

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS DE CAMUNDONGOS N:NIH(S), DESTINADOS A TESTES BIOLÓGICOS DE VACINAS BACTERIANAS.

Sandra Regina ALEXANDRE *
Sandra Fernandes LOPES **
Carlos RIGHETTI NETO ***
Maria Ivette Carboni MALUCELLI **

RESUMO — O presente estudo objetivou caracterizar os microrganismos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, potencialmente patogênicos para camundongos N:NIH(S), utilizados como modelo biológico nas provas de toxidez e potência da vacina Pertussis. As amostras de fezes foram tratadas e semeadas em meio de enriquecimento e seletivos, sendo os microrganismos isolados submetidos às provas de identificação bioquímica. Foram isolados: *Escherichia coli* (72%), *Lactobacillus sp.* (67%), enterococos (66%), *Proteus mirabilis* (25%), *Enterobacter cloacae* (10%), *Pseudomonas aeruginosa* (7%) e *Acinetobacter sp.* (4%)
UNITERMOS: *Enterobacteriaceae*, bactérias intestinais, microbiota intestinal de camundongos.

INTRODUÇÃO

Os animais estão usualmente associados com uma grande gama de microrganismos e parasitas, alguns adquiridos por via transplacentária e a maioria do meio ambiente. Alguns destes são responsáveis por doenças infecciosas, outros são necessários para o desenvolvimento normal do hospedeiro, entretanto, o efeito da grande maioria é relativamente desconhecido (Trexler¹⁵).

Assim a microbiota intestinal de camundongo foi estudada intensivamente por Schaedler & Dubos¹², registrando que os animais até o nascimento apresentam-se livres de germes.

* Seção de Biotério Geral
** Seção de Vacinas Bacterianas
*** Setor de Lav. Est. e Meios de Cultura
Instituto Butantan — C.P. 65 — 01051 — São Paulo — SP
Recebido para publicação em 8/8/1988 e aceito em 2/3/1989.

Em camundongos a invasão bacteriana do trato intestinal ocorre inicialmente por contaminação materna, através do material fecal e leite. Para que os microrganismos sobrevivam na superfície do intestino delgado devem superar duas pressões de remoção. A primeira delas é o rápido esvaziamento do conteúdo intestinal e a segunda, a contínua modificação das células do epitélio intestinal (Lee⁸).

As diferentes etapas da invasão bacteriana do trato intestinal por *Lactobacillus*, enterococos, bacilos coliformes e bacteróides foram definidos por Lee e cols⁷ e Savage¹¹.

Quanto ao gênero *Pseudomonas*, Flynn⁴ estabeleceu o índice permissível de 10 a 20% para colônias convencionais.

Autores como Hagen e cols⁵, Itoh e cols⁶, registraram diferenças sensíveis na microbiota intestinal de diferentes linhagens de camundongos. Entretanto, não ficou estabelecido se tais diferenças eram devidas a fatores genéticos, uma vez que animais mantidos em um mesmo ambiente podem exibir certas particularidades com relação a biota intestinal; ao manejo inadequado ou à luta entre hospedeiro e biota pelos nutrientes presentes na dieta, determinando distúrbios não específicos e modificando as condições fisiológicas do trato digestivo (Schaedler e cols¹³).

Segundo Manclark⁹ e Desbord & Suire¹, o sucesso e reprodutibilidade dos testes de toxicidade e potência, da referida vacina, dependem da suscetibilidade, uniformidade, comportamento imunológico e estado sanitário do camundongo, uma vez que animais pertencentes a uma mesma linhagem não respondem de maneira idêntica aos testes.

Assim sendo, o conhecimento da carga microbiana dos modelos biológicos utilizados no controle de produtos imunobiológicos é de fundamental importância.

Com este escopo, no presente trabalho foi realizado um estudo das bactérias intestinais aeróbias da colônia de camundongos albinos, variedade N:NIH (S), convencional, em diferentes faixas etárias, objetivando definir sanitariamente o modelo biológico utilizado nas provas de toxicidade e potência da vacina Pertussis, produzida no Instituto Butantan, contribuindo assim para a interpretação mais adequada dos testes e melhor controle destes parâmetros.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos albinos, variedade N:NIH(S) originários do National Institute of Health, Bethesda - Maryland, USA, mantidos como colônia fechada no biotério da Seção de Vacinas Bacterianas do Instituto Butantan, desde junho de 1983.

Os animais foram mantidos em gaiolas convencionais de polipropileno, sendo utilizada maravalha de pinho ou cedro como cama. Tanto as gaiolas como as camas foram autoclavadas a 120°C por uma hora. A higienização das gaiolas consistia em uma troca semanal.

A ração proveniente de um único fornecedor, bem como a água administrada aos animais, foram autoclavadas a 120°C durante 10 a 60 minutos respectivamente. Um suplemento vitamínico foi adicionado à água dos bebedouros, ministrada duas vezes por semana.

Dos 5.000 animais existentes, foram escolhidos ao acaso 112 camundongos, divididos em quatro faixas etárias: grupo A até 30 dias de idade

(fase pré-desmame); grupo B de 31 a 60 dias (fase em que são submetidos a testes); grupo C de 61 a 90 dias (início da vida reprodutiva) e grupo D de 91 a 180 dias (final de vida reprodutiva).

Após eutanásia por fratura cervical, através de laparotomia em cabine de fluxo laminar, foram colhidas amostras do jejuno e do cecum; a mucosa intestinal e conteúdo abdominal foram macroscopicamente examinados.

Aproximadamente 1g de fezes foi diluído em 10 ml de soro fisiológico 0,85%, estéril. Dessa suspensão 0,1 ml foi semeado em 10 ml de água de peptona 1% e mantida em estufa a 37°C, em aerobiose, por 24 horas, para enriquecimento da amostra (Edwards & Ewing³).

Para o isolamento bacteriano foram utilizados meios seletivos, tais como: Holt Harris Teague e Mac Conkey, para bacilos Gram-negativos; Agar Corynebacterium, para corinebactérias; Agar Sangue e Agar Manita, para enterococos e Agar Glicosado camada alta, para Lactobacilos. Todos os meios foram mantidos em estufa a 37°C por 24 horas, exceção feita ao Agar Manita e Sangue mantidos a 45°C por 24 horas.

Tanto o meio de enriquecimento como os seletivos foram produzidos no Setor de Meios de Cultura do Instituto Butantan seguindo as formulações originais (Difco²).

Após a obtenção de colônias isoladas, procedeu-se à identificação bacterioscópica através do método de Gram.

Para a identificação das bactérias Gram-negativas, foram realizadas provas bioquímicas, utilizando-se o sistema Bac-Tray (Difco) de identificação.

Para as bactérias Gram-positivas foram utilizados Agar glicosado, Agar Sangue e Agar Manita que diferenciam os enterococos dos demais Streptococos e Lactobacillus quando cultivados a 45°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais analisados não apresentaram sintomas de diarreia. Nas análises macroscópicas não se evidenciaram alterações na mucosa intestinal ou nas vísceras abdominais.

A freqüência de positividade dos microrganismos aeróbios isolados e identificados das fezes dos camundongos referem-se nas Tabelas 1 e 2.

O gênero *Corynebacterium* foi pesquisado em todas as amostras coletadas, não sendo detectada sua presença.

TABELA 1

Valores da freqüência de bactérias detectadas em fezes de 112 camundongos correspondentes a todas as faixas etárias.

Microrganismos	Número de Animais	Freqüência encontrada (%)
Escherichia coli	112	72
Lactobacillus sp.	112	67
enterococos	112	66
Proteus mirabilis	112	25
Enterobacter cloacae	112	10
Pseudomonas aeruginosa	112	07
Acinetobacter sp.	112	04

Pela Tabela 1, observamos que a biota intestinal aeróbia é predominantemente composta por *Escherichia coli* (72%) seguido pelos *Lactobacillus sp.* (67%), enterococos (66%) e *Proteus mirabilis* (25%).

Segundo Lee e cols⁷ e Savage¹¹, *Escherichia coli* invade o intestino do camundongo por volta do décimo dia de vida, sendo o responsável pelo consumo de oxigênio residual, propiciando o estabelecimento da microbiota anaeróbia. A predominância deste microrganismo no grupo A pode estar relacionada com o início da alimentação por meio de ração peletizada, favorecendo sua invasão e proliferação (Lee⁸). A diminuição gradativa de *Escherichia coli*, nos diversos grupos etários, sugere a invasão de outros microrganismos e a respectiva competitividade por seus nichos específicos.

A colonização do gênero *Lactobacillus* ocorre aos dois dias de vida, pelo fato da alimentação inicial do camundongo ser exclusivamente de leite materno (Lee e cols⁷ e Savage¹¹), estabelecendo-se no estômago, intestino delgado e grosso (Schaedler e cols¹²). A freqüência de positividade deste microrganismo, em nossos estudos, mostrou-se elevada em todas as faixas etárias (Tabela 2) demonstrando grande adaptação ao ecossistema intestinal como já demonstrado por Itoh & Oowada⁶.

TABELA 2

Valores da freqüência de ocorrência de bactérias detectadas em fezes de grupos compostos por 28 camundongos em diferentes faixas etárias.

Microrganismo	Grupos (dia/idade)			
	A Até 30	B 31-60	C 61-90	D 91-180
<i>Escherichia coli</i>	89%	71%	68%	61%
<i>Lactobacillus sp.</i>	68%	64%	68%	68%
enterococos	64%	68%	64%	68%
<i>Proteus mirabilis</i>	14%	36%	25%	25%
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	11%	14%	14%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4%	—	7%	18%
<i>Acinetobacter sp.</i>	4%	4%	4%	4%

Já para os enterococos, existem controvérsias quanto sua fase de invasão (Lee e cols⁷ e Savage¹¹). Em nossos estudos este microrganismo encontra-se presente em todos os grupos analisados com alta freqüência de positividade (Tabela 2). Como no grupo anterior a alta freqüência demonstra sua habilidade em adaptar-se ao ecossistema intestinal.

Quanto ao *Proteus mirabilis*, observamos sua estabilização após 60 dias com positividade de 25% (Tabela 2). Nossos resultados apresentam-se intermediários aos de Hagen e cols⁵ 9% e Srivastava e cols¹⁴ 33%. Segundo Desbordes & Suire¹, camundongos previamente sensibilizados com esse microrganismo, no teste de toxicidade, apresentam taxa de crescimento inferior à do grupo controle.

Enterobacter cloacae foi isolado a partir de 30 dias com positividade de

11%. Esse resultado diverge dos estudos de Lee e cols⁷ e Savage¹¹ que registraram sua implantação, no intestino de camundongo, aos dez dias de vida. Assim como nos demais grupos sua estabilização ocorreu aos 60 dias com positividade de 14% (Tabela 2), apresentando-se superior a encontrada por Srivastava e cols¹⁴ 2%.

O gênero *Pseudomonas aeruginosa*, nas diferentes faixas etárias, apresentou variações nas freqüências de positividade (Tabela 2), provavelmente pelo baixo poder de invasão apresentado pelo microrganismo (Millican¹⁰). Embora esse microrganismo apresente baixa virulência, e as freqüências obtidas encontrem-se dentro dos índices estabelecidos por Flynn⁴ para colônias convencionais, devemos levar em consideração sua presença indesejável em estudos que envolvam stress, como os de infecção experimental.

A freqüência de *Acinetobacter sp.*, manteve-se constante em todas as faixas etárias analisadas 4% (Tabela 2). Esse microrganismo não foi detectado em nenhum estudo realizado sobre a biota intestinal de camundongos não sendo possível prever seu efeito quando em associação com a vacina Pertussis.

CONCLUSÕES

A microbiota intestinal da linhagem de camundongos N:NIH(S) apresenta pequena diversificação de espécies, aeróbias, dentro do ponto de vista sanitário é bastante satisfatório.

A estabilização da comunidade clímax, do ecossistema intestinal, foi atingida aos 60 dias de vida do animal. Este pode ser um fator desfavorável, no que diz respeito à faixa etária em que os animais são utilizados nos testes (31-60 dias) uma vez que, a uniformidade e o comportamento imunológico são de fundamental importância para a interpretação dos testes de toxicidade da vacina Pertussis.

Além disso, na faixa etária de 31-60 dias, foram isolados microrganismos como *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* que podem interferir de maneira adversa na prova de toxicidade quando em associação com a vacina Pertussis, caracterizando uma interpretação inadequada dos resultados obtidos, como já demonstrado por Manclark⁹ e Desbordes & Suire¹.

A literatura não cita a ação de *Acinetobacter sp.*, no camundongo em teste, devendo ser estudado seus efeitos quando administrada a vacina Pertussis.

ABSTRACT: The object of the present study was to characterize the organisms, aerobic, potentially pathogenic to N:NIH(S) mice, used as biological models on the toxic and Pertussis vaccine tests. The samples of faeces were treated and propagated by means of enrichment and selective procedures, and the isolated microorganisms were submitted to biochemical identification.

Isolated were: *Escherichia coli* (72%), *Lactobacillus sp.* (67%), enterococci (66%), *Proteus mirabilis* (25%), *Enterobacter cloacae* (10%), *Pseudomonas aeruginosa* (7%) and *Acinetobacter sp.* (4%).

KEYWORDS: *Enterobacteriaceae*, *intestinal bacteria*, *intestinal microbiota of mice*.

ALEXANDRE, S.R.; LOPES, S.F.; RIGHETTI NETO, C.; MALUCELLI, M.I.C. Isolamento e identificação de bactérias intestinais de camundongos N:NIH (S), destinados a testes biológicos de vacinas bacterianas. *Mem. Inst. Butantan*, 51(2): 57-62, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DESBORDES, J & SUIRE, A. A propos du contrôle vaccin anticoquelucheux. *Progr. Immunobiol. Standard*, 4: 592-596, 1970.
2. DIFCO LABORATORIES, DETROIT, Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiology. 20. ed. Detroit, Difco Laboratories, 1984.
3. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. Isolation and preliminary identification of Enterobacteriaceae. In:— *Identification of Enterobacteriaceae*. 4. ed. Mineápolis, Burgers Publishing, 1976. p. 10-23.
4. FLYNN, R. J. Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* infection and its effects on biological and medical research. *Lab. anim. Care*, 13: 1-5, 1963.
5. HAGEN, C. A.; BARBERA, P. W.; BLAIR, W. H.; SHEFNER, A. W.; POILEY, S. M. Similarity of intestinal microflora of BDF₁ conventional mice from different sources and of different ages. *Lab. anim. Care*, 18: 550-556, 1968.
6. ITOH, K. & OOWADA, T. Characteristic faecal flora of NC mice. *Lab. Anim.*, 19: 7-15, 1985.
7. LEE, A.; GORDON, J.; LEE, C. J.; DUBOS, R. The mouse intestinal flora with emphasis on the strict anaerobes. *J. exp. Med.*, 133: 339-352, 1971.
8. LEE, A. Neglected Niches: The microbial ecology of gastrointestinal tract. In: Marshall K. C. *Advances in microbial ecology*. New York. Plenum Press, 1985. v. 8. p. 115-162.
9. MANCLARK, C. R. Selective breeding to establish a standard mouse for Pertussis vaccine bioassay II. Bioresponce of mice susceptible and resistant to sensitization by Pertussis vaccine HSF. *J. Biol. Stand.* 3: 353-367, 1975.
10. MILLICAN, R. C. *Pseudomonas aeruginosa* infection and its effects in non-radiation stress. *Lab. anim. Care.*, 13: 11-19, 1963.
11. SAVAGE, D. C. Defining the gastrointestinal microflora of laboratory mice. *Ilar News*, 12(3): 22, 1969.
12. SCHAEGLER, R. W. & DUBOS, R. J. The fecal of various strains of mice. Its bearing in their susceptibility to endotoxin. *J. exp. Med.*, 115: 1149-1159, 1962.
13. SCHAEGLER, R. W.; DUBOS, R. J.; COSTELLO, R. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J. exp. Med.*, 122: 59-66, 1965.
14. SRIVASTAVA, L.; MATHEW, T.; SURI, J. C.; EDWARD, E. J.; SOOD, P. L. Carriage of *Salmonella* species by laboratory animals. *Ind. j. Pathol. Microbiol.*, 23: 69-72, 1980.
15. TREXLER, P. C. Gnotobiotic animals. IN: THE UFAW. *Handbook on the care and management of laboratory animals*. 5 ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1976. p. 135-146.