

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Monitoramento molecular bacteriológico de ratos Wistar

Helier Balbinotti da Silveira

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Monitoramento molecular bacteriológico de ratos Wistar

Helier Balbinotti da Silveira

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Comissão de Graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa da Costa

Colaboradora: Dr^a. Fernanda Bastos de Mello

Porto Alegre, 2014

RESUMO

Os fatores microbiológicos são importantes para o desenvolvimento do bem estar dos animais de laboratório. Muitos patógenos interferem nos resultados de estudos e muitas zoonoses não apresentam sinais clínicos, representando um risco para a saúde dos animais e das pessoas que os cuidam. Logo, é necessário programas de monitoramento sanitário, capazes de possibilitar a detecção de patógenos nos animais mantidos em biotérios. Uma das metas do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) é a realização de monitoramento sanitário microbiológico dos animais criados neste Centro. Assim, este projeto visa à padronização das metodologias e técnicas para a investigação de bactérias patogênicas específicas e da microbiota bacteriana cultivável em aerobiose de origem respiratória e fecal presente em ratos Wistar criados no CREAL em sistemas de alojamento do tipo IVC e convencionais. Foram coletadas amostras de lavado traqueal, de fezes e de suabe da traqueia e do ceco de 20 animais. As amostras de suabe foram semeadas em sete tipos de meio de cultura e as colônias isoladas. A extração de DNA das colônias foi testada por meio de fervura a 100°C em água ou em solução de Tris-EDTA (TE), de fervura em água com posterior incubação com proteinase K (PK) e de incubação apenas com PK. Após, o DNA obtido foi utilizado em reações de PCR utilizando marcador molecular 16S RNAr para o Domínio Bacteria. A extração do DNA de amostras de lavado traqueal e de fezes foi testada utilizando o método com fenol-clorofórmio e kits comerciais. Para a padronização das reações de PCR para detecção patogênica foram utilizados marcadores moleculares para o gene 16S RNAr e para os genes específicos de um grupo de patógenos. A reação de PCR das colônias foi padronizada com a utilização de DNA extraído pelo método de fervura em solução de TE ou, como alternativa, pelo método de lise com PK. Foram isoladas 493 colônias de bactérias, sendo que foi possível a amplificação do DNA em 412 amostras. A extração do DNA de amostras de lavado traqueal apresentou melhores resultados com a utilização do kit da marca Stratec, já para amostras de fezes com o método fenol-clorofórmio. As reações de PCR para detecção dos patógenos específicos apresentaram produtos inespecíficos, apesar da amplificação de produtos esperados. Os produtos gênicos obtidos devem ser sequenciados para a confirmação da detecção e validação das técnicas.

Palavras-chave: animais de laboratório; monitoramento sanitário; PCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Animais de laboratório e perfil sanitário	6
1.2 Monitoramento sanitário de animais de laboratório	8
1.3 CREAL	10
1.4 Justificativa	12
1.5 Objetivos	13
1.5.1 Objetivo geral	13
1.5.2 Objetivos específicos	13
2. METODOLOGIA	14
2.1 Locais de trabalho	14
2.2 Critérios e cálculo de amostragem	14
2.3 Necropsia e coleta de amostras biológicas	15
2.4 Preparo de meios de cultura e isolamentos microbiológicos	16
2.5 Extração de DNA das colônias de bactérias isoladas	17
2.6 PCR do gene 16S RNAr	18
2.7 Extração de DNA de lavado traqueal	18
2.8 Extração de DNA de fezes	19
2.9 PCR de amostras de DNA de lavado traqueal e fezes	20
Tabela 1	20
2.10 Manuseio de reagentes e descarte de resíduos químicos e biológicos	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1 Padronização da extração de DNA de colônia e da PCR	22
Figura 1	22
Figura 2	24
3.2 Isolamento bacteriológico e PCR	26
Tabela 2	26
Figura 3	27
3.3 Padronização da extração de DNA de lavado traqueal e da PCR	28
Figura 4	29
Figura 5	30
Figura 6	31
Figura 7	33

Figura 8	35
3.4 Padronização da extração de DNA de fezes e da PCR	36
Figura 9	37
3.5 PCR para detecção de patógenos em amostras de lavado traqueal	38
Figura 10	39
Figura 11	40
Figura 12	40
Figura 13	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
5. PERSPECTIVAS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Animais de laboratório e perfil sanitário

É indiscutível a importância que o uso de modelos animais em pesquisas tem contribuído para o desenvolvimento da ciência. Entretanto, até chegarmos ao quadro atual, mais adequado e ideal, a ciência de animais de laboratório passou por um processo de desenvolvimento com adaptações e padronizações das condições de alojamento dos animais. De início, os modelos animais eram criados sem o controle de vários parâmetros como: alimentação, sanidade, características genéticas e ambientais. Assim, havia inúmeras variáveis que tornavam os resultados das pesquisas questionáveis do ponto de vista científico (Lapchik *et al.*, 2010).

Para resolver a questão destas variáveis, procurou-se modificar o cuidado e o manejo dos animais de laboratório, desenvolvendo-se sistemas padrões de controle mais rígidos quanto às condições sanitárias, genéticas e ambientais. A partir desse momento, muitas pesquisas foram iniciadas utilizando animais com perfil sanitário controlado e conhecido, surgindo a denominação do termo SPF (*Specific Pathogen Free*) para aqueles animais, cuja microbiota é livre de determinados patógenos (Lapchik *et al.*, 2010).

A espécie de roedor *Rattus norvegicus* é um modelo muito utilizado em experimentação, sendo que foi a primeira espécie de mamífero domesticada com o intuito principal de ser utilizado em investigações científicas (Lindsey, 1979; Lapchik *et al.*, 2010). Desde o começo da domesticação desta espécie, havia um interesse, por parte do pesquisador e de quem criava os animais, em monitorar a saúde dos mesmos, de modo que doenças eram listadas e descritas e conforme o estabelecimento de programas sanitários a presença ou ausência de patógenos nos animais se alteraram (Weisbroth, 1996).

Historicamente, ao longo dos anos foi possível verificar uma evolução no padrão de patógenos encontrados em roedores, que podemos conhecer melhor a partir da divisão em períodos proposta por Weisbroth (1996). Para o autor, o primeiro período é o “Estágio de Domesticação” (1880-1950), em que os animais ao serem retirados do seu ambiente natural transportaram praticamente todo o espectro de patógenos associados

aos animais selvagens. Entretanto, a mudança para um ambiente mais controlado e estável (com controle sanitário, ambiental, nutricional e reprodutivo) influenciou na diminuição da frequência ou mesmo na eliminação de infecções causadas por diversos microrganismos, tais como *Streptobacillus moniliformis* e salmonelas.

O segundo período foi nomeado de “Derivação Gnotobiótica” (1960-1985), referência ao desenvolvimento dos princípios da gnotobiologia, que envolve a eliminação de germes contidos nos animais, conseqüentemente das doenças causadas pelos mesmos, por meio da técnica de derivação cesariana. Essa técnica consiste em uma técnica de histerectomia, onde o útero com os neonatos é removido de uma fêmea prenhe doadora e, após, os neonatos são retirados do útero e ofertados para uma fêmea receptora, responsável por nutri-los até a idade do desmame. Esse procedimento é realizado em condições assépticas, dentro de microisoladores específicos para evitar contaminações, com o intuito de erradicar patógenos, em colônias de animais, transmitidos de forma vertical (Burke *et al.*, 1970; Andrade *et al.*, 2002). Nesse período, as abordagens veterinárias padrões não eram suficientes para a erradicação de doenças, tais como a micoplasmose respiratória, que tem como agente infeccioso a espécie *Mycoplasma pulmonis*. A eliminação deste patógeno foi o principal motivo que impulsionou o desenvolvimento dos animais gnotobióticos. Conforme mais adeptos começaram a utilizar, a técnica se tornou padrão na ciência em animais de laboratório e passaram a usar o termo SPF para designar o *status* sanitário dos animais.

O terceiro período correspondeu à chamada “Erradicação dos vírus murinos” (1980-1996). Murinos é referente aos animais da Superfamília Muroidea, que tem como representantes os camundongos e os ratos (Francis, 2008). Durante o período anterior, os efeitos dos vírus murinos não eram pesquisados ou mesmo reconhecidos, tornando-se uma preocupação somente ao final dos anos de 1970. Para tal, foram criados testes sorológicos para auxiliar na detecção dos animais contaminados pelos vírus de importância clínica na tentativa de erradicar tais patógenos, de modo que foram adotadas práticas de prevenção, controle e erradicação de infecções virais. As reduções do grupo de vírus murinos presente nos animais foram alcançadas devido aos testes sorológicos utilizados para microrganismos específicos, que resultaram em um melhor manejo e controle sanitário das colônias de criação, com a eliminação ou derivação cesariana dos animais supostamente contaminados, o que contribuiu positivamente no desenvolvimento dos métodos de criação de animais de laboratório (Baker, 1998).

1.2 Monitoramento sanitário de animais de laboratório

O bem estar de animais de laboratório criados e utilizados como modelo animal na experimentação científica em biotérios tem recebido mais atenção e estudos no meio científico. Para melhorar o bem estar dos animais, diferentes áreas científicas são incorporadas para compor a ciência de animais de laboratório. Os fatores microbiológicos são de suma importância para o desenvolvimento do bem estar animal, principalmente aqueles ligados à presença de microrganismos potencialmente patogênicos. É fato que a saúde dos animais em laboratório deve ser considerada, pois muitos patógenos interferem nos resultados de estudos experimentais, além do que muitas zoonoses não apresentam sinais clínicos e representam um risco para a saúde das pessoas que entram em contato com os animais (Feldman, 2001; Nicklas *et al.*, 2002; Frajblat *et al.*, 2008; Pritchett-Corning *et al.*, 2010). Dessa forma é importante e necessário o desenvolvimento de programas de monitoramento sanitário, capazes de possibilitar a detecção efetiva de potenciais patógenos nos animais mantidos em biotérios (Pritchett-Corning *et al.*, 2010).

Para o monitoramento sanitário de patógenos em biotérios são utilizadas diferentes metodologias e técnicas, dependendo de qual propósito e organismo são alvos nas identificações. Os propósitos podem ser desde a detecção de patógenos específicos, de todos os patógenos presentes na microbiota do animal, até o estudo de patógenos cultiváveis ou mesmo daqueles não-cultiváveis. Diferentes técnicas de identificação podem ser escolhidas pelo pesquisador e cada microrganismo poderá ser detectado ou não conforme a técnica utilizada (Nicklas *et al.*, 2002). Um dos métodos tradicionais mais utilizados na rotina de monitoramento sanitário em biotérios são os métodos de microbiologia, parasitologia e imunologia clássicas, que envolve o uso de conhecimentos específicos sobre sorologia, bacteriologia, virologia, micologia e protozoologia (Feldman, 2001).

Na bacteriologia, foco deste projeto, os métodos tradicionais de identificação de patógenos envolvem o isolamento e a cultura de microrganismos vivos. Conforme o tipo de amostra obtida e condições laboratoriais escolhidas pelo pesquisador, diferentes microrganismos podem ser isolados, desde aqueles patogênicos até os microrganismos que não estão correlacionados a nenhuma patogenicidade conhecida. A escolha destes métodos é importante, pois, como exemplo, há microrganismos fastidiosos que exigem

meios de cultura enriquecidos, assim como outros que exigem ambientes anaeróbios para o devido crescimento (Feldman, 2001).

Estudos que utilizam metodologias baseadas na identificação de ácidos nucleicos mostram que a maior parte das bactérias presentes em ecossistemas é diferente daquelas detectadas com metodologias tradicionais, muito devido à incapacidade de crescimento em cultura da maioria dos microrganismos. O que induz ao desenvolvimento de técnicas que não dependem de métodos de cultura para avaliar sistemas microbianos complexos (Zoetendal *et al.*, 2004). Além disso, a identificação de determinados microrganismos pode ser tediosa e difícil pelas técnicas de cultura já conhecidas, bem como devido à falta de meios de cultura e métodos apropriados (Packey *et al.*, 2013).

Outra metodologia importante de detecção de patógenos é a sorologia, em que os anticorpos contra o agente infeccioso são identificados. Os testes sorológicos mais usados em bioterismo são ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), IFA (*Indirect ImmunoFluorescence Antibody*) e HI (*Haemagglutination inhibition*), sendo que as duas primeiras apresentam maior sensibilidade de detecção. A especificidade desses testes é determinada pela escolha dos antígenos e métodos utilizados na preparação dos mesmos. Entretanto, o uso dos métodos sorológicos pode apresentar problemas de falsos positivos ou negativos devido a várias circunstâncias que vão desde o tipo de antígeno escolhido até as condições sanitárias dos animais (Nicklas *et al.*, 2002). Outra limitação da sorologia é que a identificação positiva não necessariamente reflete a presença contínua de um microrganismo, mas sim indica que o animal foi exposto ao agente infeccioso em um dado momento (Feldman, 2001).

Na tentativa de eliminar limitações nas metodologias tradicionalmente usadas na vigilância de patógenos em animais de laboratório, as metodologias baseadas em técnicas de biologia molecular, utilizando a detecção de ácidos nucleicos, são cada vez mais utilizadas. Tais metodologias podem ser usadas nos casos em que há dificuldade em detectar microrganismos de complicado isolamento por cultura ou não detectáveis pelos métodos tradicionais. Também podem ser utilizadas as técnicas baseadas em ácidos nucleicos, quando os métodos tradicionais geram resultados duvidosos ou imprecisos, além da possibilidade de serem usadas para validar resultados de outras metodologias (Feldman, 2001; Nicklas *et al.*, 2002; Pritchett-Corning *et al.*, 2010). Em comparação aos métodos microbiológicos baseados em cultivo e caracterização

bioquímica, a identificação molecular baseada em sequências de DNA apresenta maior rapidez e sensibilidade, assim como um custo relativamente baixo quando utilizada em testes de detecção de linhagens bacterianas específicas (Cai *et al.*, 2014).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida do sequenciamento de genes são técnicas amplamente utilizadas em diagnósticos de infecção para detecção de microrganismos patogênicos em animais (Cai *et al.*, 2014). Em análises clínicas, a região gênica mais comumente utilizada na identificação de bactérias patogênicas é o gene que codifica o RNA ribossômico (RNAr) 16S, devido ao seu alto grau de conservação gênica entre as espécies de bactérias (Clarridge, 2004). O gene 16S RNAr já foi utilizado em vários estudos sobre a composição da microbiota de animais de laboratório (Salzman *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008; Bendtsen *et al.*, 2012; Fouts *et al.*, 2012; Benga *et al.*, 2014). Há mais de 90 mil sequências do gene 16S RNAr depositadas no banco de dados GenBank que podem ser utilizadas para comparar com sequências de bactérias desconhecidas (Clarridge, 2004).

1.3 CREAL

O Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) é um órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), que por sua vez é uma das unidades de ensino e pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). No CREAL são criados animais da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com classificação sanitária SPF.

No CREAL, há um sistema de alojamento de animais mais controlado, comparado aos sistemas convencionais de biotérios. As gaiolas de alojamento dos animais são fechadas em *racks* com sistema automatizado de ventilação e exaustão individuais (com filtração do ar) para cada gaiola (também conhecido como sistema IVC – *Individually Ventilated Cage*), diferente dos biotérios convencionais em que as gaiolas são abertas, onde as trocas de ar ocorrem naturalmente e os animais ficam mais expostos a contaminantes ambientais. As trocas de gaiolas nas salas em questão são realizadas utilizando uma estação de troca, onde a superfície é inicialmente esterilizada com o uso de radiação ultravioleta (UV) e a passagem do animal da caixa suja para uma caixa limpa é feita com o uso de pinça estéril, desinfetada com álcool 70% a cada transferência individual dos animais.

No sistema IVC, cada gaiola recebe ar filtrado a partir da passagem do ar de insuflamento por um filtro HEPA que, sob pressão positiva, protege os animais de eventuais agentes contaminantes ou partículas nocivas presentes no ambiente. Além disso, o ar da exaustão também recebe filtração, de modo que tal sistema minimiza a disseminação de patógenos entre as gaiolas e salas (Brielmeier *et al.*, 2006). Assim, o sistema descrito ajuda no controle sanitário dos animais de laboratório, diminuindo a possibilidade de transmissão de zoonoses entre os animais e as pessoas que trabalham junto deles (Brielmeier *et al.*, 2006; Clough *et al.*, 1995).

Além de uma área com salas providas com sistema IVC instalado e em funcionamento, no CREAL também são mantidos animais em alojamento com gaiolas convencionais, ou seja, as caixas são abertas, sem sistema fechado de ventilação, como no caso do IVC. Os animais de gaiolas convencionais são mantidos em uma área separada fisicamente por uma porta de passagem unidirecional, sendo que as rotinas de limpeza, desinfecção e esterilização são as mesmas da área com sistema IVC, à exceção do sistema de trocas dos animais de uma gaiola suja para uma limpa, em que somente no sistema IVC é realizada em uma estação de troca.

Como já mencionado, os animais SPF criados no CREAL são presumidamente livres de um grupo específico de patógenos, composto de 15 táxons (*Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus* associados aos cílios respiratórios (ACR), *Citrobacter rodentium*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium kutscheri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pulmonis*, *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus beta hemolitico* (exceto grupo D), *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium piliforme* - Tyzzer) de microrganismos, que devem ser sistematicamente monitorados na colônia, como sugerido pela FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*), uma organização europeia reconhecida internacionalmente na ciência de animais de laboratório. Os animais foram adquiridos com esse *status* microbiológico, contudo devido à ausência atual de um monitoramento padronizado e rotineiro no biotério não podemos afirmar que tal *status* é mantido, apesar da ausência sintomática nos animais. Por outro lado, a hipótese de que os animais ainda possuem uma microbiota livre desses patógenos é mantida, uma vez que o biotério possui regras e rotinas rígidas e bem estabelecidas de higienização do micro e macroambiente, além do

uso de sistema IVC e estação de troca, o que teoricamente evitaria a disseminação de contaminantes nas áreas de criação.

A FELASA recentemente publicou um guia novo revisado com recomendações para a padronização de programas de monitoramento sanitário em biotérios (Mähler *et al.*, 2014). No guia é sugerido um grupo de agentes infecciosos que podem ser monitorados na colônia de criação de ratos, considerando a importância de cada agente como fator interferente nas pesquisas científicas e cuidado da saúde dos animais e das pessoas que trabalham com os mesmos. As bactérias supracitadas estão presentes no grupo de agentes infecciosos que a FELASA recomenda no monitoramento, a exceção de *C. bovis* e *S. haemolyticus* que não foram incluídos nesse novo guia. No guia atualizado foram incluídas as bactérias do gênero *Helicobacter* e da espécie *Streptobacillus moniliformis*.

Uma das necessidades do CREAL é a realização de monitoramento sanitário microbiológico, a cada três meses, da colônia de animais criados neste Centro. Inicialmente estão sendo estabelecidos os procedimentos para o monitoramento bacteriológico. Logo que for estabelecida a padronização e adequação dos procedimentos desse monitoramento, o diagnóstico virológico será trabalhado, sendo que inicialmente este controle sanitário será realizado por laboratórios da UFRGS, em parceria com o CREAL, ou por laboratórios privados contratados.

O monitoramento tem como objetivo conservar e promover o melhoramento da saúde dos animais criados no CREAL, assim como dos funcionários e pesquisadores que entram em contato com esses animais. Também tem a função de contribuir para um controle sanitário de boa qualidade, que garanta a validade e reprodutibilidade de dados científicos, redução do número de animais utilizados na pesquisa e a prevenção e combate de zoonoses.

1.4 Justificativa

Com o intuito de criar um programa de controle da saúde dos animais, dada a importância do bem estar dos mesmos, o CREAL visa à padronização do monitoramento sanitário dos animais criados no local, buscando alternativas que visem maior rapidez e precisão na detecção de patógenos. Uma dessas alternativas é a utilização de técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR),

com o uso de marcadores genéticos descritos, e o sequenciamento. Além do diagnóstico de doenças, tal projeto vai ser importante para conhecer um pouco sobre a microbiota associada dos animais criados no CREAL, uma vez que a microbiota atual dos animais é desconhecida.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo geral

Este projeto teve como objetivo geral a padronização das metodologias e técnicas para a investigação de patógenos específicos e da microbiota cultivável de origem respiratória e fecal presente em ratos Wistar criados no CREAL em gaiolas de alojamento IVC e convencionais.

1.5.2 Objetivos específicos

Para o desenvolvimento do objetivo geral deste projeto, o mesmo teve os seguintes objetivos específicos:

- Sistematização e otimização dos procedimentos necessários para o monitoramento bacteriológico;
- Padronização dos métodos de necropsia e coleta das amostras biológicas;
- Padronização do método de isolamento de bactérias cultiváveis em condições aeróbias;
- Padronização da técnica de extração de DNA das colônias de bactérias isoladas;
- Padronização da reação de PCR utilizando o gene 16S RNAr específico para o Domínio Bacteria, para a identificação das espécies e gêneros dos microrganismos cultiváveis em aerobiose;
- Padronização das técnicas de extração de DNA de amostras de lavado traqueal e fezes dos animais;
- Padronização das reações de PCR a partir do DNA extraído das amostras de lavado traqueal e fezes dos animais, utilizando os genes de patógenos específicos a partir de protocolos já padronizados na literatura científica;
- Avaliação das técnicas e metodologias escolhidas para a padronização do monitoramento sanitário dos animais criados no CREAL.

2. METODOLOGIA

2.1 Locais de trabalho

A necropsia dos animais e a coleta de amostras do trato respiratório e fecal para as análises do monitoramento sanitário foram realizadas no CREAL. Já o processamento do material biológico, preparação dos meios de cultura, isolamento das bactérias, realização das extrações de DNA e das reações de PCR foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia (CBiot) da UFRGS.

2.2 Critérios e cálculo de amostragem

O número de animais monitorados neste estudo foi baseado nas recomendações da FELASA descritas por Nicklas *et al.* (2002). Para o cálculo do número de animais foram considerados os seguintes critérios e suposições:

- Cada unidade microbiológica foi definida como uma entidade microbiológica independente, com espaços e pessoas em trânsito separando cada unidade;
- As salas que possuem o sistema IVC foram designadas como unidade microbiológica e as salas com sistema convencional como outra unidade;
- A taxa de prevalência de uma suspeita de infecção foi considerada como 30%;
- A população presente em cada unidade era igual ou superior a 100 animais;
- Tanto machos como fêmeas são infectados com a mesma taxa;
- Amostragem e distribuição aleatória da infecção.

O cálculo do tamanho da amostra utiliza a seguinte fórmula:

$$\text{Tamanho amostral} = \frac{\log 0,05}{\log N}$$

N = porcentagem de animal não-infectados

0,05 = 95% de confiança

Com base no cálculo e nos critérios adotados foram utilizados 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) saudáveis, adultos jovens (entre 6 e 8 semanas), de cada unidade microbiológica escolhida, o que resultou em um total de 20 animais monitorados neste trabalho.

A escolha dos animais por unidade foi feita considerando a posição das gaiolas de alojamento dos animais, priorizando os animais criados mais próximos da porta, do chão e do teto da sala, tendo em vista que são locais em que o perigo de contaminação é teoricamente maior.

2.3 Necropsia e coleta de amostras biológicas

A anestesia de 20 animais foi realizada pela médica veterinária do CREAL, colaboradora deste projeto, utilizando-se os fármacos Tiopental 2,5% (150 mg/Kg) e Lidocaína 2% (4 mg/Kg), ambos aplicados via intraperitoneal na mesma seringa. A eutanásia foi realizada, após a anestesia, por meio de exsanguinação, conforme recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia (2013) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). As bancadas foram previamente limpas e desinfetadas com álcool 70%, por fim adicionado um pedaço de papel Kraft estéril (em torno de 1 m²) para a realização das necropsias. Foi realizada a incisão do abdômen dos animais com auxílio de pinça e tesoura, flambadas (imersas no álcool e passagem sobre bico de Bunsen ou espíriteira acesa), assim como analisada a localização e estado dos órgãos e da cavidade dos animais. A veia cava foi localizada e realizada a coleta de sangue a ser utilizado em outras análises de rotina do biotério.

Para investigar possíveis patógenos específicos do trato respiratório dos animais, foram coletadas amostras de lavado traqueal segundo a metodologia descrita por Tedesco *et al.* (2011), com modificações e adaptações conforme as sugestões para necropsia e coleta de material de aspirado respiratório descritas por Parkinson *et al.* (2011). Após a eutanásia e coleta de sangue, a traqueia dos animais foi exposta e submetida à antissepsia com álcool 70%. A laringe foi ocluída na extremidade superior com a utilização de pinça e o lavado feito com a injeção de agulha estéril acoplada a uma seringa contendo um volume de 2 mL de solução estéril de PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,2). Logo em seguida à coleta, as amostras foram sucessivamente congeladas e armazenadas a temperatura de -80°C.

Para avaliar a presença de patógenos específicos do trato fecal dos animais, foram coletadas amostras de fezes diretamente do intestino de cada animal e também submetidas ao congelamento e armazenadas a temperatura de -80°C.

Para coleta de bactérias cultiváveis, a traqueia dos animais foi incisada, com auxílio de uma pinça anatômica e tesoura reta de ponta fina, ambas esterilizadas, e o material coletado com suabe, que foi esfregado sobre a mucosa e imergido imediatamente em meio de transporte Stuart. Além das amostras traqueais, foram coletadas amostras com suabe da mucosa do ceco dos animais, de modo que foram utilizadas pinças e tesouras diferentes para evitar contaminação cruzada. As amostras foram condicionadas em caixas isotérmicas de isopor e transportadas até o CBiot.

Os procedimentos propostos para o projeto, no que confere ao uso de animais de laboratório, obedeceram aos princípios estabelecidos pela Lei 11794/08 de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei AROUCA) e o projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovado sob o número 26470.

Quanto ao grau de severidade dos procedimentos que envolveram a necropsia, coleta das amostras e eutanásia, segue a tabela abaixo mencionando cada categoria conforme o procedimento escolhido:

PROCEDIMENTO	GRAU DE SEVERIDADE
Contenção física dos animais	Moderado
Aplicação de Anestésicos Intraperitoneais	Leve
Coleta de Sangue da Veia Cava	Sem Recuperação
Coleta do Lavado Traqueal	Sem Recuperação
Coleta das Fezes	Sem Recuperação
Eutanásia por Exsanguinação	Sem Recuperação

2.4 Preparo de meios de cultura e isolamentos microbiológicos

Para o isolamento de bactérias cultiváveis do trato respiratório e intestinal dos animais, foram utilizados os seguintes meios de cultura: Ágar Cetrimide, Ágar

McConkey, Ágar Sangue e Ágar Triptona de Soja (TSA). Particularmente, o meio de cultura Ágar Bordet-Gengou foi utilizado para isolar bactérias presentes na traqueia, enquanto os meios Ágar Salmonella-Shigella e Ágar CLED foram utilizados para o cultivo de bactérias presentes no ceco dos animais. Os meios de cultura preparados foram esterilizados conforme as orientações do fabricante e, após, armazenados a 4°C até a semeadura (técnica de isolamento por esgotamento). Após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18-48h.

As colônias que crescerem nas placas dos meios citados foram observadas e analisadas pelas suas características (tamanho, forma, pigmentação, elevação, bordos, brilho, superfície e consistência), procurando-se colônias que apresentassem diferenças morfológicas entre si. As colônias escolhidas foram reisoladas em novas placas, contendo o meio TSA, novamente pela técnica de esgotamento. Somente após dois esgotamentos consecutivos sem contaminação, estas colônias foram consideradas isoladas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18-60h (dependendo do tempo de crescimento de cada bactéria) em aerobiose.

Para a conservação das bactérias, criotubos contendo leite desnatado 10% foram preparados e esterilizados em autoclave (110°C por 20 minutos) e as bactérias inoculadas nesse meio, que posteriormente foram submetidos ao congelamento e armazenamento a -20°C.

Para validar as técnicas moleculares posteriores, foram utilizadas cepas bacterianas como controles positivos. As bactérias-controle foram crescidas e isoladas em TSA ou Ágar Sangue, também pela técnica de esgotamento, por incubação em estufa a 37°C por 18-48h.

2.5 Extração de DNA das colônias de bactérias isoladas

A padronização da extração do DNA das colônias de bactérias isoladas dos animais e de bactérias-controle foi realizada de quatro modos diferentes. Uma única colônia isolada do meio TSA foi suspensa em: a) 100 µL de água mili-Q estéril e feita a incubação a 100°C por 10 min, conforme método descrito por Riyaz-Ul-Hassan *et al.* (2008); b) 100 µL de solução TE (10 mM Tris-Cl e 1mM EDTA pH 8,0) estéril e feita a incubação a 100°C por 10 min; c) 100 µL de água mili-Q estéril e feita a incubação a 100°C por 10 min, em seguida, adição de proteinase K (50 µg/mL) e feita a incubação a

56°C por 2h e, após, 95°C por 30 min; d) 100 µL de solução de água mili-Q estéril com proteinase K (50 µg/mL) e feita a incubação a 56°C por 2h e, após, 95°C por 30 min. Após transcorrido o tempo, imediatamente todas as amostras lisadas foram incubadas em gelo por 3 min e, em seguida, centrifugadas a 10.000 g por 1 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. As amostras de DNA obtidas foram estocadas a -20°C para conservação.

Para a padronização da reação em cadeia da polimerase, foram utilizadas as quantidades de 1 µL, 2 µL e 5 µL de cada amostra lisada. Os amplicons obtidos foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

A extração do DNA das bactérias-controle também foi realizada utilizando-se os kits *Purelink Genomic DNA* (Invitrogen) e *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare), seguindo as recomendações dos fabricantes.

2.6 PCR do gene 16S RNAr

Para a identificação molecular das bactérias isoladas neste trabalho, foram utilizados os *primers* universais 16S RNAr para o Domínio Bacteria descrito por Muyzer *et al.* (1993) (*Foward* – 5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' e *Reverse* – 3' GGT CGT CGG CGC CAT TA 5'). Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizadas as seguintes condições: 0,5u *Taq* DNA Polimerase, 1x tampão *Taq* DNA Polimerase, 1,5 – 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix (reagentes da marca Ludwig Biotec), 10 pmóis de cada *primer* (Síntese Biotecnologia). O programa de amplificação consistiu de 35 a 40 ciclos: 94°C por 2 min, 94°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 58°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 6 min.

Os produtos obtidos na amplificação do DNA foram migrados em gel de agarose 1,5 – 2,0%, em 1x tampão TEB (Tris, EDTA e ácido bórico, pH 8,0), voltagem de 90V, utilizando os marcadores moleculares pUC18 clivado com a enzima *DdeI* e pThioHys C clivado com *Hinfl*.

2.7 Extração de DNA de lavado traqueal

Para a extração do DNA das amostras de lavado traqueal, foi realizado o protocolo descrito por Tedesco *et al.* (2011). O lavado obtido foi centrifugado a 12.000

g por 15 min e sobrenadante descartado. Após, foi adicionada a solução de lise (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,5%, pH 8,0) mais proteinase K (200 µg/mL) e realizada a incubação a 56°C por uma hora, seguido de 10 min a 100°C para inativação da proteinase. Ao final da incubação foi adicionado fenol tamponado com Tris e a solução resultante homogeneizada em agitador do tipo vórtex por 1 min. A solução homogeneizada foi centrifugada a 12.000 g por 5 min e a fase inferior (fenol) retirada. Em seguida, foi adicionado fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) tamponado com Tris, homogeneizada em agitador vórtex e centrifugada a 12.000 g por 5 min. A fase superior (aquosa) foi retirada e transferida para um novo tubo e adicionado acetato de sódio 3M (0,5V) e álcool absoluto (2V) gelado para precipitação do DNA (por 16h a -20°C). Após a precipitação, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 30 min, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado duas vezes com álcool 70% gelado. Após a centrifugação (12.000 g por 15 min), o álcool foi retirado e o precipitado secado em estufa a 37°C. O precipitado seco foi ressuscitado em água mili-Q estéril. As amostras de DNA isolados foram armazenadas a -20°C até o seu uso.

A extração de DNA de amostras de lavado traqueal também foi realizada utilizando-se dois kits comerciais: *Purelink Genomic DNA* (Invitrogen) e *Invisorb® Spin Universal* (Stratec molecular), seguindo as recomendações de ambos fabricantes. A eluição do material genético ligado à coluna de purificação foi realizada por duas vezes.

2.8 Extração de DNA de fezes

O isolamento do DNA de amostras de fezes foi realizado conforme o protocolo utilizado por Seok *et al.* (2005) com modificações. As fezes congeladas em nitrogênio líquido (100 mg) foram maceradas e após ressuscitadas em solução de lise (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, SDS 0,5%, pH 8,0) mais proteinase K (200 µg) com posterior incubação a 56°C por 3h. Após, foi realizada duas extrações com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). As etapas de centrifugação, precipitação e lavagem do material genético foram realizadas conforme a padronização descrita para a extração de amostras de lavado traqueal. As amostras obtidas na técnica de extração padronizada foram armazenadas a -20°C até o momento de sua utilização.

A extração de DNA de amostras de fezes (25 mg) também foi realizada utilizando-se o kit *Purelink Genomic DNA* (Invitrogen), seguindo as recomendações do

fabricante. A eluição do material genético ligado à coluna de purificação foi realizada por duas vezes.

2.9 PCR de amostras de DNA de lavado traqueal e fezes

Para a detecção dos patógenos, as amostras de DNA foram utilizadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos obtidos da literatura e os *primers* universais 16S RNAr para o Domínio Bacteria já mencionados. As condições para a PCR, tais como as concentrações dos reagentes e os programas de tempo e temperatura, foram realizadas conforme cada referência pesquisada com modificações. Para a realização da PCR com os *primers* 16S RNAr, foram utilizadas as mesmas condições descritas para a PCR das colônias de bactérias isoladas por suabe, com a exceção de duas reações-testes em que foi adicionado à reação 0,6 mg/ml de BSA (*Bovine Soro Albumine*). Nas reações foram utilizadas amostras de DNA dos patógenos em estudo, como controles positivos da reação. Na ausência de amostras de DNA dos patógenos, foram utilizados os *primers* 16S RNAr e amostras de DNA da bactéria *Proteus* sp., como controles internos da reação. As sequências de cada *primer* específico, conforme cada táxon-alvo, assim como as referências utilizadas, são apresentadas na Tabela 1.

Os produtos obtidos na amplificação do DNA foram migrados em gel de agarose 1,5 – 2,0%, em 1x tampão TEB (Tris, EDTA e ácido bórico, pH 8,0), voltagem de 90V, utilizando os marcadores moleculares pUC18 clivado com a enzima *DdeI* e pThioHys C clivado com *Hinfl*.

Tabela 1: Sequências dos *primers* específicos dos patógenos pesquisados na literatura e utilizados nas reações de PCR para detecção desses patógenos na padronização do monitoramento sanitário.

Táxon	Sequência dos <i>primers</i>	Referência
<i>C. kutscheri</i>	CKGYRBF 5'CGTGATGGCCATCTTTGGTT 3' CKGYRBR 5'AATCGTATTAGCAAAGGTATG 3'	Jeong <i>et al.</i> , 2013.
<i>K. pneumoniae</i>	KPTYRBF 5'GGCTGTACTACAACGATGAC 3' KPTYRBR 5'TTGAGCAGGTAATCCACTTTG 3'	Jeong <i>et al.</i> , 2013.
<i>S. pneumoniae</i>	SPPLYF 5'GTGATATTTCTGTAACAGCTACC 3' SPPLYR 5'GAGAATTCCTGTCTTTTCAAA 3'	Jeong <i>et al.</i> , 2013.

<i>Pseudomonas</i> sp.	PSP16SF 5' GACGGGTGAGTAATGCCTA 3' PSP16SR 5' CACTGGTGTTCCTTCCTATA 3'	Spilker <i>et al.</i> , 2004.
<i>S. aureus</i>	SADNAJF 5' GACTTTGGCGGTTTTAGTGG 3' SADNAJR 5' CAGCAGGTCCTCCATTCAC 3'	Hayashimoto <i>et al.</i> , 2009.
<i>Bacillus</i> ACR	BACR16SF 5' TTAAAGCTCCGGCGCTCGAA 3' BACR16SR 5' ACACCCTTAGAAAAGGGGATT 3'	Cundiff <i>et al.</i> , 1994
<i>M. pulmonis</i>	MP16SF 5' AGCGTTTGCTTCACTTTGAA 3' MP16SR 5' GGGCATTTCCTCCCTAAGCT 3'	van Kuppeveld <i>et al.</i> , 1993.
Família <i>Pasteurellaceae</i>	PAF16SF 5' CATAAGATGAGCCCAAG 3' PAF16SR 5' GTCAGTACATTCCCAAGG 3'	Bootz <i>et al.</i> , 1998.
<i>B. bronchiseptica</i>	BBFLAF 5' TGGCGCCTGCCCTATC 3' BBFLAR 5' AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT 3'	Hozbor <i>et al.</i> , 1999.
<i>S. moniliformis</i>	SM16SF 5' GCTTAACACATGCAAATCTAT 3' SM16SR 5' AGTAAGGGCCGTATCTCA 3'	Boot <i>et al.</i> , 2002.

2.10 Manuseio de reagentes e descarte de resíduos químicos e biológicos

O manuseio dos reagentes e resíduos foi realizado sempre com o uso de equipamentos de proteção individual (EPI's) adequados para a atividade. Durante o manejo dos animais, procedimentos de anestesia, eutanásia e coleta de material biológico, foram utilizados: propé, macacão de manga longa, luvas de látex descartáveis, touca e máscara respiratória. O manuseio microbiológico foi efetuado em capela de fluxo laminar.

O descarte dos resíduos químicos gerados durante a execução das técnicas moleculares seguiu o Plano de Gestão de Resíduos em Serviço de Saúde da UFRGS, de acordo com a RDC 306 de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Após eutanásia dos animais e coleta de material específico, a carcaça e demais resíduos biológicos oriundos desses processos, assim como as placas com os meios de cultura contaminados, foram acondicionados em saco plástico branco, com indicação de risco biológico, e foram descartados conforme o Plano de Gestão de Resíduos em Serviço de Saúde da UFRGS, de acordo com a RDC 306 de 2004.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Padronização da extração de DNA de colônia e da PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se os *primers* 16S RNAr universais para o Domínio Bacteria e a amplificação de 3 amostras foi observada com o tamanho esperado de 195 pares de bases (**Figura 1**). Foram utilizados os DNAs extraídos utilizando-se os kits descritos no item 2.5 da seção Metodologia, de duas bactérias-controle (*Proteus* sp. e *Staphylococcus aureus*), da bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, cedido gentilmente pela aluna de mestrado Fernanda Munhoz do Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do CBiot, e uma amostra de DNA da espécie *Proteus* sp. obtida pelo método de extração por fervura em TE a 100°C por 10 min.

Na amplificação do DNA de *M. hyopneumoniae* foi observada uma banda mais fraca no gel comparada com as outras espécies. Nós sugerimos que a quantidade inicial de DNA utilizada na reação não foi suficiente para amplificar mais fragmentos.

A amplificação do DNA de *Proteus* sp. obtido de lise por fervura não foi observada. A amostra utilizada foi fervida e mantida por um longo período congelada, o que pode indicar a ocorrência de degradação do material genético ou a presença de inibidores de PCR na amostra.

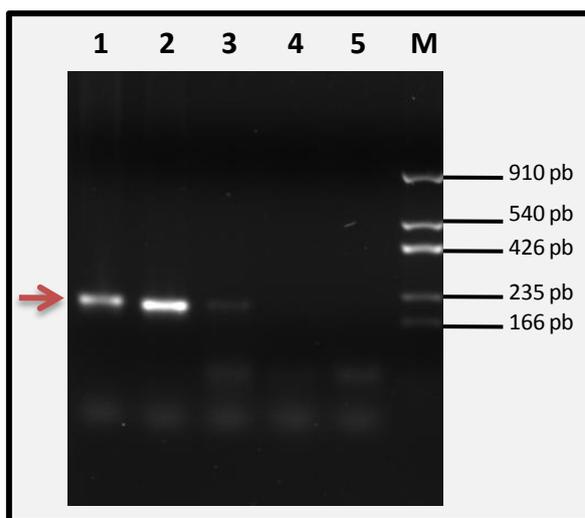


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,5% das amostras de PCR 16S RNAr Domínio Bacteria. 1 – *Proteus* sp.; 2 – *S. aureus*; 3 – *M. hyopneumoniae*; 4 – *Proteus* sp. DNA extraído por fervura; 5 – controle negativo; M – Marcador molecular pUC18 clivado com *DdeI*; ➔ Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado (195 pb).

Para a padronização do método de extração foram testados quatro métodos alternativos e utilizadas as colônias de quatro bactérias, duas classificadas como Gram

negativas e duas como Gram positivas. Foram utilizadas duas bactérias (“1/13” - uma Gram negativa e “19/13” uma Gram positiva), de espécie não identificada, isoladas de um animal (rato Wistar) a partir de uma coleta realizada anteriormente a este projeto. As demais bactérias são da espécie *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram positiva).

Para a realização da reação de PCR foram testadas quantidades de amostras lisadas diferentes (1 µL, 2 µL e 5 µL) e os produtos de amplificação foram observados e analisados (**Figura 2**). Além dessas amostras, testou-se a reação com produtos da extração por fervura em água mili-Q estéril e TE (100°C por 10 min) mantidas congeladas por um período de um mês.

Todas as amostras de “1/13” e “19/13” mostraram produtos de amplificação. Na amostra de 5 µL da cepa “1/13” lisada por fervura em TE foi observado o produto de amplificação, entretanto apresentou concomitantemente um arraste no gel, possivelmente DNA degradado.

A amplificação não foi observada nas amostras de *S. aureus*, nas condições de extração por fervura: em água mili-Q estéril (2 µL e 5 µL de lisado) 100°C por 10 min; em TE (1 µL de lisado) 100°C por 10 min. Nessas condições, contudo com quantidades de lisado diferentes, foi observada a amplificação com uma banda de intensidade mais fraca no gel. Nas condições em que foi utilizada a proteinase K, foi possível amplificar com sucesso. A ausência ou a dificuldade em amplificar o DNA de *S. aureus* deve-se possivelmente ao fato dessa bactéria ser Gram positiva, logo com uma parede celular mais espessa do que às Gram negativas, o que dificultaria o processo de rompimento da parede e exposição do material genético (Baratto & Megiolaro, 2012). O uso da proteinase K é uma alternativa de extração importante em caso de PCR negativo por meio destes métodos.

Quanto às duas amostras de lisado mantidas congeladas, foi observada a amplificação, sendo que a amostra fervida com TE apresentou uma banda no gel com coloração mais forte. Tal resultado demonstra que será possível utilizar material mantido congelado por um período de até um mês, mesmo que a técnica de extração de DNA escolhida não possibilite uma purificação adequada do material.

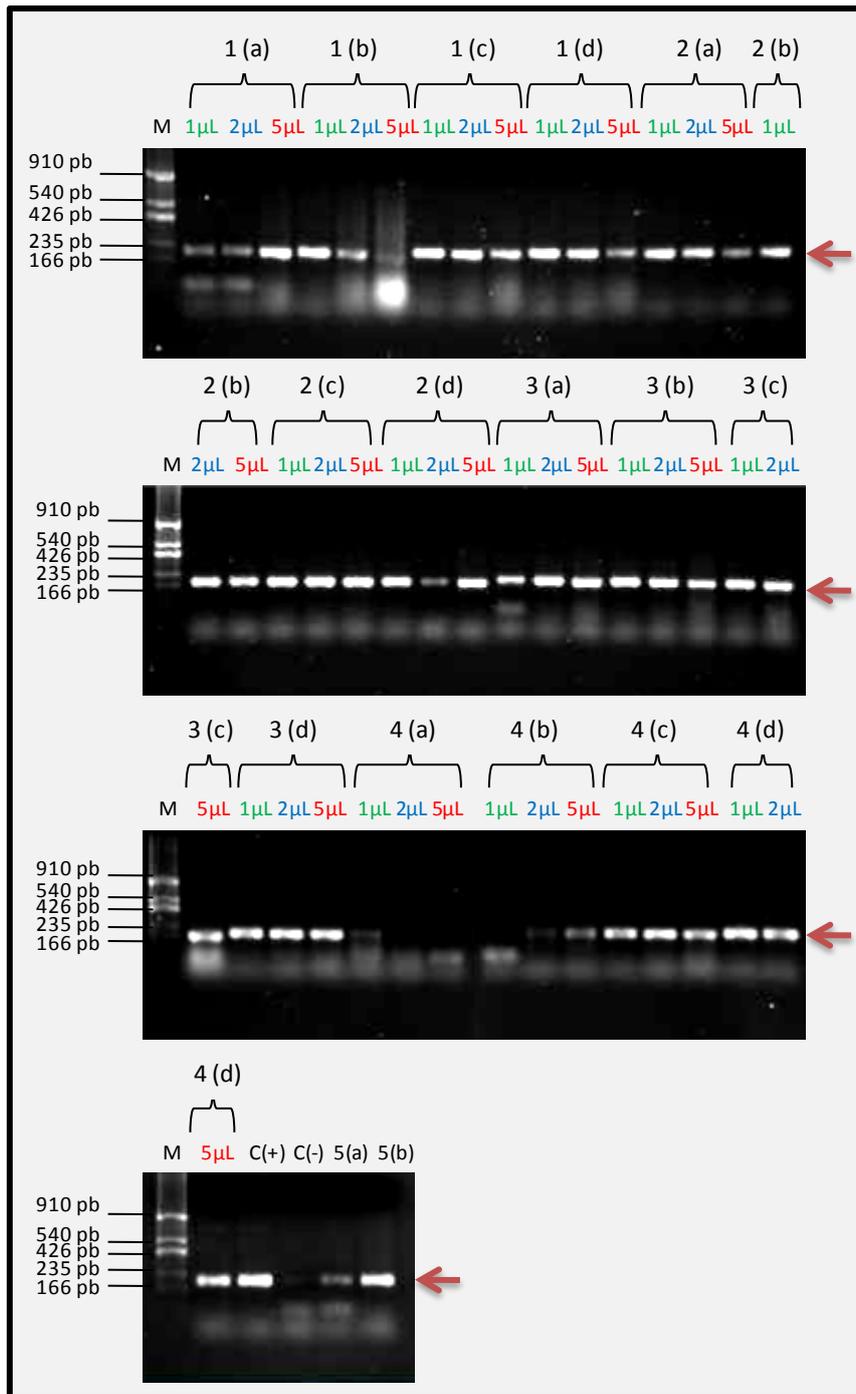


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da reação de PCR 16S RNAr Domínio Bacteria da padronização das extrações de DNA. 1 – “1/13”; 2 – “19/13”; 3 – *K. pneumoniae*; 4 – *S. aureus*; 5 – “1/13” amostra congelada por um período; (a) fervura em H₂O; (b) fervura em TE; (c) fervura em H₂O e incubação com proteinase K; (d) incubação com proteinase K; C(+) – controle positivo *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; 1 µL, 2 µL, 5 µL – volume de material lisado; M – Marcador molecular pUC18 clivado com *DdeI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado (195 pb).

Para avaliar melhor a amplificação positiva, foram selecionadas as amostras de “1/13” e “19/13” e o DNA quantificado por espectrofotômetro. Foi observada uma quantificação relativa, com concentração de variação entre 137 a 439 ng/μL de material genético amplificado. De modo geral, amostras de 2 e 5 μL de lisado apresentaram maior quantidade de DNA amplificado. No caso de amostras de “1/13”, as maiores concentrações de DNA foram quantificadas nas condições de extração por fervura com água mili-Q estéril e TE; enquanto nas amostras de “19/13” foram àquelas tratadas com proteinase K.

Com o intuito de otimizar o processo de extração de DNA com menor custo e tempo de execução, foi decidido inicialmente utilizar o método de fervura em TE, uma vez que foi o método em que a reação de PCR foi positiva, com quantidades relativas de DNA suficientes. Além disso, a solução de TE possui EDTA, um agente quelante inibidor de DNAsas, o que poderia evitar a degradação de DNA congelado e ampliar o tempo de conservação do material. Em caso de reações de PCR negativas, optou-se pelo tratamento com proteinase K.

A quantificação do DNA amplificado por PCR foi realizada e avaliada comparando-se as diferentes quantidades de material lisado utilizado. Como resultado, evidenciamos maior concentração de DNA amplificado na reação de PCR de amostras em que foi utilizado 5 μL de produto lisado. Entretanto, tal quantidade pode apresentar uma concentração maior de inibidores da reação, como resíduos proteicos e DNA degradado, interferindo negativamente na amplificação, como, por exemplo, na amostra “1/13”, extraída por fervura em TE, em que foi observado um arraste com uma banda mais fraca no gel quando utilizado 5 μL de material, o que não foi observado nas reações com 1 e 2 μL dessa amostra (**Figura 2**). A própria solução de TE pode ser um problema, uma vez que o EDTA pode inibir a reação de PCR, dependendo da concentração utilizada. Dessa forma, optou-se em utilizar 2 μL de lisado na tentativa de evitar tais problemas na amplificação e obter uma quantidade suficiente de DNA para ser utilizado nas técnicas seguintes.

Assim, as condições para amplificação do DNA dos isolados bacterianos escolhidas foram: 2 μL de DNA extraído pelo método de fervura a 100°C em solução de TE ou, como alternativa, pelo método de lise com proteinase K.

3.2 Isolamento bacteriológico e PCR

No isolamento bacteriológico do trato respiratório e intestinal dos animais foi observado crescimento de colônias de bactérias nos seguintes meios de cultura: Ágar Bordet-Gengou, Ágar Salmonella-Shigella, Ágar McConkey, Ágar Sangue, TSA e Ágar CLED. No meio de cultura Ágar Cetrimide não foi observado crescimento de microrganismos. No total foram isoladas 486 colônias de bactérias que apresentavam características distintas entre si em cada placa de cultura avaliada. Entretanto, após o reisolamento de seis bactérias no meio TSA, foi evidenciado o crescimento de novas colônias diferentes, de modo que o número foi ampliado para 493 colônias de bactérias isoladas (**Tabela 2**).

Tabela 2: Número de bactérias isoladas por animal, unidade microbiológica, sexo do animal, amostra de origem cecal e amostra de origem traqueal. SC = sistema convencional; IVC = sistema IVC; F = fêmea; M = macho.

Animal	Unidade	Sexo	Cecal	Traqueal	Total isolado	Total por sexo	Total por Unidade
1	IVC	F	15	4	19		
2	IVC	F	13	9	22		
9	IVC	F	20	20	40	150	
10	IVC	F	18	9	27		
18	IVC	F	21	21	42		256
6	IVC	M	12	2	14		(52%)
7	IVC	M	13	12	25		
8	IVC	M	19	8	27	106	
19	IVC	M	13	2	15		
20	IVC	M	10	15	25		
11	SC	F	15	12	27		
12	SC	F	17	3	20		
13	SC	F	20	2	22	116	
14	SC	F	17	6	23		
15	SC	F	14	10	24		237
3	SC	M	17	13	30		(48%)
4	SC	M	18	10	28		
5	SC	M	16	2	18	121	
16	SC	M	19	4	23		
17	SC	M	18	4	22		
Totais			325 (66%)	168 (34%)	493	493	493

Ao comparar a presença de bactérias isoladas da traqueia e do ceco, foi observada uma maior quantidade de microrganismos isolados do trato intestinal (**Tabela 2**). Este fato é totalmente esperado devido às características anatômicas e de microbiota destes órgãos.

Entre as duas unidades microbiológicas estudadas, foi isolado um número maior de bactérias (52%) presentes em animais criados em sistemas IVC (**Tabela 2**). Se compararmos o número de bactérias isoladas dos animais em relação ao sexo dos mesmos, observamos uma quantidade maior de isolados provenientes de fêmeas no caso do sistema IVC (58,6%) e de machos no caso do sistema convencional (51,1%), como mostrado na Figura 3. De modo geral, foram isoladas 166 e 127 colônias de bactérias coletadas de animais do sexo feminino e masculino, respectivamente. Apesar deste estudo ser qualitativo, devemos levar em conta esses dados se quisermos futuramente comparar e avaliar a microbiota dos animais criados nos dois sistemas de alojamento diferentes, pois o número de isolados, seja por sexo do animal ou unidade microbiológica, são variáveis que podem interferir na avaliação da diversidade bacteriana presente nos animais estudados.

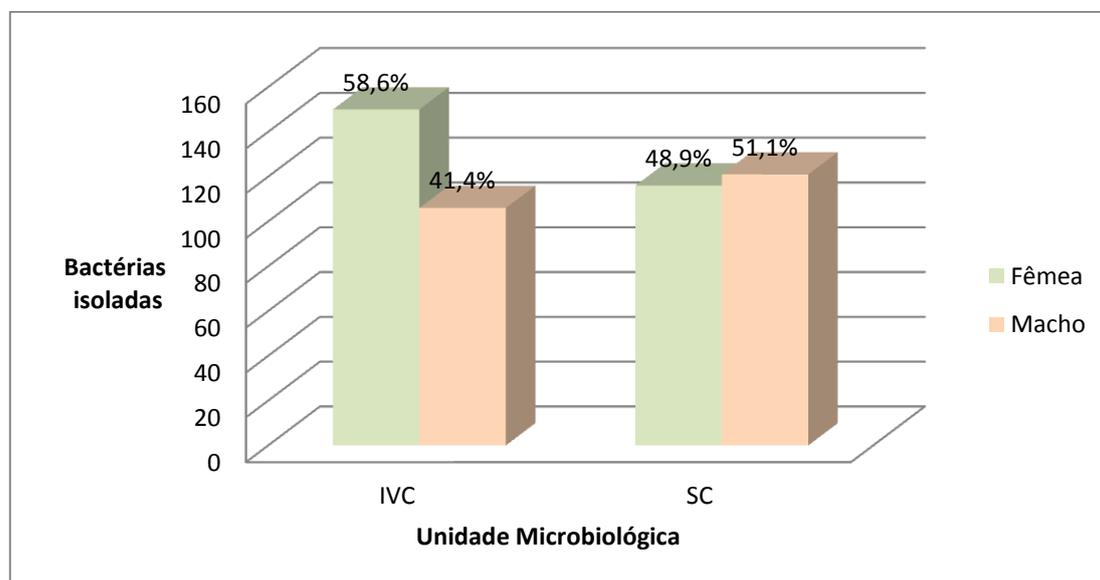


Figura 3: Porcentagem de bactérias isoladas por unidade microbiológica e sexo do animal. SC = sistema convencional; IVC = sistema IVC.

Muitas placas de Ágar Sangue e TSA, particularmente de amostras cecais, apresentaram crescimento bacteriano do tipo véu (*swarming*), o que dificultou o isolamento de algumas bactérias. Na tentativa de reduzir esse tipo de crescimento, foi incluído o meio de cultura CLED na coleta biológica de 10 animais, uma vez que esse

meio de cultura é capaz de reduzir o crescimento de espécies de bactérias do gênero *Proteus*, um grupo que se caracteriza pelo crescimento em véu e é comum estar presente na microbiota intestinal de animais de laboratório (Williams & Schwarzhoff, 1978; McInnes *et al.*, 2011). Como resultado, foi observado um crescimento isolado melhor com o uso do meio CLED, com reduzido véu, a partir de amostras do ceco dos animais.

O DNA de 468 colônias de bactérias foi extraído pelo método de fervura com TE e/ou tratamento com proteinase K e realizado a reação de PCR. Foram obtidas 412 amostras de PCR positivas, sendo que as demais o produto não foi amplificado. Possivelmente, as amostras que não amplificaram tinham a presença de inibidores da reação, pois a extração de DNA não foi purificada, apenas realizada a lise celular.

3.3 Padronização da extração de DNA de lavado traqueal e da PCR

Para a extração do DNA de amostras de lavado traqueal, foi utilizado o método clássico com fenol-clorofórmio e dois kits comerciais. O método fenol-clorofórmio (FC) foi testado e comparado com o kit de extração de DNA da marca Invitrogen (kit 1) quanto à quantidade de DNA extraído. Como resultado, não foi verificada detecção de nenhuma quantidade de DNA extraído pelo método FC, enquanto foi detectada uma quantidade de 3 - 5 ng/ μ L de material extraído pelo kit 1. A explicação possível pela falta de detecção do DNA pelo primeiro método se deve a uma quantidade de material extraído abaixo do valor mínimo possível de leitura no espectrofotômetro ou o material não foi extraído.

Para verificar a presença ou não de material genético extraído, assim como avaliar a possibilidade de amplificação de genes de bactérias, foi realizada a reação de PCR com *primers* universais do gene 16S RNAr para Bacteria, utilizando 5 μ L de material extraído. Como mostra a Figura 4, foi observada a amplificação da sequência gênica (195 pares de bases) na amostra de controle positivo, na amostra 10 (coletada do animal 10) obtida pela extração do kit 1 (2ª eluição) e pelo método de FC e na amostra 7 (coletada do animal 7) obtida pelo método de FC apenas. Ao compararmos com o controle positivo, verificamos uma fraca amplificação das amostras extraídas pelos dois métodos. Para explicar a ausência ou baixa amplificação na reação, podemos sugerir que se deve a pouca quantidade de DNA extraído e/ou devido a inibidores na reação. Para verificar a presença ou não de inibidores, foi realizada a reação de PCR utilizando em conjunto a amostra 7 (2ª eluição obtida do kit 1) mais a amostra de controle positivo.

Como resultado, foi observada a ausência de produto, o que corrobora com a hipótese de que há inibidores de PCR na solução final das extrações.

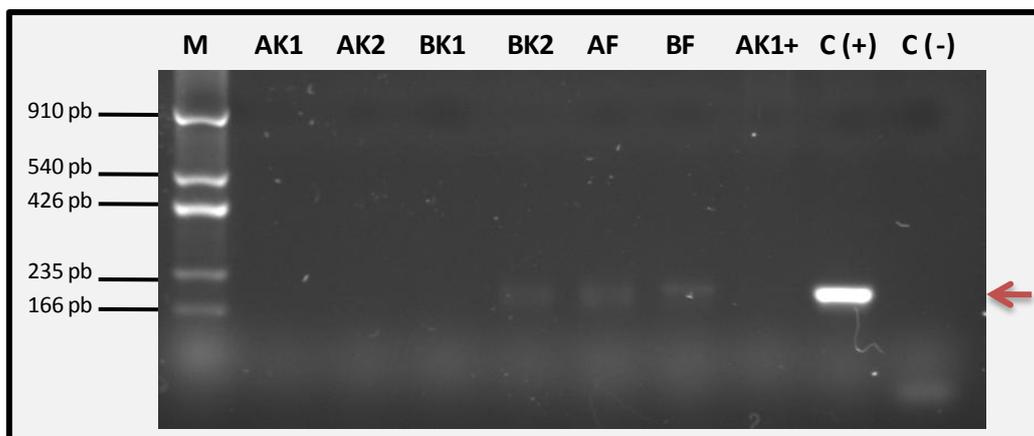


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da reação de PCR 16S RNAr Domínio Bacteria da padronização das extrações de DNA de amostras de lavado traqueal. A – “Amostra 7”; B – “Amostra 10”; K – “extração por kit da marca Invitrogen”; F – “extração por fenol-clorofórmio”; 1 – “1ª eluição”; 2 – “2ª eluição”; AK1+ – “Amostra AK1 mais o controle positivo”; C(+) – controle positivo *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pUC18 clivado com *DdeI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado (195 pb).

Na tentativa de reduzir a quantidade de inibidores na reação, procurou-se diminuir a quantidade de amostra utilizada na reação de PCR (de 5 μ L para 1 μ L). Além disso, para tentar aumentar a quantidade de amplicons, o número de ciclos da reação de PCR foi ampliado (de 35 para 40 ciclos). Como pode ser visualizado na Figura 5, a amostra 7 (extraída por kit, 2ª eluição) e a mesma amostra em conjunto do controle positivo, anteriormente ambos com amplificação negativa, nesta segunda reação de PCR tiveram o produto amplificado.

Podemos observar que as duas amostras obtidas na eluição secundária, da extração pelo kit 1, foram amplificadas, diferente das amostras da eluição primária, o que possivelmente indica que na primeira eluição a maior parte dos inibidores ficou aderida ao DNA, restando menor quantidade na segunda eluição. Na amostra 7, extraída por FC, é observada a amplificação, entretanto a amostra 10, extraído pelo mesmo método, não foi observado o produto, o que não era esperado, pois na primeira reação de PCR foi possível visualizar uma banda fraca no gel. Como a extração por FC apresentou baixo rendimento de DNA, nós sugerimos que a ausência de amplificação na segunda reação para a amostra 10 se deve a baixa quantidade de moléculas de DNA

disponível. Para descartar a hipótese de haver inibidores na amostra 7, extraída por FC, essa amostra também foi utilizada em uma reação na qual foi adicionada em conjunto a amostra de controle positivo, de modo que foi possível visualizar o produto amplificado.

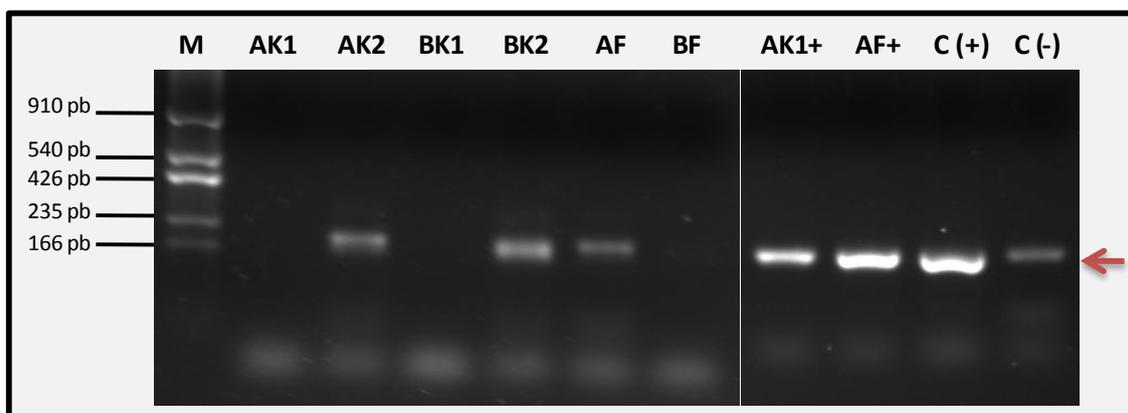


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1,5% da reação de PCR 16S RNAr Domínio Bacteria da padronização das extrações de DNA de amostras de lavado traqueal. A – “Amostra 7”; B – “Amostra 10”; K – “extração por kit da marca Invitrogen”; F – “extração por fenol-clorofórmio”; 1 – “1ª eluição”; 2 – “2ª eluição”; AK1+ – “Amostra AK1 mais o controle positivo”; AF+ – “Amostra AF mais o controle positivo; C(+)- controle positivo *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pUC18 clivado com *DdeI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado (195 pb).

Notamos uma banda na amostra de controle negativo, não esperada, contudo descartamos a hipótese dos reagentes estarem contaminados, pois os mesmos reagentes foram utilizados em reações posteriores nos quais o controle negativo apresentou ausência da banda, assim sugerimos que a micropipeta poderia estar contaminada. Por outro lado, não podemos descartar a hipótese de que a reação estava contaminada, de modo que a mesma foi repetida, com modificações que serão apresentadas a seguir (**Figura 6**).

O número de 40 ciclos da reação de PCR foi mantido, na tentativa de obter maior quantidade de fragmentos.

Para tentar solucionar o problema de inibição na reação de PCR, foi repetida a reação utilizando BSA, pois esse reagente é capaz de ligar-se a inibidores favorecendo a atividade da enzima *Taq* polimerase (Kreader, 1996). Além disso, a reação de PCR foi testada aumentando a quantidade de $MgCl_2$ (de 1,5 mM a 2,0 mM), que é utilizado como cofator para a *Taq* polimerase, sendo que uma baixa concentração de Mg^{2+} pode

gerar baixa quantidade de produto de PCR (Buckingham, 2012). Os resultados são apresentados na Figura 6.

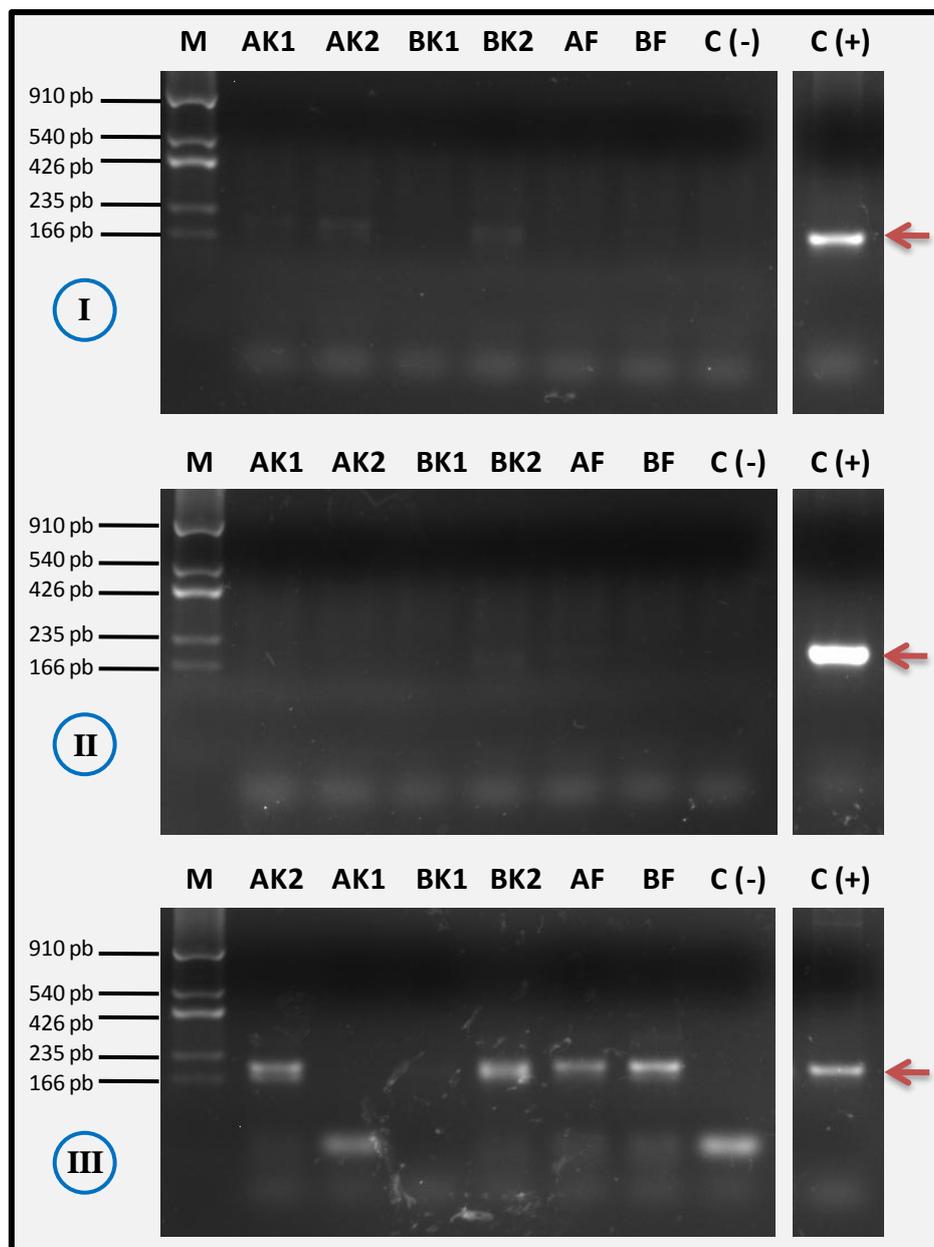


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% da reação de PCR 16S RNAr Domínio Bacteria da padronização das extrações de DNA de amostras de lavado traqueal. I – Amostras com BSA e 1,5 mM de $MgCl_2$; II – Amostras com BSA e 2 mM de $MgCl_2$; III – Amostras sem BSA e 2 mM de $MgCl_2$; A – “Amostra 7”; B – “Amostra 10”; K – “extração por kit da marca Invitrogen”; F – “extração por fenol-clorofórmio”; 1 – “1ª eluição”; 2 – “2ª eluição”; C(+) – controle positivo *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pUC18 clivado com *DdeI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado (195 pb).

O uso de BSA não melhorou a amplificação, inclusive inibiu a reação de PCR, à exceção dos controles positivos com BSA que parecem com bandas mais fortes se comparados com a banda obtida do controle positivo sem BSA. Nós observamos amplificações de tamanho esperado nas reações de PCR sem BSA e com a quantidade de $MgCl_2$ aumentada. A amostra 10, extraída pelo método de fenol-clorofórmio, foi amplificada, contrariando o que foi observado na Figura 5, no qual apresentou ausência de bandas. Nós ressaltamos que a pouca quantidade de DNA poderia explicar o fato de uma mesma amostra ser negativa em uma reação e ser positiva em outra.

Os fragmentos obtidos nas reações de PCR entre as amostras positivas em que foram utilizadas diferentes concentrações de $MgCl_2$ foram quantificados e comparados. Nas reações de PCR com 1,5 mM foi gerado em torno de 305 ng/ μ L, enquanto nas reações com 2 mM obtivemos a média de 344 ng/ μ L, o que significa uma maior produção de fragmentos com o aumento de $MgCl_2$ na reação. Como a visualização no gel é de suma importância para detecção de amostras positivas, foi escolhido padronizar as reações com a concentração de 2 mM de $MgCl_2$.

Como o resultado obtido para os dois métodos de extração mostrou-se pouco satisfatório, pois rendeu pouco DNA extraído e reações de PCR com inibição, optou-se em testar a extração de DNA de uma amostra de lavado traqueal com um segundo kit comercial da marca Stratec (kit 2). Para efeito de comparação, a extração foi realizada também com o kit 1. Como o kit 2 sugere o uso da enzima lisozima na extração de DNA bacteriano, nós optamos em realizar a pré-incubação das amostras com essa enzima, antes de realizar a extração do DNA utilizando ambos os kits. A extração da amostra 5 por meio do kit 1 gerou aproximadamente 7 ng/ μ L (total bruto de 350 ng) de DNA, tanto na primeira quanto na segunda eluição, enquanto com o uso do kit 2 foi possível extrair cerca de 14 ng/ μ L (total bruto de 1,4 μ g) de material, logo, o kit 2 rendeu maior quantidade de DNA extraído. É possível que a diferença maior na quantidade de DNA obtida na extração de DNA da amostra 5 (7 ng/ μ L), comparado com a extração da amostra 7 e 10 realizada anteriormente (3 – 5 ng/ μ L), utilizando o mesmo kit (1), deve-se ao uso da lisozima na extração da amostra 5, que auxilia no processo de lise celular. Entretanto, como utilizamos amostras diferentes para as extrações, é provável que a diferença de DNA seja devido a características específicas de cada amostra, como o número de células resgatadas e presentes na solução do lavado traqueal.

A reação de PCR com os *primers* 16S RNAr também foi realizada, utilizando-se três diferentes quantidades de material extraído (0,5 µL, 1 µL e 1,5 µL) tanto de amostras da 1ª quanto da 2ª eluição obtidas do dois kits de extração. Como mostrado na Figura 7, foi observada a amplificação a partir da amostra obtida do kit 1 em ambas eluições, a exceção da reação que foi realizada com 1 µL de amostra da segunda eluição.

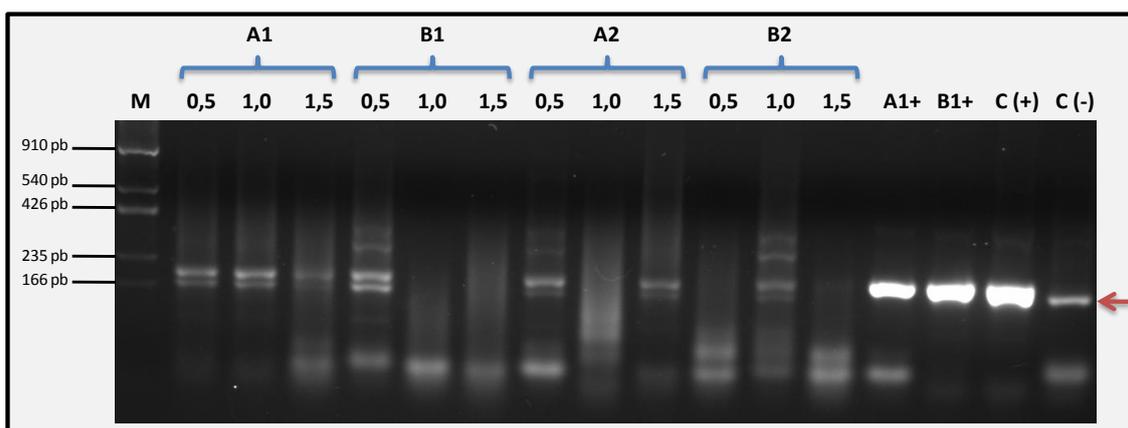


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR 16S RNAr Domínio Bacteria da padronização das extrações de DNA de amostras de lavado traqueal. A – “Amostra de DNA extraída pelo kit Invitrogen”; B – “Amostra de DNA extraída pelo kit Stratec”; 1 – “1ª eluição”; 2 – “2ª eluição”; 0,5/ 1,0/ 1,5 – “volumes em µL de material da extração utilizado na reação”; A1+ – “amostra A1 mais o controle positivo”; B1+ – “Amostra B1 mais o controle positivo”; C(+) – controle positivo *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pUC18 clivado com *DdeI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado (195 pb).

No caso das reações em que foram utilizadas amostras obtidas do kit 2, evidenciamos a amplificação a partir de 0,5 µL da amostra da eluição primária e a partir de 1 µL da amostra obtida na segunda eluição. Ao avaliar o tamanho das bandas esperadas, notamos a amplificação de produtos inespecíficos nas duas reações positivas das amostras obtidas do kit 2 e na reação em que foi utilizado 0,5 µL de material extraído obtido da eluição secundária do kit 1. É possível que a formação de produtos não esperados se deve ao aumento da concentração de MgCl₂ utilizada, uma vez que uma maior concentração desse cofator pode tornar mais estável o anelamento dos *primers* em regiões gênicas incorretas, conseqüentemente gerando amplificações inespecíficas que se apresentam como múltiplas bandas no gel (Markoulatos *et al.*, 2002). Apesar dos *primers* 16S RNAr utilizados serem específicos para uma região

conservada do Domínio Bacteria, não podemos descartar a possibilidade de amplificação de sequências com número de nucleotídeos diferente, pois a microbiota do grupo de animais estudados é desconhecida e, por conseguinte, podem estar presentes microrganismos que ainda não foram caracterizados pela literatura científica.

Nós observamos que o fator inibidor ainda está presente nas reações, dependendo da quantidade utilizada de solução. Talvez, a inibição será um fator comum no tipo de amostra estudada e como solução deveremos optar pela padronização de cada amostra em separado com sua quantidade ideal para termos reações positivas. Entretanto, no caso das amostras obtidas da extração pelo kit 2, foi avaliado posteriormente que para a realização da eluição foi utilizada uma solução específica para eluir do próprio kit. Nas instruções do fabricante, não é descrita a composição da solução de eluição, no entanto, a maioria das soluções de eluição de kits comerciais possui EDTA, uma molécula que dependendo da concentração pode inibir as reações de PCR.

Para testar a hipótese de que há inibidores na solução de eluição, optamos em realizar novas extrações de DNA eluindo o material apenas com água milli-Q estéril e novas reações de PCR com o marcador molecular 16S RNAr (**Figura 8**). Para avaliar o resultado do uso de diferentes amostras, foi extraído o DNA de 10 amostras de lavado traqueal e a reação de PCR testada com diferentes volumes de material extraído (0,5 μ L, 1 μ L, 1,5 μ L, 2 μ L).

Como podemos visualizar na Figura 8, a maioria das amostras teve produto amplificado, à exceção da amostra 1 (animal 1) em que foram utilizadas as quantidades 0,5 μ L e 1,5 μ L de DNA extraído, da amostra 8 (animal 8) utilizando-se 1 μ L de material e da amostra 3 (animal 3) no volume de 2 μ L. Logo, a reação de PCR será padronizada com o uso de 2 μ L de material obtido na extração para todas as amostras, a exceção da amostra 3 em que será utilizado 1,5 μ L, pois com volume maior teve inibição da reação.

É possível notar uma banda não esperada no controle negativo dos dois últimos testes de PCR (**Figuras 7 e 8**), semelhante ao que ocorreu na reação apresentada na Figura 5. Da mesma forma, sugerimos a possibilidade da micropipeta estar contaminada.

Novamente é evidenciado a presença de bandas no gel inespecíficas, possivelmente em virtude da concentração de $MgCl_2$ e/ou da amplificação de sequências de bactérias desconhecidas. As duas hipóteses podem ser avaliadas futuramente com a repetição da reação de PCR utilizando diferentes concentrações reduzidas de Mg^{+} e com o sequenciamento dos produtos obtidos.

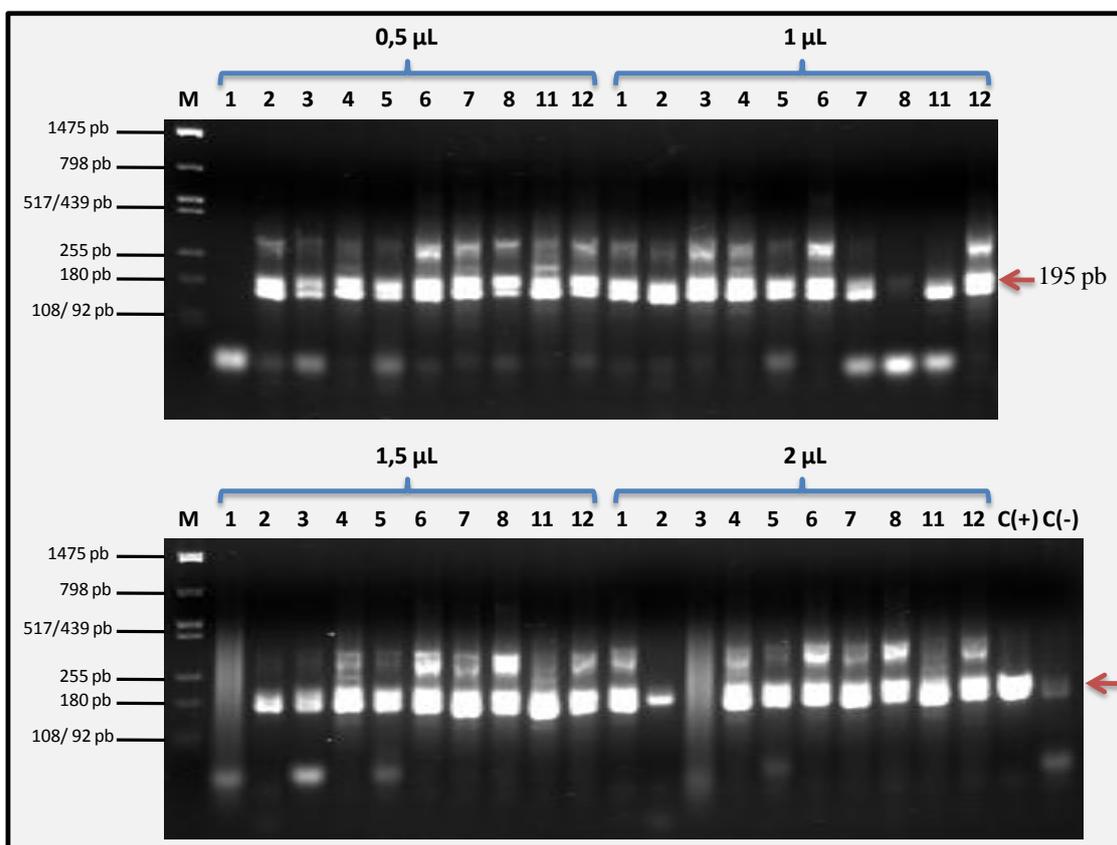


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR 16S RNAr Domínio Bacteria da padronização das extrações de DNA com o kit Stratec de amostras de lavado traqueal. 0,5/1,0/1,5 – “volumes em μL de material da extração utilizado na reação”; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 – “numeração de cada amostra”; C(+) – controle positivo *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pThioHys C clivado com *HinfI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado (195 pb).

Como esse estudo visa a detecção de patógenos que podem estar presentes em mínima quantidade no trato respiratório dos animais, optamos pelo uso do kit 2 (marca Stratec), uma vez que apresentou um rendimento maior de material genético extraído e com a possibilidade de utilizar um volume maior de extração para a reação de PCR sem que ocorra a inibição do procedimento.

3.4 Padronização da extração de DNA de fezes e da PCR

Para a extração do DNA de amostras de fezes, foi utilizado o método clássico com fenol-clorofórmio (FC) e o kit de extração da marca Invitrogen. A amostra de fezes do animal 4 foi utilizada para a extração, com a diferença de que no método FC utilizamos 100 mg de material, enquanto que a extração utilizando o kit foi feita com 25 mg de amostra. No caso da extração por FC, escolhemos realizar o procedimento testando duas soluções de fenol, sendo que uma dessas soluções estava congelada a -20°C e a outra estava descongelada e a temperatura de 4°C. A ideia de utilizar duas soluções de fenol diferentes foi para verificar se soluções desse reagente podem ser congeladas e guardadas por mais tempo, sem perder sua ação.

A extração pelo kit resultou em 22,3 ng/μL de material, na 1ª eluição, e 2,5 ng/μL, na 2ª eluição. Já a extração realizada pelo método FC apresentou uma maior quantidade de material extraído, cerca de 3728 ng/μL pelo fenol a 4°C e em torno de 3962 ng/μL pelo fenol a -20°C. Mais de um fator deve ser levado em conta para tentar explicar a maior quantidade de material extraído por FC. A quantidade alta pode ser devido ao próprio método, neste caso mais eficiente do que o kit escolhido. Além disso, no método FC utilizamos quatro vezes mais material fecal se comparado com o que foi utilizado para a extração pelo kit. Ademais, podemos inferir que uma grande parte desse material extraído possa ser RNA, uma vez que não utilizamos a enzima RNase no procedimento de extração por FC e o espectrofotômetro não distingue a quantidade relativa de DNA e RNA, apenas faz a leitura dos ácidos nucleicos em conjunto.

Para verificar a possibilidade de amplificação de sequências gênicas a partir do material extraído, foi realizada a PCR com os *primers* 16S RNAr para o Domínio Bacteria, utilizando 1 μL do material extraído (no caso das amostras extraídas por FC, o material foi diluído para a concentração de 50 ng/μL antes da sua utilização). Como resultado, foi observada a amplificação de todas as amostras testadas, entretanto com diferenças nas quantidades de produto obtido em cada reação (**Figura 9**).

As amostras extraídas por kit apresentaram produto amplificado com coloração mais fraca no gel, enquanto nas amostras extraídas por FC notamos bandas de coloração mais forte. Nós sugerimos que a quantidade de DNA utilizada em cada reação explicaria as diferenças observadas no gel, pois com a extração por kit obtivemos uma menor quantidade de material genético.

Para verificar se a quantidade de material genético obtida na extração por FC é devido também a presença de RNA, nós realizamos o tratamento das amostras com a enzima RNase e quantificamos as amostras resultantes. As amostras extraídas por fenol conservado a 4°C e por fenol congelado a -20°C resultaram em aproximadamente 762 ng/μL e 666 ng/μL de material genético, respectivamente, após o tratamento com a enzima. O resultado mostra que a maior parte do material quantificado anteriormente era composta de moléculas de RNA. Assim, na extração de DNA de amostras de fezes será adicionado o tratamento com RNase como procedimento padrão, uma vez que o interesse do estudo em questão é a identificação de patógenos a partir de amostras de DNA.

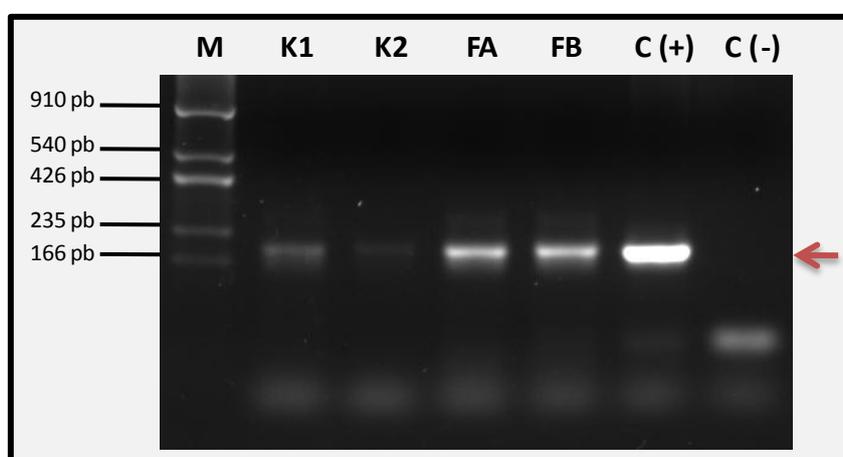


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR 16S RNAr Domínio Bacteria da padronização das extrações de DNA de amostras de fezes. K – “Amostra de DNA extraída pelo kit Invitrogen”; F – “Amostra de DNA extraída por fenol-clorofórmio”; 1 – “1ª eluição”; 2 – “2ª eluição”; A – “Fenol conservado a -20°C”; B – “Fenol conservado a 4°C”; C(+) – controle positivo *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pUC18 clivado com *DdeI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado (195 pb).

Como a extração clássica por fenol-clorofórmio apresentou um rendimento maior e bem expressivo de material genético, e a reação de PCR a partir dessa extração não apresentou inibidores, optamos por esse método de extração. Além disso, utilizando esse método reduzimos o gasto financeiro no monitoramento sanitário, considerando que o custo necessário para realizar a extração de DNA com fenol-clorofórmio é menor se comparado com o custo da mesma por meio de kits comerciais.

3.5 PCR para detecção de patógenos em amostras de lavado traqueal

Para a detecção de patógenos específicos, foi realizada a reação de PCR utilizando os *primers* publicados na literatura para cada táxon de interesse no monitoramento sanitário. As temperaturas e tempos para as reações de PCR foram padronizadas conforme a metodologia utilizada em cada estudo pesquisado. As concentrações de cada um dos reagentes foram padronizadas com as mesmas condições utilizadas nas reações-teste utilizando o marcador 16S RNAr universal para o Domínio Bacteria.

As reações de PCR para detecção dos patógenos *C. kutscheri*, *K. pneumoniae* e *S. pneumoniae* foram realizadas em Triplex (utilizado cada par de *primer* na mesma reação), conforme preconizado pela literatura, e utilizado como controle positivo uma amostra de *K. pneumoniae*. As reações para identificação de *S. aureus* e *B. bronchiseptica* foram realizadas em separado e com seus respectivos controles positivos. Já as reações para *Bacillus* ACR, *M. pulmonis*, Família *Pasteurellaceae*, *Pseudomonas* sp. e *S. moniliformis* foram realizadas em separado e devido a ausência de um controle positivo de cada patógeno foi utilizado o *primer* 16S RNAr e uma amostra de DNA de *Proteus* sp. como controle interno da reação. Os resultados obtidos de cada reação utilizando 10 amostras de DNA da extração padronizada são mostrados nas Figuras 10, 11, 12 e 13.

Na reação de PCR Triplex (*C. kutscheri*, *K. pneumoniae* e *S. pneumoniae*) não foi observado nenhum produto amplificado, nem mesmo o controle positivo (**Figura 10**). Como o controle positivo não foi amplificado, não podemos afirmar que as amostras são negativas para os microrganismos em questão. A reação deverá ser repetida para verificarmos se ocorreu inibição na mesma.

Já na reação utilizando marcador genético específico para espécie *S. aureus*, é possível observar bandas de tamanhos moleculares diferentes no gel em todas as amostras (**Figura 10**). O controle positivo foi amplificado e apresenta o tamanho molecular esperado de 499 pares de bases. Somente as amostras 4, 6, 7, 11 e 12 apresentam uma banda com tamanho esperado, entretanto as mesmas amostras apresentam produtos de amplificação de menor tamanho e de coloração mais intensa. As demais amostras também apresentam produtos de tamanho molecular menor do que

499 nucleotídeos, contudo a banda de tamanho esperado está ausente ou pouca nítida no gel para podermos afirmar se amplificou de fato.

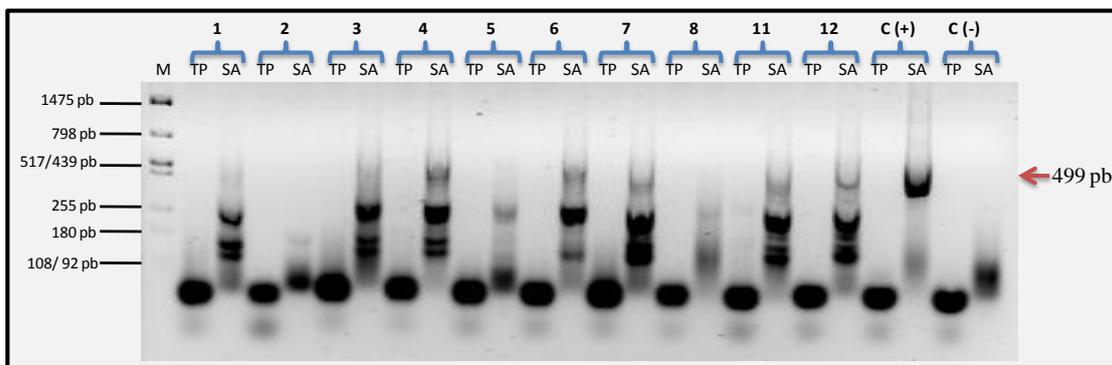


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR para detecção de patógenos específicos a partir de amostras de lavado traqueal. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 – “numeração de cada amostra avaliada”; TP – “Reação de PCR Triplex para detecção de *C. kutscheri*, *K. pneumoniae* e *S. pneumoniae*”; SA – “Reação de PCR para detecção de *S. aureus*”; C(+) TP – controle positivo *K. pneumoniae*; C(+) SA – controle positivo *S. aureus*; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pThioHys C clivado com *HinfI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado para *S. aureus* (499 pb).

Nas reações de PCR para a amplificação da sequência específica de *B. bronchiseptica*, verificamos produtos amplificados nas amostras 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11 e 12 (**Figura 11**). Todas essas amostras, assim como o controle positivo, apresentam o produto de amplificação com tamanho próximo do esperado (237 pares de bases), entretanto o controle apresenta uma banda com tamanho um pouco menor das bandas obtidas nas amostras estudadas. Nós sugerimos que possa ser um artefato na migração das amostras, pois a banda do controle interno utilizado para detecção de *Bacillus* ACR também parece estar um pouco abaixo do esperado (195 pares de bases), como mostrado na Figura 11. A migração do DNA no gel de agarose depende de vários fatores, como a conformação molecular do DNA, em que diferentes formas possuem mobilidades diferentes no gel (Sambrook & Russell, 2001). A amostra 8, em particular, apresenta bandas inespecíficas, além de uma banda com tamanho próximo do esperado.

Na tentativa de detecção da espécie *Bacillus* ACR, observamos bandas de coloração bem fraca no gel nas amostras 3, 4 e 8, com tamanho esperado de 267 pares de bases (**Figura 11**). Essas amostras da reação podem ser utilizadas em um segundo PCR utilizando os mesmos *primers*, com o intuito de aumentar a quantidade de fragmentos para termos certeza se de fato houve amplificação.

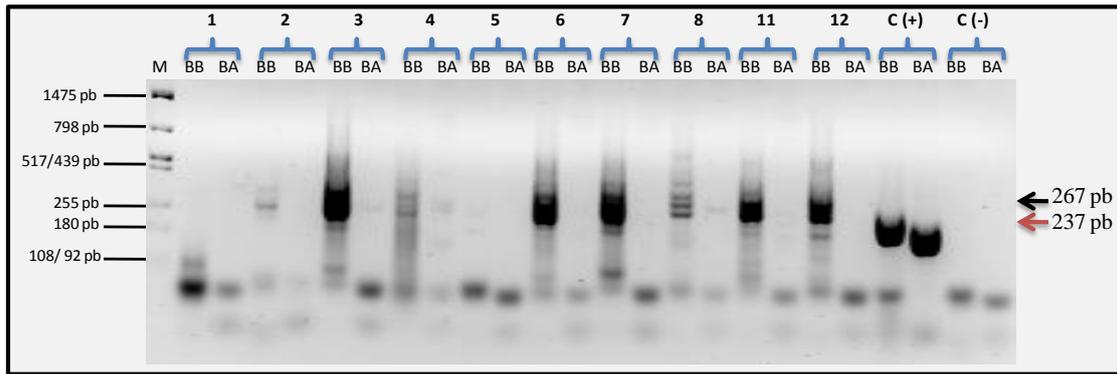


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR para detecção de patógenos específicos a partir de amostras de lavado traqueal. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 – “numeração de cada amostra avaliada”; BB – “Reação de PCR para detecção de *B. bronchiseptica*”; BA – “Reação de PCR para detecção de *Bacillus ACR*”; C(+) BB – controle positivo *B. bronchiseptica*; C(+) BA – controle positivo interno *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pThioHys C clivado com *HinfI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado para *B. bronchiseptica* (237 pb); ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado para *Bacillus ACR* (267 pb).

Na Figura 12 podemos observar os resultados da reação de PCR utilizando os *primers* específicos para *M. pulmonis*. Neste caso, esperávamos um produto de amplificação de 266 nucleotídeos, assim somente a amostra 7 parece ter uma banda próximo desse tamanho, além de produtos amplificados inespecíficos. As amostras 1, 6 e 12 também apresentaram no gel bandas de produtos inespecíficos.

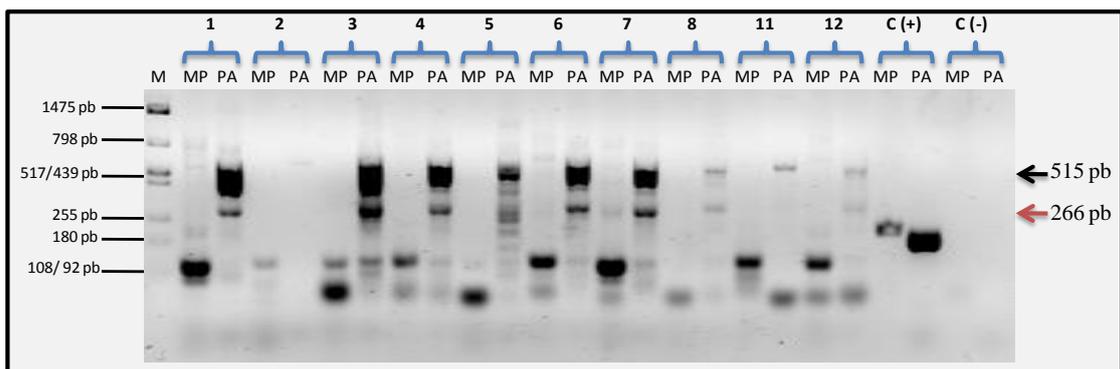


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR para detecção de patógenos específicos a partir de amostras de lavado traqueal. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 – “numeração de cada amostra avaliada”; MP – “Reação de PCR para detecção de *M. pulmonis*”; PA – “Reação de PCR para detecção de Família *Pasteurellaceae*”; C(+) MP e PA – controle positivo interno *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pThioHys C clivado com *HinfI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado para *M. pulmonis* (266 pb); ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado para Família *Pasteurellaceae* (515 pb).

Já nas reações de PCR mostradas na Figura 12 para a identificação de espécies da família *Pasteurellaceae*, observamos a amplificação de todas as amostras com produto de tamanho esperado de 515 pares de bases. A exceção das amostras 2 e 11 que apresentam uma única banda no gel, em todas as demais amostras notamos produtos inespecíficos amplificados de menor tamanho.

Para a detecção de *S. moniliformis* foram utilizados marcadores moleculares específicos para a espécie e os resultados são mostrados na Figura 13. A princípio, não foi amplificado produto com o tamanho esperado de 296 pares de bases em nenhuma amostra, entretanto as amostras 3, 4, 7 e 11 apresentam bandas de tamanho próximo a esse valor, mas com menos nucleotídeos. Novamente, notamos a presença de produtos inespecíficos nas reações de PCR.

A última reação de PCR realizada foi para a detecção de sequências específicas para as bactérias do gênero *Pseudomonas*. Na Figura 13, podemos verificar a presença de amplificação de um produto de tamanho esperado de 618 nucleotídeos, de modo que a banda desse produto apresenta uma intensidade bem forte no gel. Nas amostras 3, 4, 6, 7, 11 e 12 há a presença de sequências amplificadas inespecíficas de intensidade mais fraca no gel.

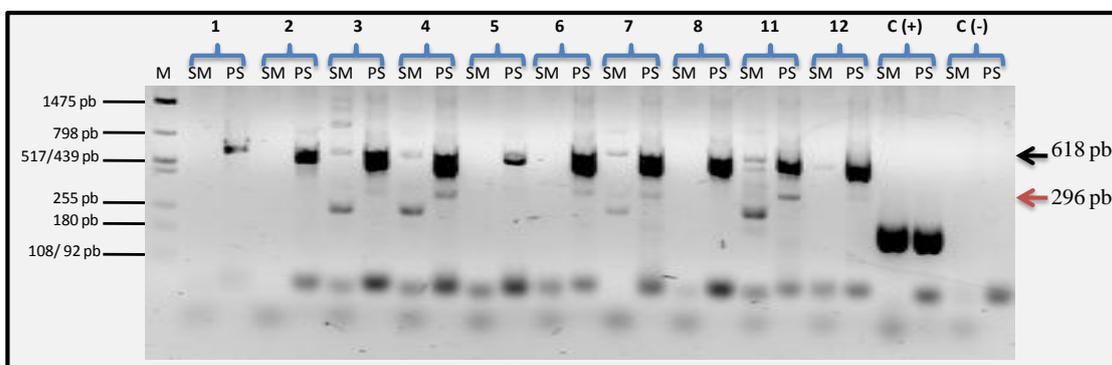


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR para detecção de patógenos específicos a partir de amostras de lavado traqueal. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12 – “numeração de cada amostra avaliada”; SM – “Reação de PCR para detecção de *S. moniliformis*”; PS – “Reação de PCR para detecção de *Pseudomonas* sp.”; C(+) SM e PS – controle positivo interno *Proteus* sp.; C(-) – controle negativo; M – Marcador molecular pThioHys C clivado com *HinfI*; ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado para *S. moniliformis* (296 pb); ← Seta indicativa do fragmento de tamanho esperado para *Pseudomonas* sp. (618 pb).

Ao analisar as quatro figuras, notamos que em muitas reações muitos produtos de amplificação apresentaram bandas de intensidade muito forte no gel. Tal resultado é um indicativo que há um excesso de DNA utilizado na reação, de modo que sugerimos como perspectiva testar as reações utilizando quantidades menores de DNA diluídas em série, assim será possível a visualização mais clara do tamanho dos produtos obtidos nessas reações.

Os produtos amplificados inespecíficos apresentados nas reações de PCR para identificação das bactérias *S. aureus*, *B. bronchiseptica*, *M. pulmonis*, da família *Pasteurellaceae*, *S. moniliformis* e *Pseudomonas* sp. podem ser artefatos da técnica utilizada, uma vez que é possível a formação de estruturas secundárias durante a reação, que impedem a completa amplificação da sequência. Outros fatores devem ser mencionados, tais como a possibilidade de amplificação de sequências gênicas desconhecidas e o aumento do anelamento inespecífico dos *primers* devido a concentração de $MgCl_2$, como já sugerido na padronização das reações de PCR 16S RNAr. Na tentativa de analisar os produtos amplificados e avaliar melhor as reações de PCR, o sequenciamento das amostras obtidas deverá ser feito futuramente.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram feitos ensaios de padronização das metodologias e técnicas para a realização da coleta de amostras microbiológicas de ratos Wistar criados em dois sistemas de alojamento distintos, do isolamento de espécies de bactérias cultiváveis em aerobiose, da extração do DNA bacteriano a partir de colônias isoladas e de amostras de lavado traqueal e fezes e, por fim, da reação de PCR a partir de marcadores moleculares conhecidos para identificação das espécies de bactérias presentes na microbiota dos animais.

Para a identificação das bactérias presentes na microbiota do trato respiratório e intestinal dos animais, foram padronizadas as extrações de DNA das colônias, de modo que a escolha por fervura a 100°C das colônias foi uma metodologia apresentada com baixo custo e menos laboriosa, contudo sem ser totalmente eficiente, pois muitas amostras tiveram a reação de PCR inibida. O uso da proteinase K pode servir como alternativa ou método padrão, pois obtivemos melhor eficiência no sucesso de amplificação de DNA extraído por meio do tratamento com essa enzima. Por outro lado, mesmo utilizando a proteinase K, tivemos amostras que resultaram em PCR negativo, além do que o uso da enzima apresenta custo e tempo de execução maior se comparado com o método por fervura. Como as células apenas foram lisadas em ambos os métodos, nós sugerimos a utilização de outras metodologias que garantam material genético purificado e livre de inibidores, como a extração de DNA com fenol-clorofórmio.

Para o isolamento de bactérias coletadas por suabe a partir da traqueia e ceco dos animais, obtivemos um número bem expressivo de bactérias, em sua maioria de origem intestinal. Em comparação aos dois sistemas de alojamento do CREAL, notamos um maior número de bactérias isoladas de animais criados no sistema IVC. Entretanto, essas diferenças podem ser apenas amostrais, sem de fato revelar a verdadeira diversidade presente nos animais, uma vez que muitas bactérias podem ter sido isoladas mais de uma vez, pois muitas bactérias apresentam polimorfismos de colônia e a mesma bactéria pode ter crescido em mais de um meio de cultura e apresentar variações morfológicas em cada meio utilizado. Outro fator importante foi a presença de bactérias com crescimento do tipo véu em muitas placas de meio de cultura a partir de amostras

de origem fecal, o que excluiu a possibilidade de isolamento de bactérias que cresceram, contudo foram envolvidas pelo véu, assim modificando o número de microrganismos isolados. Após o sequenciamento das amostras obtidas na reação de PCR positivas, poderemos avaliar e discutir melhor os dados coletados neste trabalho.

Nas extrações de DNA e reações de PCR a partir de amostras coletadas por lavagem da traqueia dos animais tivemos as maiores dificuldades na padronização. O uso do método de extração com fenol-clorofórmio, apesar de menor custo, resultou em baixo rendimento de DNA extraído, de modo que a metodologia utilizando kits comerciais apresentou-se mais eficiente nesse requisito, além de reduzir o tempo utilizado na execução da extração de DNA. Para a padronização das reações de PCR foram testadas diferentes condições, contudo evidenciamos a presença de inibidores em muitas amostras utilizadas. Ao comparar dois kits comerciais, tivemos melhor resultado, com maior quantidade de DNA extraído e com ausência ou reduzida inibição de amplificação na reação de PCR, quando foi utilizado o kit da marca Stratec, portanto optamos em padronizar a detecção molecular de patógenos específicos utilizando esse kit. Um fator importante que deve ser considerado é a necessidade de padronização da quantidade de DNA extraído de cada amostra de lavado traqueal coletada a ser utilizada nas reações de PCR, pois tivemos diferenças nas amplificações. Apesar do maior custo em utilizar o kit escolhido, em comparação a outro kit e ao método com fenol-clorofórmio, o monitoramento microbiológico deve ser padronizado com métodos eficientes e confiáveis para a validação do *status* sanitário dos animais de forma precisa e correta, de modo que o uso desse kit neste momento apresentou-se com resultados satisfatórios.

Já nas extrações de DNA de amostras de fezes dos animais, assim como nas reações de PCR utilizando o produto dessas extrações, não tivemos grandes dificuldades nos testes realizados de padronização. O método de extração com fenol-clorofórmio, em comparação a extração por kit comercial, apresentou-se eficiente, com alto rendimento de DNA extraído e com ausência de inibidores. Entretanto, devemos testar essa metodologia com outras amostras de fezes para verificar se a eficiência foi específica a uma amostra ou pode ser padronizada de modo geral. O uso do método de extração com fenol-clorofórmio, se efetivamente padronizada, reduzirá o custo necessário para a realização do monitoramento sanitário.

As primeiras tentativas de detecção de patógenos específicos do trato respiratório dos animais criados no CREAL foram realizadas, utilizando marcadores moleculares publicados na literatura científica. A maioria das reações de PCR realizadas apresentou produtos de amplificação de tamanhos inespecíficos variáveis, o que não era esperado, pois os *primers* pesquisados foram desenhados para o anelamento em regiões específicas e conservadas das sequências gênicas das bactérias de interesse deste trabalho, além disso, foram validados com diferentes metodologias. É possível que as condições utilizadas na padronização das reações de PCR tenham interferido nos resultados aqui apresentados.

Apesar da amplificação de sequências inespecíficas, tivemos amostras com produtos de amplificação de tamanho esperado. Nós podemos mencionar que tal resultado é um indicativo da presença de determinado patógeno no animal, entretanto para evitar conclusões precipitadas e errôneas, os produtos gênicos obtidos devem ser sequenciados para a confirmação da detecção e validação da técnica utilizada.

A partir do sequenciamento das amostras obtidas, poderemos conhecer melhor a microbiota bacteriana dos animais, assim como explicar melhor os resultados obtidos na padronização das metodologias escolhidas, e, por fim, propor estratégias ou alternativas para monitorar a presença ou ausência de bactérias patogênicas e avaliar o *status* sanitário dos animais criados no CREAL.

5. PERSPECTIVAS

Este projeto tem como perspectivas:

- Realização de extração de DNA com fenol-clorofórmio das amostras em que a reação de PCR foi negativa;
- Purificação das amostras de PCR positivas e a realização do sequenciamento dos fragmentos;
- Realização da extração de DNA de amostras de fezes e da reação de PCR utilizando marcadores específicos para os patógenos de interesse;
- Avaliar o *status* sanitário dos animais criados no CREAL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, A.; Pinto, S.C.; Oliveira, R.S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. Disponível em SciELO Books, 2002.
- Baratto, C.M. & Megiolaro, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 3, n. 1, p.121-130, 2012.
- Baker, D.G. Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research. **Clinical Microbiology Reviews**. 11 (2), p.231–66, 1998.
- Bendtsen, K.M.B.; Krych, L.; Sorensen, D.B.; Pang, W.; Nielsen, D.S.; Josefsen, K.; Hansen, L.H.; Sorensen, S.J.; Hansen, A.K. Gut Microbiota Composition Is Correlated to Grid Floor Induced Stress and Behavior in the BALB/c Mouse. **PLOS ONE**. 7, 2012.
- Benga, L.; Benten, W.P.; Engelhardt, E.; Köhrer, K.; Gougoula, C.; Sager, M. 16S ribosomal DNA sequence-based identification of bacteria in laboratory rodents: a practical approach in laboratory animal bacteriology diagnostics. **Laboratory Animals**. 48(4), p.305-12, 2014.
- Brooks, S.P.; McAllister, M.; Sandoz, M.; Kalmokoff, M.L. Culture-independent phylogenetic analysis of the faecal flora of the rat. **Canadian Journal of Microbiology**. 49(10), p.589-601, 2003.
- Boot, R.; Oosterhuis, A.; Thuis, H.C.W. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. **Laboratory Animals**. 36, p.200-208, 2002.
- Bootz, F.; Kirschnek, S.; Nicklas, W.; Wyss, S.K.; Homberger, F.R. Detection of *Pasteurellaceae* in rodents by polymerase chain reaction analysis. **Laboratory Animal Science**. 48(5), p.542-546, 1998.
- Brielmeier, M.; Mahabir, E.; Needham, J.R.; Lengger, C.; Wilhelm, P; Schmidt, J. Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: a field study. **Laboratory Animals**. 47, p.247-260, 2006.
- Buckingham, L. **Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications**. 2nd edition, editora F. A. Davis, 2012.

Burke, J.G.; Van Hoosier, G.L.Jr.; Trentin, J.J. Cesarean derivation and Foster nursing of strain LSH inbred hamsters. **Laboratory Animal Care**. 20(2), p.238-41, 1970.

Cai, H.Y.; Caswell, J.L.; Prescott, J.F. Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective. **Veterinary Pathology**. 51(2), p.341-50, 2014.

Clarridge, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. 17(4), p.840-62, 2004.

Clough, G.; Wallace, J.; Gamble, M.R.; Merryweather, E.R.; Bailey, E. A positive, individually ventilated caging system: a local barrier system to protect both animals and personnel. **Laboratory Animals**. 29(2), p.139-51, 1995.

Cundiff, D.D.; Besch-Williford, C.; Hook, R.R. Jr; Franklin, C.L.; Riley, L.K. Detection of Cilia-Associated Respiratory *Bacillus* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. 32(8), p.1930-4, 1994.

Feldman, S.H. Diagnostic molecular microbiology in laboratory animal health monitoring and surveillance programs. **Laboratory Animals**. 30 (10), p.34-42, 2001.

Frajblat, M.; Amaral, V.L.L.; Rivera, E.A.B. Ciência em animais de laboratório. **Ciência e Cultura**. vol.60, n.2, p.44-46, 2008.

Francis, C. M. A Field Guide to the Mammals of South East Asia: NHBS, New Holland Publishers, p.346, 2008.

Fouts, D.E.; Torralba, M.; Nelson, K.E.; Brenner, D.A.; Schnabl, B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. **Journal of Hepatology**. 56 (6), p.1283-1292, 2012.

Hayashimoto, N.; Goto, K.; Takakura, A.; Itoh, T. Isolation and identification procedure for *Staphylococcus aureus* in laboratory mice and rats by combined use of chromogenic X-SA agar and specific polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**. 71(1), p.27-32, 2009.

Hozbor, D.; Fouque, F.; Guiso, N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. **Research in Microbiology**. 150(5), p.333-41, 1999.

- Jeong, E.S.; Lee, K.S.; Heo, S.H.; Seo, J.H.; Choi, Y.K.. Rapid identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium kutscheri*, and *Streptococcus pneumoniae* using triplex polymerase chain reaction in rodents. **Experimental Animals**. 62(1), p.35-40, 2013.
- Kreader, C.A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. **Applied and Environmental Microbiology**. 62(3), p.1102-6, 1996.
- Lapchik, V.B.V.; Mattaraia, V.G.M.; Ko, G.M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. Editora Atheneu – São Paulo, 2010.
- Lindsey, J.R. Historical Foundations. In: Baker, H.J.; Lindsey, J.R.; Weisbroth, S.H.; eds. **The Laboratory Rat**, Vol. I. Academic Press, NY, p.1–36, 1979.
- Liu, Z.; DeSantis, T. D.; Andersen, G. L.; Knight, R. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. **Nucleic Acids Research**. 36, 2008.
- Mähler, M.; Berard, M.; Feinstein, R.; Gallagher, A.; Illgen-Wilcke, B.; Pritchett-Corning, B.; Raspa, M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Laboratory Animals**. 48 (3), p.178-192, 2014.
- Markoulatos, P.; Sifakas, N.; Moncany, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. 16(1), p.47-51, 2002.
- McInnes, E.F.; Rasmussen, L.; Fung, P.; Auld, A.M; Alvarez, L.; Lawrence, D.A.; Quinn, M.E.; del Fierro, G.M.; Vassallo, B.A.; Stevenson, R. Prevalence of viral, bacterial and parasitological diseases in rats and mice used in research environments in Australasia over a 5-y period. **Laboratory Animals**. 40(11), p.341-50, 2011.
- Muyzer, G.; de Waal, E.C.; Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. 59, p.695–700, 1993.

Nicklas, W.; Baneux, P.; Boot, R.; Decelle, T.; Deeny, A.A.; Fumanelli, M.; Illgen-Wilcke, B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Laboratory Animals**. 36, p.20-42, 2002.

Packey, C.D.; Shanahan, M.T.; Manick, S.; Bower, M.A.; Ellermann, M.; Tonkonogy, S.L.; Carroll, I.M.; Sartor, R.B. Molecular detection of bacterial contamination in gnotobiotic rodent units. **Gut Microbes**. 4(5), p.1-10, 2013.

Parkinson, C.M.; O'Brien, A.; Albers, T.M.; Simon, M.A.; Clifford, C.B.; Pritchett-Corning, K.R. Diagnostic necropsy and selected tissue and sample collection in rats and mice. **Journal of Visualized Experiments**. 7 (54), p.1-6, 2011.

Pritchett-Corning, K.R.; Shek, W.R.; Henderson, K.S; Clifford, C.B. Companion Guide to Rodent Health Surveillance for Research Facilities. Wilmington 01, 2ª edição, publicado por **Charles River**, 2010.

Riyaz-Ul-Hassan, S.; Verma, V.; Qazi, G.N. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Food Microbiology**. 25(3), p.452-9, 2008.

Sambrook, J. & Russel, D. W. **Molecular Cloning**. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

Salzman, N.H; Jong, H.; Paterson, Y.; Harmsen, H.J.M; Welling, G.W.; Bos, N.A. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. **Microbiology**. 148, p.3651–3660, 2002.

Seok, S.; Park, J.; Cho, S.; Baek, M.; Lee, H.; Kim, D.; Yang, K.; Jang, D.; Han, B.; Nam, K.; Park, J. Health surveillance of specific pathogen-free and conventionally-housed mice and rats in Korea. **Experimental Animals**. 54 (1), p.85-92, 2005.

Spilker, T.; Coenye, T.; Vandamme, P.; LiPuma, J.J. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(5), p.2074-9, 2004.

Tedesco, J.T.G.; Blatt, S.L.; de Cordova, C.M.M. Infecção por *Mycoplasma pulmonis* em ratos Wistar provenientes de biotério. **Revista de Patologia Tropical**. vol.40 (4), p.279-286, 2011.

van Kuppeveld, F.J.; Melchers, W.J.; Willemse, H.F.; Kissing, J.; Galama, J.M.; van der Logt, J.T. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in experimentally infected laboratory rats by 16S rRNA amplification. **Journal of Clinical Microbiology**. 31(3), p.524-7, 1993.

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

Williams, F.D.; & Schwarzhoff, R.H. Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. **Annual Review of Microbiology**. 32, p.101-22, 1978.

Zoetendal, E.G.; Collier, C.T.; Koike, S.; Mackie, R.I.; Gaskins, H.R. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. **The Journal Nutrition**. 134(2), p.465-72, 2004.