REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

ANÁLISE MOLECULAR DE PARTÍCULAS DE AR COMO ESTRATÉGIA INOVADORA PARA VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE COLÔNIAS SPF EM SISTEMAS IVC

MOLECULAR ANALYSIS OF AIR PARTICLES AS AN INNOVATIVE STRATEGY FOR SANITARY SURVEILLANCE OF SPF COLONIES IN IVC SYSTEMS

ANÁLISIS MOLECULAR DE PARTÍCULAS DE AIRE COMO ESTRATEGIA INNOVADORA PARA LA VIGILANCIA SANITARIA DE COLONIAS SPF EN SISTEMAS DE IVC

Camilla Ribeiro Nery
Mestre, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: camillarnery@gmail.com

Maria Inês Doria Rossi
Doutora, ICTB - Fundação Oswaldo Cruz, Brasil
E-mail: midoria3@gmail.com

Lília de Cássia Espírito Santo
Mestre, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: esanto.lc@gmail.com

Cladinara Roberts Sarturi
Especialista, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: cladinara@gmail.com

Joseli Maria da Rocha Nogueira
Doutora, DCB – ENSP - Fundação Oswaldo Cruz, Brasil
E-mail: joseli.maria@fiocruz.br

Resumo

Animais de laboratório mantidos em condições livres de patógenos específicos (specific pathogen-free, SPF) são essenciais para a confiabilidade e a reprodutibilidade de estudos biomédicos. Sistemas de estantes ventiladas com caixas individualmente ventiladas (individually ventilated cages, IVC) contribuem para a manutenção do status sanitário das colônias; entretanto, eventos de contaminação ainda podem ocorrer. Estratégias convencionais de monitoramento, como triagem aleatória ou uso de sentinelas expostas à cama suja (soiled bedding sentinel, SBS), apresentam sensibilidade limitada, especialmente para patógenos transmitidos por aerossóis ou contato direto. Nesse contexto, a amostragem de partículas do ar de exaustão associada à detecção molecular por PCR tem emergido como alternativa promissora. Este estudo avaliou a detecção de patógenos em partículas aerossolizadas provenientes de racks ventilados em Centros de Criação de Animais de Laboratório de Minas Gerais. *Lactobacillus* sp. foi utilizado como controle positivo e *Rodentibacter pneumotropicus* como modelo de patógeno respiratório. Foram coletadas 74 amostras em três pontos: filtros de exaustão (n = 16), caixas de animais residentes/top filter (n = 46) e mini-isoladores contendo maravalha suja (n = 12). A análise molecular demonstrou maior recuperação de DNA nos

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

filtros de exaustão, enquanto os mini-isoladores apresentaram baixas concentrações detectáveis. A não detecção de *Rodentibacter pneumotropicus* associada à recuperação consistente do controle positivo, indica a viabilidade e a confiabilidade do protocolo para vigilância sanitária ambiental. A metodologia mostrou potencial para otimização e futura substituição do uso de sentinelas, alinhando-se aos princípios dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição) na experimentação animal.

Palavras-chave: PCR; partícula de ar de exaustão; racks ventilados; *Rodentibacter pneumotropicus;* monitoramento sanitário.

Abstract

Laboratory animals maintained under specific pathogen-free (SPF) conditions are essential to ensure the reliability and reproducibility of biomedical research. Individually ventilated cage (IVC) rack systems contribute to preserving the sanitary status of animal colonies; however, contamination events may still occur. Conventional monitoring strategies, such as random animal screening or soiled bedding sentinel (SBS) programs, exhibit limited sensitivity, particularly for pathogens transmitted via aerosols or direct contact. In this context, exhaust air particle sampling combined with polymerase chain reaction (PCR)-based molecular detection has emerged as a promising alternative. This study evaluated the detection of pathogens in aerosolized particles collected from ventilated racks at Laboratory Animal Breeding Centers in Minas Gerais, Brazil. *Lactobacillus* sp. was used as a positive control, and *Rodentibacter pneumotropicus* served as a model respiratory pathogen. A total of 74 samples were collected from three sampling sites: exhaust filters (n = 16), resident animal cages/top filters (n = 46), and mini-isolators containing soiled bedding (n = 12). Molecular analysis demonstrated higher and more consistent DNA recovery from exhaust filters, whereas mini-isolators yielded low detectable DNA concentrations. The absence of *Rodentibacter pneumotropicus* detection, together with consistent recovery of the positive control, supports the feasibility and reliability of the proposed protocol for environmental health surveillance. This methodology shows potential for further optimization and may contribute to reducing or replacing sentinel animals, in accordance with the principles of the 3Rs (Replacement, Reduction, and Refinement) in animal experimentation.

Keywords: PCR; exhaust air particle; ventilated racks; *Rodentibacter pneumotropicus*; sanitary monitoring.

Resumen

Los animales de laboratorio mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (specific pathogen-free, *SPF*) son esenciales para garantizar la fiabilidad y la reproducibilidad de la investigación biomédica. Los sistemas de estanterías con jaulas ventiladas individualmente (individually ventilated cages, IVC) contribuyen al mantenimiento del estado sanitario de las colonias; sin embargo, aún pueden ocurrir eventos de contaminación. Las estrategias convencionales de monitoreo, como el cribado aleatorio de animales o el uso de centinelas expuestos a cama sucia (soiled bedding sentinel, SBS), presentan sensibilidad limitada, especialmente para patógenos transmitidos por aerosoles o por contacto directo. En este contexto, el muestreo de partículas del aire de escape combinado con la detección molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha surgido como una alternativa prometedora.
Este estudio evaluó la detección de patógenos en partículas aerosolizadas recolectadas de racks ventilados en Centros de Cría de Animales de Laboratorio de Minas Gerais, Brasil. *Lactobacillus* sp. se utilizó como control positivo y *Rodentibacter pneumotropicus* como modelo de patógeno respiratorio. Se recolectaron un total de 74 muestras en tres puntos de muestreo: filtros de escape (n = 16), jaulas de animales residentes/filtros superiores (n = 46) y mini-aisladores con cama sucia (n = 12). El análisis molecular mostró una mayor y más consistente recuperación de ADN en los filtros de escape, mientras que los mini-aisladores presentaron bajas concentraciones detectables. La ausencia de detección de *Rodentibacter pneumotropicus*, junto con la recuperación consistente del control positivo, respalda la viabilidad y confiabilidad del protocolo propuesto para la vigilancia

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

sanitaria ambiental.
Esta metodología muestra potencial para su optimización y podría contribuir a reducir o sustituir el uso de animales centinela, en concordancia con los principios de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) en la experimentación animal.

Palabras clave: PCR; partículas de aire de escape; racks ventilados; *Rodentibacter pneumotropicus*; monitoreo sanitario.

1. Introdução

Animais de laboratório desempenham papel fundamental na pesquisa biomédica, contribuindo para a geração de conhecimento aplicável à saúde humana e de outras espécies (MOLINARO, 2009). A confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados experimentais dependem diretamente do controle das condições sanitárias desses modelos biológicos, uma vez que a presença de agentes infecciosos pode interferir significativamente nos desfechos científicos. Nesse contexto, centros de criação têm investido em estratégias de biossegurança e manejo que garantam padrões microbiológicos rigorosos.

A produção de animais livres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free – SPF*) constitui requisito essencial para minimizar interferências biológicas decorrentes de microrganismos indesejáveis, aumentando a validade experimental e favorecendo a utilização desses animais em comparação com colônias convencionais (ANDERSEN, 2004). Entretanto, mesmo em ambientes com barreiras sanitárias, a introdução inadvertida de patógenos ainda representa um desafio para o monitoramento microbiológico, demandando métodos diagnósticos mais sensíveis e representativos.

Diante dessas limitações, abordagens baseadas em amostragem ambiental, associadas a técnicas moleculares, têm emergido como alternativas promissoras para a vigilância sanitária de colônias mantidas em sistemas ventilados. Nesse cenário, o presente estudo propõe avaliar a detecção de patógenos em partículas do ar de exaustão de racks ventilados em Centros de Criação de Animais de Laboratório do estado de Minas Gerais, utilizando *Lactobacillus* sp. como controle positivo e *Rodentibacter pneumotropicus* como modelo de patógeno listado pela FELASA.

2. Revisão da Literatura

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

A manutenção de barreiras sanitárias eficazes em biotérios com status SPF tem sido amplamente favorecida pela adoção de sistemas de racks equipados com caixas individualmente ventiladas (Individually Ventilated Cages – IVC). Esses sistemas promovem a injeção direta de ar filtrado nas gaiolas, reduzem a contaminação cruzada entre unidades e contribuem para a estabilidade microbiológica do ambiente (MILLER & BRIELMEIER, 2018). Apesar dessas vantagens estruturais, falhas operacionais ou a introdução acidental de agentes infecciosos podem resultar em contaminações localizadas, frequentemente restritas a unidades específicas. Essa característica dificulta sua detecção por meio de amostragens aleatórias de animais, comprometendo a sensibilidade do monitoramento sanitário (BRASIL, 2022).

Como estratégia tradicional de vigilância sanitária, recomenda-se o uso de animais sentinelas expostos à cama suja (Soiled Bedding Sentinels – SBS), nos quais indivíduos são submetidos ao contato indireto com material potencialmente contaminado ou, alternativamente, selecionados diretamente da colônia para avaliação diagnóstica (MÄHLER et al., 2014). Contudo, além de demandar maior número de animais, a eficácia desse método pode ser limitada, sobretudo na detecção de patógenos transmitidos por aerossóis ou por contato direto. Isso ocorre porque o sistema IVC restringe a disseminação desses agentes, reduzindo a sensibilidade diagnóstica da estratégia baseada em SBS (MAILHIOT et al., 2020).

Diante dessas limitações, métodos fundamentados na amostragem ambiental têm sido progressivamente investigados como alternativas complementares ou substitutivas. A coleta de poeira e de partículas provenientes do ar de exaustão, associada à detecção molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilita uma avaliação mais abrangente do status sanitário das colônias, dispensando a utilização de animais sentinelas (BARMAN, 2021). Estudos demonstram que a análise de partículas aéreas por PCR em tempo real apresenta elevada sensibilidade e desempenho satisfatório na identificação de agentes infecciosos murinos, fornecendo resultados mais representativos do ambiente quando comparados à estratégia SBS (MAHABIR et al., 2019).

A técnica de PCR destaca-se por sua elevada especificidade, robustez,

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

rapidez e custo relativamente reduzido, permitindo a detecção de DNA ou RNA de patógenos em diferentes matrizes biológicas e ambientais. Dessa forma, favorece o diagnóstico precoce de infecções e o aprimoramento das estratégias de vigilância microbiológica em biotérios (BARMAN, 2021).

3. Metodologia

Delineamento do estudo e locais experimentais

O delineamento adotado teve como objetivo principal avaliar a viabilidade técnica e o desempenho analítico da amostragem ambiental por exposição passiva de gazes em racks IVC, configurando-se como estudo metodológico exploratório.

A amostragem foi definida com base na disponibilidade dos racks nas instituições participantes e na necessidade de contemplar os diferentes pontos estratégicos do sistema (filtro de exaustão, top filter e mini-isoladores com cama suja), permitindo comparação intra e interinstitucional. Não foi realizado cálculo prévio de tamanho amostral voltado à estimativa de prevalência populacional, uma vez que o objetivo central não foi determinar frequência de infecção, mas avaliar se as partículas de ar/filtros poderiam ser utilizadas como ferramenta de vigilância.

Portanto, os resultados devem ser interpretados como evidências preliminares de aplicabilidade metodológica, que fundamentam investigações futuras que possam avaliar um maior número de unidades experimentais e uma eventual incorporação de PCR em tempo real (qPCR) para ampliação da sensibilidade diagnóstica.

O estudo foi conduzido em dois Centros de Criação de Animais de Laboratório localizados em Minas Gerais, Brasil, ambos operando sob sistema de barreira sanitária e utilizando racks com caixas individualmente ventiladas (IVC). Foram avaliados 10 racks no total, sendo quatro pertencentes à Instituição 1 e seis à Instituição 2. Nessas unidades, camundongos das linhagens C57BL/6JUnib e BALB/cAnNCrl eram mantidos rotineiramente, além de linhagens knockout na

REMUNOM
ISSN 2178-6925

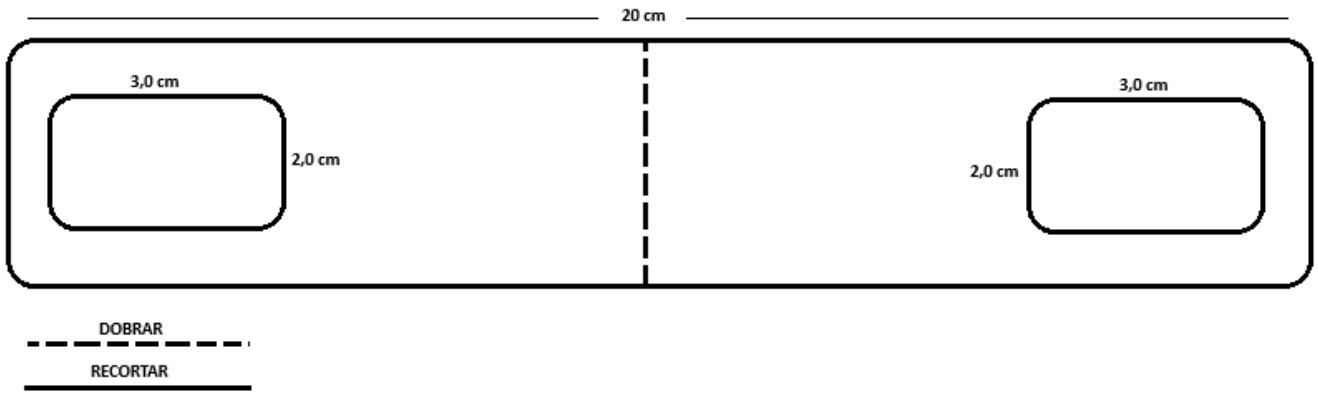
Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

Instituição 1. Os equipamentos utilizados eram da marca Alesco® (modelos AL1, AL21 e AL2).

Estratégias de amostragem ambiental

A detecção de partículas microbianas presentes no ar de exaustão foi realizada por meio da exposição passiva de gazes estéreis, utilizadas como matrizes coletoras. As gazes (3 × 2 cm, quatro camadas) foram previamente autoclavadas e fixadas em suportes estéreis (Figura 1).

Figura 1. Modelo de suporte estéril utilizado para fixação de gazes



Três estratégias independentes de coleta foram aplicadas em diferentes pontos do sistema IVC (Figura 2):

ponto 1. **Filtro de exaustão (FE)** – Suportes contendo gaze estéril foram fixados diretamente na face interna do filtro de ar de exaustão do rack, conforme Miller et al. (2016). O acesso ao filtro ocorreu sem necessidade de ferramentas, utilizando luvas limpas para manipulação.

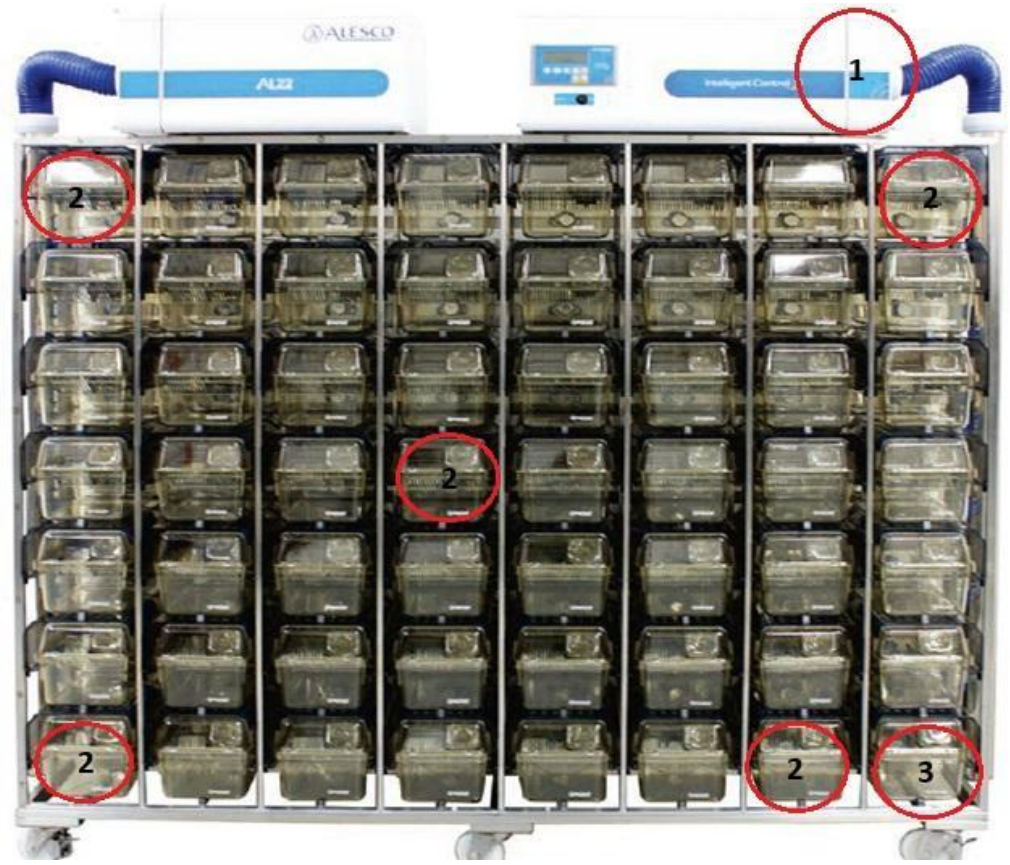
ponto 2. **Top filter de caixas com animais residentes (AR)** – Suportes com gaze estéril foram inseridos na região do top filter de mini-isoladores contendo animais residentes, conforme Dubelko et al. (2018). A manipulação ocorreu em módulo de troca, sob condições assépticas.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

ponto 3. **Mini-isoladores com cama suja (MMS)** – Gazes estéreis foram fixadas no interior de mini-isoladores contendo maravalha/flocos sujos, posicionadas em sentido oposto à válvula de ventilação, conforme O'Connell et al. (2021).

Figura 2: equipamento rack ventilado com as marcações dos pontos de coleta



Após a instalação, as gazes permaneceram expostas durante dois meses. Ao término, as amostras foram removidas com pinças estéreis, acondicionadas em microtubos de 2,0 mL e armazenadas a −20 °C até o processamento. Foram obtidas 74 amostras, sendo, 16 FE, 46 AR e 12 MMS.

Extração de DNA

A extração de DNA bacteriano foi realizada conforme protocolo adaptado de Yu et al. (1993). As gazes foram incubadas em 900 µL de tampão de lise (Tris-HCl pH 8,0, EDTA, NaCl e SDS) acrescido de 6 µL de proteinase K (20 mg/mL), com incubação overnight a 55°C. Após centrifugação (13.000 rpm por 5 min), o

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o DNA precipitado com isopropanol, seguido de lavagem com etanol 70% gelado. O pellet foi seco à temperatura ambiente e eluído em 50 µL de tampão Tris-EDTA. As amostras foram armazenadas a −20°C até análise.

Quantificação e controle de qualidade do DNA

A concentração e a pureza do DNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop™ Lite), com registro das absorbâncias em 260 e 280nm e cálculo da razão A260/A280. A integridade do material genético foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com GelRed®.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção molecular foi conduzida por PCR convencional visando à identificação de *Rodentibacter pneumotropicus* (patógeno de interesse) e de *Lactobacillus* sp., empregado como controle interno/positivo, considerando tratar-se de um microrganismo reconhecidamente integrante da microbiota desses animais, permitindo a verificação da eficiência da metodologia. Como controles positivos da reação, foram utilizados DNA de *Rodentibacter pneumotropicus* (VRL®; 5 µL por reação) e DNA de *Lactobacillus* sp. (1 µL por reação). Água ultrapura foi empregada como controle negativo.

Os primers direcionados à região 16S rRNA foram aqueles descritos por Nozu et al. (1999) para *Rodentibacter pneumotropicus* (amplicon de 296 pb) e por Bourgade et al. (2004) para *Lactobacillus* sp. (345 pb), previamente validados in silico por Primer-BLAST.

As reações foram preparadas em volume final de 20 µL contendo tampão GoTaq Green 1×, dNTPs (0,1 mM), Taq DNA polimerase (1,2 U), 1 pmol de cada primer, água ultrapura e DNA molde. As amplificações foram realizadas em termociclador T100™ (Bio-Rad) com o seguinte perfil: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

agarose 2,0% contendo GelRed®, utilizando marcador de peso molecular de 50pb, e visualizados em sistema de fotodocumentação (Gel Doc EZ™, Bio-Rad).

4. Resultados e Discussão

Validação da PCR e desempenho analítico

A validação da reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstrou amplificação específica dos fragmentos esperados para *Lactobacillus* sp. (345 pb) e *Rodentibacter pneumotropicus* (296 pb), confirmando a especificidade dos primers, a eficiência enzimática e a adequação das condições de amplificação. A ausência de bandas no controle negativo descartou contaminação cruzada, assegurando a confiabilidade analítica do ensaio.

A utilização de *Lactobacillus* sp. como controle interno permitiu avaliar simultaneamente a eficiência da extração de DNA e a presença de inibidores da PCR, estratégia recomendada em protocolos de vigilância ambiental para reduzir a ocorrência de falsos negativos em matrizes com baixa carga microbiana, como poeira de exaustão (BARMAN, 2021).

Experimento de limite de detecção (LOD)

Para avaliar a sensibilidade analítica da PCR, foi realizado experimento de limite de detecção utilizando diluições seriadas decimais do DNA controle previamente quantificado. As diluições foram preparadas em água ultrapura estéril, abrangendo uma faixa conhecida de concentrações do DNA molde. Cada diluição foi submetida à PCR nas mesmas condições descritas para as amostras ambientais, sendo analisadas em duplicata. O limite de detecção foi definido como a menor concentração de DNA capaz de produzir amplificação visível e reprodutível do fragmento alvo em, pelo menos, duas reações independentes.

A determinação do limite de detecção (LOD) evidenciou a elevada sensibilidade analítica do método empregado, indicando que a ausência de amplificação em determinadas amostras é pouco provável de ser atribuída exclusivamente a limitações técnicas intrínsecas da PCR, podendo estar associada

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

à presença de substâncias inibidoras da reação ou à degradação do material genético.

Recuperação de DNA bacteriano nos diferentes pontos de coleta

A Tabela 1 apresenta a comparação da concentração média de DNA, desvio padrão e taxa de amplificação positiva do controle interno segundo ponto de coleta e instituição.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade do DNA e amplificação por ponto de coleta e instituição.

Ponto de coleta	Instituição	n	Concentração média (ng/µL)	Desvio padrão	Amplificação positiva (n)	Taxa (%)
Filtro de exaustão	1	10	40,9	51,34	7	70
Filtro de exaustão	2	6	25,18	16,65	6	100
Top filter (rack ventilado)	1	24	16,92	18,03	6	26
Top filter (rack ventilado)	2	22	80,45	54,95	21	95
Mini-isoladores (cama suja)	1	4	3,70	1,90	0	0
Mini-isoladores (cama suja)	2	8	94,71	56,75	8	100

As gazes posicionadas no filtro de exaustão apresentaram maiores concentrações médias de DNA e maior consistência na amplificação, especialmente na Instituição 2, sugerindo que o sistema de exaustão pode atuar como ponto integrador do fluxo de ar proveniente de múltiplas gaiolas.

Esse achado é compatível com Miller e Brielmeier (2018), Mahabir et al. (2019) e Bauer et al. (2016a), que demonstraram maior sensibilidade diagnóstica da PCR de poeira de exaustão quando comparada ao uso de sentinelas.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

Resultados da Análise Estatística

A análise de variância demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os locais de coleta quanto ao rendimento médio de DNA:

[one-way ANOVA, $F(5,67) = 8,42;\quad p < 0,001$]

Esses resultados indicam que, pelo menos, um dos grupos apresentou média significativamente diferente dos demais. O total de amostras analisadas foi de 74, distribuídas entre seis grupos independentes. A variabilidade entre grupos (SQ = 74.314,36) foi superior ao esperado pela variabilidade intragrupo (QM = 1.764,56), resultando em razão F significativa.

A baixa taxa de amplificação na Instituição 1, mesmo diante da presença mensurável de DNA (como 40,9 ng/µL no filtro de exaustão), sugere fortemente interferência por inibidores da PCR ou degradação do material genético.

Considerando que o experimento de limite de detecção confirmou a sensibilidade do ensaio em condições ideais, a discrepância observada entre rendimento de DNA e sucesso de amplificação na Instituição 1 reforça a hipótese de interferência de matriz ambiental. Em amostras ambientais, compostos orgânicos, partículas de maravalha, amônia, resíduos metabólicos e biofilmes podem comprometer a atividade da DNA polimerase, reduzindo a eficiência da amplificação mesmo na presença de DNA detectável.

Comparação com métodos baseados em sentinelas

As amostras obtidas nos top filters e em mini-isoladores contendo maravalha suja apresentaram maior variabilidade e, em alguns casos, baixa concentração de DNA, limitando a amplificação. Esses resultados refletem limitações intrínsecas à estratégia baseada na exposição indireta de partículas, na qual a eficiência depende da aerossolização do material e da dinâmica local do fluxo de ar.

A literatura aponta que a estratégia de sentinelas de cama suja (SBS), embora amplamente utilizada, apresenta sensibilidade reduzida em sistemas IVC, uma vez que a ventilação individualizada restringe a disseminação de patógenos entre gaiolas (MÄHLER et al., 2014). Consequentemente, infecções de baixa prevalência

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

ou transmitidas predominantemente por aerossóis podem não alcançar as sentinelas.

Estudos recentes demonstraram que a PCR de poeira de exaustão pode detectar agentes infecciosos em situações nas quais as sentinelas permanecem negativas. Mahabir et al. (2019), por exemplo, identificaram *Pneumocystis murina* em poeira ambiental de racks onde não houve soroconversão de sentinelas, evidenciando maior sensibilidade do monitoramento ambiental. Esses achados sustentam a interpretação de que a amostragem do filtro de exaustão funciona como matriz integradora da microbiota do sistema, agregando partículas provenientes de diversas gaiolas e aumentando a probabilidade de detecção.

A sensibilidade relativa entre PCR ambiental e sentinelas pode variar conforme o agente investigado, a prevalência na colônia e a via predominante de transmissão. Assim, abordagens combinadas podem representar estratégia mais robusta em programas de vigilância abrangentes.

Influência do desenho dos racks IVC

As diferenças observadas entre instituições também podem ser atribuídas às características estruturais e operacionais de cada sistema. Henderson et al. (2022), destacam que as variações no desenho dos racks como padrão de fluxo de ar, posicionamento de filtros, presença de barreiras adicionais e zonas de deposição de poeira, influenciam diretamente a eficiência da coleta ambiental.

Esses fatores explicam por que o filtro de exaustão apresentou desempenho mais consistente e reprodutível, enquanto pontos internos, como *top filters* ou cama suja, mostraram maior heterogeneidade. Dessa forma, a identificação prévia das áreas de maior acúmulo de partículas é etapa essencial para padronização metodológica.

Detecção de *Rodentibacter pneumotropicus*

Nenhuma das amostras analisadas apresentou amplificação específica para *Rodentibacter pneumotropicus*. Esse resultado indica ausência detectável do

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

patógeno durante o período experimental e corrobora o adequado status sanitário das colônias avaliadas. Considerando evidências prévias de que o teste de PCR ambiental é capaz de detectar prevalências muito baixas de infecção (BAUER et al., 2016b), a ausência de detecção é compatível com a ausência detectável do agente no período avaliado nas colônias, e não limitação técnica do método.

Limitações do PCR convencional e potencial transição para qPCR

A discrepância observada entre a concentração de DNA e a ausência de amplificação na Instituição 1 sugere a necessidade de considerar a substituição da PCR convencional pela PCR em tempo real (qPCR) nesse cenário.

A PCR convencional detecta o produto de amplificação ao final da reação por meio de análise em gel de agarose, sendo essencialmente qualitativa e dependente da visualização de bandas, o que limita sua sensibilidade analítica e pode não detectar alvos em baixas concentrações presentes em matrizes complexas. Em contraste, a qPCR monitora a amplificação de DNA em tempo real por meio de sinal fluorescente, permitindo quantificação e detecção durante a fase exponencial da reação, o que confere maior sensibilidade, menor limite de detecção e menor risco de contaminação por manipulação pós-amplificação, sendo amplamente utilizada em diagnósticos moleculares que exigem alta sensibilidade e especificidade (JOHNSON et al., 2013).

Implicações para programas de monitoramento sanitário

De forma geral, os achados do presente estudo estão alinhados às recomendações atuais de modernização dos programas de vigilância microbiológica, que propõem a incorporação de métodos moleculares e ambientais como alternativa ou complemento ao uso de animais sentinelas (MILLER; BRIELMEIER, 2018; BARMAN, 2021).

Além de aumentar a sensibilidade diagnóstica, a amostragem ambiental reduz custos operacionais e contribui para a aplicação dos princípios dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição), diminuindo a necessidade de utilização de animais exclusivamente para fins de monitoramento sanitário.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

Limitações do estudo

O presente estudo apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Primeiramente, o número de racks avaliados, distribuídos em duas instituições, restringe a generalização dos achados para outros centros criatórios com diferentes desenhos estruturais, protocolos operacionais e padrões de ventilação. Embora o total de 74 amostras ambientais tenha permitido análises comparativas entre pontos de coleta, o delineamento não foi estruturado com base em cálculo formal de poder estatístico para estimativa de prevalência, configurando-se como investigação de caráter exploratório e metodológico.

Além disso, embora o limite de detecção analítico tenha sido estabelecido experimentalmente, por serem colônias negativas para o patógeno, não foi possível estimar a prevalência real do *Rodentibacter pneumotropicus* nas colônias avaliadas, nem descartar completamente a presença em níveis abaixo do limiar detectável pelo PCR convencional empregado. A utilização exclusiva de PCR de ponto final pode ter limitado a sensibilidade diagnóstica em matrizes ambientais com baixa carga microbiana ou presença de inibidores.

Outro aspecto relevante refere-se à variabilidade inerente às matrizes ambientais. Fatores como acúmulo diferencial de poeira, fluxo de ar específico de cada rack, frequência de troca de filtros, composição da maravalha e condições ambientais locais podem influenciar a recuperação e a estabilidade do DNA, impactando a reprodutibilidade interinstitucional.

Adicionalmente, o estudo não incluiu comparação paralela direta com resultados provenientes de animais sentinelas no mesmo período experimental. Assim, embora a literatura sustente maior sensibilidade da PCR ambiental em determinados contextos, não foi possível estabelecer equivalência ou superioridade diagnóstica no cenário específico das instituições avaliadas.

Em conjunto, os resultados indicam potencial aplicabilidade da matriz ambiental avaliada, embora sua incorporação definitiva a programas sanitários dependa de validação multicêntrica e padronização metodológica adicional.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

5. Conclusão

Os achados do presente estudo sugerem que a amostragem ambiental do filtro de exaustão pode representar estratégia relevante aos programas tradicionais de monitoramento microbiológico. No entanto, maiores estudos devem ser realizados para que tal abordagem demostre robustez e assim, no futuro, possa haver a substituição de animais sentinelas.

A estratégia baseada em sentinelas de cama suja permanece amplamente recomendada por diretrizes internacionais, especialmente para agentes cuja detecção depende de resposta sorológica ou para monitoramento de patógenos com dinâmica epidemiológica distinta da dispersão aérea.

A amostragem por PCR deve, portanto, ser interpretada como ferramenta complementar ou potencial alternativa em sistemas IVC, particularmente quando o objetivo é aumentar a sensibilidade para agentes transmitidos por aerossóis ou reduzir o número de animais utilizados exclusivamente para vigilância sanitária, em consonância com os princípios dos 3Rs. A decisão quanto à substituição, integração ou manutenção de estratégias combinadas deve considerar características específicas de cada instalação, histórico sanitário, perfil de risco e recomendações regulatórias vigentes.

Agradecimentos

Fundação Oswaldo Cruz, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto René Rachou (Fiocruz).

Referências

ANDERSEN, M. L. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2004.

BARMAN, T. K. Quality control of laboratory animals. In: NAGARAJAN, P.; SRINIVASAN, R.; GUDDE, R. (org.). *Essentials of laboratory animal science: principles and practices*. Singapore: Springer, 2021. p. 85–105.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

BAUER, B. A. et al. Exhaust air dust monitoring is superior to soiled bedding sentinels for detection of *Pasteurella pneumotropica* in individually ventilated cage systems. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Memphis, v. 55, n. 6, p. 775–781, 2016a.

BAUER, B. A. et al. Influence of rack design and disease prevalence on detection of rodent pathogens in exhaust debris samples from individually ventilated caging systems. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Memphis, v. 55, n. 5, p. 548–556, 2016b.

BOURGADE, F. et al. Simple duplex fecal PCR assay that allows identification of false-negative results in *Helicobacter* sp.-infected mice. *Comparative Medicine*, Memphis, v. 54, n. 6, p. 633–640, 2004.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). *Resolução Normativa n.º 57, de 6 de dezembro de 2022*. Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de ensino ou pesquisa científica. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 07 dez. 2022.

DUBELKO, A. R. et al. PCR testing of filter material from IVC lids for microbial monitoring of mouse colonies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Memphis, v. 57, n. 5, p. 547–553, 2018.

HENDERSON, K. S. et al. A guide to modern strategies for infection surveillance of rodent populations. Wilmington: Charles River Laboratories International, 2022.

JOHNSON, G. et al. Real-Time Quantitative PCR, Pathogen Detection and MIQE. In: Wilks, M. (eds) PCR Detection of Microbial Pathogens. Methods in Molecular Biology, vol 943. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_1

MAHABIR, E. et al. Comparison of two prevalent individually ventilated caging systems for detection of murine infectious agents via exhaust air particles. Laboratory Animals, Vol. 53(1) 84–88, 2019.

REMUNOM
ISSN 2178-6925

Received: 03/02/2026 - **Accepted:** 05/03/2026
Vol: 13.01
DOI: 10.66104/rer3nr70
Pages: 1-17

MÄHLER, M. et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*, London, v. 48, n. 3, p. 178–192, 2014.

MAILHIOT, D. et al. Comparing mouse health monitoring between soiled-bedding sentinel and exhaust air dust surveillance programs. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Memphis, v. 59, n. 1, p. 66–74, 2020.

MILLER, M.; BRIELMEIER, M. Environmental samples make soiled bedding sentinels dispensable for hygienic monitoring of IVC-reared mouse colonies. *Laboratory Animals*, London, v. 52, n. 3, p. 233–247, 2018.

MILLER, M.; RITTER, B.; ZORN, J. *et al.* Exhaust air dust monitoring is superior to soiled bedding sentinels for the detection of *Pasteurella pneumotropica* in individually ventilated cage systems. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 55, n. 5, p. 573–579, 2016.

MOLINARO, E. M.; MAJEROWICZ, J.; COUTO, S. E. R. et al. *Animais de laboratório.* In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2009. v. 1, p. 155–223.

NOZU, R. et al. Evaluation of PCR as a means of identification of *Pasteurella pneumotropica*. *Experimental Animals*, Tokyo, v. 48, n. 1, p. 45–50, 1999.

O'CONNELL, K. A.; TIGYI, G. J.; LIVINGSTON, R. S. Evaluation of in-cage filter paper as a replacement for sentinel mice in the detection of murine pathogens. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Memphis, v. 60, n. 2, p. 197–205, 2021.

YU, K. F.; VAN DEYNZE, A.; PAULUS, K. P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: GLICK, B. R.; THOMPSON, J. E. (ed.). *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 287–301.