

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO-MESTRADO PROFISSIONAL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Viviane Santos de Barros Siqueira

**“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE RAÇÕES SECAS IRRADIADAS E  
AUTOCLAVADAS OFERECIDAS *AD LIBITUM* PARA CAMUNDONGOS DA  
LINHAGEM C57BL/6”**

Rio de Janeiro

2020

Viviane Santos de Barros Siqueira

**“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE RAÇÕES SECAS IRRADIADAS E  
AUTOCLAVADAS OFERECIDAS *AD LIBITUM* PARA CAMUNDONGOS DA  
LINHAGEM C57BL/6”**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos-Fiocruz/RJ, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências em Animais de Laboratório.

Orientador: Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira

Rio de Janeiro

2020

Santos de Barros Siqueira, Viviane .

Avaliação microbiológica de rações secas irradiadas e autoclavadas oferecidas ad libitum para camundongos da linhagem C57BL/6 / Viviane Santos de Barros Siqueira. - Rio de Janeiro, 2020.  
100 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2020.

Orientadora: Joseli Maria da Rocha Nogueira .

Bibliografia: f. 80-90

1. Qualidade higiênico-sanitária. 2. Análise microbiológica. 3. Ração. 4. Linhagem C57BL/. I. Título.

Viviane Santos de Barros Siqueira

**“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE RAÇÕES SECAS IRRADIADAS E  
AUTOCLAVADAS OFERECIDAS AD LIBITUM PARA CAMUNDONGOS DA  
LINHAGEM C57BL/6”**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos-Fiocruz/RJ, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências em Animais de Laboratório.

Aprovada em: Rio de Janeiro, 23 de junho de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

*Maria Inês Doria Rossi*

---

Dra. Maria Inês Doria Rossi (Presidente da Banca)  
ICTB/FIOCRUZ

*Isabele Barbieri dos Santos*

---

Dra. Isabele Barbieri dos Santos

*Denise Borges dos Santos Dias*

---

Dra. Denise Borges dos Santos Dias  
IBRAG/UERJ

*Joseli Maria da Rocha Nogueira*

---

Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira (Orientadora)  
ENSP/FIOCRUZ

**Dedico este trabalho:**

A minha querida filha **Alice**, pelas horas em que não pudemos estar juntas. Te amo muito!

Aos **animais**, pois sem eles esse trabalho não seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida, me dando força para nunca desistir e sempre me manter firme para alcançar meus objetivos.

Aos animais, pois sem eles esta pesquisa não seria possível. A eles todo o meu respeito.

À minha filha Alice, pela compreensão, paciência, por entender meus momentos ausentes, por ser essa criança doce, amorosa e tão madura para idade. Te amo muito.

À minha mãe, Rosineide, pela presença constante, amor e carinho, pois sem seu apoio e incentivo nada disso seria possível.

Ao meu amor, Luciano, por todo seu carinho, apoio e paciência. Obrigado por me dar conforto nos meus momentos mais difíceis e por sempre estar ao meu lado me incentivando e dando força.

Ao meu pai, Ivan, minha irmã Rosiane e meu sobrinho Vinícius, obrigada por todo amor e apoio e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

A minha querida orientadora, Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira, pelo o apoio, dedicação e contribuição para a construção dessa dissertação.

A Valéria de Melo Medeiros, por todo carinho, dedicação, ensinamento e por me ajudar com as análises microbiológicas da ração, a sua parceria foi fundamental para elaboração desse trabalho.

A Dra. Silvia Maria dos Reis Lopes, pelas sugestões e por permitir a utilização do laboratório do Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia, INCQS.

A toda equipe do Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia, INCQS, por todo carinho, apoio e ajuda na preparação dos materiais utilizados durante as análises.

A equipe do Laboratório de Microbiologia do DCB (LabMicro/ENSP/Fiocruz), principalmente: Mariza Moraes Oliveira e Ary do Carmo com a ajuda na preparação dos meios de cultura. A Jaime Antonio Abrantes por me ajudar com as análises do corante e dos swabs, bem como pelas sugestões para elaboração dessa dissertação e Raquel Sales de Andrade pela ajuda com as análises dos swabs e preparação dos meios. Só tenho a agradecer a vocês por toda dedicação, carinho e apoio.

Ao subchefe do Laean, Alex Costa por me fornecer a ração autoclavada.

Aos meus chefes João Paulo de Biaso Viola e Martin Hernán, obrigada por me permitirem investir em meu crescimento pessoal e profissional.

A toda equipe da área de Recursos Animais do INCA, principalmente: Patrícia, Marcio, Renan, Pedro e Jeferson, obrigada pelo apoio, incentivo, por ouvirem meus desabafos, dividirem a minha carga e por tornarem meus dias mais alegres.

Aos meus colegas de mestrado. Obrigada pela parceria, por dividirem comigo toda experiência e conhecimento que possuem, pelos momentos de risadas e muita alegria.

A coordenação, secretaria acadêmica e professores do MPCAL. Obrigada por todo conhecimento.

A Gabriele, Gutemberg e Marcio por me darem suporte e ajuda quando precisei.

A todos os meus amigos que me deram força e entenderam as minhas ausências.

A Dr<sup>a</sup> Maria Inês Doria Rossi por ter aceitado ser a revisora dessa dissertação e por todas as sugestões realizadas e aos membros da banca pela contribuição para a construção dessa dissertação.

“A persistência é o menor caminho do êxito”  
(Charles Chaplin)

## RESUMO

A qualidade da ração peletizada disponível para animais de laboratório está ligada diretamente a condição sanitária destes biomodelos. Apesar disso, poucos são os trabalhos publicados que abordam o seu controle microbiológico. Mesmo havendo esterilização prévia das rações que serão utilizadas nos comedouros, estas entram em contato com os animais, com o ambiente e são manuseadas pela equipe técnica durante a manutenção dos animais. Além disso, sua estocagem pode ser inadequada, o que pode levar a uma contaminação e possíveis problemas na qualidade deste alimento. A partir destas possíveis vias de contaminação, este trabalho teve como objetivo verificar a qualidade microbiológica de rações irradiadas e autoclavadas e avaliar por quanto tempo elas mantêm esta qualidade higiênico-sanitária. Para atingir esse objetivo foi realizada a pesquisa de micro-organismos indicadores, durante o período de manutenção da ração nas gaiolas dos camundongos e foi verificado se os comedouros e a cavidade oral dos animais apresentaram as mesmas bactérias detectadas nas rações. Antes de iniciar as análises das rações, foram realizados dois ensaios com o corante alimentício líquido, o primeiro para verificar a inocuidade do corante frente a bactérias e o segundo para verificar se a ração marcada era palatável e se não haveria preferência ou repulsa dos animais por determinada cor. No resultado do primeiro ensaio foi constatado que o corante não interferia no crescimento bacteriano enquanto que no segundo ensaio observou-se que a ração marcada continuava palatável e não houve preferência ou repulsa dos animais por determinada cor. A partir dos resultados destes ensaios, iniciou-se o experimento que foi realizado com quatro grupos de camundongos da linhagem C57BL/6 (10 machos e 10 fêmeas) para cada ração (autoclavada e irradiada), com cinco animais em cada gaiola. As rações foram marcadas para possibilitar a diferenciação entre as rações oferecidas inicialmente e as subsequentes, permitindo comparar a sua qualidade/tempo de exposição. Esse procedimento mimetizou o procedimento padrão de acrescentar novos pellets semanalmente nos comedouros por cima dos pellets antigos, permitindo estimar o tempo em que a ração ficou no comedouro sem ocorrência de contaminação. Após as análises microbiológicas das rações os resultados obtidos foram: ausência de *Salmonella* spp. e a contagem de micro-organismos mesófilos totais, bolores, leveduras, coliformes totais e termotolerantes bem abaixo dos limites máximos estabelecidos na literatura. Mostrando assim que, após todo o período de exposição, as rações mantêm boa qualidade higiênico-sanitária. Em contrapartida, nos comedouros e na análise da microbiota da cavidade oral dos animais não foi identificado nenhum micro-organismo utilizado como indicador para qualidade das rações, mas foram isoladas algumas bactérias potencialmente patogênicas como: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Acinetobacter baumannii* complex, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* demonstrando que apesar de não haver ração contaminada, de alguma forma houve quebra de barreira sanitária, portanto todos os procedimentos dessa área devem ser revistos, pra verificar onde está havendo falha

Palavras-chave: Qualidade higiênico-sanitária. Análise microbiológica. Ração. Linhagem C57BL/6.

## ABSTRACT

The quality of the pelleted feed available for laboratory animals is directly linked to the health condition of these biomodels. Despite this, there are few published works that address its microbiological control. Even with previous sterilization of the feeds that will be used in the feeders, they come into contact with the animals, with the environment and are handled by the technical team during the maintenance of the animals. In addition, its storage may be inadequate, which can lead to contamination and possible problems in the quality of these foods. Based on these possible contamination routes, this study aimed to verify the microbiological quality of irradiated and autoclaved rations and to define how long they lose their hygienic-sanitary quality. In order to achieve this objective, the research of indicator microorganisms was carried out during the maintenance period of the feed in the mice cages and it was verified whether the feeders and the oral cavity of the animals showed the same bacteria detected in the feed. Before starting the analysis of the rations, two tests were carried out with liquid food coloring, the first to check the innocuousness of the dye against bacteria and the second to check if the marked diet was palatable and if there would be no preference or repulsion of the animals for a certain color. In the result of the first test it was found that the dye did not interfere with bacterial growth whereas in the second test it was observed that the marked diet was still palatable and there was no preference or repulsion of the animals for a certain color. In the result of the first test it was found that the dye did not interfere with bacterial growth, whereas in the second test it was observed that the marked diet was still palatable and there was no preference or repulsion of the animals for a certain color. From the results of these tests, the experiment was started with four groups of C57BL / 6 mice (10 males and 10 females) for each diet (autoclaved and irradiated), with five animals in each cage. The diets were marked to allow the differentiation between the diets offered initially and the subsequent ones, allowing to compare their quality / exposure time. This procedure mimicked the standard procedure of adding new pellets weekly in the feeders on top of the old pellets, allowing to estimate the time the feed was in the feeder without contamination. After the microbiological analyzes of the diets, the results obtained were: absence of *Salmonella* spp. and counting of total mesophilic microorganisms, molds, yeasts, total coliforms and thermotolerants well below the maximum limits established in the literature. Thus, showing that, after the entire period of exposure, it maintains good hygienic-sanitary quality. In contrast, in the feeders and in the analysis of the microbiota of the oral cavity of the animals, no microorganisms used as an indicator for the quality of the rations were identified, but some pathogenic bacteria were isolated, such as: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Acinetobacter baumannii* complex, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* demonstrating that although there is no contaminated feed, somehow there was a break in the sanitary barrier, so all procedures in this area should be reviewed, to see where there is a failure.

Keywords: Hygienic-sanitary quality. Microbiological analysis. Line C57BL / 6.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1:</b> Ingestão diária aceitável (IDA) e limites máximos de corantes artificiais.....	31
<b>Figura 1:</b> Ração marcada com corante alimentício azul, amarelo e vermelho e sem marcação.....	36
<b>Figura 2:</b> Placas com corante alimentício incorporado ao meio de cultura ágar Mueller-Hinton e placas somente com o meio de cultura.....	38
<b>Figura 3:</b> Esquema das análises microbiológicas das rações marcadas com corantes comestíveis.....	40
<b>Figura 4:</b> Swab da cavidade oral do camundongo (linhagem C57BL/6).....	41
<b>Figura 5:</b> Swab do comedouro .....	42
<b>Figura 6:</b> Esquema para análise de mesófilos totais .....	44
<b>Figura 7:</b> Esquema para análise de coliformes totais e termotolerantes .....	45
<b>Figura 8:</b> Meio de cultura EMB com crescimento típico de <i>Escherichia coli</i> .....	47
<b>Figura 9:</b> Esquema da análise de bolores e leveduras.....	48
<b>Figura 10:</b> Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	49
<b>Figura 11:</b> Esquema das análises realizadas dos swabs da cavidade oral e dos comedouros dos animais .....	51
<b>Figura 12:</b> Consumo da ração após uma semana.....	52
<b>Figura 13:</b> Consumo da ração após duas semanas. ....	53
<b>Figura 14:</b> Simulação da visão dos roedores .....	54
<b>Figura 15:</b> Placas semeadas com bactérias ATCC, Gram positivas e Gram negativas.....	55
<b>Figura 16:</b> Consumo de ração autoclavada ou irradiada após uma e duas semanas. ....	57
<b>Figura 17:</b> Contagem de mesófilos totais aeróbicos em UFC/g nas rações autoclavadas e irradiadas.....	60
<b>Quadro 2:</b> Número Mais Provável (NMP) por grama para séries de três tubos.....	63
<b>Figura 18:</b> Prevalência de bactérias encontradas nos comedouros e microbiota da cavidade oral dos animais .....	68
<b>Figura 19:</b> Amostras Gram negativas semeadas em ágar cromogênico Uri Select 4 / Bio-Rad. ....	70

<b>Quadro 3:</b> Identificação fenotípica de espécies bacterianas em meio cromogênico.....	71
<b>Figura 20:</b> Provas bioquímicas (amostra CO1b). .....	72
<b>Figura 21:</b> Provas bioquímicas (amostra AN3).....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Verificação da presença de mesófilos, bolores e leveduras nas rações estéreis analisadas.....	56
<b>Tabela 2:</b> Contagem mesófilos totais, bolores e leveduras das amostras de ração durante o consumo pelos camundongos.....	59
<b>Tabela 3:</b> Contagem de coliformes totais e termotolerantes das amostras de ração durante o consumo pelos camundongos.....	61
<b>Tabela 4:</b> Detecção microbiológica proveniente do swab dos comedouros (CO).....	64
<b>Tabela 5:</b> Detecção microbiológica proveniente do swab da cavidade oral dos camundongos.....	65
<b>Tabela 6:</b> Porcentagem de placas com presença de crescimento bacteriano. ....	65
<b>Tabela 7:</b> Teste de coloração por metodologia de Gram das colônias isoladas. ....	66
<b>Tabela 8:</b> Teste da catalase e coagulase das bactérias Gram positivas do comedouro .....	67
<b>Tabela 9:</b> Teste da catalase e coagulase das bactérias Gram positivas proveniente da cavidade oral dos camundongos.....	69
<b>Tabela 10:</b> Análise bioquímica das amostras semeadas em meio cromogênico.....	71

## LISTAS DE ABREVIATURAS

<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Colection</i>
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BAM</b>	<i>Bacteriological Analytical Manual</i>
<b>BIO-MANGUINHOS</b>	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
<b>CBE</b>	Companhia Brasileira de Esterilização
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CONCEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>DCB</b>	Departamento Ciências Biológicas
<b>DM</b>	Departamento de Microbiologia
<b>EC</b>	<i>Escherichia Coli</i>
<b>ENSP</b>	Escola Nacional de Saúde Pública
<b>EMB</b>	Eosina-Azul de Metileno
<b>EPC</b>	Equipamento de Proteção Coletiva
<b>EPI</b>	Equipamento de Proteção Individual
<b>FDA</b>	<i>Food e Drug Administration</i>
<b>FELASA</b>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>GF</b>	<i>Germe Free</i>
<b>HEPA</b>	<i>High Efficiency Particulate Arrestance</i>
<b>ICTB</b>	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>IOC</b>	Instituto Oswaldo Cruz
<b>LAEAN</b>	Laboratório de Experimentação Animal
<b>LST</b>	Caldo Lauril Sulfato
<b>NMP</b>	Número Mais Provável
<b>NRC</b>	<i>National Research Council</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>POP</b>	Procedimento Operacional Padrão
<b>RN</b>	Resolução Normativa
<b>SBCAL</b>	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

<b>SPF</b>	<i>Specif Pathogen Free</i>
<b>SIM</b>	Sulfito de Hidrogênio, Indol e Motilidade
<b>VBBL</b>	Caldo Verde Brilhante Bile Lactose
<b>SS</b>	Meio <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>18</b>
2.1	QUALIDADE DOS ANIMAIS DE LABORATÓRIOS	18
2.2	TIPOS DE FORMULAÇÃO DE RAÇÕES PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO X CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.	20
2.3	TIPOS DE PROCESSAMENTOS DAS RAÇÕES X CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.	21
2.4	PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO DA RAÇÃO	22
2.5	CONTAMINAÇÃO DA RAÇÃO X LEGISLAÇÃO	23
2.6	MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM RAÇÕES.	26
2.7	CORANTE ALIMENTÍCIO	29
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>34</b>
5.1	RAÇÃO	34
5.2	ANIMAIS UTILIZADOS	34
5.3	ALOJAMENTO E MANUTENÇÃO ANIMAL	35
5.4	DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS	35
5.4.1	Teste de palatabilidade da ração colorizada	35
5.4.2	Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do corante	37
5.4.3	Teste de esterilidade e marcação das rações.	38
5.4.4	Marcação das rações.	39
5.4.5	Coleta de material da cavidade oral dos camundongos	40
5.4.6	Coleta de material dos comedouros	42
5.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	43
5.5.1	Diluição das amostras de ração	43
5.5.2	Controle de qualidade dos meios sólidos e líquidos	43
5.5.3	Contagem de número total de micro-organismos mesófilos	43
5.5.4	NMP-Teste presuntivo para coliformes totais e termotolerantes.	44

5.5.5	Teste confirmatório para coliformes totais.....	46
5.5.6	NMP-Teste confirmatório para coliformes termotolerantes <i>E.coli</i> .....	46
5.5.7	Teste de identificação de colônias de <i>E. coli</i> .....	46
5.5.8	Bolores e leveduras .....	47
5.5.9	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	48
5.5.10	Análise das amostras do swab .....	50
5.6	DESCARTE DAS CARÇAÇAS .....	51
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
6.1	TESTE DA PALATABILIDADE DA RAÇÃO COLORIZADA .....	52
6.2	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CORANTE.....	54
6.3	CONTAGEM DE MESÓFILOS, BOLORES E LEVEDURAS NAS RAÇÕES ESTÉREIS... .....	55
6.4	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS RAÇÕES DISPOSTAS NOS COMEDOUROS .....	56
6.4.1	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	57
6.4.2	Contagem de micro-organismos mesófilos totais aeróbios.....	58
6.4.3	Contagem de bolores e leveduras.....	60
6.4.4	Contagem de coliformes totais e termotolerantes (fecais).....	61
6.5	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DOS SWABS .....	63
6.5.1	Crescimento e diferenciação de colônias bacterianas, bolores e leveduras. ....	63
6.5.2	Teste da catalase e coagulase das amostras Gram positivas dos comedouros e cavidade oral dos animais.....	66
6.5.3	Análise das amostras Gram negativas da cavidade oral dos animais e comedouros .....	70
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>PESPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXO A - PARECER DA CEUA.....</b>	<b>91</b>
	<b>ANEXO B – VALIDAÇÃO DE CICLO DE RAÇÃO EM AUTOCLAVE.....</b>	<b>92</b>
	<b>ANEXO C – MONITORAMENTO SANIÁRIO (BACTÉRIAS).....</b>	<b>93</b>
	<b>ANEXO D – RESULTADO TESTE BIOQUÍMICO AUTOMATIZADO .....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, exige-se que os animais de criatórios científicos tenham padrões sanitários e genéticos conhecidos. Para obter esses padrões são necessários: instalações apropriadas, equipamentos especializados e pessoal capacitado (MAJEROWICZ, 2008). Além disso, cada vez mais, os pesquisadores e usuários, exigem que estes animais sejam mais uniformes e produzidos com qualidade, já que desta forma, menos animais serão necessários para atingir os resultados (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

É importante que barreiras sanitárias eficazes sejam instaladas para que os animais em questão, não sejam contaminados com micro-organismos provenientes do meio externo. Por sua alimentação ser um possível ponto crítico, devemos destinar total atenção a ração oferecida, pois se ela não estiver isenta de organismos patogênicos, poderá interferir na saúde dos biomodelos (REIS, 2008). Portanto, para que os animais sejam produzidos de maneira mais uniforme, sua dieta deve possuir formulação conhecida e sem variações (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009) ser palatável, possuir nutrientes específicos para cada espécie e ser oferecida diariamente, além de ser isenta de contaminantes microbiológicos e químicos (NRC, 2010), pois o bom desenvolvimento desses animais dependerá da composição da ração que eles consomem e da qualidade que esta possui (CARVALHO et al. 2003).

Segundo Santos e colaboradores (2000), Longo, Silva e Lazarin (2010) e Americano (2016), existem poucos trabalhos realizados em nosso país referentes ao controle microbiológico de rações. Suas pesquisas apontam para a necessidade de maiores estudos sobre o assunto, já que a qualidade da alimentação compromete o padrão sanitário desses animais. Apesar da esterilização prévia utilizada nas rações, gaiolas e de todo material que entra em contato com os animais, existe o manuseio deste material pela equipe técnica responsável durante a manutenção, além da estocagem e o contato dos próprios animais com a ração durante o período de consumo, o que pode levar a uma contaminação indireta e possíveis problemas na qualidade deste alimento.

A partir desta possibilidade, este trabalho visa investigar a qualidade higiênico-sanitária das rações disponibilizadas para roedores no Biotério do Instituto

Nacional do Câncer – INCA. Para este fim serão pesquisados micro-organismos indicadores, como: mesófilos totais, coliformes totais e termotolerantes, bolores, leveduras e patogênicos como *Salmonella* spp. (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009; GIRIO et al, 2012), durante o período de sua manutenção nas gaiolas.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 QUALIDADE DOS ANIMAIS DE LABORATÓRIOS**

Os animais de laboratório são utilizados há mais de um século em várias áreas das pesquisas biomédicas e vêm colaborando com os avanços científicos e tecnológicos destas áreas. Por muito tempo estes animais foram utilizados como se fossem apenas instrumentos de trabalho, não havendo assim, preocupação com o seu bem-estar ou seu padrão sanitário (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

Com o aumento da relevância destes animais nos estudos científicos, cada vez mais se têm exigido que estes possuam uma boa qualidade sanitária (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; MAJEROWICZ, 2008), gerando diversos estudos não somente sobre esses animais em si, mas também sobre as instalações onde estes estão sendo criados. Esses cuidados acabaram por contribuir no surgimento de novo ramo de pesquisa, a Ciência de Animais de Laboratório (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Hoje é consenso que, para que esses animais tenham um bom padrão sanitário, estes devem ser mantidos em um ambiente com barreiras sanitárias adequadas que sejam formadas por uma combinação de instalações apropriadas, equipamentos, materiais, equipe treinada e procedimentos operacionais padrão, impedindo assim a contaminação da área de criação ou experimentação animal (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Segundo Fontes e Santos (2013), entre as principais barreiras sanitárias e de contenção que evitam a contaminação nas instalações animais estão a autoclave de dupla porta; o aparelho de ar condicionado com sistema de pressão, fluxo operacional, esterilização e desinfecção de materiais, tanques de imersão, filtros seletivos HEPA na entrada e saída do ar, fluxo laminar, racks ventilados, equipamentos de proteção individual, higienização dos funcionários, desinfecção do ambiente, cabines de troca, cabines de segurança biológica, guichê de passagem, microisoladores, ausência de janelas e controle de vetores.

Com base nas demandas atuais, tem-se então, realizado a uniformização microbiológica dos animais, fazendo com que haja uma redução no número de indivíduos usados, minimizando assim não só os riscos para a saúde humana devido a possíveis zoonoses, mas também proporcionando o bem-estar e a saúde dos animais de laboratório. Portanto atualmente, definem-se os padrões sanitários dos animais de laboratório, de acordo com a sua microbiota associada e com a complexidade do sistema de barreiras de proteção nos quais eles estão alocados (POLITI; PIETRO; SALGADO, 2008; ZOTZ; FICHER, 2018). Com base nestes parâmetros, os animais podem ser classificados em:

- a) Animais convencionais ou haloxênicos: possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente destituído de rígidas barreiras sanitárias. Todavia os animais são criados de acordo com princípios básicos de higiene (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; MAJEROWICZ, 2008; ZOTZ; FICHER, 2018).
- b) Animais SPF (*Specific Pathogen Free*) livre de patógenos específicos ou heteroxênicos: não apresentam microbiota capaz de lhes causar doenças, ou seja, possuem somente micro-organismos não patogênicos. São criados em ambientes protegidos por barreiras sanitárias rigorosas, onde todo o material deve ser esterilizado. Para o padrão sanitário SPF, os animais devem ser obtidos via cesariana (histerectomia) asséptica (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; MAJEROWICZ, 2008, ZOTZ; FICHER, 2018).
- c) Animais Gnotobióticos: possuem microbiota associada definida, e devem ser criados em ambientes providos de barreiras sanitárias absolutas, mantidos em isoladores plásticos e obtidos pela técnica de cesariana asséptica. Estes possuem subdivisões de acordo com a microbiota associada, sendo *Germ free* (GF), animais totalmente livres de microbiota, isto é, isento de todos os vírus, bactérias; monoxênico foram intencionalmente contaminados com uma espécie de micro-organismo; diexênicos com duas espécies e os poliexênicos com três ou mais espécies de micro-organismos (ZOTZ; FICHER, 2018).

Portanto, para obtermos animais de qualidade é preciso planejamento das áreas onde são criados, com a implementação de um rígido controle microbiológico e parasitológico, além da criação de um ambiente com barreiras sanitárias apropriadas (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006; MAJEROWICZ, 2008; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009). Dentro do planejamento para a criação e manutenção destes animais, o controle da ração fornecida deve ter destaque, visto que a

qualidade da mesma e detecção da presença de micro-organismos são extremamente importantes à saúde e a qualidade dos animais e conseqüentemente aos experimentos que estes serão expostos (REIS, 2008).

## **2.2 TIPOS DE FORMULAÇÃO DE RAÇÕES PARA ANIMAIS DE LABORATÓRIO X CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.**

A dieta de um animal de laboratório é composta por aproximadamente 50 nutrientes que são importantes para sua manutenção, crescimento e reprodução. Com base nesta necessidade foram desenvolvidas rações, que podem ser formuladas de diferentes maneiras: com ingredientes naturais, purificadas ou quimicamente definidas (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009), a característica intrínseca de cada uma delas pode interferir com a forma como os contaminantes microbianos atuam sobre elas. As rações feitas com ingredientes naturais são produzidas em moinhos comerciais e compostas por grãos de cereal, alfafa, feijão, farinha de carne e de peixe. Sua fabricação é geralmente mais barata do que a purificada e a quimicamente definida e é bem aceita pelos animais de laboratório. A desvantagem desse método é quando dois lotes da mesma ração apresentam diferenças, devido a variações das plantas, composição do solo, procedimentos de colheita, condições do tempo, métodos de moagem e fabricação, o que pode fazer com que haja variações nos resultados experimentais (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009). Além disso, esses ingredientes naturais podem sofrer contaminações microbiológicas durante plantio, colheita, armazenamento e transporte, ou seja, a própria matéria prima, tanto de origem vegetal como animal, possui um alto risco de contaminação (LONGO; SILVA; LANZARIN, 2010).

As rações purificadas utilizam somente um ingrediente para atender a cada nutriente, elas geralmente contêm uma quantidade equilibrada e padronizada de ingredientes como por exemplo, a caseína ou proteína isolada de soja que são utilizadas para atender as exigências proteicas e o amido de milho utilizado para atender as exigências de carboidrato. (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009; WEISKIRCHEN et al., 2020) possuindo assim, menor variabilidade na sua composição (FARIA, 2010).

Já as rações quimicamente definidas possuem em sua fórmula ingredientes quimicamente puros, produzidas com açúcares, triglicerídeos, aminoácidos, ácidos graxos, entre outros. Isso faz com que as concentrações dos ingredientes sejam controláveis (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009; WEISKIRCHEN et al., 2020).

Tanto a ração purificada quanto a quimicamente definida não são muito utilizadas, considerando o custo elevado, a baixa palatabilidade e por possuírem menor tempo de prateleira e por serem menos estáveis que as rações elaboradas com ingredientes naturais (NRC, 2010). No entanto, possuem menor risco de contaminação microbológica, já que existe um grande controle sobre a qualidade dos ingredientes (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009; NRC, 2010).

### **2.3 TIPOS DE PROCESSAMENTOS DAS RAÇÕES X CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.**

Além da classificação baseada na formulação, a ração também pode ser dividida de acordo com o processamento durante a sua fabricação, os dois processos mais utilizados são: extrusão e peletização. Na peletização o farelo da ração é transformado em pequenos pellets através de um processo físico-químico, aonde após ser adicionado vapor, a ração farelada é submetida à temperatura de 40 a 95°C, umidade de 14 a 20% e pressão de 2 Kgf/cm<sup>2</sup> por um curto período de tempo de 9 a 24 segundos (FARIA; STABILLE, 2007). Nesse processo o alimento fica mais compacto, facilitando o transporte, reduzindo a quantidade de partículas de pó, e ainda tornando esta mais palatável (AMARAL, 2002). Além de ser um método eficaz na redução de contaminação por *Salmonella* e outras enterobactérias (LONGO; SILVA; LANZARIN, 2010).

Já, na ração extrusada o seu farelo é elevado a uma compressão hidrotérmica que é a combinação de tempo de 5 a 10 segundos, alta pressão de 30 a 40 Kgf/cm<sup>2</sup>, temperatura de 120 a 200°C e umidade de 20 a 30%. As condições do processo e a qualidade do amido presente na mistura vai definir a eficiência da extrusão. Durante o processo de extrusão ocorre à expansão e gelatinização do amido, o que leva a redução na densidade e maior aeração do produto final. Desta maneira, as moléculas ficam mais expostas à ação enzimática, ocasionando maior digestibilidade quando comparada a ração peletizada (MOURA, 2014).

É importante enfatizar que o tratamento térmico, que ocorre na peletização e extrusão vem sendo utilizado para reduzir a incidência de fungos e bactérias em rações, incluindo a *Salmonella* spp. No entanto, este processo não deve ser o único método utilizado, pois é muito difícil conseguir que uma fábrica de rações tenha condições ideais para que todos os parâmetros de temperatura, umidade e pressão ocorram como é preconizado (VELDMAN et al., 1995; BRANDÃO et al., 2011).

Além disso, após as etapas de secagem, empacotamento e armazenamento, a ração fica suscetível a uma série de contaminantes, podendo haver proliferação de fungos e bactérias (SILVA; DOMARESKI, 2011).

## **2.4 PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO DA RAÇÃO**

Com base em todas as possíveis decorrências da contaminação microbiana das rações, e por se tratar de animais de criatórios científicos que não devem ser expostos à micro-organismos provenientes de meio externo, observa-se a necessidade da utilização de processos de esterilização destes alimentos, como autoclavação e irradiação, para que não haja a presença de contaminantes biológicos (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Geralmente, o processo mais comum de esterilização é feito por autoclavação (calor úmido) por vapor saturado sob pressão a altas temperaturas; 121°C por 20 minutos ou 132°C por 3 a 5 minutos, garantindo a eliminação de todos os micro-organismos através da termocoagulação das proteínas microbianas (MORIYA, 2012; NOGUEIRA; MIGUEL, 2013), no entanto pode haver perdas de nutrientes, pois ocorre a desnaturação de proteínas e produção de compostos tóxicos, como a acrilamida devido à alta temperatura (BARSZCZ et al., 2014; ADAMS et al., 2019).

A irradiação baseia-se na exposição do alimento à radiação ionizante, utilizando fótons gama emitidos por radioisótopos de cobalto 60. É um processo bem mais caro do que a autoclavação, pois envolve equipamentos de alta tecnologia (LUCA; REICHMANN; GONÇALVES, 2009). Este método de esterilização não é eficaz quando a carga infectante inicial do produto for muito alta, mesmo quando utilizado doses altas como 50 kGy que é o máximo permitido pela FDA (ADAMS et al., 2019). No entanto não gera a desnaturação de proteínas, mantendo o valor nutricional do alimento, já que provoca a quebra da molécula de DNA dos micro-

organismos, causando a sua morte (REIS, 2008; (LUCA; REICHMANN; GONÇALVES, 2009), mas pode haver perdas de vitaminas quando utilizado doses muito altas de cobalto 60 (WEISKIRCHEN et al., 2020).

Segundo kick (2020) o padrão ouro para esterilização é a autoclavação, pois oferece validação e análise internas, garantindo assim que o produto esteja estéril, enquanto que a irradiação ocorre em uma instalação externa e o fabricante não garante a esterilidade do produto e segundo Adams et al. (2019) o processo de irradiação não esterilizou rações que tinham uma carga alta de parvovírus murino , sendo que a autoclavação foi eficaz no processo de esterilização destas rações contaminadas com parvovírus murino.

## **2.5 CONTAMINAÇÃO DA RAÇÃO X LEGISLAÇÃO**

Segundo a resolução normativa nº 33 de 18 de novembro de 2016 a ração mais usual nos centros de criação e experimentação animal no Brasil é a de ingredientes naturais (BRASIL, 2016), esta é mais utilizada por ser mais barata e bem aceita pelos roedores (MOURA, 2016). Geralmente a fórmula nutricional de uma ração comercial para roedores com ingredientes naturais é a mesma, no entanto, as matérias-primas e a composição alimentar podem variar devido ao seu preço (MOURA, 2014).

As rações produzidas com ingrediente naturais podem sofrer com contaminações devido ao plantio, colheita, armazenamento, transporte, manuseio e por exposição a algum tipo de contaminante (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009; LONGO; SILVA; LANZARIN, 2010), fazendo com que haja comprometimento da sua qualidade higiênico-sanitária (GIRIO et al., 2012). Ao considerar também a existência de ingredientes de origem animal, observa-se que a própria matéria prima apresenta alto risco (LONGO, 2010). Um exemplo é a farinha de carne, que pelas suas próprias características é mais passível de sofrer processos de deterioração, tornando-se assim o meio ideal para proliferação de diversos micro-organismos patogênicos. Portanto, a ingestão de rações contaminadas pode causar sérios problemas para a saúde dos animais que os ingerem (FILHO et al., 2011).

Segundo Longo (2010), a presença na ração de bactérias, mesmo não patogênicas (que não provocam sintomas clínicos), pode afetar de alguma forma os animais, pois poderão competir com a microbiota normal, inibindo a absorção de

nutrientes devido à ligação nas microvilosidades intestinais, reduzindo a área de superfície de absorção de nutrientes, além disso, podem induzir uma resposta imunológica ou mesmo converter aminoácidos em aminas biogênicas.

A verificação da contaminação microbiológica da ração pode ser realizada através da constatação da presença de micro-organismos indicadores e pode oferecer elementos que indiquem a contaminação de origem fecal, deterioração do alimento, provável presença de patógenos, a não conformidade das condições sanitárias do processamento do alimento ou armazenamento e até mesmo sugerir que tempo de utilização estava inadequado (FILHO et al., 2011).

Pesquisas realizadas em indústrias de ração da União Europeia, indicam a *Salmonella* spp. como um dos principais micro-organismos contaminantes de rações de importância clínica veterinária, o que torna essa bactéria um alvo muito importante na determinação da qualidade das rações para animais (CARDOZO, 2011). Já a presença de coliformes fecais está associada ao armazenamento e à falta de higiene durante a manipulação (GIRIO, 2007).

O Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa nº 34, de 28 de maio de 2008 (BRASIL, 2008), define os procedimentos básicos para fabricação de farinhas e produtos gordurosos destinados à alimentação animal e regulamenta a Inspeção Higienico Sanitária e Tecnológica do Processamento de Resíduos de Origem Animal, estabelecendo que devem estar previstas análises periódicas para garantir a ausência de *Salmonella* spp. em 25g do produto acabado.

Segundo a Agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a detecção de toxinas ou micro-organismos patogênicos, representa não só risco à saúde do consumidor, mas indica que o alimento está em péssimas condições sanitárias. No caso dos alimentos para animais, os principais micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária, pertencem ao grupo dos coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. (SANTOS et al., 2000).

Americano (2016) estudando a legislação vigente, afirma que não existem parâmetros microbiológicos para coliformes totais, somente para os termotolerantes, já que são considerados melhores indicadores de contaminação fecal, pois o principal micro-organismo deste grupo é a *Escherichia coli*. De acordo com Neto (2016), a pesquisa de *E. coli* fornece informações sobre as condições higiênico sanitárias de um produto, sendo a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos.

Em relação à presença de fungos, a legislação brasileira não estabelece limites para a quantificação destes em alimentos para consumo humano e animal (BERNARDI; NASCIMENTO, 2005; AMERICANO, 2016), contudo a presença destes micro-organismos sugere contaminação ambiental e do alimento. Seu desenvolvimento pode ser favorecido por umidade e temperatura inadequadas, podendo gerar a produção de metabólitos tóxicos, como as micotoxinas (BERNARDI; NASCIMENTO, 2005; FRANÇA et al., 2011).

Além disso, como a maior parte das bactérias de interesse médico veterinário e agrônomo são mesófilas, que crescem em temperaturas compreendidas entre 28 e 37°C, a contagem destas bactérias é o método mais utilizado para quantificá-las em alimentos. Apesar desta técnica não diferenciar as espécies bacterianas, ela pode servir como um indicador geral desta população (SILVA; DOMARESKI, 2011), já que a quantidade desses micro-organismos nos alimentos irá sugerir a sua qualidade, mostrando assim, se os processos industriais, temperatura, transporte e armazenamento estão sendo realizados de forma correta (SILVA, 2002). Apesar da importância desta avaliação, no Brasil não existe padrão microbiológico para mesófilos em alimentos (BERNARDI; NASCIMENTO, 2005; AMERICANO, 2016; NETO, 2016.).

No Brasil o órgão responsável pela regulamentação e fiscalização de produtos destinados a alimentação animal é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que formula, executa e fiscaliza as políticas para garantir a segurança destes alimentos (AMERICANO, 2016). Seguindo essa linha, no que se refere às Boas Práticas de fabricação (BPF) e condições higiênico-sanitária, todo estabelecimento que trabalhe com nutrição animal deve seguir as normas estabelecidas pela instrução Normativa do MAPA nº 04/2007 (BRASIL, 2007).

Através da instrução normativa nº 30, de 26 de junho de 2018 o MAPA define um manual para as análises químicas e microbiológicas de Alimentos de origem animal (BRASIL, 2018b). No entanto, o referido manual não faz menção aos limites de micro-organismos nos alimentos destinados aos animais. Da mesma forma, a RDC 12 de 2001, que é o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001), também não cita as rações para animais. Segundo Americano (2016) em nosso país não há legislação específica que estabeleça padrões microbiológicos para ração animal.

## **2.6 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM RAÇÕES.**

Os micro-organismos indicadores são utilizados para demonstrar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, podendo apontar falhas durante o processamento, produção ou armazenamento, além de indicar a ocorrência de contaminação de origem fecal, possível presença de patógenos e deterioração do alimento (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014).

Apesar da maior parte dos alimentos estarem sujeitos às várias fontes de contaminação por micro-organismo, os níveis de contaminação e manutenção da microbiota em um número aceitável, pela legislação vigente, pode ser mantida por meio de manuseio adequado, conhecimento e emprego de fatores que influenciam o crescimento de micro-organismos em alimentos, dentre outras ações (SOUZA, 2006). Segundo Girio (2007) e Americano (2016) os micro-organismos que indicam a qualidade higiênico-sanitária de rações são: Mesófilos totais, bolores, leveduras, coliformes totais e termotolerantes e pesquisa de *Salmonella* spp. A seguir a descrição de cada um desses micro-organismos:

### ➤ **Mesófilos**

As bactérias mesófilas crescem em temperaturas variadas, todavia seu ideal fica em torno de 30-45°C. É um grupo de grande importância no que se refere a qualidade dos alimentos, especialmente os de origem animal, pois o índice de contagem de mesófilos pode ser bastante alto quando o alimento é mantido em temperatura ambiente (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014). Com base nisso, uma grande detecção de mesófilos em um alimento serve como indicação de contaminação da matéria-prima ou falha no processamento durante a produção ou armazenamento, indicando péssimas condições higiênico-sanitárias (AMERICANO, 2016). Além disso, quando há uma alta contagem destas bactérias no alimento, ocorre a sua deterioração, diminuindo assim o seu tempo de armazenamento e causando também riscos à saúde de quem os consomem (BERNARDI; NASCIMENTO, 2005).

## ➤ Bolores e leveduras

Os fungos são microrganismos eucariotos, heterotróficos que se dividem em bolores e leveduras (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014). Os bolores são os fungos filamentosos, multicelulares que podem estar presentes no solo, ar, água e em matéria-orgânica em decomposição. As leveduras são fungos não filamentosos que na maioria das vezes são disseminados por insetos, vetores e pelo vento (SILVA, 2002). Sendo assim, os fungos têm uma grande dispersão no ambiente. Sua proliferação é facilitada por serem tolerantes a fatores extremos que limitam o desenvolvimento bacteriano, como baixos valores de PH e temperatura (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014).

Quando estão em uma contagem elevada nos alimentos podem fornecer informações como: contaminação excessiva na matéria-prima, péssimas condições higiênico-sanitárias, falhas no processamento e/ou estocagem (SILVA, 2002). Além disso, podem causar toxicidade alimentar, visto que determinadas espécies, em condições de armazenamento e conservação deficientes, produzem micotoxinas na superfície dos alimentos (MOURA et al., 2014).

Os fungos que produzem micotoxinas de importância veterinária utilizam uma variedade de substratos como os grãos e seus subprodutos que estão entre os ingredientes utilizados na fabricação de rações. Essas micotoxinas vão apresentar diferentes “órgãos-alvo”, como aparelho reprodutor, rins, fígado, aparelho digestório e sistema nervoso central, além de afetarem o sistema imune e coagulação sanguínea (FRANÇA, et al., 2011).

Os principais fungos toxigênicos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Estes são anemófilos e podem facilmente colonizar a ração principalmente quando a umidade e a temperatura forem favoráveis (GIRIO, 2007; HILLMANN et al., 2015).

Segundo Bernardi e Nascimento (2005) quando as rações estão contaminadas com fungos toxigênicos, podem ocasionar sérios riscos à saúde dos animais e também a do manipulador.

➤ **Coliformes Totais e Termotolerantes.**

Os coliformes totais e termotolerantes são micro-organismos considerados indicadores das condições higiênico-sanitárias da água e alimentos. São os indicadores de contaminação fecal mais utilizados, sendo empregados a mais de cem anos, como parâmetro bacteriano na avaliação da qualidade de águas e alimentos contaminados (SOUSA, 2006).

Essas bactérias pertencem a família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos e apresentam a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, dentro de 24 a 48 horas a 35°C (BRASIL, 2013b). Os coliformes totais podem ser encontrados no trato gastrointestinal do homem e de outros animais homeotérmicos, no solo, água e vegetais (ALVES; ATAIDE; SILVA, 2018).

Já as bactérias termotolerantes ou fecais são aquelas pertencentes ao grupo dos coliformes totais que apresentam a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás quando incubadas por 24 horas, com temperatura entre 44,5 e 45,5°C, (AMERICANO, 2016). Nesse grupo estão presentes os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, no entanto, alguns pesquisadores consideram os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* provenientes de outras origens que não a fecal. Em contrapartida, a *E. coli*, por ter seu habitat primário no trato gastrintestinal, é considerada a principal indicadora de contaminação fecal em alimentos (MOURA et al., 2014).

➤ ***Salmonella* spp.**

A *Salmonella* é uma bactéria que pertence à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram-negativos, não fermentadores de lactose e sacarose, anaeróbios facultativos móveis e flagelados. Essa bactéria tem um crescimento ótimo na faixa de 35 a 37°C e pH 6,5 a 7,5, podendo sobreviver ao congelamento e à desidratação por longos períodos na matéria orgânica (VASCONCELLOS; HAMATY; NASCIMENTO, 2014).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *S.bongori* e *S.enterica*. A *Salmonella entérica* é dividida em várias subespécies e sorotipos importantes com base na composição antigênica com relação aos antígenos somáticos, capsulares e

flagelares. Com base na nomenclatura atual, os nomes dos sorotipos de *Salmonella* entérica da subespécie entérica não são mais escritos em itálico e aparecem com a primeira letra maiúscula (ex.: *Salmonella* Typhi) (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013). Existem cerca de 2.500 sorotipos de *Salmonella* identificados, sendo *S. Typhimurium* seguido pela *S. Enteritidis*, os principais sorotipos encontrados nos alimentos (VASCONCELLOS; HAMATY; NASCIMENTO, 2014).

A salmonelose é uma zoonose de grande importância para a saúde pública, geralmente é a causa primária de surtos por intoxicação alimentar em vários países do mundo (MOURA et al., 2014; MENDONÇA, 2016), tendo uma ampla distribuição entre os animais, que mesmo assintomáticos podem eliminar a bactéria através de suas fezes, contaminando direta ou indiretamente, alimentos de origem animal e vegetal (VASCONCELLOS; HAMATY; NASCIMENTO, 2014).

As farinhas de carne e ossos utilizadas na fabricação da ração são as principais fontes de contaminação por esse patógeno. E mesmo após a peletização a ração pode ser contaminada por *Salmonella* quando armazenada de forma inadequada ou for exposta ao contato com vetores como ratos, formigas e baratas, que podem disseminar esta bactéria (AMERICANO, 2016). Além disso, esta bactéria pode estar presente em equipamentos da linha de produção, podendo formar biofilmes, o que dificulta a ação dos desinfetantes e favorece a sua permanência e desenvolvimento nas fábricas de ração (VESTBY, 2010).

Segundo Fagundes e Ferreira (2018), uma vez instalada, a *Salmonella* spp. pode permanecer por até dois anos em rações armazenadas em temperatura ambiente. De acordo com os autores, os principais meios para a sua redução e eliminação em rações, são embasados no monitoramento e controle da contaminação dos ingredientes, tratamento químico dos equipamentos, locais de armazenamento e tratamento térmico das rações.

## 2.7 CORANTE ALIMENTÍCIO

Corantes são aditivos alimentares definidos como toda substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento (BRASIL,1977). Os corantes são utilizados em alimentos devido a uniformidade da cor, alto poder tintorial, isenção de contaminação microbiológica e produção relativamente barata

(CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002). E como a cor está associada a vários aspectos da vida ela vai influenciar bastante nas escolhas do dia-a-dia, incluindo aquelas que envolvem os alimentos (OLIVEIRA, et al. 2010). Portanto a qualidade dos alimentos não vai depender somente de suas características microbiológicas, mas também da cor, sabor, textura e valor nutritivo (ANTONIO, 2014).

Além disso, de acordo com Boley (1980 apud ANTONIO, 2014) a aparência dos produtos naturais ou processados é de extrema importância para a indústria de alimentos. Por isso, desde a descoberta dos corantes sintéticos nos séculos XVIII e XIX, o interesse por corantes artificiais pela indústria alimentícia vem aumentando, já que esses corantes podem ser utilizados para mascarar aparência de produtos de má qualidade. Atualmente vem sendo utilizado pela indústria alimentícia cerca de 750-800 mil toneladas de corantes sintéticos por ano, destes quase 26 mil são consumidos no Brasil (RESENDE, 2015).

Os corantes sintéticos são mais utilizados que os naturais, pois são mais estáveis, tem maior durabilidade e proporcionam cores mais intensas (ANTONIO, 2014). Esses corantes fazem com que o alimento apresente maior uniformidade, diminuindo variações de cor entre diferentes lotes, devolvendo a cor que foi perdida durante o processamento ou armazenamento, além de corar alimentos incolores, tornando-os mais atrativos para o consumo (MOTA, 2016). São definidos como substâncias intensamente coloridas que ao serem aplicadas em algum material conferem cor (RESENDE, 2015).

De acordo com a resolução 44/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde, os corantes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos possuem origem vegetal e eventualmente animal. Estes podem ser adquiridos diretamente da matéria prima ou mediante ao emprego de processo tecnológico adequado. Já os corantes inorgânicos são aqueles obtidos a partir de substâncias minerais e submetido a processos de construção e purificação adequados a seu emprego nos alimentos (BRASIL, 1977).

Por colorir os alimentos tornando-os mais atrativos e apetitosos os corantes vêm sendo utilizados há séculos, apesar de diferentes opiniões quanto à sua inocuidade. Com base nessa divergência, o seu uso somente é considerado inofensivo à saúde quando respeitados os parâmetros estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que determina segundo a resolução nº

387 de 05/08/1999 a ingestão diária aceitável (IDA) e os limites máximos de cada corante permitidos (BRASIL, 1999) (quadro 1), no entanto esses valores podem sofrer alterações dependendo dos resultados de estudos toxicológico (ANTONIO, 2014).

Com base no uso já consagrado de alguns corantes pela indústria alimentícia, pensamos em pesquisar também seu possível uso na marcação de alimentos dos animais de laboratório, para facilitar o controle de sua qualidade em função do tempo, e outros parâmetros, o que era impossível de realizar sem uma marcação realizada diretamente no alimento, por algo que não interferisse em sua qualidade e características.

**Quadro 3: Ingestão diária aceitável (IDA) e limites máximos de corantes artificiais.**

Nome	Cor	IDA (mg/Kg de peso corpóreo)	Limite máximo (mg/100g)
Amaranto	Magenta	0,50	10,0
Amarelo crepúsculo	Laranja	2,50	10,0
Azorrubina	Vermelho	4,00	5,00
Azul brilhante	Azul turqueza	10,0	30,0
Azul patentev	Azul	15,0	30,0
Eritrosina	Pink	0,10	5,00
Indigotina	Azul royal	5,00	30,0
Ponceau 4R	Cereja	4,00	10,0
Verde Rápido	Verde mar	10,0	30,0
Vermelho 40	Vermelho alaranjado	7,00	30,0
Tartrazina	Amarelo limão	7,50	30,0

Fonte: Adaptado: Oliveira et al., 2010

### **3 JUSTIFICATIVA**

Já que não há legislação específica para o controle de qualidade microbiológico da ração de animais de laboratório e a ração oferecida pode vir a apresentar micro-organismos que prejudicam não só a saúde dos animais, mas também os resultados experimentais das pesquisas que os utilizam, é necessária a verificação da qualidade higiênico-sanitária deste alimento, para verificar se o transporte, temperatura, armazenamento, ambiente, manuseio e tempo de disponibilização nas gaiolas estão alterando a sua esterilidade, bem como sugerir soluções nos casos em que ocorre essa alteração.

Além disso, a linhagem C57BL/6, escolhida para dar suporte a esse estudo é uma das linhagens de camundongos mais utilizadas no INCA, o que proporcionará a aplicação dos resultados obtidos nesta pesquisa, dentro da unidade onde trabalho, justificando mais ainda minha liberação e inserção no mestrado profissional em Ciência em Animais de Laboratório do ICTB/Fiocruz.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a qualidade microbiológica de rações irradiadas ou autoclavadas, e em quanto tempo que estas perdem a qualidade higiênico-sanitária quando oferecidas *ad libitum* para camundongos da linhagem C57BL/6.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**a)** Identificar se a marcação das rações com corantes alimentícios do tipo rosanilinas altera a palatabilidade, influenciando na aceitação dos diferentes pellets ofertados aos animais estudados.

**b)** Verificar *in vitro* se os corantes utilizados influenciam no crescimento bacteriano de cepas padrão.

**c)** Evidenciar nas amostras de ração a presença de indicadores de condição higiênico-sanitária, como micro-organismos mesófilos totais, coliformes totais, termotolerantes, bolores, leveduras e patogênicos como *Salmonella* spp.

**d)** Observar, no decorrer do experimento, se haverá diferença na perda da qualidade higiênico-sanitária entre as rações (irradiada ou autoclavada).

**e)** Avaliar se as bactérias detectadas nas rações disponibilizadas estão presentes também nos comedouros e na cavidade oral dos animais.

## 5 MATERIAL E MÉTODO

### 5.1 RAÇÃO

As rações utilizadas em nossa pesquisa foram rações industrializadas produzidas com ingredientes naturais em forma de *pellet* e esterilizadas por meio de processos como irradiação e autoclavação.

A ração irradiada utilizada foi a que estava disponível no INCA. Essa ração foi esterilizada pela Companhia Brasileira de Esterilização, seguindo a dose de irradiação de 10 kGy raios gama (LUCA; REICHMANN; GONÇALVES, 2009).

A ração autoclavável utilizada foi autoclavada no campus da Fiocruz Manguinhos, por 121°C por 20 minutos na autoclave da marca Getinge, modelo: PACS 2000 no Laboratório de Experimentação Animal - LAEAN/Bio-manguinhos/FIOCRUZ. O saco de 10 Kg de ração estéril foi lacrado, e posteriormente colocado dentro de um isopor higienizado e transportado para o INCA. Esse procedimento foi realizado neste laboratório, pois a autoclave do INCA não é validada para esterilizar ração e o LAEAN possui autoclave validada para esse fim (anexo b).

### 5.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram escolhidos para esse estudo, por ser a linhagem isogênica mais utilizada em pesquisas biomédicas, sendo utilizada em pesquisas de oncologia, imunologia, doença metabólica, dependência e toxicologia (TACONIC, 2020). Essa linhagem foi criada nos EUA, pelo fundador do Laboratório Jackson nas décadas de 1920-1930 e foi a primeira linhagem a ter seu genoma sequenciado. Embora essa linhagem seja refratária a alguns tumores, possui um background que permite a expressão da maioria das mutações, sendo muito utilizada como base genética para modelos de camundongos transgênicos (THE JACKSON LABORATORY, 2018).

Por ser uma linhagem consanguínea apresenta um alto grau de uniformidade em suas características herdadas, como em sua aparência, comportamento e respostas a tratamentos experimentais (CHARLES RIVER, 2020). Logo, devidos essas suas características, é uma das linhagens mais utilizadas no INCA, pois a

maioria das pesquisas nessa instituição são realizadas com animais transgênicos ou com a linhagem C57BL/6.

### **5.3 ALOJAMENTO E MANUTENÇÃO ANIMAL**

Os animais foram mantidos no Laboratório de Recursos Animais do INCA na área de criação animal, onde foi realizado todo o experimento, sendo divididos em grupos de 5 animais por gaiola.

As gaiolas utilizadas são mini-isoladores em polisulfona (32 x 20 x 21 cm) com aramado em aço inoxidável e tampa com filtro. Os mini-isoladores foram colocados em rack ventilados possuindo dupla filtragem com pré-filtro e filtro absoluto (HEPA). No aramado foi colocado água e ração fornecida *ad libitum* durante todo experimento, sendo utilizada maravalha de *Pinnus elliotii* como cama (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009), todo o material foi esterilizado por autoclavação por 121°C durante 20 minutos, exceto a ração irradiada.

Os animais foram mantidos no biotério com temperatura de conforto de 20 a 26°C e umidade de 40 a 60% e com ciclo de iluminação de 12/12 horas (claro/escuro) seguindo as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (BRASIL, 2013).

A água e as gaiolas foram trocadas uma vez por semana durante a manutenção desses animais, no momento em que as novas rações marcadas foram adicionadas por cima da ração remanescente.

### **5.4 DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS**

#### **5.4.1 Teste de palatabilidade da ração colorizada**

Para determinar o tempo de exposição das rações nos comedouros das gaiolas de camundongo foram utilizados corantes alimentícios que possuem como base corantes orgânicos e álcool etílico neutro da marca Arcólor (Arcólor S.A., São Paulo, Brasil), com diferentes cores (amarelo, vermelho e azul) para marcar as rações. Segundo o fabricante a quantidade de corante utilizado no alimento deve ser uma parte por mil, ou seja, 1mL/1000g, no entanto essa quantidade pode ser alterada de acordo com a tonalidade desejada. Portanto, para atingir a cor desejada

utilizamos aproximadamente de 0,03 mL à 0,05 mL do corante para cada *pellet* de ração, pois cada *pellet* utilizado no experimento pesava entre 3 e 5g. Segundo Lapchik, Mattaraia e Ko (2009) o consumo diário de ração para um camundongo adulto é de 4-5g/dia, sendo assim a quantidade de corante consumida pelos animais está de acordo com a legislação vigente (quadro 1).

Além do tempo de exposição da ração no comedouro, foi verificado se a ração marcada permaneceu palatável e se houve preferência entre a ração normal e a marcada e entre as diferentes cores.

O saco de 5kg contendo ração irradiada foi aberto em módulo de troca (estações de transferência de animais, onde o fluxo de ar é filtrado por filtro HEPA) e com o auxílio de um pincel estéril, marcou-se todo o pellet com o corante comestível que foi esterilizado por filtração, utilizando um filtro com membrana de 0,22 µm.

Na primeira gaiola foram marcados seis pellets com corante azul, seis pellets com o corante vermelho e seis pellets com corante amarelo que foram misturados a seis pellets de ração sem marcação. Na segunda e terceira gaiolas pellets foram alocados como na gaiola 1 (figura 1), os pellets secaram naturalmente dentro da cabine de segurança biológica. O consumo das rações foi verificado três vezes na semana (segunda, quarta e sexta), onde verificou-se a quantidade de pellets existentes em cada gaiola. Foram utilizados 15 camundongos da linhagem C57BL/6 divididos em três gaiolas, ficando cinco animais por gaiola, formando assim três grupos.

**Figura 1: Ração marcada com corante alimentício azul, amarelo e vermelho e sem marcação.**



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

#### 5.4.2 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do corante

Antes de iniciar os experimentos com os animais foi realizada a avaliação da inocuidade dos corantes alimentícios líquidos da marca Árcolor frente às bactérias padrão ATCC. Nesse teste cada corante alimentício (azul, vermelho e amarelo), foi misturado em duplicata em placas de Petri preparadas com meio de cultura ágar Mueller-Hinton esterilizado por autoclavação.

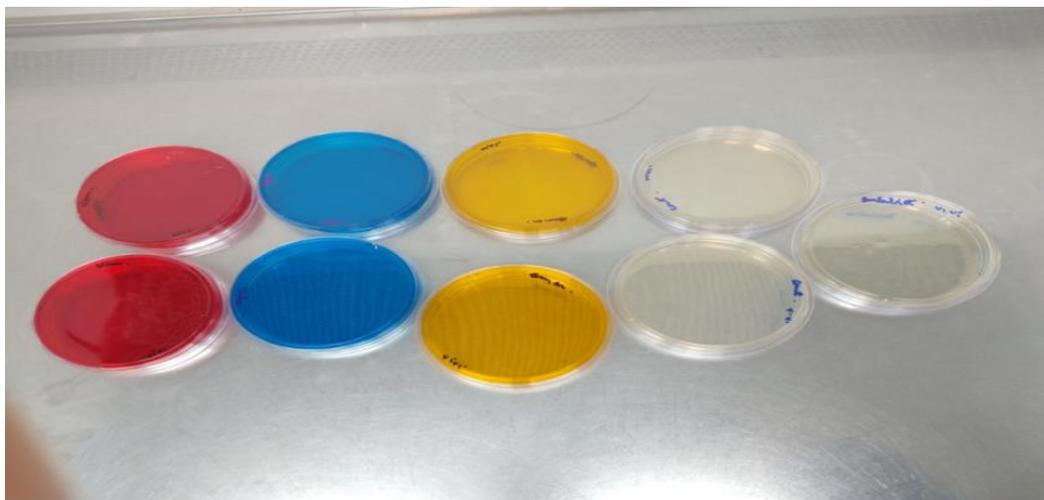
Para cada teste, duas placas foram vertidas e homogeneizadas com 18 mL do meio ainda líquido (aproximadamente 50°C) e 2 mL do corante previamente filtrado com filtro estéril de 0,22 µm.

Foram ainda adicionados em separado 20 mL de meio ágar Mueller- Hinton sem corante em três placas de Petri, duas para realização de controle positivo e uma para controle negativo, onde acrescentou-se o antimicrobiano ciprofloxacino (0,01 mg/mL) ao meio ainda líquido (aproximadamente 50°C).

Quando os meios solidificaram, as placas foram colocadas dentro de estufa bacteriológica a  $\pm 36^{\circ}\text{C}$  por 48h para teste de esterilidade (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013). Após esse período, as bactérias ATCC (*American Type Culture Colection*) *E. coli* I (25922), *E. coli* II (35218), *Staphylococcus epidermidis* (12228), *Staphylococcus aureus* (29213), *Enterococcus faecalis* (29212), *Streptococcus agalactiae* (13813), pertencentes ao LabMicro do DCB (ENSP/Fiocruz), previamente crescidas em caldo Mueller-Hinton até uma turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, foram semeadas na superfície de todas as placas, na forma de *spot* de 10 microlitros. As placas semeadas foram então novamente incubadas em estufa bacteriológica a  $\pm 36^{\circ}\text{C}$  por 24/48h (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013).

Para esse teste foi utilizado um total de nove placas de ágar Mueller- Hinton, duas sem corante (controle positivo), uma com o antimicrobiano de amplo espectro ciprofloxacino (0,01 mg/mL) (para controle negativo), e seis com adição de corantes (uma duplicata para cada teste com cada corante) (figura 2). Esse experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP- Fiocruz).

**Figura 2: Placas com corante alimentício incorporado ao meio de cultura ágar Mueller-Hinton e placas somente com o meio de cultura.**



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

#### **5.4.3 Teste de esterilidade e marcação das rações.**

O teste de esterilidade tanto da ração autoclavada como da irradiada, foi realizado dentro de cabine de segurança biológica classe II e consistiu em testes de contagem de mesófilos, bolores e leveduras, seguindo as recomendações da Anvisa (2010) descritas nos itens 5.5.3 e 5.5.8.

Esta avaliação da esterilidade foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP- FIOCRUZ) no campus da Fiocruz Manguinhos.

Após uma semana de utilização das rações, foi realizada uma nova análise para verificar se o manuseio e estocagem, após abertura das embalagens, não alterou seu conteúdo microbiológico. É importante destacar que depois de abertas, as mesmas foram lacradas com fita crepe e ficaram armazenadas dentro do módulo de troca (estações de transferência de animais, onde o fluxo de ar é filtrado por filtro HEPA).

#### 5.4.4 Marcação das rações.

Depois de verificado a inocuidade dos corantes e se os procedimentos de esterilização da ração irradiada ou autoclavada eram eficazes, foi iniciado o experimento principal. Nesta pesquisa, os sacos com as rações (autoclavada ou irradiada), que foram previamente utilizadas no teste de esterilidade uma semana antes do início do experimento, foram abertos nos módulos de troca e os pellets separados e marcados utilizando um pincel estéril (autoclavado) com corante comestível tipo anilina, que foi previamente esterilizado por filtração, utilizando um filtro com membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Este experimento foi realizado em duas semanas, sendo que na primeira semana foi colocado 220g de ração (autoclavada e irradiada) no comedouro de cada gaiola dos camundongos. Estas rações foram marcadas com corante comestível tipo anilina na cor azul e, após uma semana de permanência dessa ração no comedouro, foram retiradas amostras para a realização das análises microbiológicas (figura 3) para verificar a presença de micro-organismos indicadores, como mesófilos totais, coliformes totais, termotolerantes, bolores, leveduras e patogênicos como *Salmonella* spp.. As amostras contendo 25g desta ração foram retiradas assepticamente para análise de *Salmonella* spp. e 10g para as outras análises. As análises foram realizadas no Laboratório de análise microbiológica de alimentos e água, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS - Fiocruz), seguindo as determinações da Anvisa (2010), de Feng e colaboradores (2018) e de Andrews e colaboradores (2018).

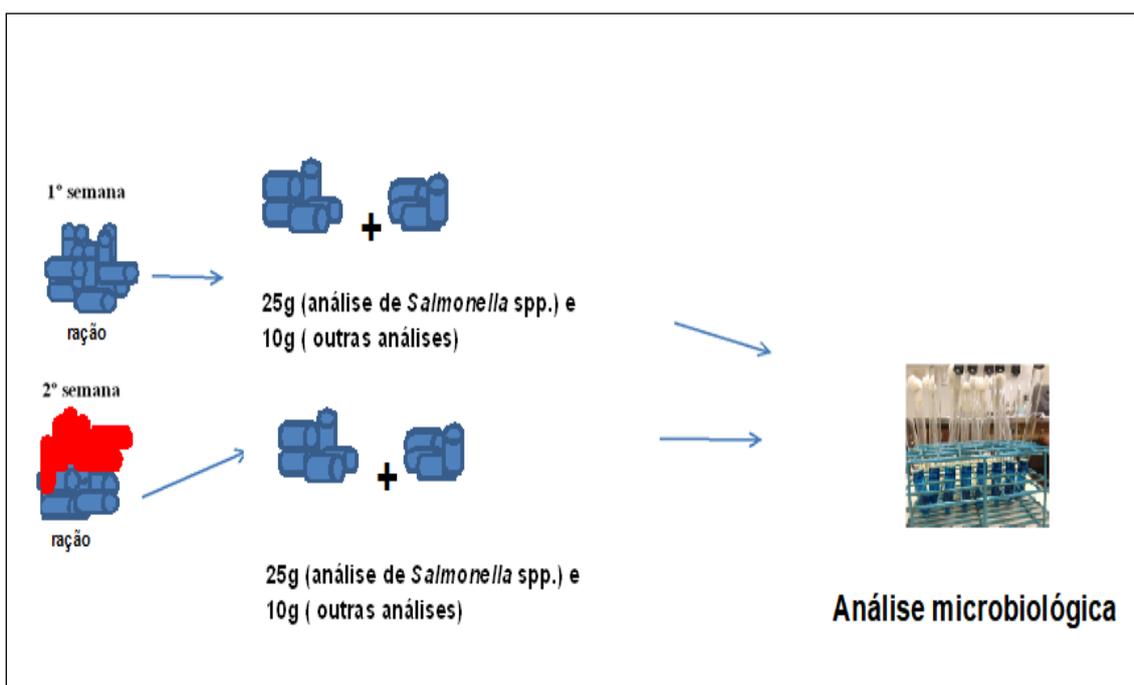
Após a retirada das amostras para as primeiras análises, foram acrescentados ao comedouro, sobre as rações azuis remanescentes, 110g de ração coradas em vermelho (figura 3). Decorrido mais uma semana, foram realizadas as análises microbiológicas dos pellets corados em azul que permaneceram duas semanas no comedouro, seguindo o mesmo protocolo do procedimento anterior, ou seja, retirou-se 25g para a pesquisa de *Salmonella* spp. e 10g para as outras análises (figura 3).

Esse procedimento mimetiza o procedimento padrão de acrescentar novos pellets semanalmente nos comedouros por cima dos pellets antigos sem a retirada do alimento remanescente. E através da ração marcada será possível a diferenciação entre as rações iniciais e as subsequentes, permitindo comparar a sua

qualidade/tempo de exposição. Assim, é possível verificar o tempo que a ração permanece no comedouro sem haver contaminação.

Nesse experimento utilizamos 40 animais da linhagem C57BL/6 que foram baseados nos trabalhos de Reis (2008), RDC nº 12 da Anvisa (BRASIL, 2001) e Clarke et al. (1977). Sendo 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) para ração irradiada e 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) para ração autoclavada, onde em cada gaiola foram colocados 5 animais, formando assim 4 grupos por ração.

**Figura 3: Esquema das análises microbiológicas das rações marcadas com corantes comestíveis**



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

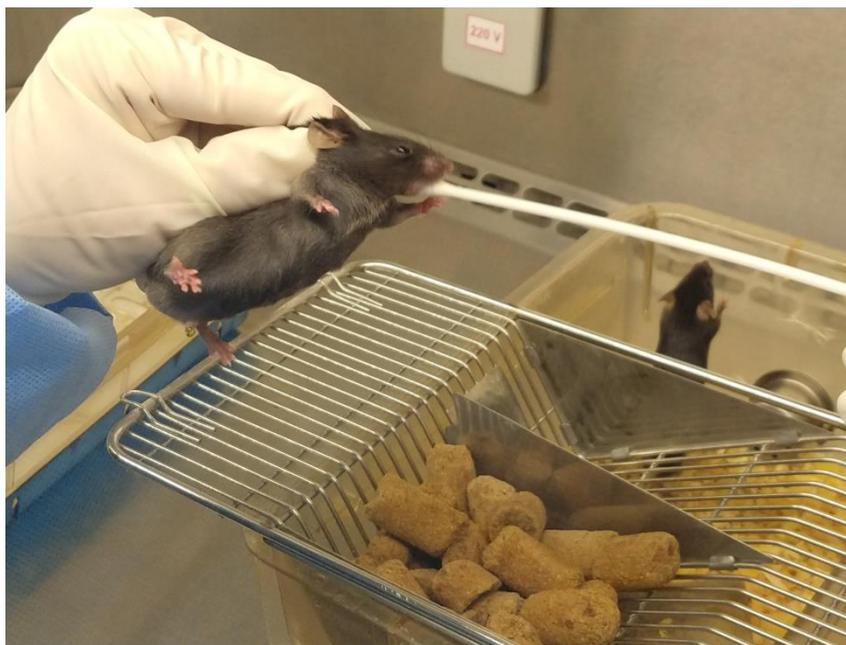
#### 5.4.5 Coleta de material da cavidade oral dos camundongos

Ao final das análises das rações (autoclavada e irradiada), foi realizada a coleta com swab estéril do material da cavidade oral de oito camundongos, conforme recomendado por Reis (2008), que em seu estudo utilizou quatro camundongos por grupo de ração para realização das análises microbiológicas, sendo assim, utilizamos quatro camundongos de cada grupo das duas rações: quatro camundongos da ração autoclavada e quatro camundongos da ração irradiada que foram escolhidos de forma aleatória dentro do grupo. Os animais foram contidos

segurando-se a pele da região dorso-cervical, entre os dedos indicadores e polegar, fixando sua cauda entre os outros dedos e a palma da mão, limitando assim os seus movimentos para que o swab pudesse ser passado em toda cavidade oral (figura 4) (YAMAMOTO; GACEK, 2012). O swab estéril foi aberto pela parte superior do pacote do lado oposto ao algodão, para evitar sua contaminação e, após a coleta do material, foi introduzido de forma asséptica em tubos contendo meio de transporte Stuart (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013) e encaminhado para o Laboratório de Microbiologia do Departamento Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP- FIOCRUZ), para análise da microbiota da cavidade oral dos animais.

Os resultados das análises microbiológicas dos animais foram então comparados com o resultado do monitoramento sanitário da colônia de criação do Inca (Anexo c). Este é realizado trimestralmente segundo recomendações da Felasa, a partir de amostras retiradas de órgãos genitais, mucosa, intestino grosso nasofaringe e traqueia (FELASA, 2014).

**Figura 4: Swab da cavidade oral do camundongo (linhagem C57BL/6).**

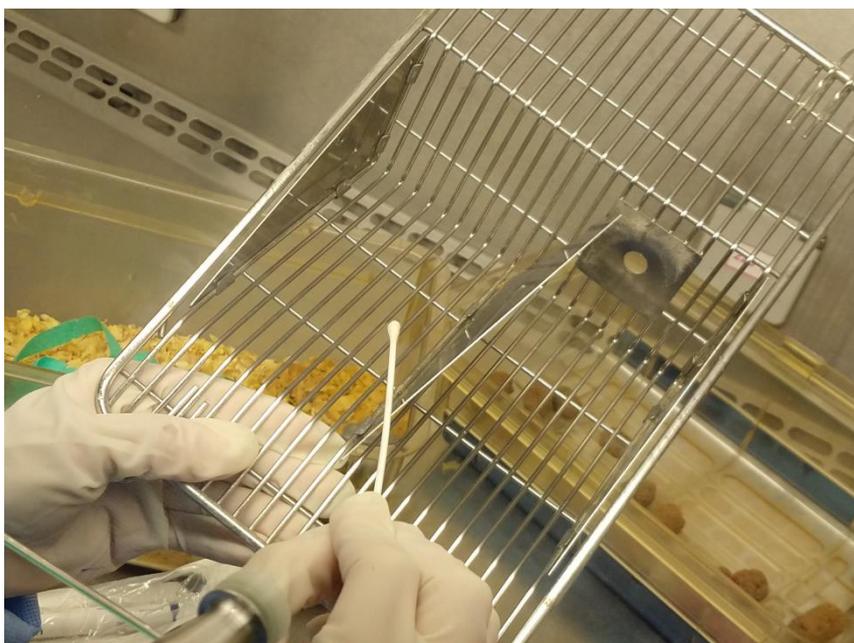


**Fonte:** Arquivo pessoal, 2019.

#### 5.4.6 Coleta de material dos comedouros

Para a coleta de material dos comedouros foi utilizado um swab estéril, que foi aberto pela parte superior do pacote do lado oposto ao algodão para evitar sua contaminação, como descrito no item anterior, porém para esse procedimento a extremidade com algodão foi umedecida no diluente (0,95 ml de salina estéril) (MARTINS; BARTH, 2013). Em seguida, foi realizada a coleta com o swab na superfície do comedouro (figura 5), realizando-se movimentos da esquerda para a direita e posteriormente de baixo para a cima, rodando continuamente o swab, para que toda a sua superfície que contém o algodão entre em contato com a amostra (SILVA, 2013). Após a coleta do material, os swabs foram introduzidos de forma asséptica no meio de transporte Stuart (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013) e encaminhado para o Laboratório de Microbiologia do Departamento Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública.

**Figura 5: Swab do comedouro**



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2019.

## **5.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA**

### **5.5.1 Diluição das amostras de ração**

Seguindo as recomendações da ANVISA (2010), para pesquisa de *Salmonella* spp. foram adicionados 225 ml do diluente (cloreto de sódio – peptona com PH 7,0) a 25 gramas de cada tipo de ração. Para a verificação da presença dos outros micro-organismos, foram adicionados 90mL do diluente (cloreto de sódio – peptona com PH 7,0) em 10 gramas de ração.

A partir destas diluições foram preparadas diluições decimais sucessivas, pela transferência de 1 mL da diluição anterior em 9 mL de diluente, fazendo as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  (ANVISA, 2010; FENG et al., 2018; ANDREWS et al., 2018). As análises microbiológicas foram realizadas após as diluições seguindo as recomendações dos mesmos autores.

### **5.5.2 Controle de qualidade dos meios sólidos e líquidos**

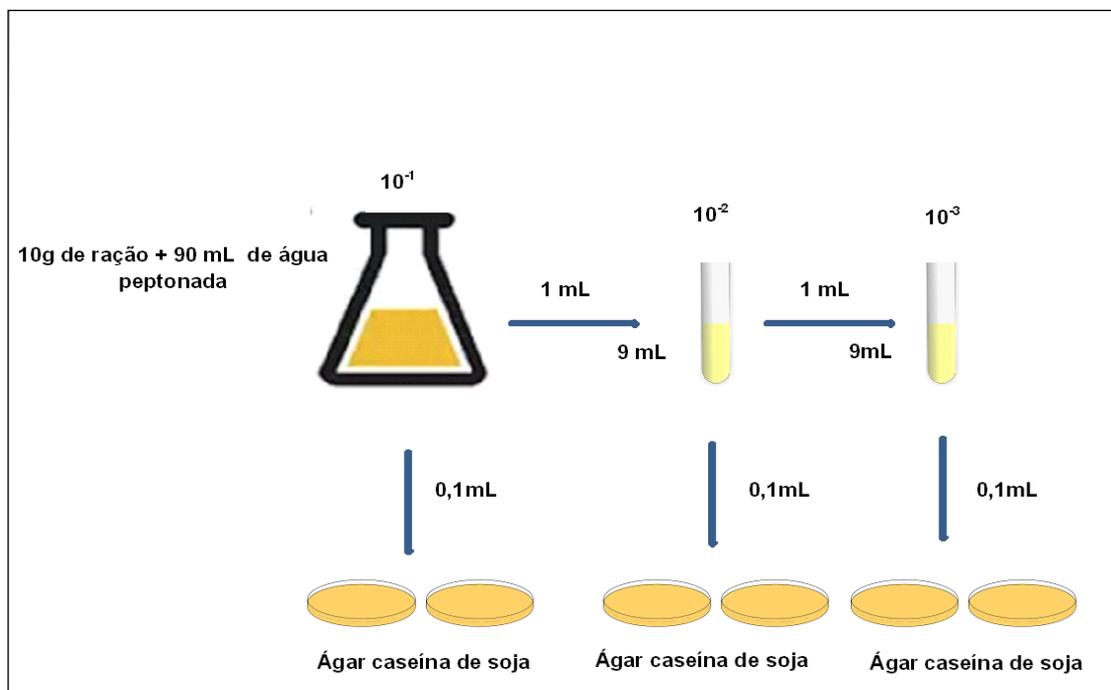
Os meios sólidos e líquidos foram autoclavados a 121°C, por 20 minutos, resfriado a 45-49°C e distribuídos em placas e tubos estéreis dentro de cabine de segurança biológica de nível II. Foram adicionados 20mL de cada meio sólido às placas de Petri estéreis (90x15mm) e aos tubos estéreis de 15mL foram adicionados 10mL de cada meio líquido. Os tubos com os meios líquidos e as placas solidificadas foram colocadas em estufa bacteriológica a 37°C para teste de esterilidade por 24 h. Após esse tempo, uma partida destas placas e tubos foi semeada para teste de viabilidade segundo as sugestões de Manrique, Paiva e Lima (2016). Após resultados satisfatórios do controle de qualidade dos meios sólidos e líquidos estes foram utilizados nas análises microbiológicas.

### **5.5.3 Contagem de número total de micro-organismos mesófilos**

Foram adicionados na superfície das placas contendo ágar caseína soja 0,1 mL de cada diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e realizada a técnica de espalhamento utilizando uma alça de Drigalski estéril (ANVISA, 2010; NOGUEIRA; MIGUEL, 2013). As placas foram semeadas em duplicata e incubadas em estufa bacteriológica a 32,5°C + ou - 2,5°C de 3-5 dias. Nas placas com crescimento bacteriano, foi realizada a

média aritmética do número de colônias contadas em cada cultura, seguida do cálculo do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama ou mL do produto (figura 6) (ANVISA, 2010). Os valores de referência utilizados foram os recomendados por Andriguetto et al. (2002) que considerou o índice ideal  $<10^6$ UFC/g.

**Figura 6: Esquema para análise de mesófilos totais**



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2019.

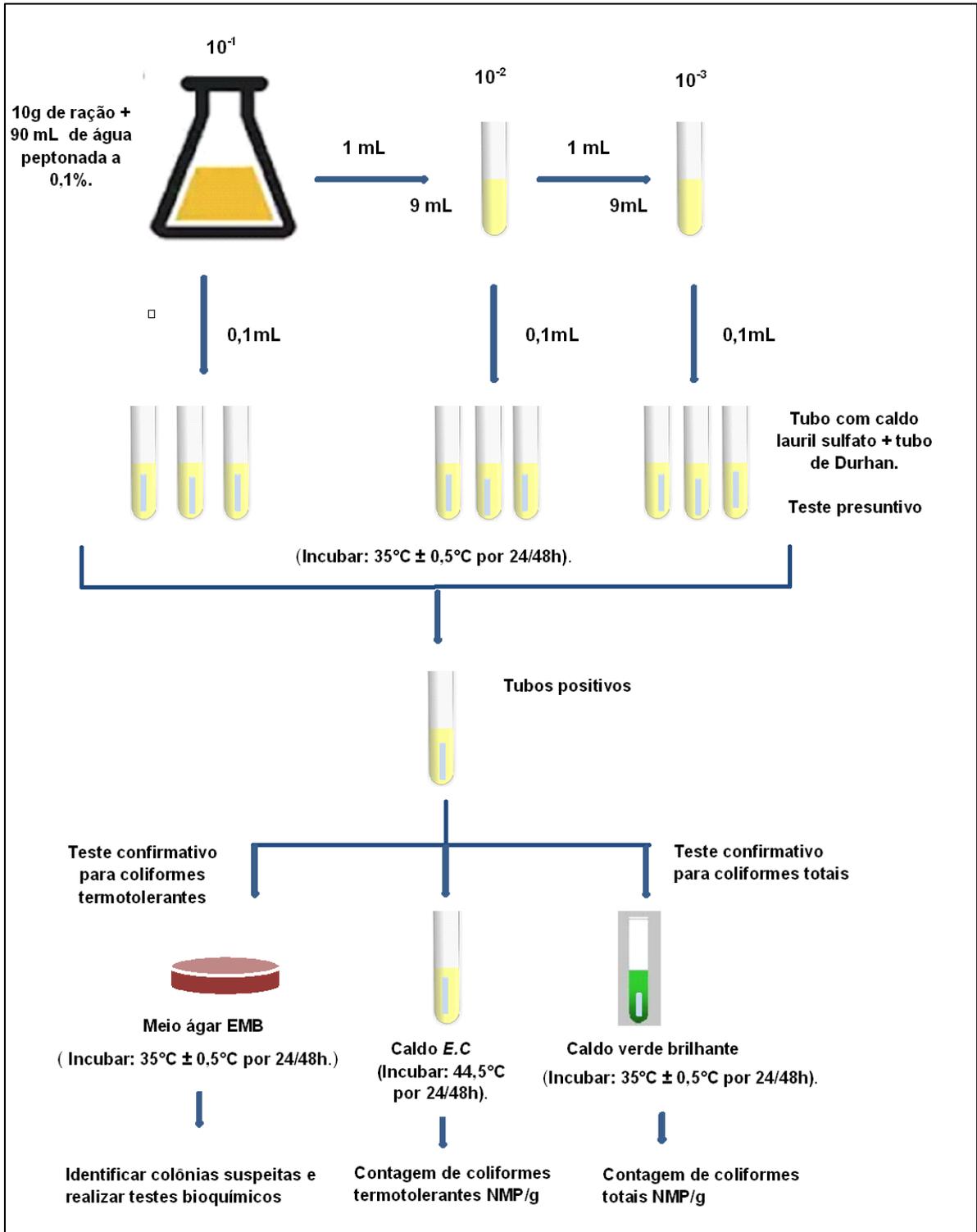
#### 5.5.4 NMP-Teste presuntivo para coliformes totais e termotolerantes.

Depois de realizadas as diluições conforme descrito no item 5.5.1, todas as suspensões foram homogêneas em vórtex por sete segundos e, logo após a homogeneização foi adicionado 1 mL de cada diluição a uma série de três tubos contendo o meio LST (caldo lauril sulfato), sendo cada diluição realizada em triplicata para que uma análise de três tubos NMP (número mais provável) fosse realizada. O fundo de cada tubo continha um tubo invertido para coleta de gás (tubo de Durhan) (figura 7) (FENG et al., 2018).

Os tubos LST foram incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 h e as reações de cada tubo foram examinadas. Os tubos onde foi possível evidenciar a produção de gás

foram registrados. Os tubos onde não se observou formação de gás foram novamente incubados por mais 24h para registro final (figura 7) (FENG et al., 2018).

**Figura 7: Esquema para análise de coliformes totais e termotolerantes**



Fonte: Elaborado pela autora, 2019

### 5.5.5 Teste confirmatório para coliformes totais

A partir de cada tubo LST em que houve produção de gás (positivo), foi transferida uma alça da suspensão para um tubo com caldo VBBL (caldo verde brilhante bile), estes tubos foram então incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e examinados quanto a produção de gás por 48h. Com base na proporção de tubos LST confirmados com gaseificação para três diluições consecutivas, foi calculado o número mais provável (NMP) dos coliformes (figura 7) (FENG et al., 2018). As análises foram realizadas em triplicata.

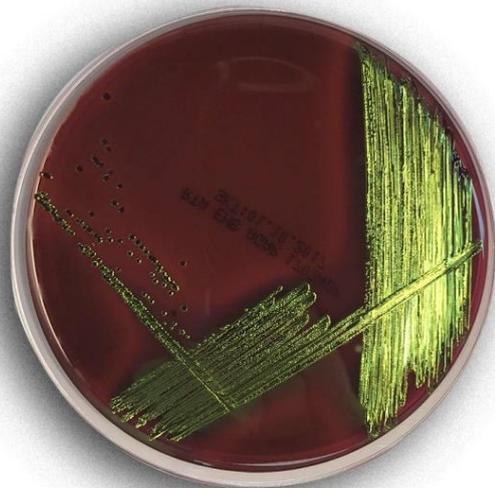
### 5.5.6 NMP-Teste confirmatório para coliformes termotolerantes/*E.coli*.

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foi retirada uma alíquota da suspensão dos tubos que tiverem resultado positivo no teste presuntivo para *E. coli* e semeamos para tubos de caldo E.C (caldo *Escherichia coli*). Os tubos E.C foram incubados a  $44,5^{\circ}\text{C}$  por 24h/48h e examinados quanto à produção de gás. Após 48h calculou-se o NMP (figura 7) (FENG et al., 2018). As análises foram realizadas em triplicata.

### 5.5.7 Teste de identificação de colônias de *E. coli*

Os tubos com gaseificação foram agitados suavemente e com o auxílio da alça bacteriológica, foi transferida parte do conteúdo para uma placa com ágar E.M. B de Levine (Ágar Eosina Azul Metileno), fazendo estrias. As placas com o meio foram incubadas por 24 h a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e examinadas quanto a presença de colônias sugestivas de *E. coli*, isto é, colônias com um centro preto e com um brilho verde metálico (figura 8). No caso de haver presença de colônias compatíveis com *E.coli* é indicada a realização de testes bioquímicos confirmatórios do IMViC (indol, vermelho de metila, Vorges-Proskauer e citrato) (FENG et al., 2018). As análises foram realizadas em duplicata.

**Figura 8: Meio de cultura EMB com crescimento típico de *Escherichia coli***

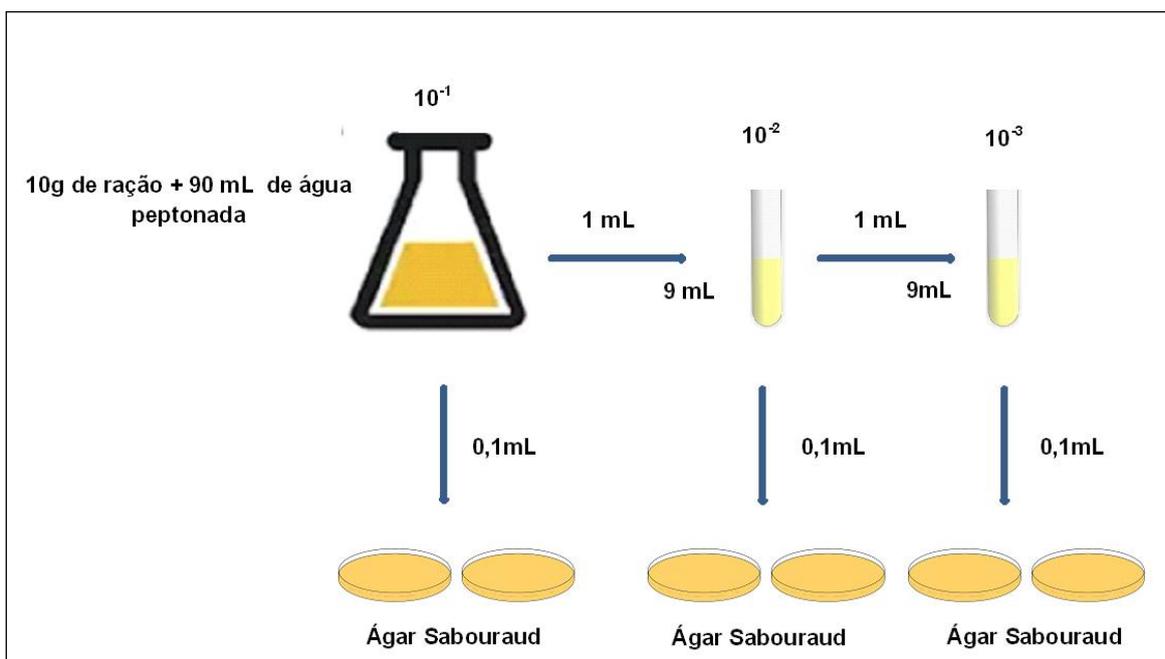


**Fonte:** Medical Expo, 2020

#### **5.5.8 Bolores e leveduras**

Para pesquisa de fungos, foi adicionado à superfície da placa de Petri contendo o meio Ágar sabouraud 0,1 mL de cada diluição (item 5.5.1). Esse volume foi então homogeneizado com a alça de Drigalski e as placas incubadas a 25°C por cinco dias. Após incubação, foi realizada a média aritmética do número de colônias, com base no cálculo das UFC/g da ração, presentes nas placas positivas. As placas foram semeadas em duplicata (figura 9) (ANVISA, 2010).

**Figura 9: Esquema da análise de bolores e leveduras**



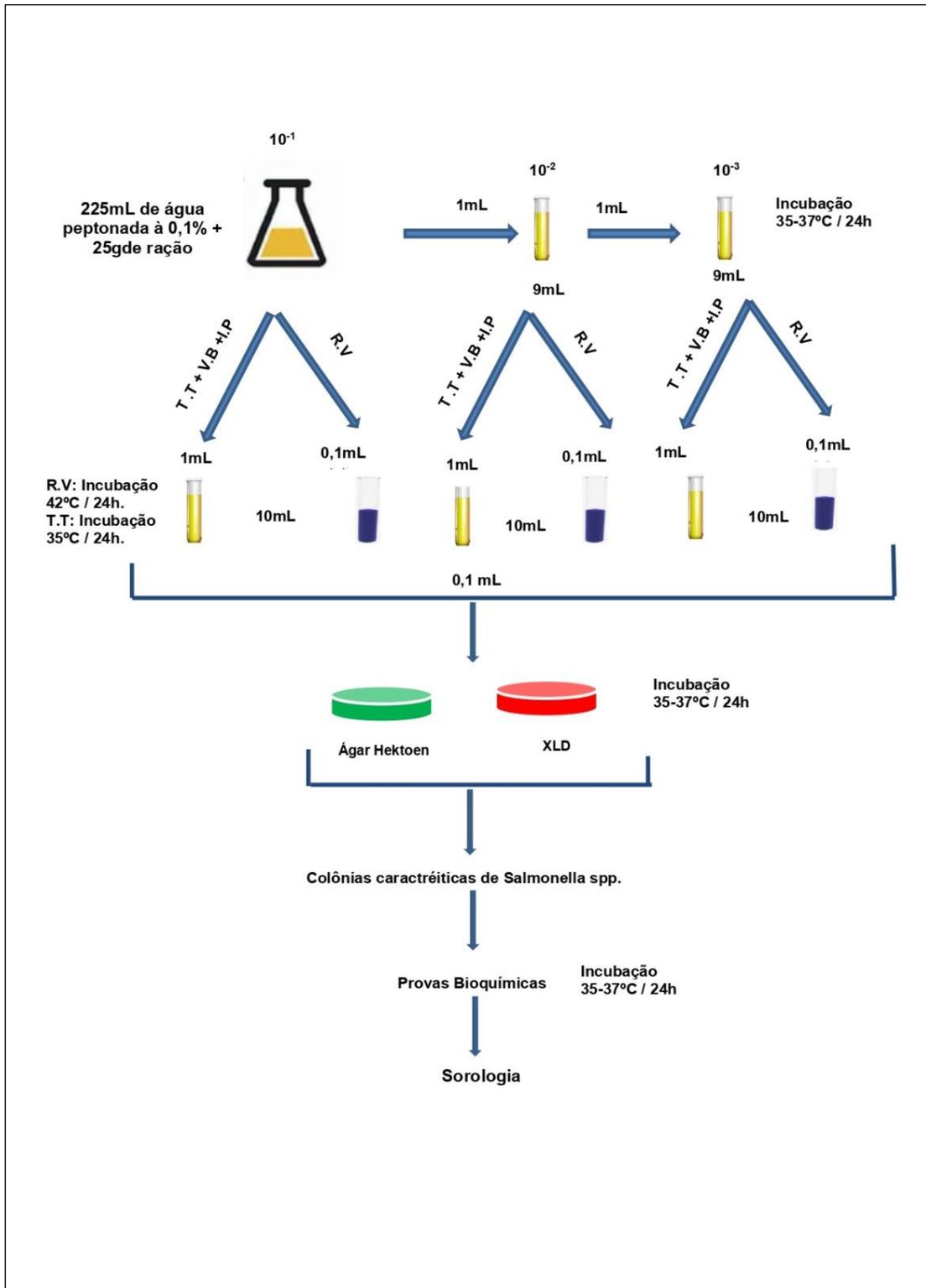
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

### 5.5.9 Pesquisa de *Salmonella* spp.

As diluições que foram realizadas conforme o item 5.5.1, foram incubadas a 35°C/24hrs. Decorrido esse tempo, foi retirado 1 mL de cada diluição e colocado no tubo que continha 10mL do caldo tetrionato, 0,1 mL de verde brilhante a 0,1% e 0,2 mL de iodeto de potássio a 0,1%, e este foi incubado a 35°C por 24h. Foi colocado 0,1 ml das diluições também no tubo contendo o caldo Rappaport Vassiliadis e incubado a 42°C/24h.

Após 24h foi transferido de cada um dos tubos contendo o caldo Rappaport Vassiliadis e caldo tetrionato, 0,1 mL para ser semeado nos meios, ágar Hektoen e XLD. Esses meios foram então incubados por 24hrs e observados. No caso de haver presença de colônias compatíveis com *Salmonella* spp. é indicado a realização de testes bioquímicos (TSI, LIA e ureia) e confirmação através de sorologia (figura 10) (ANDREWS et al., 2018). As análises foram realizadas em duplicata.

Figura 10: Pesquisa de *Salmonella* spp.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Legenda: T.T (caldo tetratonato), V.B (Caldo verde brilhante), I.P (Iodeto de potássio) e R.V (Rappaport Vassiliadis).

### 5.5.10 Análise das amostras do swab

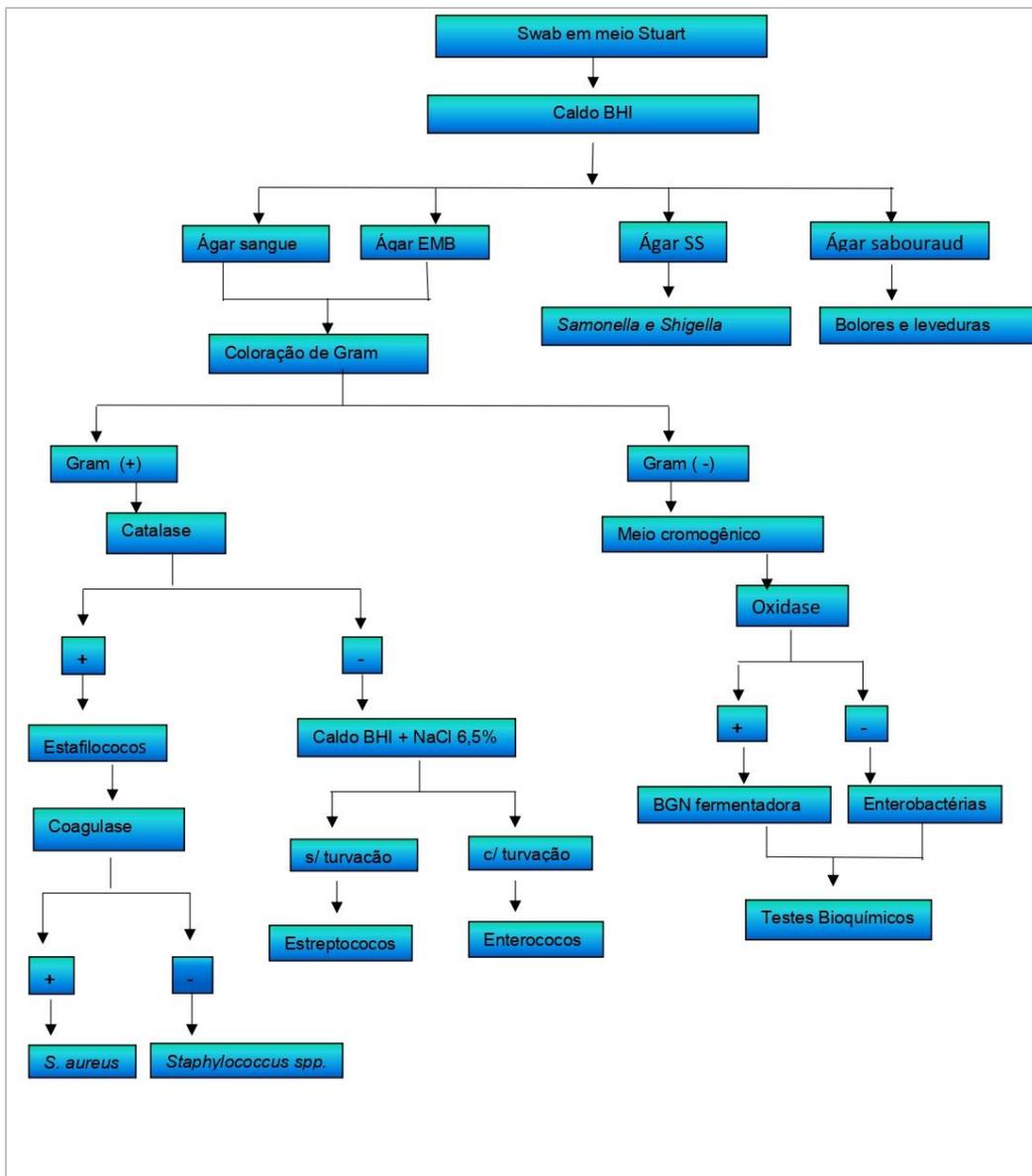
Os swabs que estavam em tubos contendo meio de transporte Stuart foram introduzidos em tubos com 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) para que as amostras ficassem menos concentradas, facilitando assim o isolamento das colônias. Em seguida, dentro de cabine de segurança biológica nível II, as amostras foram semeadas em placas de Petri estéreis (90x15mm) contendo ágar sangue para isolamento de bactérias Gram positivas e negativas, ágar EMB (Eosina azul metileno) para isolamento de bactérias Gram negativas, ágar SS (*Salmonella* e *Shigella*) para isolamento de *Samonella* spp. e *Shigella* spp. e ágar Sabouraud para isolamento de bolores e leveduras. As placas com ágar Sabouraud foram incubadas em estufa a 25°C por cinco dias e os outros meios em estufa à 36°C por 48 h.

Decorrido o tempo para crescimento bacteriano nas placas de Ágar sangue e Ágar EMB foi realizada a coloração de Gram. Após a confirmação das características das colônias, as bactérias Gram positivas foram submetidas às provas da catalase/coagulase, enquanto que as Gram negativas ao teste de oxidase e foram semeadas em meio cromogênico. As bactérias crescidas em Ágar sangue foram observadas quanto a presença ou ausência de hemólise e os resultados foram anotados.

Nas colônias bacterianas que indicaram a presença da enzima catalase realizou-se o teste da coagulase. Já as com resultados catalase negativa foram inoculadas em caldo BHI suplementado com 6,5 % de cloreto de sódio e incubadas em estufa bacteriológica a 35 +/- 2°C por 72 horas. Todos os testes microbiológicos de identificação seguiram os protocolos indicados pela Anvisa (2008)

As colônias que cresceram no meio cromogênico, foram submetidas aos testes bioquímicos necessários para sua identificação (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013). No LabMicro, realizamos as provas de fermentação da glicose, produção de H<sub>2</sub>S, motilidade e produção de Indol (meio SIM), utilização de citrato como única fonte de carbono, presença das enzimas urease e lisina descarboxilase. As bactérias não identificadas pela bateria de testes bioquímicos clássicos, foram encaminhadas para teste bioquímico automatizado no aparelho Vitek2 da biomérieux (anexo d) com dezenas de testes de identificação (Figura 11).

**Figura 11: Esquema das análises realizadas dos swabs da cavidade oral e dos comedouros dos animais**



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

## 5.6 DESCARTE DAS CARÇAÇAS

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> de acordo com resolução normativa nº 37 do CONCEA (BRASIL, 2018a), na qual se baseia o POP (Procedimento operacional padrão) de eutanásia do Inca. As carcaças foram acondicionadas em sacos brancos leitosos com o símbolo de risco biológico e congeladas em freezer a -20°C até a empresa especializada na coleta deste tipo de resíduo retirar para incineração, conforme o Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos do Instituto Nacional do Câncer.

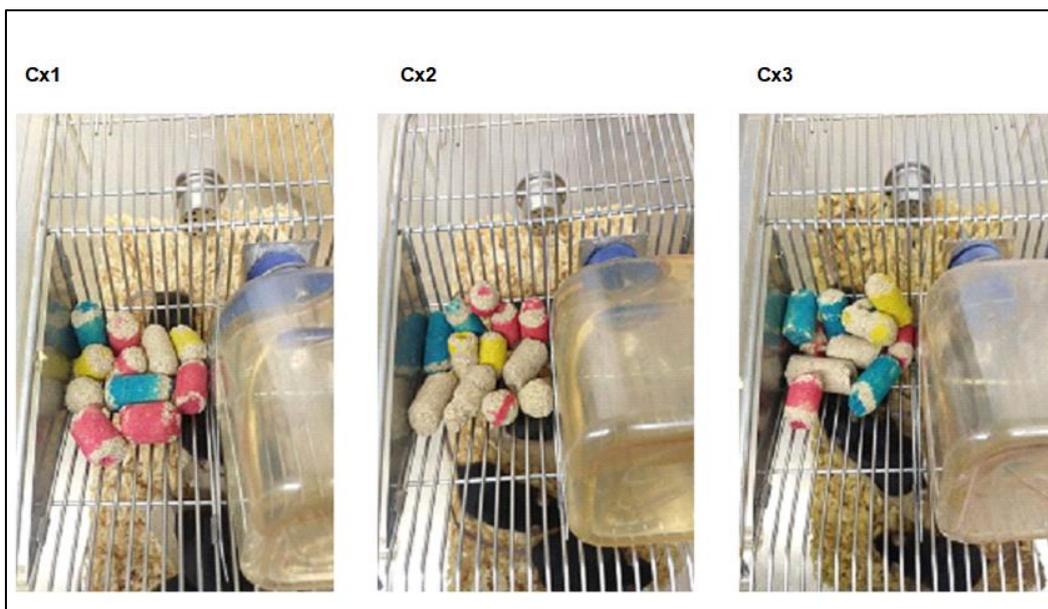
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 TESTE DA PALATABILIDADE DA RAÇÃO COLORIZADA

Esse experimento possibilitou verificar que a quantidade de ração que sobrou nas gaiolas na primeira semana que foi de cinco pellets vermelhos, dois azuis, dois amarelos e dois sem marcação na gaiola 1; quatro pellets vermelhos, dois azuis, um amarelo e quatro sem marcação na gaiola 2 e três pellets vermelhos, quatro pellets azuis, dois amarelos e dois sem marcação na gaiola 3 (figura 12). Já após duas semanas de consumo da ração sobraram: zero pellet na gaiola 1, um pellet azul, um vermelho e um sem marcação na gaiola 2 e um pellet azul e um sem marcação na gaiola 3 (figura 13)

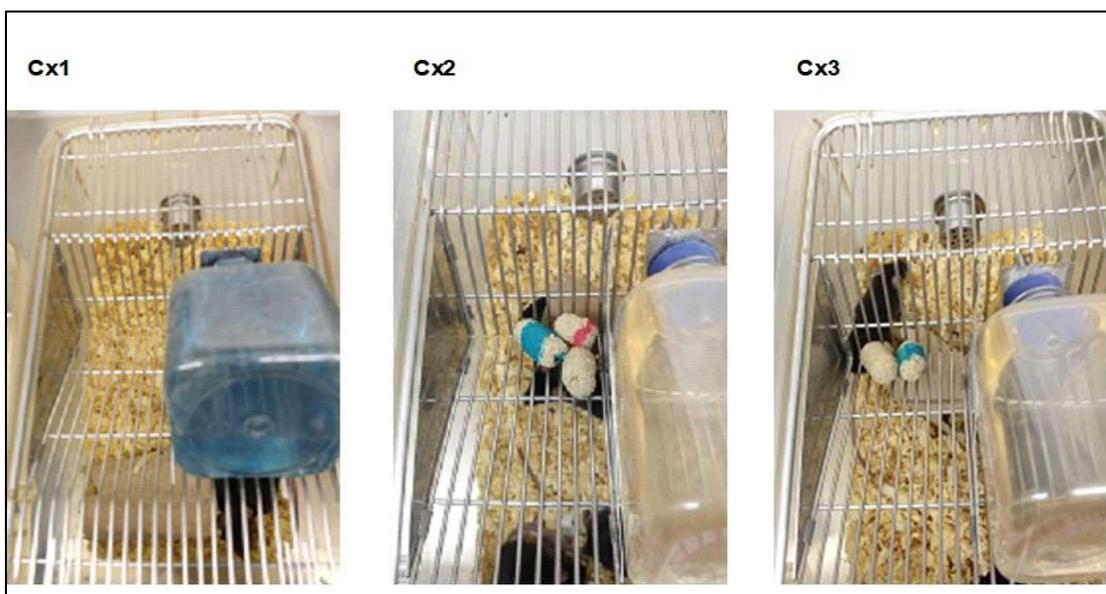
Logo foi possível constatar que a quantidade de ração fornecida permaneceu duas semanas no comedouro e continuou palatável, já que não houve preferência dos animais em se alimentar com a ração normal sem corante e a marcada, nem entre as diferentes cores disponíveis (figura 12 e 13).

**Figura 12: Consumo da ração após uma semana.**



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2019.

**Figura 13: Consumo da ração após duas semanas.**



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2019.

Apesar dos corantes artificiais serem desenvolvidos para corar, intensificar ou restaurar a cor de um alimento (PEREIRA, 2014), estes não devem interferir no sabor do alimento (ARCÓLOR, 2018), essa característica foi comprovada nesse estudo, já que não houve diferença da aceitação dos animais diante do consumo, entre as diferentes cores (figura 12 e 13) Outro fator que pode contribuir para a aceitação indiscriminada das rações coradas, pelos camundongos, é que estes animais possuem bem menos papilas gustativas que os humanos (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009) e já que esses corantes não alteram o sabor do alimento para o homem, não alterariam também para esses animais, pois têm menos percepção do sabor dos alimentos.

Em relação à preferência por determinada cor de ração, estudos demonstraram que vertebrados distinguem cores através de uma categoria específica de neurônios fotorreceptores chamados “cones”, encontrados na retina de mamíferos e responsáveis pela distinção das diversas tonalidades de cores (BITTENCOURT, 2018). Roedores possuem visão bicromática, apresentando 2 subtipos destes fotorreceptores, enquanto que humanos e primatas do velho mundo são tricromatas apresentando três subtipos (SILVA, 2017; KELBER, 2018). Por serem bicromáticos a faixa de visão desses animais vai do amarelo ao ultravioleta, passando pelo verde e pelo azul, mas não enxergando o vermelho e suas variações (JACOBS et al., 2007; SILVA, 2017, gerando uma visão dupla, embaçada e azul-

esverdeada (figura 14) (DONZA, 2019). O que pode estar contribuindo, além da palatabilidade, com os resultados obtidos, já que não houve preferência de ingestão entre as diferentes cores de ração marcada e a ração sem marcação (figura 12 e 13).

**Figura 14: Simulação da visão dos roedores**



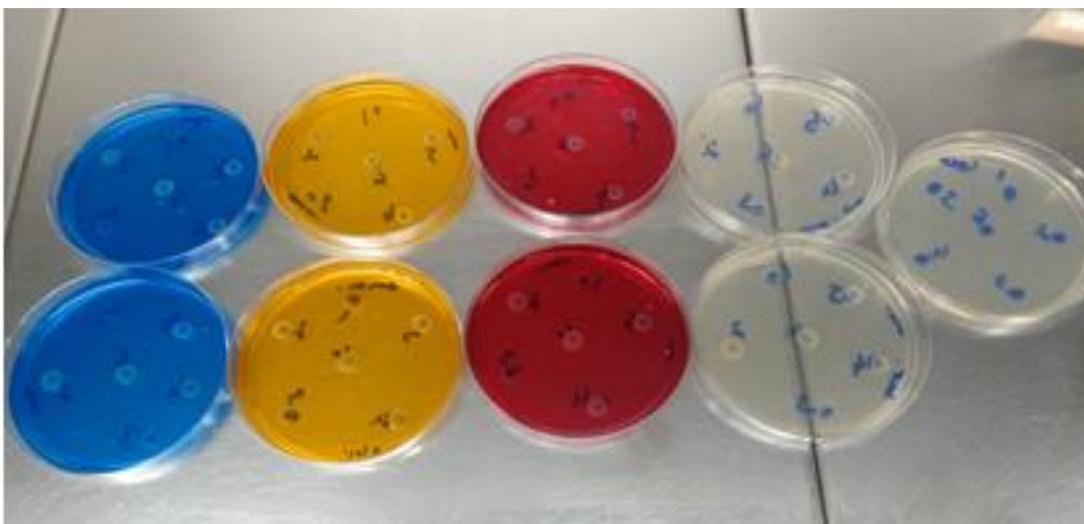
**Fonte:** Donza, 2019.

Com base neste resultado foi possível partir para a segunda parte do experimento, que foi avaliar se estes corantes poderiam interferir no resultado do isolamento bacteriano.

## **6.2 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CORANTE**

Após incubação, de todas as placas previamente semeadas, em estufa bacteriológica  $\pm 36^{\circ}\text{C}$  24/48h, foi possível observar crescimento idêntico entre os spots de todas as placas, menos naquela onde houve adição de antimicrobiano (controle negativo), confirmando que o corante não influencia no crescimento bacteriano (figura 15).

**Figura 15: Placas semeadas com bactérias ATCC, Gram positivas e Gram negativas**



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

A importância de testar a inocuidade do corante, frente às bactérias que possivelmente possam ser isoladas da ração, se pautou nos estudos de Villela (2010) que demonstraram que alguns corantes como: azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita atuam na redução de micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outros autores (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013) também já sinalizaram o uso de corantes como a eosina e o cristal violeta, funcionando como agentes seletivos para algumas bactérias no meio EMB. Logo, houve uma preocupação em analisarmos esses corantes para verificarmos se estes também poderiam ter essa mesma função, no entanto no teste realizado com os corantes alimentícios (figura 15) não foi observada essa ação, validando então quaisquer resultados obtidos usando essa forma de marcação.

### **6.3 CONTAGEM DE MESÓFILOS, BOLORES E LEVEDURAS NAS RAÇÕES ESTÉREIS.**

Como descrito na metodologia, a análise inicial de comprovação de esterilidade das rações irradiadas e autoclavadas, foi através dos testes de contagem do número total de micro-organismos mesófilos, bolores e leveduras, após

semeadura em meios próprios (ANVISA, 2010) e o resultado obtido, foi a ausência total para quaisquer dos micro-organismos testados (tabela 1), demonstrando que ambos os processos de esterilização foram eficazes. Além disso, após uma semana de abertura da embalagem e armazenamento dentro do modo de troca, o resultado obtido foi o mesmo da análise inicial, indicando a manutenção da esterilidade.

Segundo Lira (2013) os processos de esterilização tanto por calor úmido quanto por irradiação devem atingir a função probabilística de  $10^{-6}$ , indicando que o nível de garantia de esterilidade atingido deve ser no mínimo  $10^{-6}$ . Outros autores insistem que amostras estéreis testadas devem apresentar total ausência de crescimento de micro-organismos viáveis (BUGNO, 2001; ANVISA, 2010), com base no preconizado por esses autores, nossos resultados indicam que ambos os processos de esterilização utilizados foram eficazes e o manuseio após os sacos de rações abertos foi adequado, já que as rações permaneceram estéreis.

**Tabela 1: Verificação da presença de mesófilos, bolores e leveduras nas rações estéreis analisadas.**

Ração	Dia 0		Dia 7	
	M	B e L	M	B e L
Autoclavada	A	A	A	A
Irradiada	A	A	A	A

**Legenda:** M (mesófilos), B e L (bolores e leveduras); P (presença), A (ausência)

#### 6.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS RAÇÕES DISPOSTAS NOS COMEDOUROS

As análises microbiológicas das rações (autoclavada e irradiada) marcadas com corante alimentício permitiram comparar a sua qualidade/tempo de exposição.

NA figura 16, pode-se observar o consumo da ração azul após uma e duas semanas e o momento que é retirada a amostra desta ração para as análises microbiológicas, bem como a ração vermelha colocada por cima da ração remanescente (azul). Demonstrando que o máximo de tempo que a ração permaneceu no comedouro, foi de duas semanas. Além disso, foi verificado que na maioria dos comedouros houve um consumo maior da ração irradiada do que da

autoclavada. No entanto é necessário um estudo mais elaborado para comprovação deste resultado.

**Figura 16: Consumo de ração autoclavada ou irradiada após uma e duas semanas.**



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

#### 6.4.1 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Nenhuma das amostras de ração analisada evidenciou a presença da bactéria *Salmonella* spp. Esse resultado é bastante positivo, se assemelhando ao estudo apresentado por Girio e colaboradores (2012) e à pesquisa de Americano (2016) que ao analisarem rações comerciais também não encontraram a presença desse micro-organismo. Segundo relatos do Laboratório Charles River (2019) a probabilidade de identificar esse micro-organismo em colônias de roedores é bem pequena, apesar da sua transmissão não ser difícil, já que pode ser disseminada por via fecal-oral, via fomites e algumas vezes verticalmente.

E as salmoneloses ocupam uma das posições mais destacadas na área da saúde pública em todo o mundo, devido as suas características de endemicidade, morbidade e pela dificuldade de seu controle (HOFER; FILHO; REIS, 1998). Todos os roedores de laboratório são suscetíveis à infecção por *Salmonella* spp. e devido ao seu potencial zoonótico pode causar doenças graves ou até a morte nos bioteristas imunocomprometidos (CHARLES RIVER 2019). Portanto, todos os

animais diagnosticados com *Salmonella* spp. devem ser eutanasiados, já que à bactéria pode ser transmitida verticalmente e a rederivação por histerectomia pode não ser eficaz (CHARLES RIVER, 2019).

Além disso, o que contribuiu para a contaminação por *Salmonella* spp. nessa área ser bem reduzida é a qualidade da ração consumida por esses animais e a desinfecção do ambiente ser realizada com o produto de nome comercial “Virkon S”, pois segundo Vestby (2010) em seu estudo sobre o efeito de produtos desinfetantes usados nas indústrias de ração animal, descobriu que a sua eficiência é substancialmente reduzida quando *Salmonella* spp. forma biofilmes em equipamentos e materiais das linhas de processamento da fábrica, no entanto constatou que dois desinfetantes se mantinham eficientes na descontaminação desses materiais, o primeiro era um produto contendo 70% de etanol e o segundo era um produto com nome comercial “Virkon S”.

#### **6.4.2 Contagem de micro-organismos mesófilos totais aeróbios**

Ao analisarmos as rações autoclavadas e irradiadas que permaneceram no comedouro para contagem de mesófilos totais (tabela 2 e figura 17) verificamos que houve a presença destes micro-organismos em todas as placas, todavia o número máximo encontrado foi  $1,0 \times 10^3$  UFC/g, ficando a maioria dos resultados na faixa de  $10^2$  UFC/g.

No Brasil não há legislação para referências de valores para contagem de mesófilos totais em ração, assim utilizamos os recomendados por Andriguetto et al. (2002) que considerou o índice ideal  $<10^6$ UFC/g, esse valor vem sendo utilizado por outros autores como padrão para contagem de mesófilos totais em ração e em outros alimentos, como: Carvalho et al. (2005), Girio et al. (2012), Americano (2016) e Neto (2016).

Segundo Americano (2016) quando o alimento apresenta uma grande quantidade de contagem de mesófilos significa uma contaminação da matéria-prima ou falha no processamento durante a produção ou armazenamento, indicando péssimas condições higiênico-sanitárias e que o alimento não está próprio para o consumo. Quando analisamos o que encontramos em nossa pesquisa, podemos afirmar que os micro-organismos detectados certamente não são provenientes da ração ou sua matéria prima, já que testes preliminares do controle de esterilidade

foram realizados e não houve nenhum crescimento. Além disso, como a contagem de mesófilos totais em nosso estudo foi bem abaixo do padrão estabelecido na literatura (tabela 2), as rações analisadas, apesar de não permanecerem estéreis, se conservaram próprias para o consumo dos animais, pois mantiveram um bom padrão higiênico-sanitário.

**Tabela 2: Contagem mesófilos totais, bolores e leveduras das amostras de ração durante o consumo pelos camundongos.**

	Amostra	Mesófilos		Bolores e leveduras	
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
<b>Ração autoclavada</b>	<b>1</b>	2,4 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	<1	<1
	<b>2</b>	3,1 x 10 <sup>2</sup>	8,0 x 10 <sup>2</sup>	<1	<1
	<b>3</b>	6,0 x 10 <sup>2</sup>	9,0 x 10	<1	1,5 x 10 <sup>2</sup>
	<b>4</b>	6,0 x 10 <sup>2</sup>	4,7 x 10 <sup>2</sup>	<1	<1
	<b>5</b>	2,0 x 10	2,2 x 10 <sup>2</sup>	<1	<1
<b>Ração Irradiada</b>	<b>6</b>	4,4 x 10 <sup>2</sup>	2,0 x 10 <sup>2</sup>	<1	<1
	<b>7</b>	9,0 x 10	10 x 10	<1	<1
	<b>8</b>	5,0 x 10 <sup>2</sup>	6,1 x 10 <sup>2</sup>	<1	<1

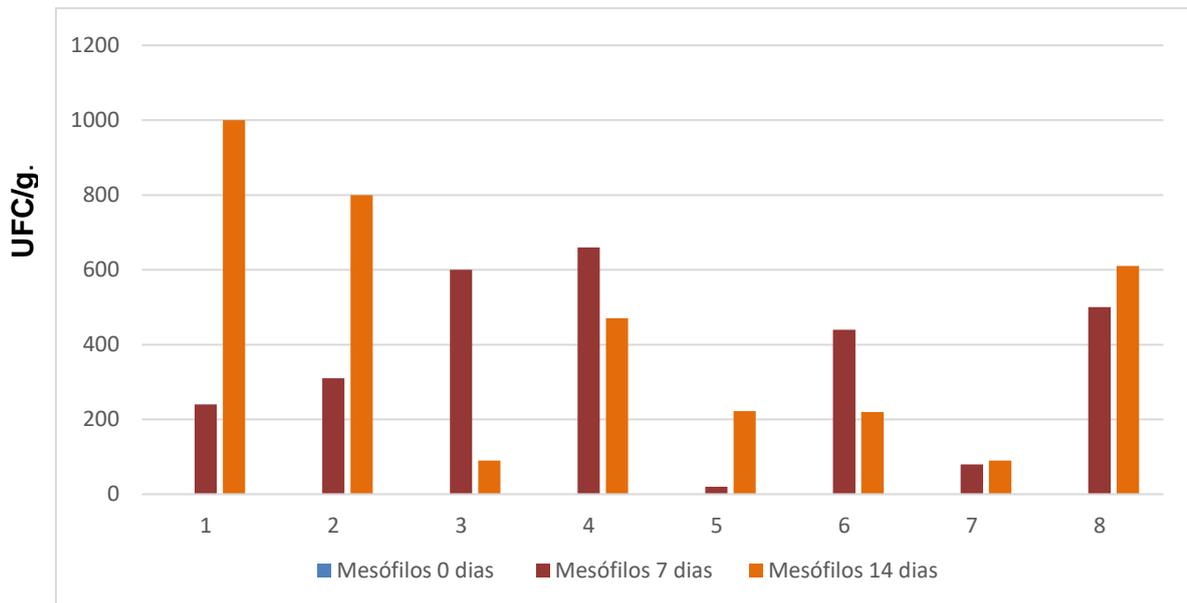
**Legenda:** Resultado em UFC/g (unidade formadora de colônias por grama).

Foi possível observar durante o experimento, que na maioria das amostras houve um aumento na contagem de mesófilos totais aos 14 dias, não acontecendo isso com as amostras 3, 4 e 6 (figura 17). Isso pode ter ocorrido, pois esses animais roeram menos a ração azul nessa semana que foi a ração que permaneceu no comedouro por duas semanas, dando preferência para a ração vermelha que era mais nova. O que não aconteceu com as outras gaiolas que a ração mais consumida continuou sendo a azul, pois estava mais perto da base do comedouro.

Logo, na maioria das gaiolas houve um aumento da contagem do número de mesófilos totais na segunda semana, já que a ração que estava na base do comedouro (ração azul) continuou sendo consumida na segunda semana. Por estarem mais tempo expostas e mais roídas, tiveram assim, portanto, maior contato com a saliva e patas do animal, sendo mais manipuladas pelos roedores. Este fato pode ser explicado pelo trabalho de Ponath e colaboradores (2016) que indicam que

a manipulação dos alimentos é uma das principais causas de contaminação. Além disso, todos os índices estão bem abaixo do limite mínimo recomendado pela literatura, não afetando a qualidade higiênico-sanitária da ração.

**Figura 17: Contagem de mesófilos totais aeróbicos em UFC/g nas rações autoclavadas e irradiadas.**



**Legenda:** Abscissas: 1 a 4 - Ração autoclavada; 5 a 8 - Ração irradiada.

#### 6.4.3 Contagem de bolores e leveduras.

No presente estudo todas as amostras de ração analisadas em função do tempo, apresentaram contagem para bolores e leveduras menores que 1 UFC/g, somente uma amostra da segunda semana apresentou o resultado  $1,5 \times 10^2$  UFC/g (tabela 2). Segundo Santos e colaboradores (2000) e Americano (2016) esses valores estão dentro do padrão aceitável para o consumo deste alimento que deve ser  $< 10^4$  UFC/g da amostra.

Em seu estudo, Bernardi e Nascimento (2005), descobriram que a contaminação da ração por fungos é favorecida pela umidade, temperatura e substrato apropriado, levando a multiplicação dos micro-organismos e produção de metabólitos tóxicos.

Segundo Moura e colaboradores (2014), os metabólitos fúngicos podem causar toxicidade alimentar, visto que determinadas espécies de fungos, em condições de armazenamento e conservação inadequadas, produzem micotoxinas

na superfície dos alimentos que ao serem ingeridas pelo homem ou animal podem causar intoxicações, problemas leves e até graves, que podem afetar várias funções do organismo, como alterações hepáticas, renais, circulatórias, no sistema nervoso e no trato digestivo (VECCHIA; FORTES, 2007). Para evitar que isso ocorra Hilmann e colaboradores (2015) sugerem que as rações destinadas à alimentação animal, devam ser armazenadas em temperaturas de 21,5 a 23,6°C e umidade relativa do ar de 59 a 65%, preservando assim as matérias-primas. Como as rações analisadas no presente estudo foram armazenadas e consumidas pelos animais seguindo esses parâmetros, é possível que essa condição tenha dificultado o crescimento fúngico, o que possibilitou a manutenção do padrão higiênico-sanitário das rações.

#### 6.4.4 Contagem de coliformes totais e termotolerantes (fecais).

As amostras de ração analisadas segundo a tabela de NMP foram todas negativas para coliformes termotolerantes, sendo a contagem menor que 3,0NMP/g (tabela 3 e quadro 2 marcado em azul). Em relação a coliformes totais (35°C), duas amostras apresentaram um resultado menor que 3,6 NMP/g (tabela 3 e quadro 2 marcado em azul).

**Tabela 3 – Contagem de coliformes totais e termotolerantes das amostras de ração durante o consumo pelos camundongos**

	Amostra	Coliformes totais		Coliformes termotolerantes	
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
<b>Ração autoclavada</b>	<b>1</b>	<3,0	<3,6*	<3,0	<3,0
	<b>2</b>	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	<b>3</b>	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	<b>4</b>	<3,6*	<3,0	<3,0	<3,0
<b>Ração Irradiada</b>	<b>5</b>	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	<b>6</b>	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	<b>7</b>	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	<b>8</b>	<3,0	<3,0	<3,0	< 3,0

**Legenda:** Resultado expresso em NMP por grama (NMP/g). \* Limite inferior confiável (LIC) = 0,17 e Limite superior confiável (LSC) = 18 e o restante das amostras LIC= - e LSC= 9,5.

Em nossos resultados, apresentados no quadro 2 de número mais provável adaptada de Blodgett (2010), para três tubos com inóculos 0,1, 0,01, 0,001 e respectivos intervalos de confiança 95%, houve ausência de coliformes termotolerantes em todas as amostras e em duas amostras houveram a presença de coliformes totais na diluição  $10^{-1}$ , uma amostra na primeira semana e outra na segunda.

A legislação vigente não estabelece parâmetros microbiológicos para coliformes totais em alimentos e segundo Americano (2016), os coliformes termotolerantes são considerados melhores indicadores de contaminação fecal do que os coliformes totais, já que dentro deste grupo encontra-se a *Escherichia coli*. A presença deste grupo bacteriano em rações indica condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, devido a matérias-primas contaminadas, manipulação inadequada ou aplicação de calor insuficiente na peletização.

Os coliformes fecais são indicadores da má qualidade microbiológica das rações, mas quando estão presentes no alimento não significa necessariamente a existência de patógenos ou contaminação fecal e sim que a qualidade higiênico-sanitária do alimento não está adequada (CAPPELLI et al., 2016). Como houve ausência de *E. coli* e dos outros coliformes fecais em todas as amostras, significa que as rações estão com boa qualidade higiênico-sanitária.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cappelli e colaboradores (2016) que ao analisarem 11 amostras de ração para cães e 11 para gatos, não observaram crescimento para coliformes termotolerantes, todavia detectaram crescimento de coliformes totais em algumas amostras tanto para ração de cães como para gatos. Esse mesmo resultado foi observado nos experimentos de Brandão e colaboradores (2011).

De acordo com Girio et al (2012) a contaminação por coliformes totais e termotolerantes em todas as amostras das rações em seu estudo, ocorreu devido ao acondicionamento inadequado e manipulação intensa. O que não ocorreu no nosso estudo, já que as rações analisadas foram armazenadas, em temperatura e umidade controladas e a sua manipulação é realizada de forma asséptica, dentro de cabine de segurança biológica. Além disso, os animais que a consomem são criados em sistema com barreiras sanitárias controladas.

**Quadro 4: Número Mais Provável (NMP) por grama para séries de três tubos.**

Número de tubos positivos			NMP/g ou mL	Intervalo de confiança (95%)	
0,1	0,01	0,001	-	Inferior	Superior
0	0	0	<3	--	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	3,6	20
1	1	1	11	4,5	38
1	2	0	11	4,5	42
1	2	1	15	1,4	42
1	3	0	16	3,6	42
2	0	0	9,2	4,5	38

Fonte: Adaptado: Blodgett, 2010.

## 6.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DOS SWABS

### 6.5.1 Crescimento e diferenciação de colônias bacterianas, bolores e leveduras.

As tabelas 4 e 5 apresentam os resultados de crescimento bacteriano e fúngico nos comedouros e microbiota da cavidade oral dos animais. Os resultados apontaram crescimento bacteriano nos meios EMB e Ágar Sangue e ausência no meio SS. Também não houve crescimento fúngico no meio Ágar Sabouraud, específico para o isolamento destes micro-organismos (tabela 4 e 5).

**Tabela 4: Detecção microbiológica proveniente do swab dos comedouros (CO).**

Amostra	Ágar EMB	Ágar Sangue	Ágar SS	Ágar Sabouraud
CO1	Presente	Presente	Ausente	Ausente
CO2	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
CO3	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
CO4	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
CO5	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
CO6	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
CO7	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
CO8	Ausente	Presente	Ausente	Ausente

**Legenda:** CO (Comedouro)

Esses resultados demonstram que nem *Salmonella* sp. nem *Shigella* sp. (que cresceriam no meio SS), nem nenhuma espécie de fungo (que cresceriam no meio Sabouraud), foram detectados nos comedouros (tabela 4) com a metodologia proposta, por outro lado o uso do meio de EMB permitiu a detecção de bastonetes Gram negativos em uma das amostras. Apesar do pequeno número de Gram negativos, detectados nos comedouros pelo meio EMB, esse achado significa a possibilidade de manutenção destes micro-organismos neste local e a possibilidade de detecção através das metodologias empregadas.

O meio de Ágar sangue por ser muito rico promove com mais facilidade o crescimento dos micro-organismos sem distinção, permitindo até mesmo o crescimento de heterotróficos fastidiosos (NOGUEIRA; MIGUEL, 2013), o que aumentou as chances de isolamento desses micro-organismos, tanto nos comedouros como na cavidade oral (tabela 4 e 5).

**Tabela 5: Detecção microbiológica proveniente do swab da cavidade oral dos camundongos.**

Amostra	EMB	Ágar sangue	Ágar SS	Ágar sabouraud
AN1	Presente	Presente	Ausente	Ausente
AN2	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
AN3	Presente	Presente	Ausente	Ausente
AN4	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
AN5	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
AN6	Presente	Presente	Ausente	Ausente
AN7	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
AN8	Ausente	Presente	Ausente	Ausente

**Legenda:** AN (animal)

Os dados apresentados nestas tabelas possibilitaram observar um maior isolamento de Gram negativos da cavidade oral dos animais que dos comedouros. Esse fato já era esperado, já que na microbiota oral de roedores espera-se um percentual aproximado de 30% de bactérias Gram negativas (PORTO et al, 2007) e o restante de Gram positivas e outros micro-organismos, que podem ser detectados pelo Ágar Sangue, assim como feito por Yamamoto e Gacek (2012) em seu trabalho sobre a microbiota oral de ratos e camundongos.

Seguindo esse raciocínio, podemos observar que de acordo com os dados da tabela 6, onde apresentamos o percentual de cada tipo de isolamento, houve crescimento de colônias bacterianas das amostras dos comedouros em 12,5% no meio EMB (somente bactérias Gram negativas) e 100% no Ágar Sangue (bactérias Gram positivas e negativas), 0% no ágar SS (*Salmonella* spp. e *Shigella* spp.) e de bolores e leveduras foi de 0% (meio ágar Sabouraud).

**Tabela 6: Porcentagem de placas com presença de crescimento bacteriano.**

Amostra	EMB	Ágar sangue	Ágar SS	Ágar sabouraud
Comedouros	12,5% (1/8)	100% (8/8)	0% (0/8)	0% (0/8)
Animais	37,5% (3/8)	100% (8/8)	0% (0/8)	0% (0/8)

Na análise da microbiota da cavidade oral dos camundongos houve crescimento bacteriano em 37,5% das amostras do meio EMB (eosina azul de metileno), 100% no ágar sangue, 0% no ágar SS (*Salmonella* spp. e *Shigella* spp.) e nenhum bolor ou levedura foi detectado usando o meio preconizado de ágar Sabouraud. Corroborando ainda mais com os resultados de Porto e colaboradores (2007), que definiram um percentual aproximado de 70% de bactérias Gram-positivas e 30% de bactérias Gram-negativas aeróbias, compondo a microbiota oral de roedores.

**Tabela 7: Teste de coloração por metodologia de Gram das colônias isoladas.**

Amostra	Gram	Amostra	Gram
CO1	+/-	AN1	+/-
CO2	+	AN2	+
CO3	+	AN3	+/-
CO4	+	AN4	+
CO5	+	AN5	+
CO6	+	AN6	+/-
CO7	+	AN7	+
CO8	+	AN8	+

**Legenda:** CO (comedouros) e AN (cavidade oral dos camundongos)

Após a realização do teste de coloração de Gram (tabela 7), na amostra CO1 dos comedouros foi confirmada a presença bactérias Gram negativas. No restante das amostras dos comedouros só foi observado a presença de bactérias Gram positivas. O mesmo ocorrendo nas amostras obtidas a partir do meio EMB da cavidade oral, confirmando o percentual de 37,5% encontrado e a prevalência geral de bactérias Gram positivas nos isolamentos.

### **6.5.2 Teste da catalase e coagulase das amostras Gram positivas dos comedouros e cavidade oral dos animais.**

Nas colônias confirmadas como Gram positivas, foi possível constatar após as provas de catalase (tabela 8 e figura 18), que 100% das amostras dos comedouros, foram positivas, indicando a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp.

(NOGUEIRA; MIGUEL, 2013). Nessas amostras foram realizadas o teste da coagulase, onde 37,5% foram positivas, indicando a presença da espécie *Staphylococcus aureus* (figura 18).

Segundo Rossi, Devienne e Raddi (2008) o ambiente pode ser um dos reservatórios desse micro-organismo, podendo ocorrer então, transmissão cruzada ou ambiental facilitada devido ao micro-organismo sobreviver em superfícies secas, mesmo não sendo capazes de formar esporos.

**Tabela 8:** Teste da catalase e coagulase das bactérias Gram positivas do comedouro

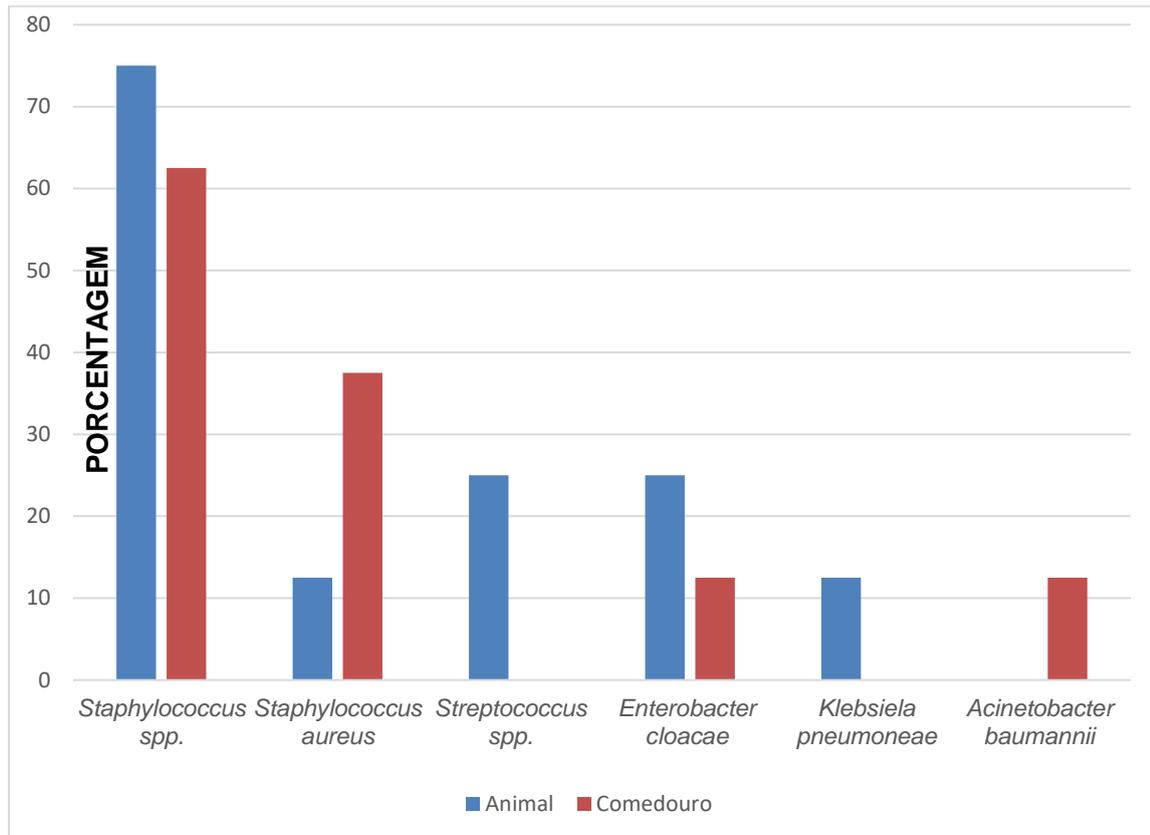
Amostra	Catalase	Coagulase	Identificação
CO1	+	+/-	<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>S. aureus</i>
CO2	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
CO3	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
CO4	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
CO5	+	+/-	<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>S. aureus</i>
CO6	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
CO7	+	+/-	<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>S. aureus</i>
CO8	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.

**Legenda:** CO (comedouro)

Assim como ocorreu nos comedouros, a maior parte das bactérias encontradas na cavidade oral dos animais analisados apresentaram-se morfotintorialmente cocos Gram positivos (tabela 7). Após a realização das provas bioquímicas de catalase e coagulase a maioria indicou a presença de *Staphylococcus* spp. (75%), *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. (12,5%) e somente *Streptococcus* spp. (12,5%) (figura 18). Esses dados estão de acordo com aqueles encontrados por Araújo e colaboradores (2007) e Yamamoto e Gacek (2012), no que concerne ao fato de que os cocos Gram-positivos correspondem às bactérias mais comumente encontradas na microbiota oral normal dos animais. Todavia se contrapõem de certa forma, aos achados de Araújo e colaboradores (2007), que apesar de sugerirem que estes micro-organismos representam 80% do total de bactérias encontradas em sua microbiota, indicam uma prevalência de

*Enterococcus* (56%), seguido por *Staphylococcus* (30%) e *Streptococcus* (14%). O primeiro destes micro-organismos não foi detectado no presente estudo.

**Figura 18: Prevalência de bactérias encontradas nos comedouros e microbiota da cavidade oral dos animais**



Segundo Barbosa e colaboradores (2011) uma das maneiras desses micro-organismos entrarem em contato com o organismo humano ou animal é através de artigos contaminados (fômites), quando esses artigos recebem uma carga infectante, pode disseminá-la para um novo hospedeiro. Além disso, essas bactérias possuem um tempo de sobrevivência maior quando entram em contato com fluidos biológicos (ROSSI; DEVIENNE; RADDI, 2008). Logo, os comedouros podem ser uma fonte de contaminação para esses animais, assim como os animais podem contaminar os comedouros.

De acordo com Lira e colaboradores (2015) no momento em que ocorre a detecção de bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, pode-se considerar que os outros animais da colônia também são seus portadores, contanto que a amostragem tenha sido adequada. Segundo esses autores, para evitar a entrada

desses micro-organismos é necessário a criação de barreiras sanitárias, evitando assim que esses agentes presentes no meio ambiente entrem em contato com as instalações animais.

Em seu estudo Silva (2013) fez a análise microbiológica de todo ambiente do biotério de criação, e as bactérias Gram positivas encontradas foram somente *Staphylococcus* spp., não encontrando *Streptococcus* spp.. Esse achado corrobora com nossa pesquisa microbiológica das gaiolas e da ração, já que *Streptococcus* sp. foi somente encontrado na microbiota oral dos animais. E como no Ágar sangue foi observado a ausência de hemólise total, foi considerado que os *Streptococcus* spp. encontrados eram do grupo viridans, que são bactérias alfa hemolíticas que fazem parte da microbiota normal da cavidade oral, trato gastrointestinal e trato genital de homens e animais (BAGLIE, 2004; PEGADO, 2010). Além disso, foi descartada a possibilidade de serem bactérias do gênero *Enterococcus* spp., pois quando inoculados em caldo BHI suplementado com 6,5 % de cloreto de sódio não houve turvação dos tubos que continham as amostras AN4 e AN8.

Marks, Reddinger e Hakansson (2014) afirmam que o risco de transmissão de *Streptococcus* spp. em superfícies ambientais ainda é desconhecido. No entanto esses autores acreditam que embora a inalação direta de gotículas respiratórias através de aerossóis sejam um dos principais fatores de transmissão dessa bactéria, é possível que em alguns casos, fomites e superfícies ambientais possam facilitar a sua transmissão.

**Tabela 9: Teste da catalase e coagulase das bactérias Gram positivas proveniente da cavidade oral dos camundongos.**

Amostra	Catalase	Coagulase	Identificação
AN1	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
AN2	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
AN3	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
AN4	-	*N/A	<i>Streptococcus</i> spp.
AN5	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
AN6	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
AN7	+	-	<i>Staphylococcus</i> spp.
AN8	-/+	+	<i>Streptococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i>

**Legenda:** \*N/A = não analisado, AN = animal

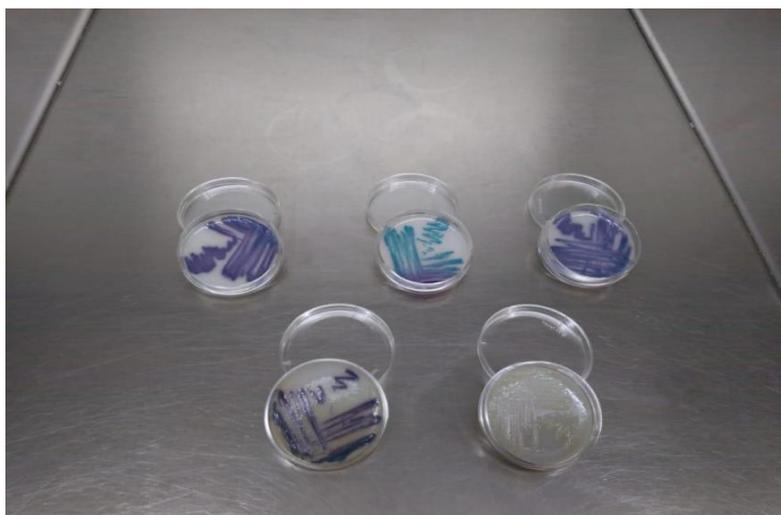
Apesar de ter ocorrido isolamento de bactérias Gram positivas nas amostras da cavidade oral, os animais do presente estudo estavam aparentemente saudáveis, não apresentando nenhum sinal clínico.

Segundo Minagawa (2007), o gênero bacteriano *Streptococcus* spp. é integrante da microbiota normal das vias aéreas superiores e trato intestinal, podendo também agir como um patógeno clássico ou oportunista. Segundo Yamamoto e Gacek (2012) e Lira e colaboradores (2015) essas bactérias fazem parte da microbiota oral normal de homens e animais, e somente resultam em doenças quando há queda da imunidade ou se a barreira natural da pele e mucosas são lesadas por traumas ou corpos estranhos.

### 6.5.3 Análise das amostras Gram negativas da cavidade oral dos animais e comedouros

Com base nos resultados das tabelas 4 e 5, todas as amostras que foram positivas para crescimento no meio EMB foram semeadas no meio cromogênico UriSelect™4/Bio-Rad, onde as amostras semeadas seguiram a avaliação visual presuntiva do gênero/espécie (figura 19) de acordo com as recomendações do fabricante (quadro 3) (BIO-RAD, 2013).

**Figura 19: Amostras Gram negativas semeadas em ágar cromogênico Uri Select 4 / Bio-Rad.**



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2019.

**Legenda:** Da esquerda para direita: AN1, AN3, AN6, CO1a e CO1b.

**Quadro 3: Identificação fenotípica de espécies bacterianas em meio cromogênico.**

Estirpes	Cor das colônias no UriSelect™ 4
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	cor-de-rosa
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	azul-turquesa
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	roxo azulado
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	marrom alaranjado com um halo amarronzado
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	branco

Fonte: Adaptado Bio-Rad, 2013.

Com base na suspeita da identidade taxonômica da colônia (quadro 3 e figura 20), foram realizados os testes bioquímicos confirmatórios (tabela 10) para identificação bacteriana das amostras AN1, AN3, AN6 e CO. Como a amostra CO apresentou duas colônias distintas na placa de EMB, esta foi repicada separadamente e originou duas amostras para análise, CO1a e CO1b.

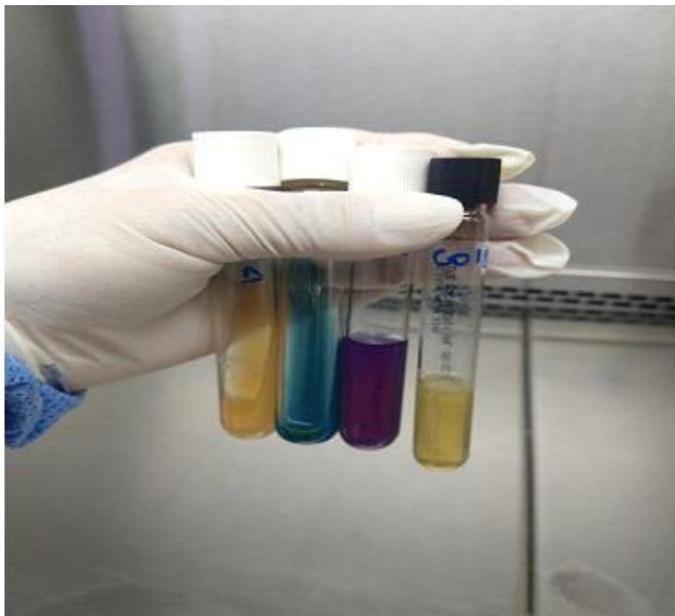
De acordo com os resultados bioquímicos clássicos (tabela 10) as amostras AN1, AN6 e CO1a foram identificadas como *Enterobacter cloacae* e a amostra AN3 como *Klebsiella pneumoniae* (Figura 21), já na amostra CO1b (figura 20), o resultado foi inconclusivo necessitando de novos testes. Essa amostra posteriormente foi encaminhada ao teste bioquímico automatizado, no qual o resultado indicado foi *Acinetobacter baumannii complex* (anexo d).

**Tabela 10: Análise bioquímica das amostras semeadas em meio cromogênico.**

Amostras	Oxi	Cit.	Uréia	Lis	Mot	H2S	Indol	Identificação
AN1	-	+	-	-	+	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
AN3	-	+	+	-	+	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AN6	-	+	-	-	+	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
CO1a	-	+	-	-	+	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
CO1b	-	-	-	+	-	-	-	Inconclusivo

Legenda: Oxi = oxidase, cit = citato, lis = lisina e mot = motilidade, H2S = Gás Sulfídrico.

**Figura 20: Provas bioquímicas (amostra CO1b).**



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2019.

**Legenda:** Provas da esquerda para direita: ureia (-), citrato (-), lisina (+) e SIM (-).

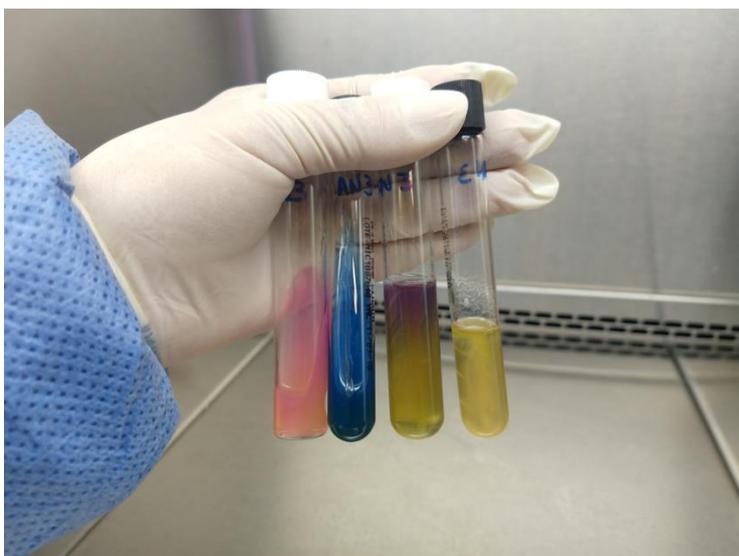
Segundo Silva e Silva (2014), as espécies de Enterobacteriaceae encontradas neste estudo, *Enterobacter cloacae* encontrada nos comedouros e cavidade oral dos animais e *Klebsiela pneumoniae* encontrada na microbiota oral dos animais, fazem parte de um grupo onde podemos incluir alguns dos patógenos mais importantes para o homem e os animais (SILVA; SILVA, 2014).

Essas enterobactérias podem provocar, além de infecções intestinais, infecções urinárias, cutâneas e respiratórias. No ambiente são encontradas na água, esgoto, solo e vegetais, mas também fazem parte da microbiota intestinal comensal (SANT'ANA et al., 2008).

Apesar de *Enterobacter cloacae* fazer parte do grupo comensal do trato gastrointestinal tanto do homem como de animais, e estar amplamente distribuída no ambiente (KELLER et al. 1998; REGLI; PAGÈS, 2015), pode ser também caracterizada como um patógeno oportunista, já que essa espécie forma biofilme e secreta várias citocinas que são importantes para sua patogenicidade (FEI; ZHAO, 2013). Em nossa pesquisa ela foi encontrada na microbiota oral dos animais e também nos comedouros (tabela 10 e figura 18), corroborando com Regli e Pagès (2015), que afirmam em seus estudos que além de infectar o homem ela pode contaminar equipamentos, dispositivos hospitalares e materiais cirúrgicos, já que está presente no ambiente.

Uma outra bactéria isolada da cavidade oral dos animais em nossa pesquisa foi a *Klebsiella pneumoniae* (figura 21 e tabela 10) que Segundo Reis e colaboradores (2017) pode ser encontrada colonizando a orofaringe e fezes de pessoas e animais sadios. Contudo, esse mesmo autor assegura que em indivíduos imunocomprometidos, esse micro-organismo pode ocasionar um quadro de infecção bastante grave, já que funciona como um oportunista que no ambiente é encontrado em locais como água, solo, plantas e esgoto (REIS et al., 2017). Em ambientes de saúde, segundo Esteves et al. (2016), pode estar presente em fômites, já que têm a capacidade de crescer e sobreviver em superfícies como cerâmica, aço inoxidável, vidro e polietileno, entre outros. Isto acontece devido a sua habilidade em aderir nesses materiais e formar biofilmes, no entanto no nosso estudo esta bactéria não foi encontrada nos comedouros dos animais (figura 18) o que também aconteceu com Silva (2013) que não isolou essa bactéria nas análises microbiológicas do ambiente e materiais do biotério de criação.

**Figura 21: Provas bioquímicas (amostra AN3)**



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2019.

**Legenda:** Provas da esquerda para direita: ureia (+), citrato (+), lisina (-) e SIM (Motilidade (+), H<sub>2</sub>S e Indol (-)).

Em uma das amostras do comedouro foi encontrado a bactéria *Acinetobacter baumannii* (anexo d) que pertence à família Moraxellaceae, é um bacilo não-fermentador, Gram-negativo, oxidase-negativo e sem motilidade (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Esse achado corroborou com os resultados de Silva (2013) que

isolou essa bactéria em uma amostra do ambiente de um biotério de criação. Segundo Scarcella, Beretta e Scarcella (2017), essa bactéria pode sobreviver por longos períodos em objetos inanimados e também formar biofilme, facilitando a sua adesão aos objetos (MARTINS, BARTH, 2013). A mesma característica é salientada por Chagas (2015), que argumenta que apesar de serem bactérias saprófitas, estas apresentam grande diversidade metabólica e nutricional o que facilita sua adaptação a diversos ambientes até os mais hostis, além disso, possuem alta resistência a desinfetantes. Segundo esse autor, colonizam o homem e os animais vivendo como comensais na pele, no trato gastrointestinal e em zonas úmidas de indivíduos saudáveis, além disso, também podem ser encontradas em alimentos (CHAGAS, 2015). No entanto não foram isoladas na microbiota oral dos animais no presente estudo (figura 18).

Nos resultados referentes às análises microbiológicas da ração, foi demonstrado que a ração não perdeu sua qualidade higiênico-sanitária, logo não serviu como fonte de contaminação para os animais. No entanto ao realizar as análises dos comedouros isolou-se bactérias potencialmente patogênicas (*Staphylococcus* spp., *Acinetobacter baumannii* complex e *Enterobacter cloacae*), o mesmo ocorrendo na cavidade oral dos animais (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus viridans*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*). Embora não apresentassem sinais clínicos, segundo Pereira e colaboradores (2012), as infecções subclínicas são muito comuns em animais de experimentação e mesmo que o animal não apresente a doença, os resultados experimentais poderão ser afetados, além de poder ocorrer infecções oportunistas que podem pôr em risco a saúde dos animais, e em casos de zoonoses, a saúde humana. Além disso, os comedouros contaminados, também podem servir de fonte de infecção tanto para o homem quanto para os animais.

No entanto, os resultados do monitoramento sanitário das colônias da área de criação animal (anexo c) não indicaram nenhuma dessas bactérias. Essa ausência provavelmente está associada ao fato de que o controle sanitário destes animais segue estritamente as recomendações da Felasa (2014) e as bactérias *Streptococcus* do grupo viridans e *Enterobacter cloacae* não estão na lista de bactérias a serem pesquisadas no procedimento padrão. E comparando nossos resultados com os trabalhos de Yamamoto e Gacek (2012) e Abusleme e colaboradores (2017), podemos considerar que as bactérias que foram encontradas

na cavidade oral dos camundongos, fazem parte da microbiota oral desses animais, não sendo consideradas patogênicas quando habitam esse local em indivíduos saudáveis. Inclusive esses micro-organismos podem beneficiar o hospedeiro, prevenindo o crescimento excessivo de outras bactérias por competição (YAMAMOTO; GACEK, 2012).

De acordo com estudos realizados por Chun e colaboradores (2010) a microbiota oral bacteriana entre os camundongos é muito semelhante, o que não ocorre entre humanos, onde cada indivíduo possui quantidade e variabilidade bacterianas distintas em sua cavidade oral. Em camundongos essa semelhança ocorre devido a dieta controlada, instalações livres de patógenos e com rígidas barreiras sanitárias, além de serem animais com background genético conhecido (CHUN et al., 2010). Portanto as bactérias encontradas na cavidade oral dos camundongos em nosso estudo não representam risco para a saúde desses animais, já que fazem parte da sua microbiota oral como descrito por Yamamoto; Gacek (2012) e Abusleme e colaboradores (2017).

Em contrapartida, como foi identificado algumas bactérias patogênicas nos comedouros dos animais, pode ter havido quebra de barreira sanitária, o que indica que todos os procedimentos dessa área devem ser revistos, para verificar onde possa estar havendo falhas. Segundo Silva (2013) para termos animais de qualidade, se faz necessário a criação de barreiras sanitárias apropriadas, onde deve haver conscientização da equipe técnica, pesquisadores e de todos que trabalham direta o indiretamente com os animais. Além de haver a necessidade da implantação de protocolos para avaliação das condições sanitárias dos animais e do ambiente onde estes estão alocadas e garantir o respeito à todas as exigências éticas e legislação sobre o uso de animais na pesquisa.

Já em relação ao controle de qualidade de ração, como não há legislação específica, este trabalho poderá servir de orientação para definir parâmetros para a análise microbiológica de ração para animais de laboratório, pois segundo Reis (2008), a ração fornecida aos animais merece toda a vigilância possível, já que a presença de micro-organismos pode causar danos à saúde ou qualidade desses animais. Além disso, o estudo comprovou que mantidos os cuidados específicos, a ração nova pode ser disposta por cima da ração remanescente sem que haja contaminação da inicial, isto evitará um grande desperdício, já que não será

necessário desprezar a ração inicial em todo procedimento de manutenção do animal.

Este estudo também comprova que não há necessidade da utilização de grande número de animais para realização de uma pesquisa científica, quando bem desenhada, já que visando o bem-estar dos animais, neste trabalho foi utilizada somente a quantidade de animais recomendada pela literatura, onde nos baseamos nos trabalhos de Reis (2008) que comparou o desenvolvimento de camundongos alimentados com ração autoclavada, e verificou que foram necessários onze animais por sexo para cada tipo ração, considerando 95% de confiança, 80% de poder do teste e diferença mínima significativa de 0,1 e Clarke e colaboradores (1977) que sugeriram que para realizar trabalhos de avaliação microbiológica de ração são necessárias pelo menos quatro amostras de 25g para cada lote analisado. Já a RDC nº 12 da Anvisa (BRASIL, 2001) indica que são necessárias três amostras para a análise microbiológica de alimentos. Assim formamos quatro grupos (quatro amostras) para cada ração analisada. Além disso, a quantidade de animais por gaiola seguiu a resolução normativa nº 15 do CONCEA, onde o número máximo de animais que poderíamos colocar em cada gaiola seria de cinco camundongos (BRASIL, 2013a).

Logo, seguimos o que indica Cazarin, Corrêa e Zambrone (2004) e Tréz (2018) que diz que devemos evitar a replicação dos estudos *in vivo*, pois todos nós do meio científico devemos ter o compromisso de seguir os princípios dos 3R's. (*reduction, refinement, replacement*), que preconiza, além da redução do número de animais utilizados na pesquisa, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo*.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ Os corantes alimentícios utilizados podem ser empregados para marcar rações para análise microbiológica, já que se mostraram inócuos frente ao crescimento bacteriano e não houve preferência dos animais entre a ração normal e a marcada, nem entre as diferentes cores. Além disso, essa metodologia poderá ser utilizada em outros experimentos que haja a necessidade de diferenciação da ração.
- ✓ Não houve diferença da qualidade higiênico-sanitária entre a ração irradiada e autoclavada ambas obtiveram resultados semelhantes em relação às análises.
- ✓ Não foi identificado nas rações, nos comedouros e nas cavidades orais dos animais, nenhum micro-organismo indicado na legislação como referência negativa para análise de rações ou mesmo alimentos em geral.
- ✓ Foi possível através da metodologia usada, isolar bactérias potencialmente patogênicas dos comedouros (*Staphylococcus* spp., *Acinetobacter baumannii* complex e *Enterobacter cloacae*), demonstrando que pode ter havido quebra de barreira sanitária, portanto todos os procedimentos dessa área devem ser revistos, para verificar onde possa estar havendo falhas.
- ✓ Na cavidade oral dos animais as bactérias encontradas fazem parte da microbiota oral, não tendo sido evidenciadas anteriormente no monitoramento sanitário, que poderia ser ampliado além da lista da FELASA.
- ✓ Os micro-organismos detectados na ração durante o experimento, não afetam a sua qualidade higiênico-sanitária, pois não só ficaram quantitativamente abaixo dos limites estabelecidos na literatura, como não são patogênicos ou indicadores de baixa qualidade.

- ✓ A pesquisa estabeleceu que rações novas podem ser dispostas por cima das antigas, todavia, recomenda-se o descarte das rações muito velhas (mais de 15 dias nos comedouros) que estiverem muito ruídas e não mais sendo consumidas, já que o teste foi para rações que permaneceram no comedouro por duas semanas, pois os animais consumiram toda a ração, não excedendo esse período.
  
- ✓ É necessário seguir sempre os protocolos para criação de animais de laboratório incluindo a vigilância de doenças, diagnóstico e um programa periódico de monitoramento sanitário que obedeça às normas vigentes, com controle de qualidade microbiológico efetivo, já que para realizar pesquisas de boa qualidade é necessário que os animais estejam saudáveis.

## 8 PESPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Utilizar os conhecimentos adquiridos para evitar o desperdício de ração no INCA, mudando o pop de manutenção animal, onde a ração nova deverá ser colocada por cima da antiga e futuramente avaliar a economia gerada.
- ✓ Utilizar a técnica desenvolvida de uso dos corantes alimentícios para marcação de ração em outros experimentos.
- ✓ Fazer um estudo mais elaborado para observar se há algum motivo para o consumo diferenciado entre as rações irradiadas e autoclavadas.
- ✓ Coletar o swab de outras linhagens de camundongos para verificar a microbiota oral existente e compará-la com os nossos resultados.
- ✓ Padronizar as análises microbiológicas de ração para futura contribuição na criação ou ampliação de legislação específica.

## REFERÊNCIAS

ABUSLEME, L.; HONG, B.; HOARE, A.; KONKEL, J. E.; DIAZ, P. I.; MOUTSOPOULOS, N. M. Oral microbiome characterization in murine models. **Bio Protoc**, v.7, n.24, p. 1-17, 2017.

AMARAL, C. M. C. **Extrusão e peletização de ração completa: efeitos no desempenho, na digestibilidade e no desenvolvimento das câmaras gástricas de cabritos saanen**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de ciências agrárias e veterinárias. São Paulo, 2002.

AMERICANO, M. M. S. **Qualidade microbiológica de ração para cães produzidas e comercializadas no Estado de Mato Grosso**. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal), Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2016.

ADAMS, S. C; MYLES, M. H; TRACEY, L. N; LIVINGSTON, R. S; SCHULTZ, K. L; REUTER, J. D; LEBLANC, M. Effects of Pelleting, Irradiation and Autoclaving of Rodent Feed on MPV and MNV Infectivity. Colorado, **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.58, n.5, pg.542-550,2019.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SCIELO-Editora FIOCRUZ, 2006.

ANDREWS, W.H.; WANG, H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. **Salmonella**. Bacteriological Analytical Manual, chapter 5. Food and drug administration, U.S.A, 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam-chapter-5-salmonella>> Acesso em: 19 fev. 2019.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A. **As bases e os fundamentos da nutrição animal**. 4ª ed. São Paulo: Nobel; 2002.

ALVES, S. G. S.; ATAIDE, C. D. G.; SILVA, J. X. Microbiológica de coliformes totais e termotolerantes em água de bebedouros de um parque público de Brasília, Distrito Federal. **Rev. Cient. Sena Aires**, v.7, n.1p.12-7, 2018.

ANTONIO, J. M. **Avaliação do consumo de corantes alimentares amarelos por lactentes e crianças em idade pré-escolar**. Monografia (graduação) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curso superior de engenharia de alimentos, Campo Mourão, 2014.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Curso de boas práticas módulo IV. 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/intr\\_ent.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_ent.htm)> Acesso em: 10 ago. 2018.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1, 5ª Ed. Brasília, 2010.

ARAÚJO, F. R. G.; CASTRO, C. M. M. B.; SEVERO, M. S.; DINIZ, M. T. VIANA, M. F. A.; EVÊNCIO, L. B. Normal microbiota of the perialveolar region of incisors of rats. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.6, p.1586-1588, 2007.

ARCÓLOR. **Ingredientes para confeitaria e panificação**, São Paulo, 2018. Disponível em:< <https://arcolor.com.br/produto/corantes-liquidos/> > Acesso em: 10 de ago. 2018.

BAGLIE, R. C. C. **Efeito da clatomicina sobre a resistência a antimicrobianos de estreptococos orais e estafilococos nasais de indivíduos sadios**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Cmpinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2004.

BARBOSA, A. C. N.; SOUZA, M. A.; VILAR, M. S. A.; VILAR, D. A.; VELOSO, M. F. L.; SILVA, A. L. R. Avaliação microbiológica de artigos de uso médico numa unidade de terapia intensiva. **Revista Tem@**, v.11, n.16, 2011.

BARSZCZ, M.; TUŚNIO, A.; TACIAK, M.; JOLANTA, P. L.; MOLEND, M.; MORAWSKI, A. Effect of the composition and autoclave sterilization of diets for laboratory animals on pellet hardness and growth performance of mice. **Annals of Animal Science**, v. 14, n.2, p.315–328, 2014.

BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. Fungos anemófilos na praia do Laranjal, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 72, n. 1, p. 93-97, 2005.

BIO-RAD. **Meio cromogênico não seletivo para o isolamento direto, diferenciação e enumeração de patógenos do trato urinário**. UriSelect™4, 2013. Disponível em: <[bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/pt/63726\\_2013\\_11\\_BR.pdf](http://bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/pt/63726_2013_11_BR.pdf)> Acesso em: 18 fev. 2020.

BITTENCOURT, G.B. **Morfologia dos fotorreceptores e genética dos pigmentos visuais de Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus (Serpentes, Viperidae)**. Dissertação (mestrado), São Paulo. Universidade de São Paulo, Instituto de Psicologia, 2018.

BLODGETT, R. **Most probable number from serial dilutions**. **Bacteriological analytical manual, food and drug administration**, U.S.A, 2010. Disponível em:< <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions#tab1>>Acesso em: 06 fev. 2018.

BRANDÃO, P. A.; NASCIMENTO, T. R.; SOBRAL, F. E. S.; FREITAS, M. R. V.; BRITO I. C. A.; SILVA, S. G. Avaliação da Qualidade Bromatológica e Microbiológica de Rações para Cães. **Rev. Cient. Prod. Anim**, v.13, n.1, p.71-74, 2011.

BRASIL. CONCEA. Resolução nº 15. Dispõe sobre: Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 Dez. 2013a. Disponível em: <[http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros\\_atos/resolucoes/migracao/Resolucao\\_Normativa\\_CONCEA\\_n\\_15\\_de\\_16122013.html](http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_15_de_16122013.html)> Acesso em: 15 ago. 2018.

BRASIL. CONCEA. Resolução nº 33. Dispõe sobre: Procedimentos – roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de novembro de 2016. Disponível em: <[http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf](http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf)> Acesso em: 19/05/20

BRASIL. CONCEA. Resolução nº 37. Dispõe sobre: Diretrizes da prática de eutanásia. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 de fevereiro de 2018a. Disponível em: <[http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Anexo-Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia\\_site-concea-.pdf](http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Anexo-Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea-.pdf)> Acesso em: 10 ago. 2019.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Manual prático de análise de água. Fundação Nacional de Saúde, 4. ed. Brasília, Funasa, 2013b. Disponível em: <[http://www.funasa.gov.br/site/wpcontent/files\\_mf/manual\\_pratico\\_de\\_analise\\_de\\_agua\\_2.pdf](http://www.funasa.gov.br/site/wpcontent/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf)>. Acesso em: 31 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 04 de 23 de fevereiro de 2007. Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal e o roteiro de inspeção. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1864199569>> Acesso em 10 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 34, de 28 de maio de 2008. Regulamento técnico da inspeção higiênico sanitária e tecnológica do processamento de resíduos de origem animal. Diário Oficial da União. Brasília, 29 de maio de 2008. Disponível em:<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=284275208>> Acesso em 15 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 30, de 26 de junho de 2018b. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. . Diário Oficial da União. Brasília, 13 de julho de 2018. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/poa/Manualdemtodosoficiaisparaanlisedealimentosdeorigemanimal1ed.rev\\_.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/poa/Manualdemtodosoficiaisparaanlisedealimentosdeorigemanimal1ed.rev_.pdf)> Acesso em: 11 mar. 2020.

BRASIL, Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 44, 1977. Estabelece condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados em alimentos (e bebidas). Disponível em: <[portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/RESOLUCAO\\_CNNPA\\_44\\_1977.pdf/b8d43a0d-5c1b-4be1-ba69-67f69cf55446](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf/b8d43a0d-5c1b-4be1-ba69-67f69cf55446)>. Acesso em 16 maio. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cultura, isolamento e identificação da *Neisseria gonorrhoeae*. - Brasília: Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 1997. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd07\\_06.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd07_06.pdf)>. Acesso em 08 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 387, 1999. Uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos. Diário Oficial da União. Brasília, 09 de agosto de 1999. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Microsoft%2BWord%2B-%2BResolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2Bn%25C2%25BA%2B387%2Bde%2B05%2Bde%2Bagosto%2Bde%2B1999.pdf/1240800a-0d4b-4cc9-8d9c-5211e9c3fb93>> > Acesso em 17 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 de jan. 2001. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/anexos/anexos\\_res0012\\_02\\_01\\_2001.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/anexos/anexos_res0012_02_01_2001.pdf)>. Acesso em: 09 mar. 2020.

BUGNO, A. **Esterilidade: Validação de metodologia e proposta de otimização de resultados**. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de ciências farmacêuticas. São Paulo, 2001.

CAPPELLI, S.; LUNEDO, P.; FREITAS, C. P.; RABER, H. R.; MANICA, E.; HASHIMOTO, J. H.; OLIVEIRA, V. Avaliação química e microbiológica das rações secas para cães e gatos adultos comercializadas a granel. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.1, p. 90 -102, 2016.

CARDOZO, V. M. **Salmonella spp. e Clostridium perfringens em farinhas de origem animal utilizadas na fabricação de rações e avaliação de aditivo na inibição de patógeno**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. São Paulo, 2011.

CARVALHO, A. C F. B.; CORTEZ, A. L. L.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P VIDAL-MARTINS, A. M. C. Presença de microrganismos mesófilos, psicotrópicos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.303-307, 2005.

CARVALHO, R. A.; CARVALHO, S. A.; MOURÃO, F. R. P.; BRITO M. V. H. Avaliação nutricional de ração comercial para camundongos (*Mus músculos*), *Rev. para. Med.* v.17, n.2, p. 2-28, 2003.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.3, p.289-299,2004.

CHAGAS, T. P. G. **Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos oxae ndm, isolados de diferentes regiões do Brasil.** Tese (doutorado). Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro, 2015.

CHARLES RIVER. ***Salmonella (S. enterica, various subspecies and serotypes)***, USA. Disponível em: <<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/SalmonellaTechnicalSheet.pdf>> Acesso em: 29/01/2019.

CHARLES RIVER. **C57BL/6 mouse**, USA, 2020. Disponível em: <<https://www.criver.com/products-services/find-model/c57bl6-mouse?region=3611>> Acesso em 20 fev. 2020.

CHUN, J.; KIM, K. Y.; LEE, J.; CHOI, Y. The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. **BMC Microbiology**, v.10, n.101, p.1-8, 2010.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P.; SANDI D. **Corantes alimentícios.** **B. CEPPA**, v. 20, n.2, p. 203-220, 2002.

CLARKE, H. E.; COATES, M. E.; EVA, J.; KFORD, D. J.; MILNER, C. K.; O'DONOGHUE, P. N.; SCOTT, P. P.; WARDR, R.J. Dietary standards for laboratory animals: report of the Laboratory Animals Centre Diets Advisory Committee. **Laboratory Animals**, London, v. 11, pg.1- 28, 1977.

DONZA A. **Ratos enxergam cores?** SANITAS. Jul. 2019. Disponível em: <<https://www.sanitas.com.br/node/194>> Acesso em: 20 dez. 2019.

ESTEVES, D. C.; PEREIRA, V. C.; SOUZA, J. M.; KELLER, R.; SIMÕES, R. D.; WINKELSTROTER ELLER, L. K.; RODRIGUES, M. V. Influence of biological fluids in bacterial viability on different hospital surfaces and fomites. **Am J Infect Control**, v.44, n.3, p: 311-114, 2016.

FAGUNDES, R. M.; FERREIRA, L. C. Contaminação microbiológica da ração e água fornecida a frangos em granja avícola da cidade de Januária, Higiene Alimentar, v.32, n.282/283, p. 35-39, 2018.

FARIA H. G. Considerações sobre dietas experimentais para animais de laboratório: formulações, aplicações, fornecimento e efeitos experimentais. In: **SIMPÓSIO DE BIOTERISMO DA FIOCRUZ - PE.** Recife, 2010. Disponível em: <<http://www.bit.uem.br/Dietas-experim.pdf%3E>> acesso em: 10/10/2018

FARIA H. G.; STABILLE, S. R. Desempenho de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar em crescimento alimentados com dietas extrusadas e peletizadas. Maringá, Acta **Sci. Biol. Sci**, v. 29, n. 1, p. 75-79, 2007.

FEI, N.; ZHAO, L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. **The ISME Journal**, v.7, p.880–884, 2013.

FELASA - FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS. (Working Group on Revision of Guidelines For Health Monitoring of Rodents and Rabbits) 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.

FERREIRA, H.; LIMA, H.; COELHO, T. **Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal**. Trabalho de conclusão (especialização). Universidade Federal Rural do Semiárido. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, maio, 2014.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. **Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**. Bacteriological Analytical Manual, Food and Drug Administration, U.S.A, 2018. Disponível em:<<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm#conventional>>. Acesso em 19 fev. 2019.

FILHO, F. C. C.; ALVES, V. C.; LIMA, C. E.; GUIMARÃES, C. M. M.; PEREIRA, M. M. G.; MURATORI, M. C. S. Qualidade higiênico-sanitária da ração utilizada em piscicultura. **Rev Inst Adolfo Lutz**, V: 70 n.3, p.391-4, 2011.

FRANÇA, J.; SAAD, F. M. O. B.; SAAD, C. E. P.; SILVA, R. C.; REIS, J. S. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Rev. Bras. Zootec**, v.40, p.222-231, 2011.

FONTES, R. S.; SANTOS, R. A., **Seção de Produção de Animais Specified Pathogen Free**. In: Silvânia M. P.; Neves et al. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, p. 43-72. São Paulo, 2013.

GIRIO, T. M. S. **Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

GIRIO, T. M. S.; FILHO, A. N.; JUNIOR, O. D. R.; AMARAL, L. A. GIRIO, R. J. S. Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.036-040, 2012.

HILLMANN, B.; SORIANO, V. S.; PETROLI, T. G.; MACCARI, M. Análise microbiológica de rações para cães comercializadas a granel e em embalagem fechada. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**. Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.11 n.21; p. 134-141, 2015.

HOFER, E.; FILHO, S. J. S.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras**, v.18 n.1 p.21-27, 1998.

JACOBS G. H.; WILLIAMS G. A.; CAHILL H.; NATHANS J. Emergence of Novel Color Vision in Mice Engineered to Express a Human Cone Photopigment. **Science**, v.315, n.23, p.1723-1725, 2007.

KELBER, A. Vision: Rods see in bright light. **Current Biology**, v. 365, n.28, p.342–366, 2018.

KELLER, R.; PEDROSO, M. Z.; RITCHMANN, R.; SILVA, R. M. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. **Infect Immun**, v.66, n.2, p.645–649, 1998.

KICK, B. D. V.M. **Want to know what to feed mice?** U.S.A, The Jackson Laboratory.Jan.2020. Disponível em: <<https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2020/january/mouse-diet-guide#>> Acesso em: 2 ag.2020.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009.

LIRA, R.S. **Validação de teste de esterilidade baseado na detecção de dióxido de carbono**. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de ciências farmacêuticas. São Paulo, 2013.

LIRA, S.; FERREIRA, R. R.; TAMBELLINI, V. Y.; GARCIA, I. P.; FERRAZ, R. R. N.; SILVA, R. N. Isolamento de *Staphylococcus aureus* no trato respiratório inferior de rato Wistar. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, n. 26, p.36-40, 2015.

LONGO, F. A.; SILVA, I. F.; LANZARIN, M. A. A importância do controle microbiológico em rações para aves. **XI Simpósio Brasil Sul de Avicultura e II Brasil Sul Poultry Fair**. Chapecó, SC. Abril, 2010.

LONGO, F. A. **A importância do controle microbiológico em rações para aves**. 2010. Disponível em:<<https://pt.engormix.com/avicultura/artigos/control-microbiologico-racoes-aves-t36902.htm>>. Acesso em: 10 out. 2018.

LUCA, G.C.; REICHMANN, F.; GONÇALVES, S.D. Efeitos da radiação gama (CO-60) em conservantes utilizados na indústria cosmética, CBE Embrarad , COMPANHIA BRASILEIRA DE ESTERILIZAÇÃO, **Pro Serv Quimica**, São Paulo, 2009. Disponível em: <<https://document.onl/business/cbe-radiacao-em-conservantes-na-industria-cosmetica.html> >\_Acesso em: 02 out. 2018

MAJEROWICZ, J. **Boas práticas em biotérios e biossegurança**. 1ª ed. p. 13-17. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

MANRIQUE, E. J. C.; PAIVA, E. S.; LIMA, A. B. M. **O controle de qualidade dos meios de cultura como ferramenta para assegurar a confiabilidade dos ensaios microbiológicos**. 2016. Disponível em: <<http://www.sbmt.org.br/medtrop2016/wp->

content/uploads/2016/11/10127-O-controle-de-qualidade-dos-meios-de-cultura-como-ferramenta...pdf>. Acesso em: 08 mar. 2020.

MARKS, L. R.; REDDINGER, R. M.; HAKANSSON, A. P. Biofilm formation enhances fomite survival of *streptococcus pneumoniae* and *streptococcus pyogenes*. **Infect immun**, v. 82, n. 3, p. 1141–1146, 2014.

MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* multirresistente um desafio para a saúde pública. **Scientia Medica**, v.23, n.1, p. 56-62, 2013

MEDICAL EXPO. EMB. Reagente meio reacional/ para isolamento bacteriano/ clínico/ de *Escherichia coli*. Disponível em: <<https://www.medicalexpo.com/pt/prod/rta-laboratories/product-110748-866335.html>> Acesso em: 27 fev. 2020.

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de salmonella com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária. Uberlândia, 2016.

MINAGAWA, C. Y. **Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpes de E. coli e do meio ambiente em biotérios**. Dissertação (mestrado), Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia. São Paulo, 2007

MORIYA, G. A. A. **Prazo de validade de esterilização de materiais utilizados na assistência à saúde: um estudo experimental**. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, 2012.

MOURA, A.M.A. Nutrição de roedores de laboratório: paradigmas e desafios- artigo de revisão. **RESBCAL**, São Paulo, v.2 n.4, pg. 288-296, 2014.

MOURA, A. C.; TASCA, A. C.; PINTO, F. G. S.; SOARES, I. A.; ASSUMPÇÃO, R. B. Qualidade microbiológica de farinhas de trigo (*Triticum aestivum*) comercializadas na cidade de Cascavel (Paraná). **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 2, n.2, p.499-504, 2014.

MOTA, I. G. **Corantes artificiais: Riscos à saúde e necessidade de revisão da regulamentação brasileira**. Monografia (graduação). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de ciências da saúde do departamento de nutrição. Natal, 2016.

NRC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. 8 th. Washington: D.C: National Academy Press, 2010.

NETO, J. P. S. **Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e Salmonella sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos**. Dissertação (mestrado). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2016.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. **Bacteriologia. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. 2a ed., v. 4, p. 221-397. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2013.

OLIVEIRA, A. P. S.; JACQUES, G. F.; NERY, V. V. C.; ABRANTES, S. Consumo de corantes artificiais em balas e chicletes por crianças de seis a nove anos. **Revista Analytica**, n.44, p.79-85, 2010.

PEGADO, F. J. N. **Infecções orais por *Streptococcus* spp. e suas repercussões por via sistêmica: relevância em Medicina Dentária?** Monografia (graduação). Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2010.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clin Microbiol Ver**, v.21, n.3, p.538-582, 2008.

PEREIRA G. A. A. **Pesquisa de corantes orgânicos artificiais em bebidas não alcoólicas dos tipos suco, néctar e refresco** (monografia). Assis: Fundação Educacional do Município de Assis, Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, 2014.

PEREIRA, T. C; PEDRINI, S. C. B; ESCUDERO, H. H; GERMINO, R. V; ROSA, P. S. Monitoramento sanitário de colônia de camundongos BALB/c mantidos em biotério convencional. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 8, ed. 195, p.1310- 2012.

POLITI, F. A. Z.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.29, n.1, p.17-28, 2008.

PONATH, F. S; VALIATTI, T. B; SOBRAL, F. O. S; ROMÃO, N. F; ALVES, G. M. C; PASSONI, G. P. Avaliação da higienização das mãos de manipuladores de alimentos do Município de Ji-Paraná, Estado de Rondônia, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.7, n.1, 2011.

PORTO, S. M. M. S.; VIANA, M. T.; SILVA, K.M.F.; DINIZ, M. F. A.; CASTRO, C. M. M. B. Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. **Rev. Nutr. Campinas**, v.20, n.6, p.625-632, Dec, 2007.

REGLI, A. D.; PAGÈS, J. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Front Microbiol**, v.6, p. 392. p.1-10, 2015.

REIS, K. T. **Comparação do desenvolvimento de camundongos alimentados com ração comercial autoclavável de diferentes marcas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde); Fundação Oswaldo Cruz.- FIOCRUZ, Belo Horizonte, 2008.

REIS, W. A.; CARVALHO, F. R. S.; FRANCO, O. L.; OLIVEIRA, J. R. Estudo histopatológico da infecção pulmonar causada por *Klebsiella pneumoniae*, em

modelo experimental murino. **69ª Reunião Anual da SBPC** – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte/MG 16 a 22 de julho de 2017.

RESENDE, M. R. **Mutagenicidade do corante alimentício tartrazina no ensaio Salmonella/microsoma**. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia, Limeira, 2015.

ROSSI, D.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Influência de fluídos biológicos na sobrevivência de *Staphylococcus aureus* sobre diferentes superfícies secas. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 29, n.2, p. 211-214, 2008

SCARCELLA, A. C. A.; BERETTA; L. R. Z.; SCARCELLA, A. S. A. Infecção relacionada a assistência a saúde associada a *Acinetobacter baumannii*: Revisão de literatura. **RBAC**, v.49, n.1, p.18-21, 2017.

SANT'ANA, F. J. F.; GARCIA, E. C.; RABELO, R. E.; BRAGA, C. A. S. B.; LIMA, C. R. O.; COSTA, Y. L. Relato de caso epididimite crônica por *Enterobacter cloacae* em cão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 796-800, jul./set. 2008.

SANTOS, E. J.; CARVALHO, E. P.; SANCHES, R. L.; BARROS, B. E. B. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no Estado de Minas Gerais para produção de ração animal. **Ciência Agropecuária**, Lavras, v.24, n.2, p.425-433, 2000.

SILVA, A. C. B. **Investigação eletrofisiológica e comportamental da função visual em camundongos suíços com hipotireoidismo congênito induzido por metimazol**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Pará, Núcleo de teoria e pesquisa do comportamento, Belém, 2017.

SILVA, A. K.; DOMARESKI, J. L. Avaliação da qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo de Foz do Iguaçu / PR. **Pleiade**, v. 9, n. 9, p. 7-32, 2011.

SILVA, E. L. A.; SILVA, P. R. S. Investigação microbiológica da saliva de animais de estimação. **Rev. saúde em Foco**, v. 1, n. 2, p. 109-122, 2014.

SILVA, J. R. F. **Avaliação sanitária do Biotério de Criação: uma contribuição para a melhoria da qualidade dos animais de laboratório produzidos no CPqAM**. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate**. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Escola superior de agricultura, Piracicaba, 2002.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v.9, n.1, p. 83-88, jan./jun. 2006.

TACONIC. **Black 6 (B6NTac) inbred**, USA, 2020. Disponível em:<<https://www.taconic.com/mouse-model/black-6-b6ntac>>Acesso em: 19 fev. 2020.

THE JACKSON LABORATORY. **C57BL/6NJ**, USA, 2020. Disponível em <<https://www.jax.org/strain/005304>>Acesso em: 2 set. 2018.

TRÉZ, T. A. Considerações sobre o conceito dos 3Rs e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. **Revista Brasileira de Zootecias**, v,19, n,2, p.97-113, 2018.

VASCONCELLOS, G. S. F. M.; HAMATY, M. H. R. C.; NASCIMENTO, R. S. Surto de salmonelose em produtos de origem aviária. São Paulo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.7, n.12, p.1-23, 2014.

VECCHIA, A. B.; FORTES, R. C. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.27, n.2, P.324-327, 2007

VELDMAN, A.; VAHL, H. A.; BORGGREVE, G. J.; FULLER, D. C. A survey of the incidence of *Salmonella* species and *Enterobacteriaceae* in poultry feeds and feed components. **Vet. Rec**, v.136, n.7, p.169 – 172, 1995.

VESTBY L. K. **Why is it so difficult to eradicate *Salmonella*?** 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedaily.com/releases/2010/02/100202103928.htm>>\_\_Acesso em: 31 jan. 2020.

VILELA, S. F. G. **Ação de diferentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica antimicrobiana.** (dissertação de mestrado). São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, 2010.

WEISKIRCHEN, S; WEIPER, K; TOLBA, R. H; WEISKIRCHEN, R. All you can feed: some comments on production of mouse diets used in biomedical research with special emphasis on non-alcoholic fatty liver disease research. Germany, **Nutrients**, v.12, n.163, p.1-40, 2020.

YAMAMOTO, V.; GACEK, R. R. F. Microbiota oral de ratos e camundongos: estudo da prevalência de bactérias Gram positivas. São Paulo, **RESBCAL**, v.1, n.4, p.302-309, 2012.

ZOTZ, R.; FICHER, M. L. **Ética em pesquisa: Experimentação animal.** 1ª ed. Curitiba: PucPRESS, 2018.

## ANEXO A- PARECER DA CEUA

MINISTÉRIO DA SAÚDE

www.inca.gov.br



### PARECER DE AVALIAÇÃO DE PROJETO SUBMETIDO À CEUA – INCA

Protocolo CEUA - INCA nº 005/18

Parecer nº 001/19

<b>Pesquisador: Martin Hernan Bonamino</b>	
<b>Avaliação microbiológica de rações secas irradiadas e autoclavadas durante um período de exposição nas gaiolas de camundongos de uma colônia de criação isogênica</b>	
<b>Data de entrada:</b> 30/10/2018	<b>Data da reunião:</b> 30/11/2018
<b>Situação do Projeto:</b> <u>APROVADO</u>	<b>Validade:</b> 01/03/2020
<b>Número de animais aprovado:</b> 95	<b>Linhagem:</b> C57BL/6
<b>Idade / Peso:</b> 8-12 semanas	<b>Sexo:</b> macho e fêmea
<b>Instituição de origem dos animais:</b> INCA	
<b>Finalidade do projeto:</b> pesquisa	
<b>Considerações e Parecer:</b>	
<p>Ao analisar a apresentação do projeto de pesquisa "Avaliação microbiológica de rações secas irradiadas e autoclavadas durante um período de exposição nas gaiolas de camundongos de uma colônia de criação isogênica", tendo como pesquisador responsável Martin Hernan Bonamino, verificou-se que o mesmo encontra-se em conformidade com o Regimento Interno desta Comissão e os requisitos éticos na experimentação animal. Desta forma, classifico o protocolo como: APROVADO.</p> <p>Informo que o solicitante possui o prazo de <b>180 dias</b> a contar da data de hoje para apresentar o <b>relatório parcial de atividades relacionadas ao projeto aprovado</b> e, após o término de validade do mesmo, o prazo de <b>30 dias</b> para apresentar o <b>relatório final</b>, ambos em modelo aprovado pela CEUA-INCA. A não apresentação do relatório pode resultar na suspensão ou cancelamento da aprovação do projeto.</p>	

Rio de Janeiro, 11 de janeiro de 2019.

Renata Batista da Silva  
Coordenadora da CEUA-INCA

## ANEXO B – VALIDAÇÃO DE CICLO DE RAÇÃO EM AUTOCLAVE.



RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO DE CICLO DE ESTERILIZAÇÃO POR VAPOR SATURADO

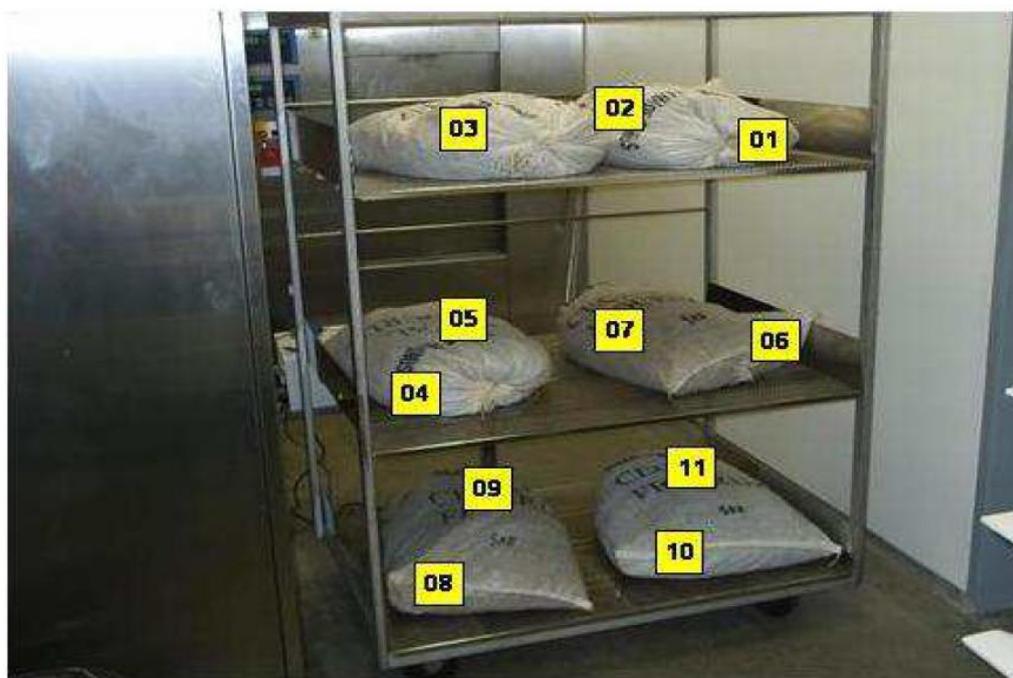
Nº: 000175271

UO: DIBIO/VQUAL/LAEAN

<b>Equipamento:</b> AUTOCLAVE	<b>Modelo:</b> GE 91813 ARB -2
<b>TAG:</b> AUT012	<b>Nº de Série:</b> 5100747-100-01
<b>Fabricante:</b> GETINGE	<b>Patrimônio:</b> 30-02-01164

<b>Ciclo ID:</b> SP09-AUT012	<b>Contagem:</b> Porosa	<b>Exposição:</b> 30
<b>IHM:</b> P9	<b>Pré-Cond:</b> 2 PULSOS DE VÁCUO	
<b>Set-point:</b> 121	<b>Pós-Cond:</b> 20 MIN DE SECAGEM A VACUO	
<b>Carga:</b> RAÇÃO		

*Diagrama*



**CONFORME**

Executado em: 01/11/2011 13:00:00

Elaborado

Verificado

Aprovado

<i>BRUNO LUIS MUZY</i>	<b>Thiago Jorge Teixeira Menezes</b> Assinado digitalmente por Thiago Jorge Teixeira Menezes Data: 2013.12.23 09:54:30 -0200	<b>Walter Alexandre dos Santos Junior</b> Digitally signed by Walter Alexandre dos Santos Junior DN: email=walter@bio.fiocruz.br, cn=Walter Alexandre dos Santos Junior, ou=SEQES, o=Bio-Manguinhos, c=BR Date: 2013.12.23 09:59:09 -0200
------------------------	--	--

## ANEXO C – MONITORAMENTO SANIÁRIO (BACTÉRIAS)



**DTAPEP**  
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa  
Biotério Central da FMUSP



**Nº Cliente/ Sequência:** 7245/63922      **Sexo:** Macho/Fêmea  
**Procedência:** INCA      **Idade:** 13 a 44 semanas  
**Espécie:** Camundongo      **Data:** 28/01/2020  
**Linhagem:** Matriz C57Bl/6      **Foto referência:** 8/9

Bactérias	Método	Resultados (Positivos/Total)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PCR	0/2
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	PCR	0/2
<i>Helicobacter</i> spp.	PCR	0/2
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PCR	0/2
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	PCR	0/2
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura/PCR	0/2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PCR	0/2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR	0/2
<i>Citrobacter rodentium</i>	Cultura	0/2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0/2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultura	0/2
<i>Pasteurella multocida</i>	Cultura	0/2
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultura	0/2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0/2
<i>Salmonella</i> spp.	Cultura	0/2



**DTAPEP**  
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa  
Biotério Central da FMUSP



**Nº Cliente/ Sequência:** 7245/63922      **Sexo:** Fêmea  
**Procedência:** INCA      **Idade:** 13 a 44 semanas  
**Espécie:** Camundongo      **Data:** 28/01/2020  
**Linagem:** Estoque NSG      **Foto referência:** **10**

Bactérias	Método	Resultados (Positivos/Total)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PCR	0/1
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	PCR	0/1
<i>Helicobacter</i> spp.	PCR	0/1
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PCR	0/1
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	PCR	0/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura/PCR	0/1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PCR	0/1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR	0/1
<i>Citrobacter rodentium</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultura	0/1
<i>Pasteurella multocida</i>	Cultura	0/1
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultura	0/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0/1
<i>Salmonella</i> spp.	Cultura	0/1



**DTAPEP**  
 Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa  
 Biotério Central da FMUSP



**Nº Cliente/ Sequência:** 7245/63922      **Sexo:** Macho  
**Procedência:** INCA      **Idade:** 13 a 44 semanas  
**Espécie:** Camundongo      **Data:** 28/01/2020  
**Linhagem:** Estoque C57Bl/6      **Foto referência:** **11**

Bactérias	Método	Resultados (Positivos/Total)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PCR	0/1
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	PCR	0/1
<i>Helicobacter</i> spp.	PCR	0/1
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PCR	0/1
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	PCR	0/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura/PCR	0/1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PCR	0/1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR	0/1
<i>Citrobacter rodentium</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultura	0/1
<i>Pasteurella multocida</i>	Cultura	0/1
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultura	0/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0/1
<i>Salmonella</i> spp.	Cultura	0/1



**DTAPEP**  
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa  
Biotério Central da FMUSP



**Nº Cliente/ Sequência:** 7245/63922      **Sexo:** Macho  
**Procedência:** INCA      **Idade:** 13 a 44 semanas  
**Espécie:** Camundongo      **Data:** 28/01/2020  
**Linhagem:** Estoque NSG      **Foto referência:** **12**

Bactérias	Método	Resultados (Positivos/Total)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PCR	0/1
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	PCR	0/1
<i>Helicobacter</i> spp.	PCR	0/1
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PCR	0/1
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	PCR	0/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura/PCR	0/1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PCR	0/1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR	0/1
<i>Citrobacter rodentium</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultura	0/1
<i>Pasteurella multocida</i>	Cultura	0/1
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultura	0/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0/1
<i>Salmonella</i> spp.	Cultura	0/1



**DTAPEP**  
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa  
Biotério Central da FMUSP



**Nº Cliente/ Sequência:** 7245/63922      **Sexo:** Fêmea  
**Procedência:** INCA      **Idade:** 13 a 44 semanas  
**Espécie:** Camundongo      **Data:** 28/01/2020  
**Linhagem:** Balb/CJ      **Foto referência:** **13**

Bactérias	Método	Resultados (Positivos/Total)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PCR	0/1
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	PCR	0/1
<i>Helicobacter</i> spp.	PCR	0/1
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PCR	0/1
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	PCR	0/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura/PCR	0/1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PCR	0/1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR	0/1
<i>Citrobacter rodentium</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultura	0/1
<i>Pasteurella multocida</i>	Cultura	0/1
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultura	0/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0/1
<i>Salmonella</i> spp.	Cultura	0/1



**DTAPEP**  
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa  
Biotério Central da FMUSP



**Nº Cliente/ Sequência:** 7245/63922      **Sexo:** Fêmea  
**Procedência:** INCA      **Idade:** 13 a 44 semanas  
**Espécie:** Camundongo      **Data:** 28/01/2020  
**Linhagem:** Produção C57Bl/6      **Foto referência:** **14**

Bactérias	Método	Resultados (Positivos/Total)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PCR	0/1
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	PCR	0/1
<i>Helicobacter</i> spp.	PCR	0/1
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PCR	0/1
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	PCR	0/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura/PCR	0/1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PCR	0/1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR	0/1
<i>Citrobacter rodentium</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultura	0/1
<i>Pasteurella multocida</i>	Cultura	0/1
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultura	0/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0/1
<i>Salmonella</i> spp.	Cultura	0/1



**DTAPEP**  
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa  
Biotério Central da FMUSP



**Nº Cliente/ Sequência:** 7245/63922      **Sexo:** Macho  
**Procedência:** INCA      **Idade:** 13 a 44 semanas  
**Espécie:** Camundongo      **Data:** 28/01/2020  
**Linhagem:** Produção NSG      **Foto referência:** **15**

Bactérias	Método	Resultados (Positivos/Total)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PCR	0/1
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	PCR	0/1
<i>Helicobacter</i> spp.	PCR	0/1
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	PCR	0/1
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	PCR	0/1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura/PCR	0/1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PCR	0/1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR	0/1
<i>Citrobacter rodentium</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cultura	0/1
<i>Pasteurella multocida</i>	Cultura	0/1
<i>Proteus mirabilis</i>	Cultura	0/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0/1
<i>Salmonella</i> spp.	Cultura	0/1

## ANEXO D – RESULTADO TESTE BIOQUÍMICO AUTOMATIZADO

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

Relatório do Laboratório

Cliente bioMérieux: \_\_\_\_\_  
 Nº do Sistema: \_\_\_\_\_  
 Nome do Doente: \_\_\_\_\_  
 Isolado: co1-1 (Validado)

Impresso a 19/Set/2019 06:44 CDT  
 Impresso por: LabSuper

ID do Doente: \_\_\_\_\_

Tipo de carta: GN Código de barras: 2410000203523507 Aparelho de teste: 00000EBB52DC (LARANJEIROS)  
 Técnico: Laboratory Supervisor(LabSuper)

Bionúmero: 0201010103500312

Quantificação de microrganismos: **Microrganismo Seleccionado: Acinetobacter baumannii complex**

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	+	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	+			

