

**UNIVERSIDADE VILA VELHA
FARMÁCIA**

ISIDORA RENATA ACEVEDO MORENO

**LEVANTAMENTO DE MICRORGANISMOS NO AMBIENTE DO BIOTÉRIO DA
UNIVERSIDADE DE VILA VELHA.**

**VILA VELHA
2024**

ISIDORA RENATA ACEVEDO MORENO

LEVANTAMENTO DE MICRORGANISMOS NO AMBIENTE DO BIOTÉRIO.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Vila Velha como pré-requisito para graduação do curso de farmácia.
Orientador: Prof. Me. João Damasceno Lopes Martins

VILA VELHA

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Boris e Desirée;
e a minha irmã Maria Ignacia.

LEVANTAMENTO DE MICRORGANISMOS NO AMBIENTE DO BIOTÉRIO

RESUMO

Esta pesquisa realizou um estudo sobre o levantamento de microrganismos no ambiente do biotério da Universidade Vila Velha, analisando os procedimentos adotados pela instituição no local onde os animais ratos e camundongos são criados, armazenados e posteriormente utilizados para fins de pesquisas científicas. Para as análises, foram utilizadas duas salas, uma para ratos e a outra para os camundongos, onde foram coletadas as amostras por meio de swabs esterilizados nas paredes utilizando um padrão para delimitar a área de coleta totalizando 50 cm² pesquisados. Posteriormente usou-se a água peptonada estéril (0,1%) como diluente para a extração das amostras. No sentido de averiguar e identificar as amostras coletadas, foi preparado e utilizado o meio de cultura ágar sangue, para crescimento bacteriano. Os métodos como catalase, coagulase e coloração de gram também foram utilizados. Para investigar e analisar os resultados da pesquisa utilizou-se a análise microscópica com a finalidade de observar e acompanhar o crescimento dos microrganismos e os resultados dos testes ao longo das semanas, de modo a averiguar se os dados coincidiam com o objetivo da pesquisa de investigar e identificar a presença de microrganismos, que seria alcançado ao se comprovar a presença e a influência de microrganismos no ambiente do biotério. Concluiu-se, por meio dos resultados, que a pesquisa foi satisfatória, atingindo o objetivo ao evidenciar e quantificar o crescimento de bactérias do gênero *Staphylococcus*. Assim, sendo possível a análise e a adoção de medidas que possam melhorar a higiene do ambiente, garantindo a preservação dos animais e dos resultados das pesquisas.

Palavra-chave: biotério, microrganismos e bactérias.

ABSTRACT

The study conducted aimed to assess the presence of microorganisms in the bioterium environment at the University of Vila Velha, focusing on the practices followed in the areas where rats and mice are bred and housed for scientific research. The research involved two rooms: one for rats and another for mice, with samples collected using sterilized swabs from the walls, each covering a 50 cm² area. Peptone water (0.1%) was used as a diluent for extracting the samples. Blood agar was employed for bacterial culture growth, alongside tests like catalase, coagulase, and Gram staining for microorganism identification. The research also involved microscopic analysis to monitor microbial growth and the results of these tests over several weeks. The study successfully identified the growth of *Staphylococcus* bacteria, confirming the presence of microorganisms and suggesting areas for improvement in hygiene practices. These findings highlight the need for further actions to ensure the animals' welfare and the integrity of scientific results in the bioterium.

Keywords: animal facility, microorganisms, and bacteria.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	METODOLOGIA.....	9
2.1	Coloração de gram:	9
2.2	Catalase:.....	10
2.3	Coagulase:.....	10
2.4	Ágar sal Manitol:	10
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4	CONCLUSÃO	13
	REFERÊNCIAS	14

1 INTRODUÇÃO

A microbiologia é uma área muito importante e extensa, os quais são estudados os microrganismos, a sua presença no ambiente e a sua relação com a saúde humana e animal (TORTORA; BERDEL; CASE, 2012; LEITE; VALENTE, 2020).

Os ensaios realizados com animais, permitem uma melhor compreensão de processos fisiológicos e patológicos que aconteceriam de forma semelhante em humanos e, ao mesmo tempo, o desenvolvimento de fármacos e afins para os mais diversos propósitos (POLITI *et al.*, 2008; MULLER *et al.*, 2015).

A realização destes ensaios aconteceram em biotérios, que são laboratórios onde são mantidos e/ou reproduzidos os animais (roedores) havendo toda a preocupação e controle com a qualidade de vida dos mesmos e não, simplesmente, com a utilização descontrolada e de maneira não regulamentada (SOUZA, 2017).

A regulamentação dos biotérios aconteceu no Brasil, no ano de 2008, com a lei nº 11.794/2008 e Decreto nº 6.899/2009, que inclusive criou o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), que entre outras diretrizes e normas regulamentadoras, estabelece as normas técnicas para a área física e instalações desses laboratórios (BRASIL, 2009). É de fundamental importância prever, no projeto de biotérios, quais os tipos de linhagens de animais que serão usados e também, o padrão sanitário pretendido para estas linhagens (MAJEROWICZ, 2019).

A definição e manutenção do *status* sanitário de biotérios é dependente de rigorosas barreiras sanitárias e monitoração dos animais, para se ter certeza que contaminantes indesejáveis não se estabeleçam (MULLER *et al.*, 2015). Conforme a microbiota e o tipo de barreira sanitária existente, os animais podem ser classificados em (MAJEROWICZ, 2005):

- Convencionais - tem microbiota indefinida e padrões de limpeza básicos com retirada de sujeira com uso de desinfetantes.

- Monitorados - monitoramento periódico e são livres da maioria dos microrganismos patogênicos e não patogênicos.
- Gnotobióticos – tem microbiota definida, sendo criados dentro de isoladores.
- Livres de microrganismos patogênicos específicos (SPF) – são livres de microrganismos e parasitos específicos, sendo mantidos dentro de isoladores..
- Axênicos ou germfree – são totalmente livres de microrganismos e são concebidos e gerados em ambiente estéril.

O espaço físico do biotério pode ser dividido em microambiente (gaiola ou isoladores) e macroambiente, que inclui sala (piso e paredes), sistema de ventilação/exaustão e qualquer outro local que envolve o microambiente.

Os contaminantes podem vir do pessoal que frequenta o laboratório, novos animais adquiridos e também, da serragem (POLITI *et al.*, 2008).

O monitoramento da contaminação biológica das instalações onde os animais de laboratório são mantidos é importante pois, além da saúde animal pode comprometer a realização dos ensaios e influenciar negativamente os resultados obtidos com os experimentos (SILVA, 2014).

Em relação à saúde animal, microrganismos patogênicos exercem bastante influência em muitos experimentos. Infecções virais influenciam o sistema imune animal. As infecções bacterianas, podem gerar a morte dos animais, enquanto que infecções por *Pseudomonas* e *Bordetella*, interferem em pesquisas respiratórias (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

No biotério da Universidade Vila Velha (UVV), os animais são mantidos em micro-isoladores, usam cabines de troca para os animais, fazem uso de serragem estéril e portanto, exercem algum controle sanitário do plantel, assim como, o ambiente tem procedimentos de higienização controlados, porém, que precisam ser monitorados. Dessa forma, este trabalho propõe como objetivos realizar um levantamento de bactérias das salas de ratos e camundongos do biotério-UVV e buscar relacionar a presença microbiana com o controle sanitário do ambiente.

2 METODOLOGIA

O estudo foi realizado de forma exploratória e descritiva, sendo caracterizada por avaliar os microrganismos de forma quantitativa e qualitativa. A pesquisa foi realizada no ambiente do biotério da Universidade Vila Velha, espaço que possui duas salas para acomodação dos animais e uma para realização dos experimentos.

As coletas aconteceram entre os meses de agosto e setembro de 2024, sendo utilizados swabs estéreis embebidos em solução de água peptonada estéril (0,1%). Para quantificação dos microrganismos, utilizamos nas coletas, padrões que determinavam a área a ser coletada (10 cm²). De cada superfície (parede e piso) foram coletadas 5 amostras, totalizando 50 cm². Estas amostras (cinco swabs) foram colocadas em frasco Erlenmeyer contendo 50mL de solução de água peptonada estéril (0,1%) (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). Neste caso, teríamos a proporção entre volume/área para cada mL correspondente a 1 cm².

A partir dos frascos Erlenmeyer, foi inoculado 0,1mL em placas (duplicatas) contendo ágar Sangue, sendo colocadas em estufa, regulada à 37°C/48 horas (FERREIRA; SILVA, 2013). A contagem total por superfície foi determinada pela média aritmética de contagem de colônias após observação de crescimento nas duas placas. A média seria dada pela somatória das colônias, divididas por 2 e multiplicado por 10, uma vez que a intenção seria apresentar os resultados em UFC/cm² (unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado).

Para a identificação das bactérias foi feita a coloração de Gram, testes de catalase e conforme os resultados, foram feitos ainda, coagulase e verificação de crescimento em ágar Sal Manitol (KONEMANN *et al.*, 2008).

2.1 Coloração de gram:

- Preparou-se 13 lâminas, colocando pequena quantidade de amostra das colônias bacterianas em cada uma.

- Cobrindo a lâmina com o corante cristal de violeta por 60 segundos e lavando com água destilada.
- Cobrindo por mais 60 segundos com o corante lugol e lavando com água destilada.
- Descorando com álcool a 95% por 20 segundos e lavando com água destilada.
- Cobrindo por 20 segundos com o corante fucsina, lavando com água destilada e esperando a secagem das lâminas levando ao microscópio.

2.2 Catalase:

- Lâminas preparadas com pequena amostra das colônias e uma gota da solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
- Observando formação de bolhas indicativo de positivo e ausência sendo negativo.

2.3 Coagulase:

- Realizou-se o teste em um tubo de ensaio com a mistura de plasma e amostra.
- Observando a formação de coágulo, ao formar teste positivo e na ausência teste negativo.

2.4 Ágar sal Manitol:

- Espalhar amostra bacteriana por toda a superfície da amostra.
- Observando a mudança da coloração vermelha/rosa indicativo de teste negativo, pois não houve fermentação e coloração amarela teste positivo indicando fermentação do manitol.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média (UFC/cm²) da contagem total de colônias com crescimento em ágar sangue está expresso nos quadros 1 (Sala de ratos) e 2 (Sala de camundongos). A partir do crescimento e dos testes realizados, Gram (cocos gram positivos) e catalase (positiva), fez-se a identificação do gênero *Staphylococcus*. Com as avaliações posteriores, testes de coagulase (negativa) e crescimento em ágar Sal Manitol (colônias na cor rosa), pode-se identificar como sendo *Staphylococcus* do tipo coagulase negativa.

Quadro 1. Contagem total de bactérias a partir do ambiente da sala de ratos.

Superfícies	Média (UFC/cm ²)
Parede1	6×10^2
Parede 2	10
Parede 3	$2,35 \times 10^2$
Parede 4	$2,9 \times 10^2$

Quadro 2. Contagem total de bactérias a partir do ambiente da sala de camundongos.

Superfícies	Média (UFC/cm ²)
Parede1	$7,5 \times 10^1$
Parede 2	10
Parede 3	5
Parede 4	2×10^1

Estes resultados, coincidem com os achados por Silva (2014), onde a partir de coleta de amostras de superfícies de maçaneta e saída de ar, o gênero *Staphylococcus* foi o mais encontrado nos Biotérios avaliados.

Os *Staphylococcus* coagulase negativa são encontrados na pele e mucosas de humanos e animais, sendo mais associados à infecções oportunistas. Podem causar cistite e pela capacidade em formar biofilme, podem estar envolvidos em infecções a partir de catéteres e derivações usados por pacientes hospitalizados (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Inúmeras são as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, sendo relacionadas a animais e seres humanos. As espécies *S. xilosus*, *S. cohnii* e *S. haemolyticus* tem relação direta de colonização de cães e bovinos (SOARES *et al.*, 2008). A espécie *S.*

sciuri tem sido associada a roedores, sendo isolada também do ambiente de biotérios (CALAZANS-SILVA, 2013).

É importante monitorar a qualidade microbiológica do ambiente de criação e realização de pesquisas com animais, para que não hajam reflexos negativos nos resultados dos experimentos. Em avaliação realizada por Silva (2022), em ambientes e água ofertada aos animais de biotério, os *Staphylococcus* coagulase negativa foram bactérias comumente encontradas, com destaque para as espécies *S. cohnii*, *S. xilosus* e *S. lentus*.

A resolução nº18 de 23 de março de 2018 (CTNBio), Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção. Esta mesma resolução determina que:

“Em biotérios, a água a ser ingerida pelos animais deve ser filtrada, acidificada ou autoclavada. O fluxo de ar deve sofrer cerca de 20 renovações por hora, assim como recomenda-se que haja controle sanitário, parasitológico, microbiológico, de micoplasmas e virológico dos animais e também, o controle genético dos animais deve ser realizado, se possível, a cada nova geração.”

O biotério da instituição avaliada possui animais geneticamente modificados em seu plantel e por isso, tem buscado atender a esta normativa. Porém os resultados encontrados neste trabalho podem representar uma possibilidade de falhas em seus processos.

Várias são as situações onde há preocupação com a qualidade do ar ambiente e o perigo de gerar contaminantes biológicos. Consultórios odontológicos, laboratórios de análises clínicas e também, hospitais, são exemplos de ambientes/atividades, que podem facilmente apresentar estes contaminantes. Neste sentido, as bactérias do gênero *Staphylococcus* e algumas gram negativas, *Pseudomonas* sp. por exemplo, já foram isoladas de situações do ambiente (NUNES, 2005).

Provavelmente, alguns contaminantes encontrados, poderiam ser evitados com uso de filtros especiais. Um biotério deve apresentar barreiras sanitárias que conferem

proteção aos animais em áreas de criação e experimentação. Neste sentido, pode-se destacar as barreiras físicas como uso de autoclave, fornos, radiação ultravioleta e filtros. Estes últimos retiram impurezas do ar e, conforme sua eficiência, podem reter também microrganismos (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

4 CONCLUSÃO

A presença das bactérias do gênero *Staphylococcus* nas paredes das salas de ratos e camundongos pode indicar possíveis falhas nos procedimentos de limpeza dessas áreas.

Embora a presença dessas bactérias represente um risco biológico considerado baixo, torna-se fundamental revisar e aprimorar as medidas de biossegurança e os protocolos de higienização para reduzir a incidência. A revisão contínua dessas medidas, associada à análise de novas coletas microbiológicas, contribuirão para a redução da prevalência de bactérias nesses ambientes.

Como medidas corretivas, propõe-se procedimentos padrões que incluem a implementação de quarentena obrigatória para novos animais antes de sua introdução em salas já ocupadas, a supervisão do cumprimento das normas durante o acesso e a manipulação dos animais, bem como as realizações de controles microbiológicas com maior regularidade.

É recomendável que seja incluído o aumento da frequência das rotinas de limpeza, utilizando o protocolo de Manual de Biossegurança para Serviços de Saúde utilizando o produto hipoclorito de sódio (0,5-1%) como um desinfetante seguro nas áreas do biotério como nas superfícies de paredes, pisos, bancadas e isoladores.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

BRASIL, Comissão Técnica Nacional em Biossegurança (CTNBio). Resolução Normativa nº 18, março de 2018. **Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção**. Disponível em: https://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/-/asset_publisher/OqW431Rs9dQ6/content/resolucao-n%C2%BA-18-de-23-de-marco-de-2018#:~:text=As%20atividades%20e%20projetos%20envolvendo,de%20Risco%20o%20OGM%20manipulado. Acesso em 21 de novembro de 2024.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 6.899, **Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA, estabelece normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA**, mediante a regulamentação da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 jul. 2009.

CALAZANS-SILVA, Amanda Couto. **Caracterização de Staphylococcus do grupo sciuri e análise fenotípica da resistência à oxacilina em isolados de roedores e equinos do Instituto Biológico do Exército**. 2013. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

KONEMAN, E. W.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G.; WINN Jr., W. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LEITE, B. R.; VALENTE, L. P. A microbiologia e a extensão universitária. **Revista Brasileira de Extensão Universitária**, v. 11, n. 1, p. 61-71, jan.–abr. 2020.

MAJEROWICZ, J. **Procedimentos de Biossegurança para as Novas Instalações do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) de Biomaguinhos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

MAJEROWICZ, J. Planejando Biotério de Roedores. **RESBCAL**, São Paulo, v.7 n.1, pg. 9-23, 2019.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. ELSEVIER, 8ª ed. Cap. 18, 2017.

NUNES, Z. G. **Estudo da Qualidade Microbiológica do Ar de Ambientes Internos Climatizados.**/ Zilma das Graças Nunes. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, Programa de pós-graduação em Vigilância Sanitária, 2005. Disponível em:

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

SILVA, J. R. F. **Sanitary evaluation of the vivarium of creation: a contribution to improvement of the health of laboratory animals produced at the CPqAM. 2013.** Dissertation (Professional Master in Public Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2014.

SILVA, N. JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: SP, Ed. Varela, 1997.
SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; COELHO, S. M. O.; CUNHA, C. M. M.; OLIVEIRA, D. F. B.; MIRANDA, A. N.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1346-1350, ago, 2008.

SOUZA, I. M. A. Afeto entre Humanos e Animais não Humanos no Biotério. **RBCS** Vol. 32 n° 94 junho/2017.