



CERTIFICAÇÃO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO DO LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE SANITÁRIA DO CEMIB/UNICAMP JUNTO AO ICLAS

CERTIFICATION OF MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTIC METHODS
OF THE CEMIB/UNICAMP SANITARY QUALITY CONTROL
LABORATORY TOGETHER WITH ICLAS

*Josélia Cristina de Oliveira Moreira*¹
*Daniele Masselli Rodrigues Demolin*²
*Clarice Yukari Minagawa*²
*Silvio Rogério Cardoso dos Santos*²
*Lenira Aparecida Guaraldo de Andrade*²
*Euma Cunha Ramos Silva*²
*Rovilson Gilioli*²

RESUMO

O programa internacional “*ICLAS Animal Quality Network*” foi desenvolvido em 2007 com o objetivo de melhorar a qualidade dos animais utilizados em pesquisas científicas. Desta forma, foi criado o “*Performance Evaluation Program (PEP)*” para auxiliar laboratórios de diagnóstico na avaliação da sensibilidade e especificidade dos testes laboratoriais. O programa conta com 22 participantes mundiais e na América do Sul apenas o Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB/UNICAMP faz parte deste grupo. Foram recebidas 20 amostras biológicas “cegas” constituídas de: culturas bacterianas isoladas de trato intestinal, fluído e vagina; fezes de camundongo; homogenato de pulmão e baço; 5 soros de ratos e 5 soros de camundongo. Para diagnóstico bacteriológico foram utilizados meios de cultivos de enriquecimento e seletivos-diferenciais. Os soros foram testados por Imunofluorescência Indireta para 16 antígenos virais e as amostras de tecido por PCR e RT-PCR. Das 20 amostras, o laboratório identificou corretamente 17 delas, o que corresponde a 89,4% de compatibilidade no diagnóstico. As bactérias identificadas foram: *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus agalactiae*, *Stenotrophomonas malthophilia*, *Staphylococcus sciuri* e *Mycoplasma pulmonis*. Os soros apresentaram anticorpos contra: Reovírus-3, vírus minuto do camundongo, *Mycoplasma pulmonis*, vírus da Hepatite murina, vírus Sendai, Rat coronavírus, Rat Theilovírus e Adenovírus. Destes soros 2 foram negativos. As análises moleculares do homogenato de pulmão e baço apresentaram positividade para *Pneumocystis murina* e Parvovírus, respectivamente. Esta primeira triagem foi importante para avaliar as metodologias adotadas e detectar possíveis problemas relacionados aos métodos utilizados no processo, garantindo a certificação da qualidade do diagnóstico oferecido pelo laboratório à comunidade científica.

PALAVRAS-CHAVE: ICLAS. Monitoramento sanitário. Imunofluorescência indireta. PCR. RT-PCR.

¹ Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Paulista UNIP. Mestranda no Curso de Fisiopatologia Médica pela Universidade Estadual de Campinas. Técnica em Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas junto ao Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Animais de Laboratório (CEMIB/ UNICAMP). Campinas, SP. E-mail: jocris@unicamp.br

² Funcionários da Universidade Estadual de Campinas.

Submetido em: 05/01/2016 – **Aceito em:** 22/01/2016.

ABSTRACT

The international program "ICLAS Animal Quality Network" was developed in 2006 with the goal of improving the quality of animals used in scientific researches. Thus, the "Performance Evaluation Program" (PEP) was created to assist diagnostic laboratories in evaluating the sensitivity and specificity of laboratory tests. The program has 22 participants worldwide, and the CEMIB / UNICAMP Animal Health Laboratory is the only one in South America that attends this program. For analysis, we received 20 blinded samples as followed: isolated bacterial cultures of intestinal fluid and vaginal tract, feces of mice, lung and spleen homogenates, 5 mice and 5 rat sera. For bacteriological diagnosis, selective and differential medium were used. Sera were tested by Indirect Immunofluorescence assay for 16 antigens, and the PCR and RT-PCR were applied for tissue samples. From this total, the laboratory correctly identified 17 of them, which corresponds to 89.4% of compatibility in the diagnosis. The bacteria identified were: *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus agalactiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus sciuri*, and *Mycoplasma pulmonis*. It was observed that the serum had specific antibodies to: Reovirus-3, Mouse minute virus, *Mycoplasma pulmonis*, Murine hepatitis virus, Sendai virus, rat coronavirus, rat theilovirus and Adenovirus. Two of these sera showed negative results for the tested antigens. Molecular analyses of lung and spleen homogenates were positive for Parvovirus and *Pneumocystis murina*, respectively. This first trial was important to evaluate the methodologies adopted and to detect potential problems related to methods used in the process, which aims to ensure the quality of the laboratory diagnosis offered to the scientific community.

KEYWORDS: ICLAS. Sanitary monitoring. Indirect Immunofluorescence assay. PCR. RT-PCR

INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica dos animais utilizados na experimentação pode afetar significativamente resultados experimentais ou até invalidar os mesmos. A presença de microorganismos patogênicos e oportunistas pode levar a infecções e resultar em doenças clínicas ou sub-clínicas com alterações patológicas, causando uma grande perda de tempo e dinheiro. Assim o controle microbiológico e um programa de monitoramento sanitário efetivo são muito importantes, pois podem minimizar perdas e garantir resultados experimentais reprodutíveis (PARK et al., 2006).

Desde que foi criado no Japão em 1979, o Comitê Internacional de Ciência de Animais de Laboratório (ICLAS), vem promovendo ações de sensibilização para a importância da qualidade dos animais de laboratório para a comunidade científica mundial. Com intuito de melhorar e manter a qualidade dos animais utilizados em pesquisas, o órgão criou em 2007 o programa internacional "*ICLAS Animal Quality Network*", uma rede formada por 20 dos maiores laboratórios de diagnóstico do mundo na área da saúde animal. O programa consiste em avaliar a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico utilizados pelos laboratórios, para monitorar a saúde dos animais utilizados na pesquisa biomédica.

Em 2007, o então designado "*Performance Evaluation program*" (PEP) foi realizado pela Idexx Laboratório e a CRL (Charles River Laboratories) como um protótipo, porém acompanhadas de perto por um grupo de representantes da antiga rede de laboratórios de referência do ICLAS, para avaliar como seria a aplicação do programa a todos os laboratórios participantes. Após essa primeira triagem ter sido bem sucedida, a

auto-avaliação dos laboratórios passou a ser realizada anualmente (GOTO et al., 2009). Cada laboratório pode utilizar diferentes métodos de diagnóstico para detecção de agentes patogênicos primários, secundários e oportunistas, dentre eles vírus, bactérias e fungos, presentes em colônias de roedores utilizados como modelos na experimentação (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals issued by CIOMS, 1986).

Diante da introdução de novas colônias de linhagens de camundongos geneticamente modificados tornou-se necessário aos laboratórios de diagnóstico implantar novas técnicas de diagnóstico para microorganismos emergentes e re-emergentes (RODENTS et al., 2014).

Com o intuito de melhorar a qualidade dos serviços que são oferecidos à comunidade científica, o Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB/UNICAMP (LCQS), que desde 1997 era membro da antiga rede de laboratórios de referência do ICLAS, tornou-se membro da nova rede internacional “ICLAS Animal Quality Network” para servir como uma referência internacional no campo de alta qualidade de modelos animais de laboratório. Na América do Sul apenas o Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB faz parte deste seleto grupo e em 2013 recebeu pela primeira vez amostras testes do Programa de Avaliação de Desempenho diagnóstico do ICLAS (ICLAS PEP).

Neste artigo, relatamos as técnicas e procedimentos adotados para o diagnóstico das amostras biológicas recebidas, assim como discutimos a validação dos métodos empregados e a implantação do diagnóstico de novos agentes infecciosos emergentes e re-emergentes, no sentido de aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos no monitoramento da saúde das colônias de animais de laboratório.

MATERIAL E MÉTODO

Todos os protocolos contendo os procedimentos para a realização dos testes diagnósticos a serem utilizados foram elaborados em conformidade com as recomendações da FELASA 2014 e do banco de dados de agentes infecciosos do ICLAS.

Antes do recebimento das amostras biológicas ‘cegas’ enviadas pelo programa de avaliação de desempenho diagnóstico do ICLAS (ICLAS PEP), um inventário contendo informações sobre pesquisa de anticorpos séricos ou de antígenos de agentes patogênicos foi previamente enviado ao Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB/UNICAMP.

Nas seções seguintes, será feita uma descrição das metodologias adotadas nesta certificação.

Amostras biológicas

Foram recebidas do ICLAS PEP, 20 amostras “cegas”, sendo descritas apenas como: culturas bacterianas isoladas de trato intestinal, fluído e vagina; fezes de camundongo; homogenato de pulmão e baço e 5 soros de rato e 5 soros de camundongo conforme inventário descrito na tabela 1.

TABELA 1- Inventário de amostras (ICLAS PEP)

Nº de ID	Descrição	Volume	Teste	Observação
30.1	Soro de camundongo 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.2	Soro de rato 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.4	Soro de camundongo 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.5	Soro de rato 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.6	Soro de camundongo 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.7	Soro de rato 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.8	Soro de rato 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.9	Soro de camundongo 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.10	Soro de rato 1:5	0,5 mL	anticorpo	
30.11	Cultura não patogênica	0,5 mL	Bactéria	
30.12	Fezes de camundongo	0,5 mL	Vírus	RNA
30.13	Cultura não patogênica	0,5 mL	Bactéria	
30.14	Homogenato de pulmão	0,5 mL	Vírus	DNA virus
30.15	Homogenato de pulmão	0,5 mL	Fungo	DNA
30.16	Cultura não patogênica	0,5 mL	Bactéria	isolado de trato intestinal
30.17	Cultura não patogênica	0,5 mL	Bactéria	isolado de vagina de camundongo
30.18	Homogenato de baço de rato	0,5 mL	Vírus	DNA vírus
30.19	Cultura não patogênica	0,5 mL	Bactéria	
30.20	Fluído de camundongo	0,5 mL	Bactéria	

Fonte: Autores.

Após o recebimento das amostras, foi realizada a conferência quanto às suas identificações, condições de conservação e integridade dos contêineres, conforme inventário recebido, e separação das mesmas de acordo com o tipo de teste a que seriam submetidas (testes bacteriológicos, sorológicos e moleculares).

Testes Bacteriológicos

As amostras para cultura de agentes bacterianos foram inoculadas em meios de cultivo de enriquecimento, seletivo-diferenciais: Caldo BHI (Brain Heart Infusion), Caldo PPLO (Pleuro Pneumoniae Like Organisms Broth), Ágar Sangue, Ágar Cetrimida, Ágar

Manitol e Ágar MacConkey e incubadas em aerobiose a 37°C. A leitura foi realizada com 24 e 48 horas e todas as colônias encontradas foram submetidas à coloração de GRAM (STAINIER, 1977). Após, as amostras foram submetidas a provas de identificação bioquímica utilizando os meios Mili, Rugai e Citrato para detecção de *Enterobacteriaceas* (Rugai & Araújo, 1968). Para a confirmação do diagnóstico de *Enterobacteriaceas* foi utilizado API 20E bioMérieux Brasil API®(MURRAY, 1978). Amostras que apresentaram acidificação no caldo PPLO, foram testadas pela técnica de PCR com primers para o gênero *Mycoplasma* e primers específicos para espécies do gênero(VAN KUPPEVELD et al., 1993).

Testes sorológicos

As amostras de soros foram testadas pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), de acordo com o protocolo estabelecido no laboratório, (KRAFT; MEYER, 1986) para antígenos virais e bacterianos, conforme recomendação da FELASA (NICKLAS et al., 2002).

A relação contendo os anticorpos séricos testados para a presença de agentes infecciosos de rato e de camundongo estão descritos na tabela 2.

TABELA 2 - Antígenos testados para amostras de ratos e de camundongos

Antígenos Testados/Métodos	Camundongo	Rato
Virus da Ectromelia-IFI	X	
Virus do Polyoma-IFI	X	
Vírus da pneumonia do camundongo (PVM)-IFI	X	X
Vírus da hepatite do camundongo(MHV)-IFI	X	
Vírus Minuto do Camundongo(MVM)-IFI	X	
Norovírus murino(MNV)-IFI	X	
Virus Sendai-IFI	X	X
Virus da Encefalomielite de Theiler(TMEV)-IFI	X	
Reovírus tipo 3-IFI	X	X
Adenovírus tipo 1-IFI	X	X
Adenovírus tipo 2-IFI	X	X
Rotavírus do camundongo(EDIM)-IFI	X	X
<i>Mycoplasma pulmonis</i> -IFI	X	X
<i>Clostridium piliforme</i> -IFI	X	X
Coronavírus do rato(RCV/SDAV)-IFI		X
Virus Theiler do rato(RTV)-IFI		X
Virus minuto do rato(RMV)-IFI/IHA		X
Virus Kilhan do rato (KRV) -IHA		X
Virus Toolna H-1- IHA		X
Bordetela bronchseptica-MA	X	X
<i>Corynebacterium kutscheri</i> -MA	X	X

Fonte: Autores

<i>Rev. Saberes Univ.</i>	Campinas, SP	v.1	n.1	p.50-62	mar. 2016	ISSN 2447-9411
---------------------------	--------------	-----	-----	---------	-----------	----------------

Para a avaliação das amostras, 25µl dos soros testes diluídos a 1:20 em solução salina tamponada com fosfatos (PBS 0,01M, pH 7,2) foram adicionados em cada poço de lâminas multitestes teflonadas contendo antígenos virais ou bacterianos e incubados à temperatura ambiente em câmara úmida por 20 minutos. Após, as lâminas foram submetidas a duas lavagens com a mesma solução tampão por dez minutos cada lavagem. Em seguida, 25µL de conjugado IgG de carneiro anti-IgG de camundongo ou IgG de carneiro anti IgG de rato marcados com Isotiocianato de Fluoresceína, diluído a 1:160 em solução PBS - Azul de Evans, foi acrescentado em cada poço e novamente as lâminas foram incubadas nas mesmas condições ambientes descritas anteriormente. As lâminas foram montadas com lamínula de vidro utilizando solução de glicerina tamponada alcalina (0,5M, pH 8,5). As leituras foram realizadas em microscópio binocular de fluorescência de epi-iluminação (ZEISS, Alemanha) modelo Standart 20, lâmpada de mercúrio HBO 50W para luz ultravioleta, filtro barreira 450 a 490nm, filtro de excitação BG 38 e aumento final de 400 vezes.

Os Parvovírus de ratos Toolan H-1 e Kilham rat vírus (KRV) foram testados pela técnica de Inibição da Hemaglutinação (IHA). Também por esta técnica, foram testadas as amostras de soros positivas na IFI para Parvovirus, com o objetivo de diferenciar entre os seguintes antígenos: MVM, MPV, RMV e RPV. Todas as amostras de soro foram testadas ainda por Microaglutinação (MA) para a presença de anticorpos contra *Bordetella bronchiseptica* e *Corynebacterium kutscheri*. Tanto nas reações de IFI, MA e IHA foram utilizados controles de reação positivos de animais previamente imunizados e controles negativos.

Testes moleculares

Para as amostras de tecido aplicaram-se técnicas de PCR e RT-PCR. Os DNAs e RNAs foram extraídos utilizando kits comerciais QIAamp® DNA Mini e RNeasy Mini kit (QIAGEN® Inc., Valencia, California), respectivamente, conforme protocolo descrito pelo fabricante. Para cada agente infeccioso utilizou-se condições de reação e sequência de primers específicos conforme quadro 1.

QUADRO 1- Sequência de primers utilizados para os testes moleculares

Primers	Sequência (5' - 3')	Microorganismo	Tamanho do amplificado (pb)
GPO3 MGSO	F- GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT R-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC F- ACACCATGGGAGCTGGTAAT R-CTTCATCGACTTTCAGACCCAAGGCAT	<i>Mycoplasma pulmonis</i> GÊNERO (VAN KUPPEVELD et al., 1993) <i>Mycoplasma pulmonis</i> esécie-específico (FAN; KLEVEN; JACKWOOD, 1995)	270

PC-1 PC-2	F- ATTTATGGGTTTCAATGG R- GTTCCCTTTAATAATGCA	<i>Pneumocystis carinii</i> (WEISBROTH et al., 1999)	355
Parvo (Gênero)	F-GATGATGATGCAGCCAGACAGT R-TAGTTTGCTGGTTTCAGCTTTTTC	Parvovirus (REDIG; BESSELSSEN, 2002)	154

Fonte: Autores

RESULTADOS

Das 20 amostras recebidas, o laboratório LCQS identificou corretamente 17 delas. o que corresponde a 89,4% de compatibilidade no diagnóstico, sendo que para uma das amostras (homogenato de pulmão) contendo Adenovirus 1, o LCQS não havia implantado ainda o diagnóstico molecular (PCR). Em uma das amostras de fezes, recebidas para diagnóstico molecular, a pesquisa de Norovirus murino não foi possível ser diagnosticada, pois a quantidade de amostra era insuficiente para extração de RNA e posterior detecção do antígeno. Quanto aos resultados sorológicos, em apenas uma das amostras de soro não foi possível detectar a presença de anticorpos contra o vírus Polyoma, devido à má qualidade do lote de antígenos disponível para uso na reação de IFI no momento dos testes.

Dentre os testes bacteriológicos foram identificadas corretamente as seguintes bactérias: *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus agalactiae*, *Stenotrophomonas malthophilia*, *Staphylococcus sciuri* e *Mycoplasma pulmonis* (Figura 1).

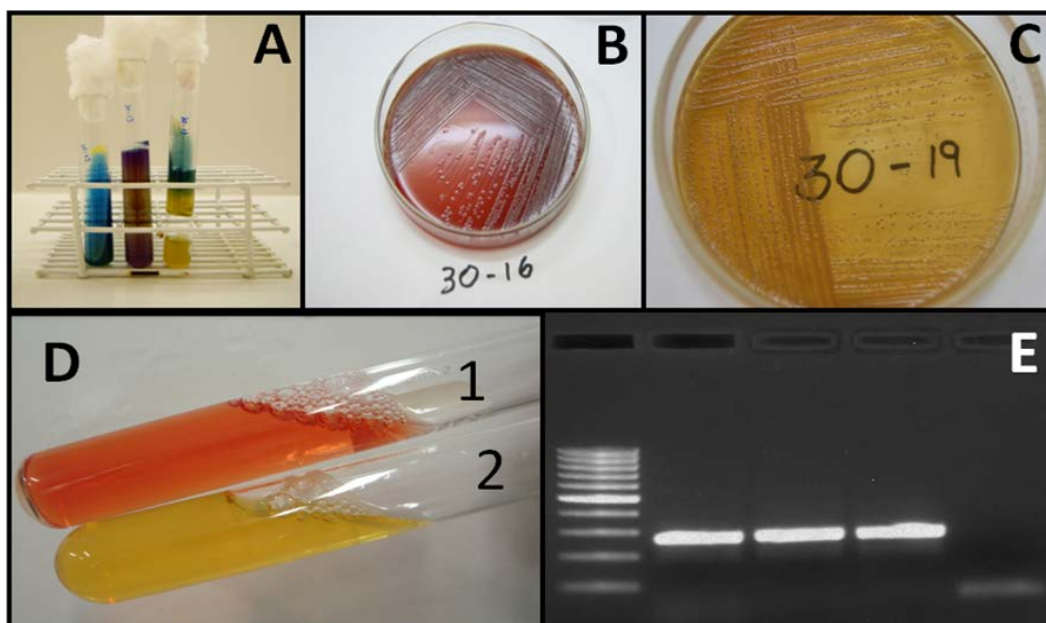


Figura 1 – Bactérias Isoladas: A: Série bioquímica *Klebsiella oxytoca* B: *Streptococcus agalactiae* em ágar sangue; C: *Stenotrophomonas malthophilia* em ágar macconkey.; D: Caldo PPLO (1- Controle negativo, 2- Amostra positiva); E: Amostra positiva de *M. pulmonis* em Gel de agarose 2%.

Fonte: acervo do laboratório Controle de Qualidade Sanitário do Cemib/Unicamp)

Os soros de camundongos testados por IFI apresentaram anticorpos contra Reovírus tipo 3 (REO-3), vírus minuto do camundongo (MVM), *Mycoplasma pulmonis* e vírus da Hepatite murina (MHV), enquanto os soros de ratos apresentaram anticorpos positivos para vírus Sendai, Coronavírus do rato (RCV/SDAV), vírus Theiler do rato (RTV) e Adenovírus tipo 1 (Figura 2). Dois destes soros apresentaram-se negativos para todos os antígenos testados por IFI, sendo que um deles foi retestado posteriormente com novo lote de antígenos demonstrando a presença de anticorpos para Polyoma. Quanto aos testes de microaglutinação e inibição da hemaglutinação, todas as amostras testadas foram negativas, exceto para uma amostra de soro, a qual foi confirmada positividade de anticorpos contra MVM pela técnica de IHA.

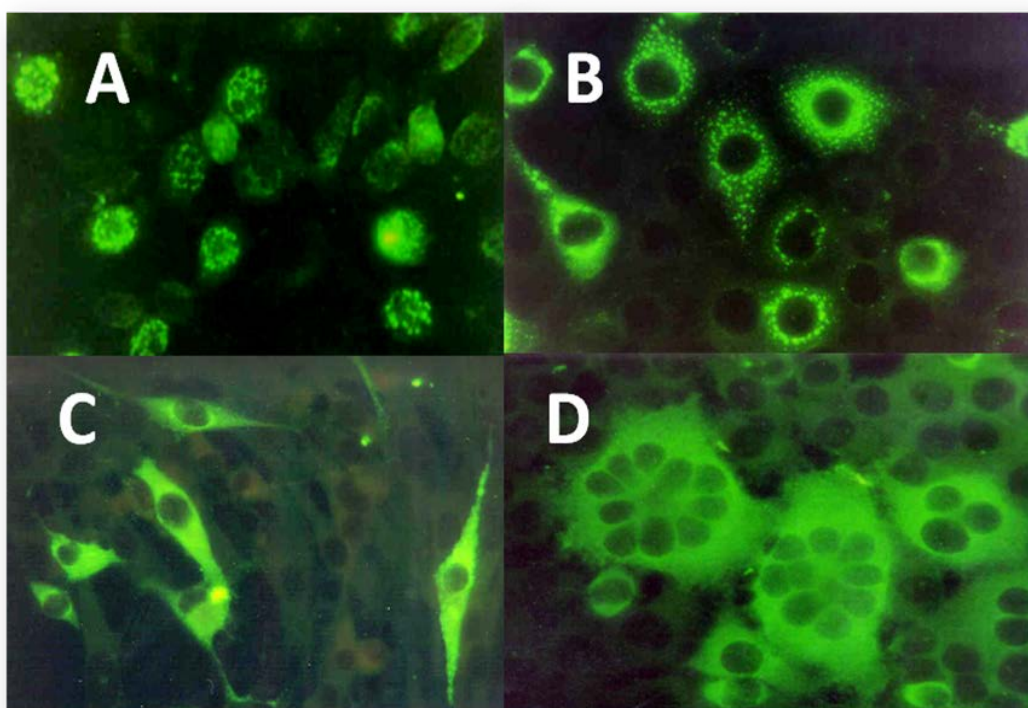


FIGURA 2 - Reação de Imunofluorescência Indireta: A: REOVIRUS-3 em Células VERO E6; B: MVM em células L929; C: TMEV-GDVII em células BHK-21; D: MHV em células L929, aumento de 400X. (Fonte: acervo do laboratório Controle de Qualidade Sanitário do Cemib/Unicamp)

Os testes moleculares realizados dos homogenatos de pulmão e baço apresentaram positividade para *Pneumocystis murina* e Parvovírus, respectivamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A qualidade microbiológica dos animais de laboratório que são utilizados na pesquisa científica pode influenciar a reprodutibilidade e a validação dos resultados experimentais. Vários grupos de microorganismos são responsáveis por infecções que

acometem os animais de laboratório, mas estes muitas vezes não levam a sinais clínicos aparentes. Infecções latentes ou inaparentes, no entanto, podem ter impacto considerável sobre o resultado da experimentação animal (NICKLAS et al., 2002).

Numerosos exemplos da influência direta ou indireta desses microorganismos sobre a fisiologia destes animais são conhecidos, tais como: alteração do comportamento, diminuição nas taxas de crescimento e de reprodução e alteração da resposta imune, possibilidade para confundir os resultados experimentais, aumentando a variabilidade nos resultados obtidos, bem como no número de animais utilizados nos experimentos (RODENTS et al., 2014).

Pensando nisso, o ICLAS estabeleceu o PEP para avaliar a especificidade e a sensibilidade dos testes laboratoriais empregados para monitorizar a saúde dos animais utilizados como modelos experimentais. No Brasil e na América do Sul, o Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB/UNICAMP é o único membro integrante da rede de laboratórios do Programa “*ICLAS PEP Network*” e tem a responsabilidade de avaliar e certificar o estado de saúde das colônias de animais de laboratório do Brasil e da América Latina.

Anualmente cada laboratório dos países participantes do programa pode optar por receber amostras para serem avaliadas por todos os testes diagnósticos (microbiológicos, sorológicos e moleculares) ou somente para cada um dos testes separadamente. Cada amostra enviada para monitoramento microbiológico é cuidadosamente selecionada, empregando-se amostras de patógenos emergentes e prevalentes de cada País.

Dentre as bactérias isoladas pelo nosso laboratório, *Klebsiella klebsiella oxytoca*, *Mycoplasma pulmonis* e *Staphylococcus sciuri* são rotineiramente diagnosticados, enquanto *Streptococcus agalactiae* e *Stenotrophomonas maltophilia* não são bactérias comumente encontradas nos biotérios brasileiros. Para isolamento destas bactérias, técnicas simples de inoculação em meios seletivos e diferenciais foram realizadas. A observação das colônias e a coloração de Gram direcionaram a identificação presuntiva e a confirmação foi realizada com uso de API 20 NE para *Enterobacteriaceas* e API STAPH para diferenciação de espécies do gênero *Staphylococcus*.

Embora testes como API estejam no mercado e ajudem muito no diagnóstico rápido de bactérias, optamos por semear as amostras em todos os meios de cultura, incluindo o caldo PPLO logo após sua chegada, no intuito de minimizar qualquer possibilidade de contaminação ou perda de amostra. O uso do API foi utilizado apenas como teste confirmatório. A eficiência deste método foi evidenciada no correto isolamento de todas as amostras bacterianas, incluindo *Mycoplasma pulmonis*, onde a detecção só foi possível mediante o cultivo em caldo PPLO e posterior confirmação de crescimento por meio do uso de testes de diagnóstico molecular (PCR).

Para a identificação de anticorpos presentes nas amostras, foram utilizadas as técnicas de IFI e IHA. Ambas têm sido amplamente utilizadas na rotina do laboratório e apresentaram bons resultados. Dentre as amostras sorológicas identificadas, MHV e MVM têm sido descritos como altamente prevalentes em colônias de camundongos de países do leste Europeu, Índia, Coreia e Japão, assim como RCV/SDAV e RTV têm afetado os biotérios de ratos (MAHLER; KOHL, 2009; MANJUNATH et al., 2015), (HAYASHIMOTO et al., 2013; SEOK et al., 2005). Esse cenário tem se repetido também no Brasil segundo dados de prevalência evidenciados por nossa equipe (GILIOLI et al., 1996; RODRIGUES et al., 2005).

Embora a técnica de IFI seja muito específica e barata, ela apresenta a desvantagem de depender de um técnico altamente treinado para a realização da leitura das lâminas e interpretação dos resultados (COMPTON; RILEY, 2001). Por isso faz-se necessário a implantação de outras técnicas sorológicas, a fim de serem utilizadas como técnicas confirmatórias e também rotineiras, como é o caso da técnica de Elisa que é rápida e de fácil uso (VOLLER; BARTLETT; BIDWELL, 1978).

Atualmente os métodos sorológicos são ainda amplamente utilizados no monitoramento sanitário, pois são considerados baratos e eficientes e atendem às necessidades principalmente de países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil e demais países da América Latina. A importância das infecções virais, como interferentes na pesquisa biomédica, tem sido amplamente reconhecida, e a triagem sorológica obtida por programas de monitoramento em animais de laboratório tem contribuído para entender melhor a epidemiologia destas infecções (ZENNER; REGNAULT, 2000).

Com o avanço da biologia molecular, a técnica de PCR e RT-PCR tem sido amplamente utilizada em laboratórios de diagnóstico, pois são rápidas, eficazes e necessitam de pequena quantidade de amostras. Em contrapartida ainda, são muito onerosas para tornarem-se a primeira opção para quem solicita o serviço de monitoramento sanitário das colônias de ratos e camundongos (COMPTON; RILEY, 2001). Por isso no Brasil testes sorológicos ainda são os mais requisitados pelos pesquisadores e biotérios brasileiros públicos e privados.

Para o diagnóstico molecular *primers gênero e espécie-específicos*, tem sido utilizados para detecção de diferentes agentes patogênicos e secundários oportunistas em nosso laboratório, entretanto, rotinas mais abrangentes ainda precisam ser implantadas para se adequar às exigências da nova lista de bio-exclusão segundo recomendações da FELASA 2014. Atualmente, alguns agentes emergentes como Norovirus murino (MNV) e os parvovírus têm sido descritos como altamente patogênicos em animais de laboratório e necessitam de monitoramento microbiológico constante e rotinas de diagnósticas muito bem estabelecidas, pois podem se disseminar muito rapidamente pelas colônias de camundongo (HENDERSON, 2008).

No primeiro envio do PEP ao laboratório, obtivemos uma taxa de aproveitamento de 89,4% de acertos de diagnóstico. Esta avaliação foi considerada bem sucedida, embora a reprodutibilidade não tenha sido maior, pois ainda não tínhamos implantado diagnóstico para alguns agentes, como foi o caso do PCR para Adenovirus.

Desta forma, esta primeira triagem das amostras enviadas pelo ICLAS PEP foi de grande valor para o Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB/Unicamp, pois tornou possível avaliar a confiabilidade dos métodos de diagnóstico laboratoriais utilizados, bem como garantir a certificação do laboratório para continuar prestando serviços diagnósticos de qualidade para a certificação de colônias de animais de laboratório aos nossos clientes.

REFERÊNCIAS

COMPTON, S. R.; RILEY, L. K. Detection of infectious agents in laboratory rodents: traditional and molecular techniques. **Comp Med**, v. 51, n. 2, p. 113-9, Apr 2001.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Dis**, v. 39, n. 4, p. 729-35, Oct-Dec 1995.

GILIOLI, R. et al. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 582-584, Oct 1996.

GOTO, K. et al. First Trial in the Developmental Phase of the "Performance Evaluation Program" Based on the ICLAS Animal Quality Network Program: Self-Assessment of Microbiological Monitoring Methods Using Test Samples Supplied by ICLAS. **Experimental Animals**, v. 58, n. 1, p. 47-52, Jan 2009.
<<http://iclas.org/animal-quality-network/performance-evaluation-program-for-diagnostic-laboratories-pep>>. Acesso em: 18 nov. 2015.

HAYASHIMOTO, N. et al. Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan. **Exp Anim**, v. 62, n. 1, p. 41-8, 2013.

HENDERSON, K. S. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice. **Lab Animal**, v. 37, n. 7, p. 314-320, Jul 2008.

International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals issued by CIOMS. **Vet Q**, v. 8, n. 4, p. 350-352, Oct 1986.

KRAFT, V.; MEYER, B. Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. **Lab Anim Sci**, v. 36, n. 3, p. 271-6, Jun 1986.

MAHLER, M.; KOHL, W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in western Europe. **Lab Anim (NY)**, v. 38, n. 5, p. 161-5, May 2009.

MANJUNATH, S. et al. Sero-Prevalence of Rodent Pathogens in India. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131706, 2015.

MURRAY, P. R. Standardization of the Analytab Enteric (API 20E) system to increase accuracy and reproducibility of the test for biotype characterization of bacteria. **J Clin Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 46-9, Jul. 1978.

NICKLAS, W. et al. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Lab Anim**, v. 36, n. 1, p. 20-42, Jan. 2002.

PARK, J. H. et al. Microbiological monitoring of guinea pigs reared conventionally at two breeding facilities in Korea. **Experimental Animals**, v. 55, n. 5, p. 427-432, Oct. 2006.

REDIG, A. J.; BESSELSSEN, D. G. Detection of rodent parvoviruses by use of fluorogenic nuclease polymerase chain reaction assays (vol 51, pg 328, 2001). **Comparative Medicine**, v. 52, n. 2, p. 176-176, Apr. 2002.

RODENTS, F. W. G. O. R. O. G. F. H. M. O. et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Lab Anim**, v. 48, n. 3, p. 178-192, Feb. 2014.

RODRIGUES, D. M. et al. Theiler's murine encephalomyelitis virus in nonbarrier rat colonies. **Comparative Medicine**, v. 55, n. 5, p. 459-464, Oct. 2005.

RUGAI; ARAÚJO. Meios de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais gram-negativos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n.28, p.79-83, 1968.

SEOK, S. et al. Health surveillance of specific pathogen-free and conventionally-housed mice and rats in Korea. **Exp Anim**, v. 54, n. 1, p. 85-92, Jan. 2005.

STAINIER, R.Y.; DOUDOROFF, M. ; ADELBERG, E. Metodos de coloraciones. In: **MICROBIOLOGIA**. 2. ed. Madrid: Aguilar S. de Ediciones, 1977.

VAN KUPPEVELD, F. J. et al. Detection of Mycoplasma pulmonis in experimentally infected laboratory rats by 16S rRNA amplification. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 3, p. 524-7, Mar 1993.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **J Clin Pathol**, v. 31, n. 6, p. 507-20, Jun 1978.

WEISBROTH, S. H. et al. Latent Pneumocystis carinii infection in commercial rat colonies: Comparison of inductive immunosuppressants plus histopathology, PCR, and serology as detection methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1441-1446, May 1999.

ZENNER, L.; REGNAULT, J. P. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study. **Laboratory Animals**, v. 34, n. 1, p. 76-83, Jan. 2000.

