



R375

Reis, Sonia Rolim

Manual básico de bioterismo / Sonia Rolim Reis, Antonia Maria Ramos Franco. --- Manaus : [s.n.], 2012.

47 p. : il. color.

Elaboração Projeto Fronteiras: Alto Rio Negro; apoio FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos.

Inclui sugestão de referências para leitura.

ISBN:

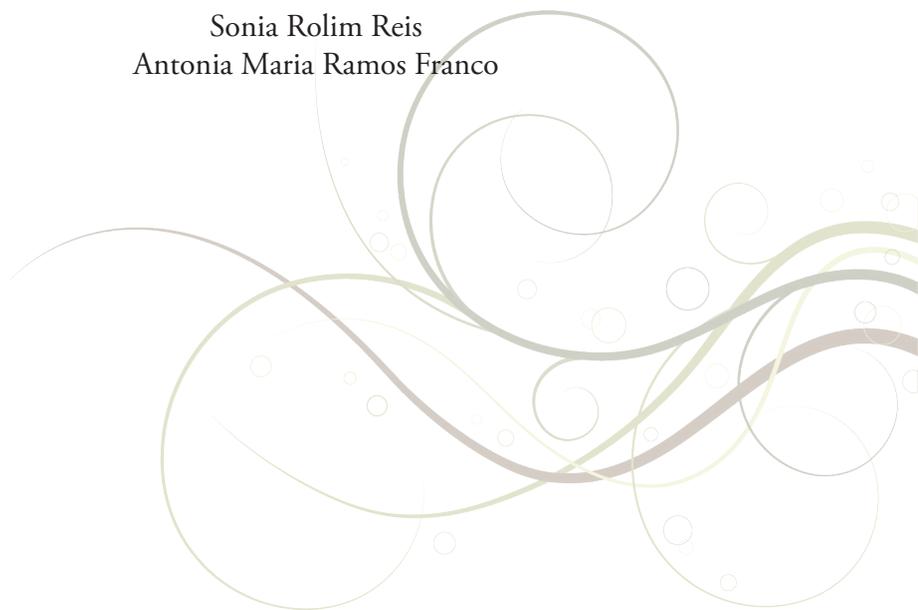
1. Biotérios – Medida de segurança. 2. Experiência com animais – Medida de segurança. 4. Animais de laboratório. 5. Biossegurança. 6. Bioética. I. Franco, Antonia Maria Ramos. II. Título.

CDD 19. ed. 636.0885



MANUAL BÁSICO DE BIOTERISMO

Sonia Rolim Reis
Antonia Maria Ramos Franco

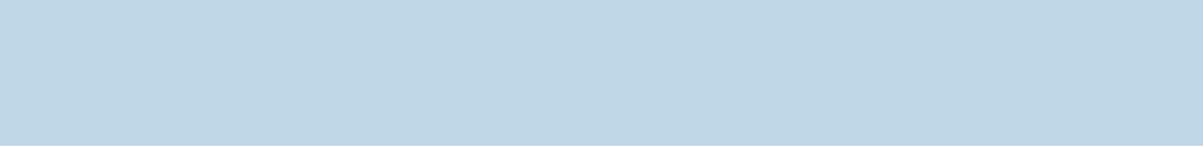


Agradecimentos

Homenagem

À Deus!
Aos nossos pais e esposos e
aos nossos filhos, pela paciência e dedicação,
com muito amor e carinho.





Sumário

Introdução.....	9
1. As barreiras sanitárias.....	10
2. Espécies mais utilizadas em pesquisas.....	10
3. Classificação dos animais quanto ao status sanitário.....	11
4. Fatores ambientais em um biotério.....	12
4.1. Temperatura.....	12
4.2. Umidade.....	12
4.3. Ventilação e renovação do ar.....	13
4.4. Luz e fotoperíodo.....	14
4.5. Ruído.....	14
4.6. Caixas e gaiolas.....	14
4.7. Cama das gaiolas.....	15
4.8. Alimentação e água.....	16
4.9. Manejo e comportamento.....	16
4.10. Higiene e limpeza.....	17
5. Normas de segurança.....	18
6. Eutanasia.....	19
Capítulo I – Das normas gerais.....	20
Capítulo II – Dos procedimentos.....	20
Capítulo III – Dos métodos recomendados.....	20
Anexo I.....	22
Bibliografia.....	25
Prática de dissecação de flebotomíneos.....	29
Coleta de material para demonstração direta do parasito.....	33
Prática de coloração de lâmina para diagnóstico de leishmaniose.....	34
Coloração giemsa.....	36
Isolamento de parasitas em meio de cultura NNN agar sangue.....	37
Sugestão de referências.....	39

Introdução

Este manual descreve de modo sucinto os aspectos importantes na utilização de animais de laboratório. Aborda os parâmetros físicos, químicos e biológicos preconizados em biotério de Experimentação Animal, bem como, as principais normas de biossegurança que devem ser empregadas.

O livro proporciona o conhecimento das técnicas e das necessidades básicas no manejo de animais de laboratório, enfocando, principalmente, a questão da ética, do bem-estar animal. Dessa forma, o manual, resultado da observação das necessidades principalmente quanto a boas práticas no manejo com animais de experimentação, oferece uma contribuição de grande relevância, apresentando ao leitor os diversos aspectos do bioterismo no momento em que se verifica uma profunda mudança nos padrões das pesquisas realizadas no Brasil. Literatura essencial para profissionais da área, incluindo os de nível técnico e os pós-graduandos que fazem uso de animais de experimentação no desenvolvimento de suas pesquisas.

O manejo adequado de animais de laboratório implica na interação de diversos fatores sejam estes físicos, químicos, biológicos e da responsabilidade e profissionalismo do bioterista.

Biotérios são as instalações capazes de produzir e manter espécies animais destinadas a servir como reagentes biológicos em diversos tipos de ensaios controlados, para atender as necessidades dos programas de pesquisa, ensino, produção e controle de qualidade nas áreas biomédicas, farmacológicas e biotecnológicas segundo a finalidade de cada Instituição.

É necessário que os biotérios sejam construídos amparados em rígidos critérios de biossegurança e em também quanto à sua organização funcional, espacial, permitindo assim a criação ou a experimentação animal, dentro dos padrões preconizados de higiene, assepsia e segurança, necessários à obtenção ou a utilização de diferentes espécies animais.

1. As Barreiras Sanitárias

As barreiras sanitárias são imprescindíveis nos biotérios de Criação e Manutenção/Experimentação. São definidas como mecanismos físicos, químicos e biológicos que dificultam ou minimizam os efeitos da interação entre agentes biológicos de risco com o homem e o animal e que são necessárias de acordo com o grau de risco do agente envolvido.

São exemplos de barreiras sanitárias: materiais utilizados na construção dos Biotérios (isolantes térmicos, impermeabilizantes), equipamentos para a filtração de ar, autoclaves, higiene pessoal da equipe de funcionários do setor e dos usuários de animais, pressão diferencial entre ambientes, compostos químicos utilizados em desinfecção e esterilização, etc.

O ambiente do biotério requer cuidados rigorosos, pois os animais vivem em ambientes artificiais, recebem dieta padronizada e, na maioria dos experimentos, as doenças são artificialmente induzidas. Estes animais dependem totalmente do técnico responsável pelo biotério para suprir suas necessidades nutricionais e pelo seu bem estar.

Deve-se também obter apenas animais com padrão sanitário definido, adotando-se barreiras sanitárias eficientes no biotério, para diminuir as chances de contaminação, pois isto poderia ocasionar doença ou morte destes animais propiciando falhas nos resultados das pesquisas.

É necessário o monitoramento cuidadoso da saúde dos animais e dos técnicos a fim de se evitar doenças que podem ser transmitidas do homem para os animais e vice-versa.

Quanto mais eficientes são as barreiras sanitárias dos biotérios, sejam estes de Criação ou Manutenção/Experimentação, menores as chances de contaminação dos animais e do homem.

2. Espécies mais utilizadas em pesquisa

As espécies mais utilizadas em pesquisas são:

- Cães (*Canis familiaris*);
- Camundongos (*Mus musculus domesticus*);
- Cobaia ou porquinho-da-Índia (*Cavia porcellus*);
- Coelho (*Oryctolagus cuniculus*);
- Hamster chinês (*Cricetulus griseus*);
- Hamster sírio (*Mesocricetus auratus*);
- Macaco Rhesus (*Macaca mulatta*); e
- Rato (*Rattus norvegicus*).

3. Classificação dos Animais quanto ao Status Sanitário

O manejo na criação e manutenção de animais de laboratório pode ser através de técnicas que resultarão em animais livres de qualquer forma de vida associada (vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos, etc).

De acordo com o status sanitário que apresentam os animais de laboratório estes podem ser classificados como:

- Gnotobióticos → Possuem uma microbiota associada conhecida.
- Germ Free → Animais totalmente isentos de germes.
- Specific Patogen Free (SPF) → Animais isentos de Agentes Patogênicos Específicos.
- Animais Convencionais → Animais que possuem microbiota indefinida.

Fatores como temperatura, umidade, ventilação e qualidade do ar, luz e ruído devem ser controlados o máximo possível (Fig. 1).



Figura 1. Sala de manutenção de animais de experimentação, mantidos em ambientes com climatização controlada. Fonte: Marcel Frajblat, 2003

4. Fatores ambientais em um biotério

4.1. Temperatura

A temperatura ideal para quase todas as espécies de animais em biotérios é de $21^{\circ}\text{C} (\pm 3)$. Para evitar situações de estresse térmico que levariam a queda da resposta imune dos animais e conseqüentemente alterações nos dados dos experimentos esses animais devem ser mantidos constantemente em sua zona de conforto térmico, o que implica no controle rigoroso da temperatura.

4.2. Umidade

Umidade relativa do ar recomendada para a maioria dos animais de laboratório é de $55\% (\pm 15)$.

A maioria dos animais de laboratório apresenta sudoração insignificante e usa a taquipnéia como mecanismo de adaptação frente ao calor. Assim, o excesso de umidade interfere na dissipação de calor destes animais.

4.3. Ventilação e renovação do ar

Os animais estão constantemente perdendo calor e umidade e eliminando CO_2 , além de outros produtos resultantes de reações metabólicas. Os biotérios devem ter um mecanismo de renovação de ar, a fim de evitar o acúmulo de substâncias tóxicas nas salas. O uso de exaustores e condicionadores de ar é, portanto, indispensável.

Em relação ao ambiente de trabalho, alguns odores animais são agressivos para seres humanos. Grande parte destes odores é produzida pela decomposição bacteriana dos excrementos, porém não se devem usar produtos que os mascare, pois, podem ser extremamente nocivos aos animais. Esses odores devem ser controlados por procedimentos rotineiros de limpeza e ventilação adequados. As pessoas que trabalham nestes ambientes obrigatoriamente devem usar máscaras.

O mais comum e mais sério dos contaminantes ambientais dos biotérios é o amoníaco (NH_3), que se forma pela ação das bactérias (urease positiva) sobre os excrementos. A concentração do amoníaco é influenciada por muitos fatores, como: ventilação, umidade relativa, número de animais por gaiola, alimentação, etc. Atualmente existem sistemas de estantes que comportam certo número de animais e gaiolas em um ambiente ventilado e climatizado (Fig.2).

Estantes ventiladas



Figura 2. Tipo de estante ventilada e climatizada.
Fonte: Marcel Frajblat,2003

4.4. Luz e fotoperíodo

A intensidade luminosa e o foto período influenciam o metabolismo e o ciclo estral dos animais, alterando suas respostas biológicas. O fotoperíodo consiste na quantidade de luz que estes animais receberão durante o dia (10h, 12h, etc.). Recomenda-se o isolamento total do biotério em relação à luz natural, permitindo o controle da intensidade luminosa e do fotoperíodo.

Deve-se preferir o uso de luzes fluorescentes brancas, em virtude de menor emissão de calor. A intensidade luminosa não deve ultrapassar a 300 Lux, na sala, a um metro do chão, e, o interior das gaiolas, não deve exceder a 60 Lux. Outras variáveis devem ser consideradas, como a luminosidade dentro das gaiolas, uma vez que, como estas estão dispostas em prateleiras, gaiolas das prateleiras superiores tendem a receber mais luz do que as situadas nas prateleiras inferiores.

4.5. Ruído

O ruído é um fator de grande influência sobre o bem estar dos animais de biotério, principalmente considerando-se que os ouvidos dos roedores possuem a capacidade de escutar frequências mais altas (ultrassons), inaudíveis pelos ouvidos humanos. Frente a sinais de estresse dos animais, deve-se verificar se há alguma fonte de ruído (por exemplo, um equipamento que possa estar emitindo ultrassons) que esteja perturbando os animais, mas que não seja perceptível pelo tratador. Notar também que ruídos contínuos são menos estressantes do que um ruído repentino. Alguns autores recomendam o uso de música para minimizar o estresse por ruído. É recomendado ruído com até cerca de 45 Db (decibéis).

4.6. Caixas e gaiolas

Existem vários modelos de dimensões variadas e de gaiolas e caixas (Tab. 1) que são utilizadas para a manutenção de animais em biotérios, sendo mais indicadas as de policarbonato ou polipropileno, por serem

autoclaváveis (Fig. 3). As gaiolas devem ser periodicamente higienizadas e autoclavadas.



Figura 3. Gaiola para camundongos

Fonte: www.insightltda.com.br

Tabela 1. Número de animais por caixa, para as principais espécies de laboratório.

espécie	peso (gr)	dimensões (cm)			nº de animais
		largura	profundidade	altura	
cobaias	250-300	20-35	30-50	20-20	1-4
coelhos	4000	45	60	40	1
ratos e hamsters	150-200	20-35	30-50	20-20	3-10
camundongos	20	20-30	30-45	12-12	10-20

Fonte: LUCA et al, 1996.

4.7. Cama das gaiolas

Os materiais que podem ser utilizados são: vermiculita e a palha de arroz, contudo, o mais adequado é a maravalha (serragem grossa) de *Pinus*. A serragem esterilizada por autoclavagem é a mais indicada, e deve ser trocada regularmente. Seu descarte deve ocorrer em sacos plásticos fechados, com o status de lixo contaminado, recolhido por serviço especial de coleta.

a) Filete de maravalha de 2 cm (ratos)

b) Filete de maravalha de 3 cm (camundongos)



Figura 4. Gaiolas com dois tipos de cama diferentes.

Fonte: Marcel Frajblat, 2003

4.8. Alimentação e água

A dieta deve atender os requisitos nutricionais de cada espécie, tanto quantitativa quanto qualitativamente. Geralmente as rações comerciais de animais de laboratório são apresentadas em “pellets”, pois a maioria dos animais necessita estar roendo diariamente para desgastar os dentes. Ratos e camundongos se alimentam da mesma ração. Dietas são normalmente superestimadas (Proteína: 140-227 g/kg).

Ter cuidado na estocagem da ração para não haver contaminação por fungos, bactéria, insetos etc. Ela deve estar armazenada em local limpo, seco e ventilado.

A água é oferecida em bebedouros ou através de sistema automático usando válvulas. Os bebedouros devem ser lavados e autoclavados. A água é filtrada e tratada, podendo ser esterilizada com a adição de 01 mL/litro de ácido clorídrico.

4.9. Manejo e comportamento

É necessário submeter os animais à climatização padronizada para que eles se habituem ao ambiente que serão criados e mantenham sua ho-

meostase. Os técnicos que trabalham em biotério devem estar treinados para que se habituem a observar os animais e anotarem qualquer alteração comportamental. Os animais de laboratório conhecem o seu tratador pelo odor e se estressam menos quando manipulados por tratadores com quem já tenham tido contato anterior. Não é recomendado trocar o pesquisador/ técnico durante o experimento, pois isto pode alterar o metabolismo devido ao estresse dos animais. Também é comprovado que pessoas estranhas na sala de experimentação podem resultar em um aumento de temperatura corpórea do animal por estresse. Esse cuidado é de especial importância quando um experimento está sendo realizado.

4.10. Higiene e limpeza

A eficiência de qualquer procedimento de limpeza depende do zelo do executor. A higiene pessoal constitui uma importante barreira contra infecções. O hábito de lavar as mãos antes e após manipular qualquer animal, reduz o risco de disseminar doenças, bem como o de auto-infecção.

É obrigatório o uso de luvas para qualquer procedimento nos biotérios (criação e experimentação). Ao manipular agentes patogênicos, em biotérios experimentais, utilizar luva dupla. Uniforme completo (Jaleco de mangas compridas e longo, calça exclusiva para uso no biotério, máscara, gorro, pantufas, etc). Aventais, jalecos ou uniformes são vestimentas de proteção usada nas áreas de animais, devendo ser retiradas antes de sair do ambiente.

As roupas de laboratório usadas em áreas de risco devem ser autoclavadas antes de serem lavadas. O material descartado (proveniente de necrópsia, carcaças de animais infectados, etc) deve ser identificado e autoclavado. Se possível incinerado.

Equipamentos e superfícies de trabalho devem ser descontaminadas com desinfetante apropriado, em uma rotina básica, após o término do trabalho com materiais infecciosos e especialmente após derrame, gotejamento ou outra forma de contaminação com material infeccioso.

É importante conhecer as características das substâncias

empregadas na higienização para que seja eficaz e segura. Ler com atenção o modo de utilização de cada desinfetante. Utilizar a dose recomendada pelo fabricante.

5. Normas de biossegurança

Todos os bioteristas ou estudantes/pesquisadores que trabalham com animais infectados ou não devem ter treinamentos específicos e serem informados sobre todos os riscos a que estão sujeitos, bem como as maneiras de se proteger e evitá-los.

Fumar, comer ou beber não é permitido dentro dos biotérios ou em qualquer outra área em que existam microorganismos patogênicos.

Gabinetes de fluxo laminar, contenções físicas e/ou equipamentos de proteção individual (respiradouros, máscaras faciais) devem ser usados sempre que procedimentos com alto potencial de formação de aerossóis são realizados.

Qualquer ferimento na pele do técnico, ou estudante, ou pessoal de apoio, deve ser devidamente protegido antes de se iniciar a manipulação de animais e agentes patogênicos.

Se agentes altamente infecciosos ou nocivos são usados, o animal deve ser isolado em unidade de fluxo laminar ou mesmo em isoladores, nos quais o ar que entra e sai é convenientemente filtrado, através de filtros absolutos.

Necrópsias de animais infectados com organismos altamente contagiosos devem ser feitas em gabinetes ventilados, que permitam a filtração do ar.

Avaliação sorológica periódica do pessoal, considerando o agente de risco.

O acesso para estudantes, pesquisadores, visitantes deverá ser limitado ao horário em que os bioteristas estiverem presentes.

Os biotérios devem ter um programa de segurança que inclui equi-

pamentos de combate a incêndio, instruções para o uso correto de equipamentos e treinamento de primeiros socorros.

Tabela 2. Níveis de Biossegurança recomendados no uso de animais infectados.

Nível de biossegurança	Práticas e técnicas	Equipamentos de segurança	Instalações
1. Baixo risco individual e comunitário.	Manejo padrão para colônias convencionais		Básicas
2. Moderado risco individual e comunitário podendo causar patologias ao homem ou ao animal.	Uso obrigatório de jaleco e luvas, descontaminação dos dejetos infectados e das gaiolas dos animais antes da higienização, acesso limitado e sinalização para alerta de riscos.	Barreira parcial (guichê de desinfecção), uso de EPIs (máscara, óculos protetor, etc) para a manipulação de agentes ou animais infectados que produzem aerossóis.	Básicas
3. Risco individual elevado, risco comunitário baixo	Práticas do nível 2, mais: uniforme especial e acesso controlado	Os do nível 2, porém, devem ser usados para todos os tipos de manipulações com animais infectados.	Alta segurança
4. Elevado risco individual e comunitário	Prática do nível 3, mais: troca de roupa de rua por uniforme especial em vestiário, ducha na saída, descontaminação de todos os dejetos antes de sua retirada do infectório.	Barreiras máximas, isto é, classe III de segurança biológica ou barreira parcial em combinação com: Proteção total do corpo com uma peça única dotada de ventilação e pressão positiva, gaiolas dotadas de filtros, estantes com fluxo laminar, etc	Segurança máxima

É imprescindível a notificação IMEDIATA de possíveis acidentes que venham ocorrer nos biotérios.

6. Eutanásia

Define-se como eutanásia a morte serena, sem dor ou sofrimento. Após a realização dos experimentos os animais envolvidos devem ser submetidos á eutanásia, no entanto, eles não optaram por morrer e não tem consciência que vão morrer. A eutanásia é um procedimento emocional e ético que deve ser executado por um médico veterinário segundo resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária nº 714, de 20 de junho de 2002. Os pontos mais importantes da resolução estão descritos abaixo:

CAPÍTULO I DAS NORMAS GERAIS

Art. 2º A eutanásia deve ser indicada quando o bem-estar do animal estiver ameaçado, sendo um meio de eliminar a dor, o estresse ou o sofrimento dos animais, os quais não podem ser aliviados por meio de analgésicos, de sedativos ou de outros tratamentos, ou, ainda, quando o animal constituir ameaça à saúde pública ou animal, ou for objeto de ensino ou pesquisa.

Parágrafo único. É obrigatória a participação do Médico Veterinário como responsável pela eutanásia em todas as pesquisas que envolvam animais.

CAPÍTULO II DOS PROCEDIMENTOS

Art. 8º A escolha do método dependerá da espécie animal envolvida, dos meios disponíveis para a contenção dos animais, da habilidade técnica do executor, do número de animais e, no caso de experimentação animal, do protocolo de estudo, devendo ainda o método ser:

I - compatível com os fins desejados;

II - seguro para quem o executa, causando o mínimo de estresse no operador, no observador e no animal;

III - realizado com o maior grau de confiabilidade possível, comprovando-se sempre a morte do animal, com a declaração do óbito pelo Médico Veterinário.

Art. 10. Os procedimentos de eutanásia são de exclusiva responsabilidade do médico veterinário.

Art. 11. Nas situações em que o objeto da eutanásia for o ovo embrionado, a morte do embrião deverá ser comprovada antes da manipulação ou eliminação do mesmo.

CAPÍTULO III DOS MÉTODOS RECOMENDADOS

Art. 12. Os agentes e métodos de eutanásia, recomendados e aceitos sob

restrição encontram-se listados, por espécie, no anexo I.

§ 1º Métodos recomendados são aqueles que produzem consistentemente uma morte humanitária, quando usados como métodos únicos de eutanásia.

§ 2º Métodos aceitos sob restrição são aqueles que, por sua natureza técnica ou por possuírem um maior potencial de erro por parte do executor ou por apresentarem problemas de segurança, podem não produzir consistentemente uma morte humanitária, ou ainda por se constituírem em métodos não bem documentados na literatura científica. Tais métodos devem ser empregados somente diante da total impossibilidade do uso dos métodos recomendados constantes do anexo I desta Resolução.

Art. 13. Outros métodos de eutanásia não contemplados no ANEXO I poderão ser permitidos, desde que realizados sob autorização do CRMV ou CFMV.

Art. 14. São considerados métodos **inaceitáveis**:

I - Embolia Gasosa;

II - Traumatismo Craniano;

III - Incineração in vivo;

IV - Hidrato de Cloral (para pequenos animais);

V - Clorofórmio;

VI - Gás Cianídrico e Cianuretos;

VII - Descompressão;

VIII - Afogamento;

IX - Exsanguinação (sem sedação prévia);

X - Imersão em Formol;

XI - Bloqueadores Neuromusculares (uso isolado de nicotina, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e todos os curarizantes);

XII - Estricnina.

Parágrafo único. A utilização dos métodos deste artigo constitui-se em infração ética.

Art. 15. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

Anexo I:

Espécie	Recomendados	Aceitos sob Restrição
Anfíbios	Barbitúricos, anestésicos inaláveis (em algumas espécies), Dióxido de Carbono (CO ₂), Monóxido de Carbono (CO), metano sulfonato de triclaína (TMS, MS222), hidrodoreto de benzocaína, dupla secção da medula espinhal.	Pistola de ar comprimido, pistola, atordoamento e decapitação, decapitação e secção da medula espinhal.
Animais selvagens de vida livre	Barbitúricos intra-venoso (IV) ou intra-peritoniais (IP), anestésicos inaláveis, cloreto de potássio com anestesia geral prévia.	CO ₂ , CO, Nitrogênio (N ₂), argônio, pistola de ar comprimido, pistola, armadilhas (testadas cientificamente)
Animais de zoológicos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ₂ , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia.	N ₂ , argônio, pistola de ar comprimido, pistola.
Aves	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ₂ , CO, pistola.	N ₂ , argônio, deslocamento cervical, decapitação.
Cães	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ₂ , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia.	N ₂ , argônio, pistola de ar comprimido, eletrocussão com sedação prévia.

Cavalos	Barbitúricos, cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido.	Hidrato cloral, (IV, após sedação), pistola, eletrocussão com sedação prévia.
Coelhos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ₂ , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia.	N ₂ , argônio, deslocamento cervical (<1kg), decapitação, pistola de ar comprimido.
Gatos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ₂ , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia.	N ₂ , argônio.
Mamíferos marinhos	Barbitúricos, hidrodoreto de etorfina.	Pistola (cetáceos <4m de comprimento)
Peixes	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ₂ , tricafina metano sulfonato (TMS, MS222), hidrocloreto de benzocaína, 2-fenoxietanol.	Decapitação e secção da medula espinhal, atordoamento e decapitação ou secção da medula espinhal.
Primatas não-humanos	Barbitúricos	Anestésicos inaláveis, CO ₂ , CO, N ₂ , argônio.
Répteis	Barbitúricos, anestésicos inaláveis (em algumas espécies), CO ₂ (em algumas espécies).	Pistola de ar comprimido, pistola, decapitação e secção da medula espinhal, atordoamento e decapitação

Roedores e outros pequenos mamíferos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ₂ , cloreto de potássio com anestesia geral prévia.	Metoxiflurano, N ₂ , argônio, deslocamento cervical (ratos <200g), decapitação.
Ruminantes	Barbitúricos, CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido.	Hidrato cloral (IV, após sedação), pistola, eletrocussão, com sedação prévia.
Suínos	Barbitúricos, CO ₂ , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido.	Anestésicos inaláveis, CO, hidrato cloral, (IV após sedação), pistola, eletrocussão com sedação prévia, pancada na cabeça (< 3 semanas de idade).
Visões, raposas, e outros mamíferos criados para extração do pêlo.	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ₂ (visões requerem altas concentrações para eutanásia sem agentes suplementares), CO, cloreto de potássio, com anestesia geral prévia.	N ₂ , argônio, eletrocussão, com sedação prévia seguida de deslocamento cervical.

Bibliografia:

Animais de Laboratório – Criação e Experimentação- Antenor Andrade et al, 2002 – Ed Fiocruz

Biossegurança em Experimentação animal – Um enfoque microbiológico – Jonas Borges da Silva. 1998.

CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz - <http://www.fiocruz.br/cecal/Bioterismo.htm>

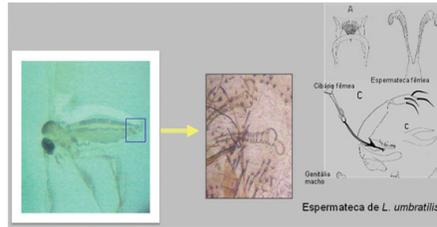
CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo - <http://www.unifesp.br/mapageral.htm>

Manual para experimentação animal – Tânia Araújo Jorge e Solange Lisboa de Castro – 2000 – Ed.Fiocruz.

Procedimento Operacional N° 340000.014 /CECAL/FIOCRUZ – Biossegurança em Biotério.

Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Brasília, DF. Ed. CFMV, 2003.

[WWW.http://bioclima.info/pbioterio.php](http://bioclima.info/pbioterio.php) acesso realizado em 12/06/2010.



Armadilha luminosa do tipo CDC

Paralelamente serão realizadas capturas manuais (capturador de Castro ou aspiradores elétricos de 6 Volts) onde serão realizadas buscas ativas dos vetores nas paredes externa e interna dos domicílios com o auxílio de uma lanterna, essas coletas serão realizadas também mensalmente em cada área de risco, com início às 18h e encerradas às 22h, totalizando 4 h / homem/ parede externa ou interna.

Identificação dos vetores coletados

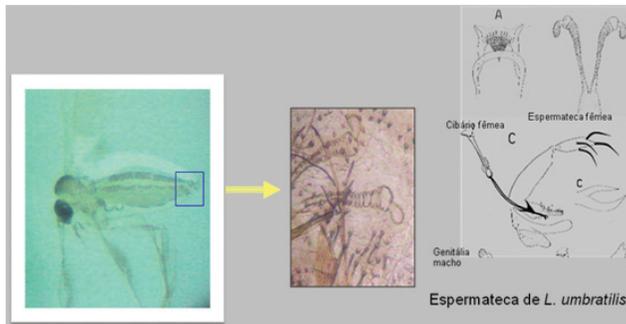
A identificação do material será realizada da seguinte forma:

- Pelos municípios ou regiões que possuem núcleo de entomologia, equipado e com funcionários devidamente treinados pelos núcleos de referência.
- As amostras coletadas serão enviadas para os laboratórios referências, durante o primeiro ano de trabalho em cada município.
- A partir do segundo ano, credenciar cada município para identificar 50 % das amostras coletadas.
- Pelos núcleos de referência, quando o município ou região não possuir equipe capacitada para identificação.

Metodologia

Os flebotomos coletados podem ser sacrificados através de diversos meios: álcool 70 % , gelo seco, clorofórmio ou cianureto (morteiros) ou aquecendo em luz solar direta . Os exemplares sacrificados com morteiros e luz solar deverão ser armazenados entre capas de papel de seda em pequenos recipientes com tampa.

Diversos métodos de montagens de flebotomos estão disponíveis em diversas referências relacionadas ao assunto (Forattini, 1974; Ryan e cols. , 1986; Young e col. 1994) . Descrevemos aqui o método de montagem em Berlese.



Método de Berlese (Hoyer modificado):

- 1-3 h em Potassa 10 % (KOH)
- 2- 20 minutos em ácido acético 10 %
- 3 -3 séries de 20 minutos em água destilada
- 4 - 24 h em Lactofenol
- 5 - Montagem em Berlese (Lâmina e lamínula)

Formulações: Lactofenol - Fenol cristalizado(100 mg), ácido láctico (100 ml), Glicerina (100 ml) e água destilada (100 ml).

Berlese - Goma arábica (08g) , hidrato de cloral (74g) , xarope de glicose (5 ml) e água destilada (10 ml), ácido acético (3ml) . Todos estes ingredientes são misturados e aquecidos sem deixar a solução ferver . Manter o Berlese em frasco âmbar.

Metodologia de Dissecação:



Introduzir o tubo contendo fêmeas de flebotomos vivas no congelador, por um período de 10 minutos, para imobilização dos exemplares. A seguir, colocar um exemplar sobre uma lâmina de microscopia, ao lado de uma gota de salina estéril, e o conjunto visualizado em lupa estereoscópica. Com o auxílio de um estilete de ponta recurvada (ângulo de 90°), fixar a cabeça do inseto contra a lâmina e com outro estilete pressionar levemente o penúltimo segmento do abdômen, retesando em direção ao centro da gota de salina, de modo a extrair o estômago anterior e posterior, intestino e túbulos de Malpighi. O conjunto é arrumado sobre a lâmina, de modo que, do pró-ventrículo à ampola retal sejam claramente visíveis. Por último, cobrir o conjunto com lamínula e examinar sob microscopia comum (aumento de 400 vezes).

Também pode ser realizado da seguinte forma:

Para examinar *Lutzomyia* suspeitos de estar com *Leishmania*, pode-

mos ter mais dois procedimentos:

a. dissecação: o inseto vivo deve ser imobilizado em salina ou no frio (colocando-o por alguns minutos no congelador) logo antes do exame; colocá-lo em uma lâmina com salina, sob uma lupa e, com o auxílio de estilete, decapitar o inseto, puxando pelo “pescoço” as glândulas salivares e o conteúdo intestinal; ao microscópio (40x) pode - se ver as promastigotas movimentando-se; com o material pode-se fazer um esfregaço, fixar pelo álcool metílico e corar pelo Giemsa;

b. trituração: imobilizar os insetos como citado antes e colocar alguns (três a cinco) no buraquinho de placa de ELISA contendo um pouco de salina; com um bastão de vidro, triturar o material, que poderá ser examinado em microscópio a fresco, fixado e corado pelo Giemsa ou inoculado em focinho ou cavidade peritoneal de hamster.

PRÁTICA DE DISSECÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS

1. FINALIDADE

Preparo de Lâminas de abdômem e intestino de fêmea de flebotomíneos para identificação da espécie de inseto e procura de promastigotas de *Leishmania*.

2. AMOSTRA

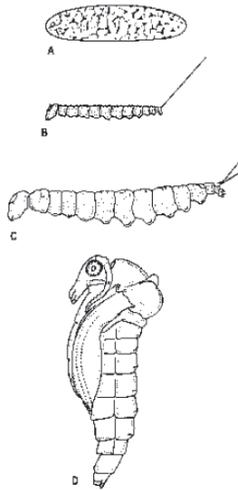
As amostras usadas serão coletadas em base de árvore com armadilha de luz do tipo CDC modificada para aspiração.

3. MATERIAIS NECESSÁRIOS

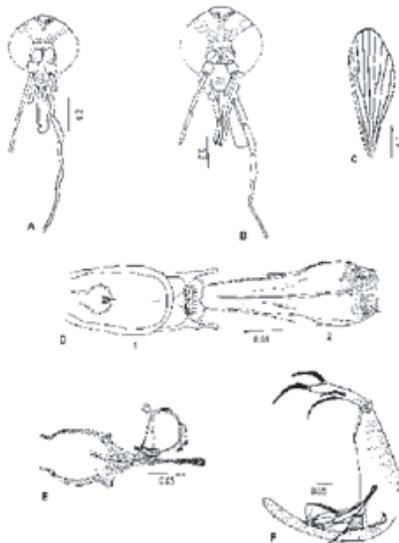
- Lâmina de vidro.
- Lamínulas.
- Salina
- Estiletos.
- Recipiente pequeno com água e detergente
- Estereoscópio

4. PROCEDIMENTO TÉCNICO

1. Coloca-se os insetos coletados dentro do recipiente com detergente para a retirada do excesso de cerdas;
2. Transfere-se o inseto individualmente para o centro da lâmina contendo uma gota de salina;
3. Observa-se o material em estereoscópio e com o estilete retira-se o final do abdômen da fêmea ou do macho e transfere-se para outra lâmina colocando-se uma gota de xilol para clarificar o material para a observação do aparelho genital;
4. Do restante do abdômen com muito cuidado retira-se o intestino utilizando-se o estilete e transfere-se o material para outra lâmina contendo uma gota de salina;
5. Coloca-se uma lamínula sobre o material e observa-se em microscópio de luz em aumento de 100X e 400X para a pesquisa de flagelados.



Ciclo biológico de um flebotomo. A) ovo; b) larva de primeiro instar; c) larva de quarto instar; d) pupa.



Aspectos morfológicos de *Lutzomyia longipalpis*: a) cabeça do macho; b) cabeça da fêmea; c) asa; d) armadura cibarial e faringe da fêmea; e) espermateca da fêmea; f) genitália do macho

Doença Clínica	Espécies de <i>Leishmania</i>	Posição Geográfica	
Leishmaniose cutânea	Complexo <i>L. tropica</i>	Velho Mundo	
	<i>L. tropica</i>		
	<i>L. aethiopica</i>		
	<i>L. major</i>		
	Complexo <i>L. mexicana</i>	Novo Mundo	
	<i>L. mexicana</i>		
	<i>L. pífanoi</i>		
	<i>L. amazonensis</i>		
	Leishmaniose	<i>L. garnhami</i>	Velho Mundo
		<i>L. venezuelensis</i>	
		Complexo <i>L. braziliensis*</i>	
		<i>L. peruviana</i>	
		<i>L. guyanensis</i>	
		<i>L. panamensis</i>	
<i>L. lainsoni</i>		Novo Mundo	
<i>L. colombiensis</i>			
<i>L. infantum</i>		Novo Mundo	
<i>L. chagasi</i>		Novo Mundo	
Leishmaniose	Complexo <i>L. braziliensis*</i>	Novo Mundo	
	<i>L. braziliensis</i>		
	<i>L. guyanensis</i>	Novo Mundo	
	<i>L. panamensis</i>		
	<i>L. mexicana</i>		
<i>L. tropica</i> <i>L. major</i>	Velho Mundo		
Leishmaniose visceral	Complexo <i>L. donovani</i>	Velho Mundo	
	<i>L. donovani</i>		
	<i>L. infantum</i>	Velho Mundo	
	<i>L. chagasi</i>	Novo Mundo	
	<i>L. tropica</i>	Velho Mundo	
<i>L. amazonensis</i>	Novo Mundo		

*Os membros do complexo *L. braziliensis* são considerados como um subgênero, *Viannia*, separado de todas as outras *Leishmania*, que pertencem ao subgênero *Leishmania*. Os organismos do complexo *L. braziliensis* desenvolvem-se no intestino posterior do flebotômico (peripilária). Os do sub-gênero *Leishmania* desenvolvem-se na região anterior do flebotômico (suprapilária).

COLETA DE MATERIAL PARA DEMONSTRAÇÃO DIRETA DO PARASITO:

Visando obter uma amostra viável para um diagnóstico confiável, alguns cuidados são necessários: o primeiro deles é o preparo do local de onde será coletado o material (úlceras recentes são mais ricas em parasitos).

Deve ser feita uma limpeza vigorosa do local da lesão com água e sabão, retirando-se resíduos de medicamentos ou outras substâncias, seguida de antissepsia com álcool a 70%. Quando necessário, pode-se fazer um pequeno botão anestésico com lidocaína 1 ou 2%.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

- O esfregaço é realizado por escarificação da borda interna da úlcera ou da superfície de lesão fechada, utilizando-se lâminas de bisturi estéreis ou estilete.
- A punção aspirativa pode ser realizada após injeção de 3mL de solução salina estéril na borda da lesão ou linfonodo, utilizando-se uma seringa de 5mL e agulha 25x8.
- Após a excisão cirúrgica, a técnica de aposição em lâmina (também denominada *imprint* ou *touch preparation*) pode ser realizada por meio da delicada compressão de fragmento de tecido, obtido por biópsia, sobre uma lâmina de vidro. Uma boa execução da técnica requer que o fragmento seja previamente banhado em solução salina estéril e o excesso de sangue e líquidos absorvidos em gaze ou papel de filtro.
- O material obtido por qualquer das técnicas deve ser distendido em lâminas de microscopia previamente limpas, desengorduradas e secas. Se possível, empregar lâminas de borda fosca para melhor identificação do material.

- Após a confecção do esfregaço, as lâminas serão coradas com derivados do Romanowsky: Giemsa, Leishman ou corantes rápidos (este último ainda visto com algumas restrições por alguns cientistas) e
- Escarificação da borda de lesão cutânea, localizada no membro superior, com lâmina de bisturi e confecção do esfregaço em lâmina de vidro.

PRÁTICA DE COLORAÇÃO DE LÂMINA PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE

PANÓTICO RÁPIDO LB

1. FINALIDADE

Coloração de material de lesão para a visualização de amastigotas

2. INTRODUÇÃO

O Panótico Rápido LB baseia-se no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky, atuando em 15 segundos.

3. AMOSTRA

A amostra usada consiste em lâminas com extensões de material retirado da borda das lesões.

O material é submetida a ação de um fixador e duas soluções corantes, por meio de imersões de 5 segundos em cada, e ao final da última

imersão encontra-se pronta para leitura.

4. REAGENTES

- Panótico rápido n° 1: compõe-se por uma solução de triarilmetano a 0,1%.

- Panótico rápido n° 2: compõe-se por uma solução de xantenos a 0,1%

- Panótico rápido n° 3: compõe-se por uma solução de tiazinas a 0,1%

5. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a) Preparar as extensões sangüíneas e deixar secar em temperatura ambiente;
- b) Preencher 3 recipientes com as soluções número 1, 2 e 3 respectivamente;
- c) Submergir as lâminas na solução número 1 mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer bem;
- d) Submergir as lâminas na solução número 2 mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer;
- e) Submergir as lâminas na solução número 3 mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer bem;
- f) Lavar com água deionizada recente (de preferência tamponada a pH 7,0), secar ao ar na posição vertical e com o final da extensão voltado para cima.

COLORAÇÃO GIEMSA

1. FINALIDADE

Coloração de material de lesão para a visualização de amastigotas

2. PRINCÍPIO

Os corantes para esfregaços sanguíneos, também chamados de pancrômicos, são uma mistura de corantes de características neutras, dependentes do pH da solução corante, que em condições apropriadas coram os componentes nucleares e citoplasmáticos dos leucócitos, com predominância de tons vermelhos (quando ácidos) e azulados diversos (quando básicos).

3. AMOSTRA

A amostra usada consiste em lâminas com extensões de material retirado da borda das lesões.

4. REAGENTES

Corante Giemsa, em pó	8g
Glicerol	500mL
Metanol (tamponado pH 6,8) q.s.p.	1000mL

5. MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Suporte para coloração.
- Cronômetro.
- Lâminas.
- Água tamponada.
- Metanol.

5. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a) Fixar o esfregaço, cobrindo-o com 15 a 20 gotas de metanol por 5 minutos.
- b) Escorrer o álcool metílico e, sem lavar ou deixar secar.
- c) Cobrir a lâmina com solução de uso de Giemsa diluído (2 gotas de solução mãe para 1mL de água tamponada).
- d) Proceder à coloração por 10 minutos.
- e) Lavar a lâmina em água corrente e deixá-la secar em posição vertical.

ISOLAMENTO DE PARASITAS EM MEIO DE CULTURA NNN AGAR SANGUE

1. FINALIDADE

Isolar parasitas de insetos em meio específico para estudo e diagnóstico

2. AMOSTRA

A amostra usada será retirada de fêmeas de flebotomíneos infectados

3. MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Meio de cultura NNN Agar sangue
- Estilete estéril

4. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a) Após a leitura da lâmina positiva o intestino é retirado com um estilete e transferido para tubo de ensaio com meio NNN.
- b) O tubo é então fechado e colocado em estufa de BOD a temperatura de 24 °C.

SUGESTÃO DE REFERÊNCIAS

Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. pp. 749–54. ISBN 0838585299.

Myler P; Fasel N (editors). (2008). *Leishmania: After The Genome*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-28-8.

Momen H, Cupolillo E (2000). “Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 (4): 583–8. doi:10.1590/S0074-02762000000400023. PMID 10904419.

Noyes HA, Morrison DA, Chance ML, Ellis JT (2000). «Evidence for a neotropical origin of *Leishmania*». *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 (4): 575–8. doi:10.1590/S0074-02762000000400021. PMID 10904417.

Kerr SF (2000). “Palaeartic origin of *Leishmania*”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 (1): 75–80. doi:10.1590/S0074-02762000000100011. PMID 10656708.

Leishmania mexicana / *Leishmania major*

Laskay T. *et al.* (2003). “Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?”. *Trends in Microbiology* 11 (5): 210–4. doi:10.1016/S0966-842X(03)00075-1. PMID 12781523.

www.pdhealth.mil/downloads/Leish_brfng.ppt

<http://en.wikipedia.org/wiki/Leishmania> acesso em 9/07/2010

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Leishmaniose>

Akopyants, N. *et al.* *Science* 324, 265–268 (2009).

Panton, L. J., Tesh, R. B., Nadeau, K. C. & Beverley, S. M. *J. Protozool.* 38, 224–228 (1991)

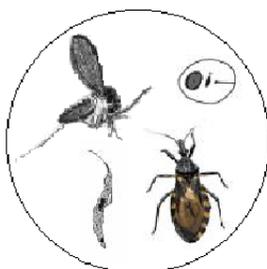
Miles, M. A., Yeo, M. & Mauricio, I. L. *Science* 324, 187–189 (2009)

Akopyants NA *et al.* Demonstração de troca de material genético durante o desenvolvimento cíclico de *Leishmania* em flebotomíneos . *Ci*

Apoio Financeiro:



Universal proc. No. 2108354408954041



Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/INPA

Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas (SUSAM)

Fundação Nacional de Saúde

Escola Agrotécnica de São Gabriel da Cachoeira

Exército Brasileiro



"De manhã, o batalhão do Exército bate continência pra selva, treinando seus homens para proteger as fronteiras com a Colômbia e a Venezuela. Na cidade, índios tucanos, barés e banivas acordam nas suas casas cobertas de folhas de palmeira e vão ao trabalho: são peões. Alguns esqueceram até o nome de suas tribos. Outros guardam velhos hábitos. De côcoras, nas ruas de terra, as índias ainda ralam mandioca para fazer o tucupí. E a estranha língua que se ouve é o dialeto hengatu, dos abaúnas, que passeiam sempre pela cidade.

O que nós temos a dizer...

Ah! Somente um muito obrigado à todos vocês ... sabem porque Por sermos brasileiros ! E termos o orgulho de dizer que respeitamos vocês!