícia Andrade Guimarães. Padronização de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para Detecção de <i>Mycoplasma pulmonis</i> como Parte do Programa de Monitoramento Sanitário do Centro de Ciência Animal da UFOP Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.</p>		

ANEXO - APROVAÇÃO DO PROJETO NA CEUA/UFOP



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Padronização de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em Tempo Real para Detecção de Patógenos Respiratórios de Roedores como Parte do Programa de Monitoramento Sanitário do Centro de Ciência Animal da UFOP", protocolada sob o CEUA nº 1756060618 (ID 000059), sob a responsabilidade de **Cláudia Martins Carneiro e equipe; Patrícia Andrade Guimarães Mitre; Mariana Boechat de Abreu; Breno de Mello Silva; Karina Barbosa de Queiroz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 15/06/2018.

We certify that the proposal " Standardization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) for Detection of Rodent Respiratory Pathogens as Part of the Sanitary Monitoring Program of the Centro de Ciência Animal da UFOP", utilizing 40 Isogenics mice (males and females), 20 Heterogenics mice (males and females), 20 Isogenic rats (males and females), 20 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 1756060618 (ID 000059), under the responsibility of **Cláudia Martins Carneiro and team; Patrícia Andrade Guimarães Mitre; Mariana Boechat de Abreu; Breno de Mello Silva; Karina Barbosa de Queiroz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 06/15/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 07/2018 a 07/2019

Área: Ciências Biológicas

Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	3 a 60 semanas	N:	20
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 60 g		
Linhagem:	Balb/c						
Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	3 a 60 semanas	N:	20
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 60 g		
Linhagem:	C57BL/6						
Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	3 a 60 semanas	N:	20
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 60 g		
Linhagem:	Swiss						
Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	3 a 60 semanas	N:	20
Espécie:	Ratos isogênicos			Peso:	40 a 500 g		
Linhagem:	Fisher						
Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	3 a 60 semanas	N:	20
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	40 a 500 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: Centro de Ciência Animal da UFOP

Ouro Preto, 19 de junho de 2018



Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto