

Artigo de Pesquisa Científico

Eficácia do método de graham para o diagnóstico de *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802) no monitoramento sanitário de camundongos Swiss Webster de um biotério de criação

Effectiveness of the graham method for *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802) diagnosis in the health monitoring of Swiss Webster mice in a breeding colony

Incerlande Soares dos Santos^{1*}, Carla Santana da Silva¹, Cleber Hooper da Silva¹, Thaynara Oliveira da Silva¹, Larine Fiuza¹, Simone Ramos¹, Lilian Gonçalves de Carvalho¹, Márcia Cristina Ribeiro Andrade¹

¹Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Como citar: Santos IS, Silva CS, Silva CH, et al. Eficácia do método de graham para o diagnóstico de *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802) no monitoramento sanitário de camundongos Swiss Webster de um biotério de criação. *Bio M Res Tech.* 2022;2:e00092022. <https://doi.org/10.4322/2675-9225.00092022>

Resumo

A infecção por Oxyuridae constitui um problema nas barreiras sanitárias em colônias de roedores, tendo em vista que esta é a família de parasito mais encontrada em instalações de animais de laboratório, especialmente a espécie *Syphacia obvelata*. Camundongos outbred stock Swiss Webster apresentam sinais clínicos quando associados com elevada carga parasitária e, geralmente, é observado um aumento no número de animais com prolapso retal. O controle desse parasito e outros patógenos é realizado mediante monitoramento sanitário trimestral, conforme as recomendações da Federação das Associações Europeias de Ciência de Animais de Laboratório (FELASA). O diagnóstico pelo método de Graham é determinante para a pesquisa dos ovos através de impressão de fita adesiva na região perianal do animal no início do ciclo do oxiurídeo. Foi realizada uma análise comparativa entre os métodos de Graham e o exame direto da mucosa intestinal para diagnóstico de *S. obvelata* de 60 camundongos sentinelas fêmeas outbred stock Swiss webster, procedentes de instalações de roedores de um biotério de criação. Os resultados mostraram uma diferença significativa entre o método de Graham e o exame direto da mucosa intestinal ($p > 0,001$ a 95%, teste de Fisher exato), com uma prevalência de 50% de ovos do parasito pela técnica de Graham e 8,33% pelo exame direto da mucosa intestinal, que detectou todas as formas do parasito. Pelo exame direto, além de ovos, foram identificadas outras formas do parasito, como: larvas, fêmeas adultas e machos adultos. Concluiu-se que a técnica de Graham é capaz de ampliar o espectro de identificação de *S. obvelata*, pois detecta com maior precisão a presença de ovos do parasita, uma vez que a fita adesiva demonstra que as fêmeas adultas grávidas migram para o ânus antes de morrer, depositando seus ovos na região perianal do hospedeiro. Sendo assim, o método de Graham deve ser adicionado ao programa de monitoramento sanitário, associado aos outros rotineiramente empregados no controle da qualidade de animais de laboratório, contribuindo com as condutas de manejo da criação animal em prol do controle e erradicação do agente em questão.

Palavras-chave: *Syphacia obvelata*, camundongo, monitoramento sanitário, método de Graham, técnicas de diagnóstico parasitológicos, controle parasitológico.

*Autor correspondente: incerlande.soares@fiocruz.br

Conflito de interesses: Não há.

Recebido: Setembro 07, 2021. Aceito: Dezembro 08, 2022.



Este é um artigo publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Attribution, que permite uso, distribuição e reprodução em qualquer meio, sem restrições desde que o trabalho original seja corretamente citado.

Abstract

Infection by Oxyuridae is a problem in sanitary barriers in rodent colonies, considering that this is the parasite family most commonly found in laboratory animal facilities, especially the species *Syphacia obvelata*. Outbred stock Swiss Webster mice show clinical signs when associated with a high parasite load and, generally, an increase in the number of animals with rectal prolapse is observed. The control of this parasite and other pathogens is carried out through quarterly sanitary monitoring, in accordance with the recommendations of the Federation of European Associations of Laboratory Animal Science (FELASA). Diagnosis by Graham's method is crucial for the search for eggs by printing adhesive tape in the animal's perianal region at the beginning of the oxyuride cycle. A comparative analysis was performed between Graham's methods and direct examination of the intestinal mucosa for the diagnosis of *S. obvelata* in 60 female sentinel Swiss outbred stock Swiss webster mice, from rodent installations in a breeding animal facility. Results showed a significant difference between Graham's method and direct examination of the intestinal mucosa ($p > 0.001$ at 95%, Fisher's exact test), with a prevalence of 50% of parasite eggs by Graham's technique and 8.33% by direct examination of the intestinal mucosa, which detected the whole parasite forms. By direct examination, in addition to eggs, other forms of the parasite were identified, such as: larvae, adult females and adult males. It was concluded that Graham's technique is capable of expanding the identification spectrum of *S. obvelata*, as it detects the presence of parasite eggs more accurately, since the adhesive tape demonstrates that adult pregnant females migrate to the anus before dying, depositing its eggs in the perianal region of the host. Therefore, Graham's method should be added to the health monitoring program, associated with others routinely used in the quality control of laboratory animals, contributing to the management of animal husbandry in favor of the control and eradication of the agent in question.

Keywords: *Syphacia obvelata*, mice, sanitary monitoring, Graham monitoring, parasitological diagnostic techniques, parasitological control.

INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais causadas por helmintos e protozoários em animais de laboratório criados e mantidos em instalações animais continuam a ser uma preocupação nas colônias de roedores¹⁻³. Os camundongos outbred stock Swiss Webster são importantes biomodelos para o desenvolvimento adequado de vários ensaios biológicos, sendo recomendada a sua utilização em pesquisas científicas para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis⁴⁻⁶.

Nas instalações de criações de animais de laboratório, o controle das barreiras sanitárias é imperioso para evitar ou minimizar a infecção por helmintos e outros patógenos⁴. Agentes infecciosos indesejáveis podem comprometer o status sanitário das colônias de animais de laboratório em áreas limpas de biotério. Portanto, falhas no sistema de esterilização e barreiras sanitárias podem causar infecção/infestação por microrganismos e endo e ecto parasitos^{1,2,4,6-11}.

Dentre os principais parasitos que infectam os camundongos, a mais frequente é o nematoide *Syphacia obvelata*, que pertence à família Oxyuridae⁹. Um estudo realizado em 18 biotérios brasileiros demonstrou que as infecções parasitárias estavam presentes na maioria das instituições investigadas, observando-se elevada prevalência de animais infectados com várias espécies de parasitos, principalmente por *S. obvelata*⁵.

O diagnóstico é determinante para adoção de medidas eficazes de tratamento, controle e para a manutenção da qualidade dos biomodelos fornecidos para pesquisa^{1-4,6,9,12,13}. O parasito pode infectar tanto o homem, quanto animais de laboratório^{7,9,13-16}. Os ovos depositados apresentam aspecto reniforme, são alongados, com uma parede fina e achatados em um dos lados e embrionam entre 5 e 20 horas a 37°C ou, mais lentamente, em temperatura ambiente, são leves e se dispersam facilmente, resultando em contaminação generalizada do ambiente, o que dificulta o seu controle nas colônias de roedores^{7-10,13,15,17-21}.

Embora não sejam considerados patogênicos, os oxiurideos definitivamente afetam seus hospedeiros de várias maneiras, alterando o comportamento, crescimento, fisiologia intestinal e sistema imunológico. As infecções por *Syphacia* spp. podem alterar a resposta humoral do hospedeiro a estímulos antigênicos, desencadear uma resposta imune do tipo Th2 (linfócitos T CD4⁺) com elevada produção de citocinas, podendo induzir uma autoimunidade, aumentar a mielopoiese e eritropoiese, alterar a reatividade da medula óssea à interleucina, bem como manipular a transdução de sinal nas células da medula óssea do hospedeiro. As alterações imunológicas geradas em biomodelos

acometidos por *Syphacia* spp. podem interferir no desenvolvimento de protocolos experimentais e alterar a interpretação dos resultados em pesquisas científicas^{4,6,10,12,22,23}.

Deste modo, os animais infectados por *Syphacia* spp. não são recomendados para estudos nutricionais, imunológicos ou hematológicos devido as modificações causadas nos parâmetros fisiológicos normais^{1,4,6,12}. Os animais apresentam sinais clínicos quando há elevada carga parasitária, a migração dos parasitas fêmeas para o ânus provoca irritação na região perianal dos animais afetados, produzindo coceira excessiva, levando o animal à automutilação^{2,3,7,18,24}.

Em decorrência do ciclo do parasito, o diagnóstico com o método de Graham na região perianal do animal para detecção de ovos do verme oxiurídeo se mostra eficiente, pois a fita adesiva da técnica demonstra que as fêmeas adultas grávidas migram para o ânus antes de morrer, depositando os seus ovos na região do perianal do hospedeiro. Apresenta ciclo biológico direto, que se completa a cada 15 dias e os ovos se tornam infectantes após 6 horas após serem depositados pelas fêmeas. A ingestão dos ovos por outros animais iniciam um novo ciclo biológico, reinfectando o hospedeiro. Os ovos eclodem no hospedeiro e ocorre a migração da larva para o ceco^{1,3,5,8,12,14,15,17,20,25,26}. Há várias técnicas de diagnóstico para *Syphacia* spp., e as mais utilizadas são a impressão da fita adesiva da região perianal, flutuação fecal, exame macroscópico do conteúdo intestinal e exame histológico^{1,5,7,20,25}.

As colônias de camundongos devem ser monitoradas trimestralmente e, dependendo das circunstâncias e necessidades, o monitoramento e o programa de controle sanitário dos animais para diagnóstico de agentes patogênicos podem ocorrer de forma mais frequente^{1,7,8}.

Segundo a Federação das Associações Europeias de Ciência em Animais de Laboratório (FELASA), no programa de monitoramento sanitário de roedores são preconizados, os exames de parasitologia, imunologia, anatomia patológica e bacteriologia¹⁹. Este programa é utilizado para verificar a saúde dos animais na colônia através da detecção de agentes patogênicos primários e secundários oportunistas em animais utilizados como biomodelos na experimentação animal^{4,5,19,27-29}.

Os animais sentinelas são utilizados nas colônias e mantidos neste local como forma de controle de patógenos, no mínimo quatro semanas antes do início do programa de monitoramento sanitário e, nas mesmas condições da criação. Períodos de exposição mais longos (12 a 16 semanas) são preferíveis, pois pode ser necessário maior tempo de exposição para detecção de determinados microrganismos^{1,4}.

Algumas instituições internacionais utilizam métodos alternativos como forma de controle de patógenos nas salas de criação, não havendo necessidade de enviar os animais sentinelas para o controle sanitário. Desta forma, a saúde, o bem-estar e a integridade dos animais seriam mantidos. Tais métodos se baseiam na detecção de patógenos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de amostras biológicas coletadas em equipamentos presentes das salas de criação, como filtros de exaustão, por exemplo. Alguns autores afirmam que a PCR é uma técnica mais sensível e eficaz para a detecção de agentes infecciosos detectados em camas sujas de gaiolas, quando comparada com o método tradicional de animais sentinela³⁰.

Em contrapartida, a FELASA ainda recomenda o uso de animais sentinela, uma vez que esta técnica ainda se mostra muito eficaz e traz excelentes resultados, principalmente porque são capazes de minimizar erros nos diagnósticos. Recomenda-se utilizar uma amostragem inicial de cerca de 10% do total de animais por sala. Em recintos com mais de 100 animais, recomenda-se em torno de 10 a 12 indivíduos sentinelas^{4,19}.

O objetivo deste trabalho foi realizar inclusão do método Graham para avaliação da eficácia do diagnóstico de *Syphacia* spp., através de uma análise comparativa entre os métodos de Graham e o exame direto da mucosa intestinal de 60 camundongos sentinelas fêmeas *outbred* stock Swiss webster com idade média de três meses, procedentes das instalações de roedores de um biotério de criação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Princípios éticos

O presente estudo se encontra licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (nº LW-27/17, Ceua-Fiocruz).

Animais

O estudo de identificação de *S. obvelata* foi conduzido com camundongos Swiss Webster com status SPF (*Specific Pathogen-Free*), procedentes das instalações de roedores de um biotério de criação no Rio de Janeiro/RJ. Os animais foram enviados para o laboratório de controle de qualidade animal da mesma instituição, para a realização do monitoramento sanitário da colônia.

Foram utilizados 60 camundongos sentinelas SPF do biotério de criação com barreiras sanitárias e foram monitoradas sete salas (A1 a A7), incluindo cinco salas de criação e duas de matrizes. Todos os animais sentinelas SPF eram fêmeas *outbred stock Swiss Webster* com idade média de três meses e peso médio de 26g, provenientes de sete salas de criação monitoradas. Uma vez que a FELASA não estabelece critérios quanto ao sexo do animal sentinela, podendo ser escolhidos aleatoriamente, e tendo em vista que havia um número maior de fêmeas do que machos na criação, optou-se em utilizar somente fêmeas como sentinelas neste trabalho. Os animais foram criados em racks individualmente ventilados, mantidos em ambientes controlados, com temperatura de 18 a 22°C e umidade de 45 a 55%, ciclo regular e automatizado de luz (claro/escuro); e alojados em gaiolas de polissulfona (37,0 cm comprimento x 24,2 cm largura x 24,0 cm altura), forradas com maravalha autoclavada, com oferta de água e ração comercial autoclavadas *ad libitum* diariamente. Os animais SPF da criação analisada são livres dos patógenos especificados na Tabela 1.

Quando os animais são recém-chegados de outra instituição para compor uma nova colônia, o biotério aqui analisado normalmente mantém esses animais em uma área de quarentena, onde são mantidos em isoladores. Neste período são realizados exames de monitoramento sanitário para confirmação da certificação sanitária dos biomodelos importados. Assim, foram realizadas análises de identificação da presença de possíveis patógenos conforme recomendação previamente descrita (Tabela 1).

Tabela 1. Agentes infecciosos recomendados pela FELASA para monitorar em colônias de camundongos (*Mus musculus*) de criação SPF

Vírus	Bactérias	Parasitas
Vírus da Hepatite Murina (MHV)	<i>Helicobacter</i> sp.	Ácaros e piolhos
Rotavírus(EDIM)	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	<i>Syphacia obvelata</i>
Norovírus murino (MNV)	<i>Streptococcus beta hemolitico</i>	<i>Syphacia muris</i>
Vírus Diminuto de Camundongos (MMV) Parvovírus de camundongo Vírus da Encefalomielite murina (Theiler)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Balantidium</i> spp. <i>Aspicularis tetrap- tera</i> , <i>Rodentolepis nana</i>
Vírus da Coriomeningite Linfocítica Murina (LCMV)	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Spironucleus</i> sp
Adenovírus (MAV)	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	<i>Giardia muris</i>
Ectromelia vírus	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Entamoeba muris</i>
Pneumovírus de camundongos (PVM)	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	
Reovírus tipo 3 (REO 3)		
Sendai vírus		

Fonte: FELASA¹⁹

Os animais sentinelas foram posicionados de forma estratégica em racks individualmente ventilados e devidamente identificados, com três meses de antecedência ao monitoramento sanitário.

A quantidade de exemplares seguiu a proporção recomendada, utilizando 10 animais de cada sala, considerando que todas as salas desse biotério abrigam mais de 100 animais¹⁹. Os camundongos foram submetidos a exames parasitológicos nos períodos do programa do monitoramento sanitário de acordo com o cronograma pré-estabelecido.

Quanto ao programa de manejo dos animais sentinela, o cronograma foi encaminhado ao biotério de criação com no mínimo três meses de antecedência (16 semanas) da data de início do monitoramento sanitário. Os animais sentinelas foram separados e acondicionados em gaiolas individuais, de acordo com o que ficou acordado no planejamento. Durante o manejo da colônia de criação, uma vez por semana, foi realizada a troca da cama de maravalha e da ração das gaiolas de acordo com recomendação da FELASA¹⁹. Os animais sentinelas foram manuseados sempre ao final de cada manejo e expostos à maravalha e ração suja de outros animais. Foram mantidos os cuidados necessários com o animal sentinela, a fim de evitar possíveis transmissões de agentes patogênicos para os outros animais.

Eutanásia dos animais, coleta e processamento das amostras

Os animais foram previamente submetidos à eutanásia, com a associação de cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg) + cloridrato de cetamina (80-100 mg/kg) por via intramuscular, como medicação pré-anestésica e, em seguida, receberam thiopental 2,5% (150 mg/kg) por via intra-cardíaca¹⁶. Após a eutanásia, antes da necropsia do animal foram colocadas fitas adesivas na parte perianal do animal para confecção das lâminas.

Método da Graham

Os animais, foram dispostos em decúbito ventral em uma placa de cortiça, revestida com papel filtro. Lâminas de microscopia com ponta fosca foram previamente identificadas com o número de identificação interna do animal, utilizando lápis preto. Em seguida, um pedaço de aproximadamente 5 cm de fita de celofane transparente não fosca (comprimento suficiente para ser manipulada por uma extremidade sem tocar a sua região central), foi fixada firmemente sobre a região perianal do animal e anexada à lâmina previamente identificada.

Após a confecção das lâminas, foi feita a leitura em microscópio óptico Eclipse Ni-E Nikon®, de campo claro, com aumentos de 10x, 20x e 40x. A avaliação das lâminas foi realizada campo a campo, até que toda a área da lamínula fosse inspecionada para identificação e quantificação dos ovos de *S. obvelata*. No caso de leitura de amostras com ausência do parasito, uma nova leitura por outro colaborador era realizada^{20,25,28,31}.

Processamento e exame macroscópico da mucosa intestinal

Os animais foram submetidos ao exame anatomopatológico, realizando-se uma incisão pré-retroumbilical na linha mediana do abdômen e abertura da musculatura, removendo todo o intestino. Uma vez removido, o intestino foi acondicionado em placas de Petri estéreis, descartáveis e macerados com 3 mL de solução salina de NaCl 0,85%, utilizando uma tesoura cirúrgica de ponta fina (Buck Spencer®, tamanho 11cm). Posteriormente, realizou-se o exame macroscópico pela observação do macerado intestinal diretamente numa lupa, na placa de Petri sobre um fundo preto próprio para pesquisa de helmintos. Foram retiradas alíquotas de diversos pontos da placa de Petri, tanto da superfície como do fundo²⁸.

Processamento do exame direto da mucosa intestinal

Para cada amostra, foram confeccionadas três lâminas de microscopia e, quando alguma apresentava ausência dos parasitas, era realizada dupla conferência, resultando um total de seis lâminas por análise.

Para cada técnica, a leitura foi realizada em microscópio óptico Eclipse Ni-E Nikon®, de campo claro, com aumentos de 10x, 20x e 40x em lentes objetivas de aumento. A avaliação das lâminas foi feita campo a campo 20x e 40x, até que toda a área sob a lamínula fosse inspecionada.

Quando um parasito adulto era visualizado, realizava-se a coleta deste com auxílio de uma pinça anatômica de dissecação para montar a lâmina para exame direto e identificação das diversas formas parasitárias (adulto macho ou fêmea, larva e ovos). Os machos deste parasito possuem em sua morfologia três projeções cuticulares ou “mamelões”, os quais se localizam na região central do corpo do parasito e sua cauda é recurvada ventralmente com comprimento aproximado da largura do corpo. Em ambas as técnicas, as amostras foram consideradas positivas quando constatada a presença do helminto, seja por detecção de ovos, adultos ou larvas²⁸.

Registro fotográfico

Foram feitas fotomicrografias das imagens das lâminas do método de Graham e exame direto da mucosa intestinal. O registro foi realizado com o auxílio de uma câmera digital Axio CamERc-5s®, acoplada ao microscópio. Para análise da microscopia digital foi utilizado o software AxionVision Release®, versão 4.8.2, 2010.

RESULTADOS

Os resultados demonstraram uma frequência de 50% de ovos do parasito pela técnica de Graham em 30 animais. Pela técnica do exame direto da mucosa intestinal, obtivemos uma frequência de 8,33% de várias formas: ovos, larvas, fêmeas adultas e machos adultos, encontrados em 5 animais. Deste modo, foram verificadas diferenças significativas entre o método de Graham e o exame da mucosa intestinal ($p > 0,001$, a nível de 95%, pelo teste de Fisher exato).

Conforme a Tabela 2, observou-se que o método de Graham facilitou a visualização de ovos de *S. obvelata*, demonstrando ser um método mais eficaz para detectar o ovo do parasito, quando comparado com o exame direto da mucosa intestinal e descartando uma falsa ausência do agente nas análises dos resultados de rotina do biotério.

Tabela 2. Carga parasitária de *Syphacia obvelata* obtida da análise comparativa entre os métodos de Graham e o exame direto da mucosa intestinal de camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster

Técnica	Amostras (n)	<i>Syphacia obvelata</i> Macho	<i>Syphacia obvelata</i> Fêmea	Ovos de <i>Syphacia obvelata</i>	Larvas de <i>Syphacia obvelata</i>	Amostras positivas (%)
Técnica de Graham	60	Não detectado	Não detectado	+++	Não detectado	50
Exame direto da mucosa intestinal	60	+	++	+	+	8,3

n: número de amostras; Carga parasitária: + 1-100; ++ 101-300; +++ > 301. Fonte: Flynn²⁶

Pelo método de Graham, ficou claro que o ciclo do parasito ainda estava no início da infecção, uma vez que foram encontrados os ovos na área perianal do animal. Em contrapartida, o método direto da mucosa intestinal permitiu observar as formas larvares e parasitos adultos, bem como ovos na mucosa intestinal. Isso reforça que o método Graham deve ser adicionado no controle sanitário da colônia, para servir de controle da barreira sanitária da colônia.

A partir dos dois métodos parasitológicos, foram encontradas todas as formas parasitárias de *S. obvelata*, sendo ovos, pelo no método de Graham (Figura 1); ovos e larvas, pelo exame direto da mucosa intestinal (Figura 2); e formas adultas de machos e fêmeas, pelo exame direto da mucosa intestinal (Figura 3).

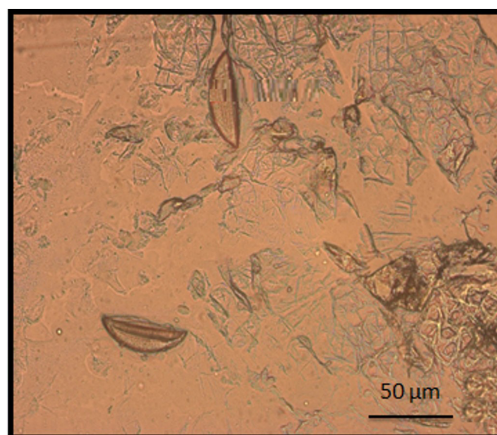


Figura 1. Fotomicrografia de lâmina do método da Graham realizada em camundongos fêmeas com três meses da linhagem Swiss Webster, infectadas naturalmente nas colônias. Ovo de *Syphacia obvelata*. Microscopia óptica aumento (40x) Fonte própria.

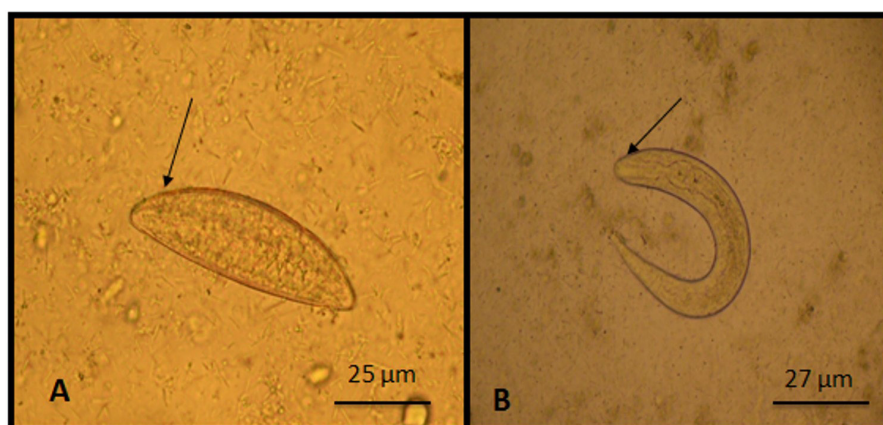


Figura 2. Fotomicrografia de lâmina do método direto da mucosa intestinal obtida através de camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster com três meses de idade e infecção natural. (A) Ovo de *Syphacia obvelata*. (→) Microscopia óptica aumento (40x); (B) Larva de *Syphacia obvelata*. (→) Microscopia óptica aumento (40x). Fonte própria.



Figura 3. Fotomicrografia do método de exame direto da mucosa intestinal obtida de análise de amostras de camundongos fêmeas com três meses da linhagem Swiss Webster, infectadas naturalmente pelo parasita na colônia. (A) Macho adulto de *Syphacia obvelata*, evidenciando morfologicamente três projeções cuticulares ou “mamelões” localizados na região central do corpo do parasito e cauda em recurvada ventralmente. (→) Microscopia óptica aumento (40x); (B) Fêmea adulta de *Syphacia obvelata*, evidenciando esôfago, bulbo esofágico e intestino. (→) Microscopia óptica aumento (40x). Fonte própria.

DISCUSSÃO

O gerenciamento das colônias e da eficácia do sistema de barreiras sanitárias, com promoção de ambientes controlados, incluindo monitoramentos genético e sanitário periódicos, são fundamentais para a manutenção da qualidade dos animais e, conseqüentemente, dos resultados dos experimentos neles desenvolvidos^{10,11,22}. No biotério de criação em estudo houve quebra de barreiras, permitindo acesso ao *S. obvelata*, detectado no programa de monitoramento sanitário, fato que reforça a importância deste programa no plantel, para que condutas de manejo sejam imediatamente efetuadas no tocante à correção da quebra de barreiras e à eliminação do patógeno identificado.

Um método de monitoramento sanitário adotado nesta criação é o uso de animais sentinelas¹⁹. Em ambientes com barreiras controladas, com a utilização de racks individualmente ventilados, os animais devem ser tratados como sentinelas a partir de 3-4 semanas até completar 16 semanas. Eles recebem o mesmo tratamento dos animais mantidos na criação, além da exposição de maravalha e ração utilizadas por outros animais dessa sala. Esses animais são excelentes exemplares para detecção e rastreabilidade de patógenos presentes nas instalações de roedores^{3,5,9,11,13,19,26}. A instituição estudada utiliza rotineiramente camundongos outred como biomodelos para sentinela¹⁹, obtendo resultados satisfatórios no diagnóstico de microrganismos em animais sentinelas de três meses de idade no programa de controle sanitário.

Os diagnósticos moleculares tornaram-se comuns em pesquisas de agentes infecciosos de animais de laboratório. Contudo, manter ou substituir métodos sorológicos, microbiológicos e parasitológicos ainda é uma questão de estudos mais aprofundados no programa de monitoramento sanitário. Em algumas situações, os testes baseados em PCR substituíram outros métodos tradicionais, enquanto em outros casos, usando PCR em conjunto com outros métodos do uso de sentinelas, melhoram a capacidade de monitorar infecções agentes oportunistas em colônias de animais de criação e seu macro e microambiente³². Devido aos potenciais riscos de diagnósticos indeterminados, o presente biotério de criação ainda utiliza a técnica tradicional de animais sentinela, como forma de garantir a qualidade sanitária dos animais e controle de suas barreiras, até que este seja substituído por outros métodos alternativos.

Ressalta-se que inúmeros microrganismos que normalmente não causam sinais clínicos em animais imunocompetentes podem acarretar doenças em animais imunodeficientes ou em animais cuja resistência é reduzida. Portanto, ainda se torna imprescindível monitorar esses animais por sentinelas, que são capazes de detectar potenciais agentes oportunistas^{12,19,33,34}.

As fêmeas grávidas de *S. obvelata* migram do intestino para o reto, atravessam ativamente o ânus do animal infectado e depositam todos os seus ovos diretamente sobre a pele na região perianal e, devido ao gasto de energia, acabam morrendo em poucas horas. Os ovos embrionados se tornam infectantes e podem eclodir ali mesmo e retro infectar o animal. Por isso, são encontrados ovos na parte perianal do animal e não no intestino, o que pode ser um indicativo de que a infecção parasitária está no início, quando associada a idade do hospedeiro analisado. Machos adultos não são encontrados no intestino do animal, pois após a fertilização da fêmea, o macho acaba morrendo e é eliminado nas fezes^{9,17,18,26}.

Existem divergências quanto ao tempo de sobrevivência dos ovos de *Syphacia* spp. no ambiente; entretanto, sabe-se que o controle parasitológico é um trabalho árduo, podendo ser comprovado pelas falhas nas barreiras sanitárias, que são imprescindíveis para impedir a entrada de agentes patogênicos nas colônias^{1-3,13,35}.

O método de Graham no diagnóstico de infecções por *Syphacia* spp. em roedores deve ser realizado na parte da manhã, pois é o horário que o hospedeiro terá sua temperatura corporal reduzida e a fêmea da *Syphacia* spp. liberará os ovos na região perianal do animal. A partir de meio dia, os ovos poderão se dispersar no ambiente⁵ em função da leveza dos mesmos ou contaminar outros camundongos com a presença de formas infecciosas^{3,9,10,22}. Devido à característica do parasito, este diagnóstico é mais indicado para detecção de ovos no início e no final do seu ciclo^{5,11,20,26,36}. Desta forma, identificou-se neste estudo a necessidade de adicionar o diagnóstico de *Syphacia* spp. através do método de Graham, em associação ao exame direto da mucosa intestinal, para a detecção de todas as formas do agente parasitário.

Portanto, os resultados demonstraram que é possível inferir que o método de Graham²⁰ é capaz de ampliar o espectro de identificação de *S. obvelata*, sendo esta técnica adotada como diagnóstico padrão no monitoramento sanitário da criação animal estudada. Tal técnica auxilia nas condutas de manejo a serem empregadas nesta criação, em prol do controle e erradicação do parasito em questão.

O coeficiente Kappa de Fleiss é usado quando colaboradores independentes realizam mais de uma leitura da mesma amostra analisada, como uma forma de garantia da qualidade das amostras analisadas^{12,29}. As análises realizadas no presente estudo indicaram que a leitura das seis lâminas por amostras de fezes foi satisfatória para padronizar esta metodologia. Nesta avaliação, constatou-se que a leitura adotada contribuiu para a eficiência e redução na falha do diagnóstico de parasitoses, bem como permitiu o estabelecimento e validação da técnica no serviço de parasitologia.

Por fim, afirma-se que possíveis infecções intercorrentes com outros microrganismos ou parasitas podem alterar os resultados experimentais, fazendo-se necessária a implementação de um programa contínuo de monitoramento sanitário, além da manutenção em instalações adequadas e, eliminação de agentes patogênicos de um biotério^{2-5,12,13,27}. Neste contexto, é válido enfatizar que o método de Graham deve ser adotado como uma técnica complementar às rotineiramente utilizadas em programas de controle da qualidade sanitária de animais de laboratório.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a inclusão do método de Graham para pesquisa de *S. obvelata* no programa de monitoramento sanitário, permite detectar ovos do parasito estudado na região perianal e, dessa forma, descartar o diagnóstico falso negativo nas amostras analisadas. O método, assim, possibilita ampliar o espectro de identificação de *S. obvelata*, bem como compreender melhor o ciclo do parasito em questão, em que os machos adultos morrem na fecundação e as fêmeas adultas morrem em poucas horas no momento de liberação dos ovos. É válido salientar que esta é uma técnica de fácil e rápida execução, já que a coleta da amostra pode ser realizada pelo próprio profissional técnico da criação, sem a necessidade de envio do animal ao laboratório.

Assim, o emprego dos métodos de Graham e exame direto da mucosa intestinal pode ser considerado como padrão no monitoramento sanitário, pois com este conjunto de técnicas é possível assegurar que todas as possibilidades de erro na detecção do parasito sejam esgotadas, já que a associação dos mesmos evidencia todas as formas do parasito, ou seja, ovos, larvas, adultos machos e fêmeas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a toda à equipe do Serviço de Controle da Qualidade Animal (SCQA), pelo suporte técnico dos exames laboratoriais. À Dra. Marcia Justo (Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz), pelo apoio técnico na realização deste trabalho.

Fonte de financiamento

Recurso institucional.

REFERÊNCIAS

1. De Luca RR, Alexandre SR, Marques T, et al. Manual para técnicos em bioterismo. 2ª ed. São Paulo: Cobeia. Finep; 1996. 260 p.
2. Marques MAP. Controle Parasitológico. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editores. Animais de laboratório: criação e experimentação. 2ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006. p. 303-315. <http://dx.doi.org/10.7476/9788575413869.0037>.
3. Molinaro EM, Majerowic J, Couto SE, et al. Animais de laboratório. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR, editores. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. 1ª ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009. 203 p.
4. Borges CCA. Estudo retrospectivo do monitoramento sanitário parasitológico dos camundongos SWISS WEBSTER, BALB/c An e C57BL/6 criados e mantidos em instalação de produção do CECAL-FIOCRUZ-Rio de Janeiro [dissertação]. Rio de Janeiro: ICTB/Fiocruz; 2018.

5. Gilioli R, Sakurada JK, Andrade LA, Kraft V, Meyer B, Rangel HA. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. *Lab Anim Sci*. 1996;46(5):582-4. PMID:8905597.
6. Lipman NS, Dalton SD, Stuart AR, Arruda K. Eradication of pinworms (*Syphacia obvelata*) from a large mouse breeding colony by combination oral anthelmintic therapy. *Lab Anim Sci*. 1994;44(5):517-20. PMID:7844964.
7. Klement P, Augustine JM, Delaney K, Klement G, Weitz JI. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. *Lab Anim Sci*. 1996;46(3):286-90. PMID:8799934.
8. Lewis JW, D'Silva J. The life-cycle of *Syphacia muris* Yamaguti (Nematoda: Oxyuroidea) in the laboratory rat. *J Helminthol*. 1986;60(1):39-46. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X00008208>. PMID:3701019.
9. Moreira WC, Santos BF, Santos SI, et al. Erradicação de *Syphacia* spp. de uma grande colônia de criação de roedores combinando ivermectina oral, sistema de barreira sanitária e higienização ambiental. *Resbecal*. 2013;2(2):111-23.
10. Meade TM, Watson J. Characterization of rat pinworm (*Syphacia muris*) epidemiology as a means to increase detection and elimination. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2014;53(6):661-7. PMID:25650973.
11. Ribeiro ARS, Cruz RJ, Marques T. Diagnóstico parasitológico. In: Lapchik, VBV, Mattaraia, VGM, Kog M, editores. Cuidados e manejo de animais de laboratório. 2ª ed. São Paulo: Atheneu. 2017; p. 394-398.
12. Fleiss JL, Levin B, Paik MC. Statistical methods for rates and proportions. 1st ed. New York: John Wiley; 2013. p. 212-236.
13. Parkinson M, O'Brien TMA, Meredith A, et al. Diagnosis of ecto-and endoparasites in laboratory rats and mice. *J Vis Exp*. 2011;55(55):e2767<http://dx.doi.org/10.3791/2767>. PMID:21912374.
14. Abdel-Gaber R. *Syphacia obvelata* (Nematode, Oxyuridae) infecting laboratory mice *Mus musculus* (Rodentia, Muridae): phylogeny and host-parasite relationship. *Parasitol Res*. 2016;115(3):975-85. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4825-0>. PMID:26581371.
15. Baker DG. Flynn's parasites of laboratory animals. 2nd ed. Boston: Wiley-Blackwell; 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470344552>.
16. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2002. 387p.
17. Chan KF. Life cycle studies on the nematode *Syphacia obvelata*. *Am J Hyg*. 1952;56(1):14-21. PMID:14933386.
18. Col EB. Parasitos de camundongos de laboratório: uma abordagem informatizada com animações gráficas [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2003.
19. Mähler Convenor M, Berard M, Feinstein R, et al. Felasa recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*. 2014;48(3):178-92. <http://dx.doi.org/10.1177/0023677213516312>. PMID:24496575.
20. Graham CFA. Device for the diagnosis of *Enterobius* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1941;21(1):159-161. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1941.s1-21.159>.
21. Plachý V, Litvinec A, Langrová I, et al. The effect of *Syphacia muris* on nutrient digestibility in laboratory rats. *Lab Anim*. 2016;50(1):39-44. <http://dx.doi.org/10.1177/0023677215577038>. PMID:25777968.
22. Marque ST, Cruz RJ. Controle parasitológico. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM, editores. Cuidados e manejo de animais de laboratório. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 337-357.
23. Santos IS, Silva SC, Hooper SC, et al. Análise comparativa entre dois métodos de diagnóstico para detecção de *Syphacia obvelata* no monitoramento sanitário de camundongos (*Mus musculus*) de um biotério de criação. *Resbecal*. 2017;5(2):160.
24. Wiese E, Maurer S, Steige G, et al. Decontamination of a barrier facility using microisolator cages and provisional partitioning. *Lab Anim*. 2007;36(7):31-5. <http://dx.doi.org/10.1038/labon0707-31>. PMID:17585355.
25. Eguíluz C, Viguera E, Perez J. Modification of the anal tape method for detection of pinworms in rodents. *Lab Anim*. 2001;30(10):54-5. PMID:11923870.
26. Flynn RJ. Parasites of laboratory animals. 1st ed. Ames: Iowa State University Press; 1973. p. 10-11.
27. Doyle RL, Monteiro SG, Graça DL, et al. Avaliação helmintológica de camundongos (*Mus musculus*) criados em biotério experimental. *FZVA*. 2006;13(2):108-15.
28. De Carli GA. Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas. 2ª ed. São Paulo: Ateneu; 2001. 340 p.
29. Tibiriçá SHC, Abramo C, Simões AS, et al. Validação do número de lâminas para realização do método de sedimentação espontânea das fezes. *Hu Revista*. 2009;35(2):105-9.

30. Winn CB, Rogers RN, Keenan RA, et al. Using filter media and soiled bedding in disposable individually ventilated cages as a refinement to specific pathogen-free mouse health monitoring programs. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2022;61(4):361-9. <http://dx.doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-22-000013>. PMID:35750479.
31. Bazzano T, Restel TI, Pinto RM, Gomes DC. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(6):847-53. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000600017>. PMID:12386708.
32. Compton PCR Sr. PCR and RT-PCR in the diagnosis of laboratory animal infections and in health monitoring. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020;59(5):458-68. <http://dx.doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-20-000008>. PMID:32580820.
33. Brasil. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa n. 39, de 20 de junho de 2018. Dispõe sobre restrições ao uso de animais em procedimentos classificados com grau de invasividade 3 e 4, em complemento à Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. *Diário Oficial da União*; Brasília; 25 jun. 2018, seção I, p. 7.
34. Brasil. Lei Federal n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. *Diário Oficial da União*; Brasília; 9 out. 2008, p. 1.
35. Hill WA, Randolph MM, Mandrell TD. Sensitivity of perianal tape impressions to diagnose pinworm (*Syphacia spp.*) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009;48(4):378-80. PMID:19653945.
36. Santos IS, Carreiro CC, Jesus VLT, et al. Diagnóstico parasitológico de *Tritrichomonas muris* (Grassi, 1879) em hamster golden (*Mesocricetus auratus*) (waterhouse, 1839): comparação entre as técnicas de sedimentação, flutuação e exame direto. *Resbecal.* 2019;7(2):98.