

ISSN: 2965-3541

ANIMAL EM FOCO



VOLUME 2

2022

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE PATOS DE MINAS

ANIMAL EM FOCO

Revista do Centro Universitário de Patos de Minas

UNIPAM | Centro Universitário de Patos de Minas

Reitor

Henrique Carivaldo de Miranda Neto

Pró-reitora de Ensino, Pesquisa e Extensão

Maria Marta do Couto Pereira Rodrigues

Pró-reitor de Planejamento, Administração e Finanças

Pablo Fonseca da Cunha

Coordenadora de Extensão

Adriana de Lanna Malta Tredezini

Diretora de Graduação

Mônica Soares de Araújo Guimarães

Coordenador do Núcleo de Editoria e Publicações

Geovane Fernandes Caixeta

A revista **Animal em Foco** é uma publicação anual do UNIPAM que visa publicar artigos originais de contribuição científica, revisões bibliográficas e notas científicas nas áreas de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Catálogo na Fonte
Biblioteca Central do UNIPAM

R454 Revista Animal em Foco [recurso eletrônico] / Centro Universitário de Patos de Minas. – Dados eletrônicos. – v. 1, n. 1 (2019)- . – Patos de Minas : UNIPAM, 2019-

Semestral: 2019-2019. Anual: 2022-

Disponível em: < <https://revistas.unipam.edu.br/index.php/revistaanimalemfoco> >

ISSN 2965-3541

1. Animais - Periódicos. 2. Animais Silvestres. 3. Animais de Companhia. I. Centro Universitário de Patos Minas. II. Título.

CDD 636.05

Centro Universitário de Patos de Minas

Rua Major Gote, 808 - Caiçaras

38702-054 Patos de Minas - MG Brasil

Telefax: (34) 3823-0300 web: www.unipam.edu.br

NEP | Núcleo de Editoria e Publicações

Telefone: (34) 3823-0341

<http://nep.unipam.edu.br>

ANIMAL EM FOCO

Revista do Centro Universitário de Patos de Minas

ISSN 2965-3541

Volume 2, 2022

Patos de Minas: Animal em Foco, UNIPAM, v. 2: 1-94



Centro Universitário de Patos de Minas



Núcleo de Editoria e Publicações

Editores

Luiz Fernando Rocha Botelho (UNIPAM)
Mariana Assunção de Souza (UNIPAM)

Conselho Editorial

Alex André da Silva (UNIPAM)
Alice Pratas Glycério de Freitas (UNIPAM)
Ana Luísa Soares de Miranda (UFMG)
Bethânia Cristhine de Araújo (UNIPAM)
Brendhal Almeida Silva (UFMG)
Camila de Fátima Nascimento (UNESP Jaboticabal)
Cinara da Cunha Siqueira Carvalho (Unimontes)
Cristiane Quiteria Caldeira (SEBRAE-DF)
Edilson Paes Saraiva (UFPB Areia)
Eliane de Sousa Costa (UNIPAM)
Estevão Vieira de Rezende (UNIPAM)
Everton Rusciolli Nascimento (CONDESC)
Flávio Moreira de Almeida (UNIPAM)
Gilson Passos de Moraes (UNIPAM)
Guilherme Nascimento Cunha (UNIPAM)
Hélio Henrique Vilela (NUTRON GARGIL)
Jéssica Luana Guimarães Oliveira (UNIPAM)
Jeyson Cesary Lopes (UNIPAM)
Karine Cristine de Almeida (UNIPAM)
Junior Artur dos Reis (ATENAS)
Juliana Borges Pereira (UNIPAM)
Lorrayne de Barros Bosquetti (UNIPAM)
Lucas de Assis Ribeiro (UFU)
Luiz Flávio Nepomuceno do Nascimento (UNIPAM)
Marcelo Bernardi Manzano (UNIPAM)
Marcelo Coelho Lopes (UFMG)
Maria Clara Grossi Andrade (UNIPAM)
Matheus Matioli Mantovani (UFU)
Matilde da Conceição Pessoa (BRF)
Marieli de Lima (UFU)
Mirley Alves Vasconcelos
Nadia Grandi Bombonato (UNIPAM)
Nicolle Pereira Soares
Pollyanna Mafra Soares (FAZU)
Priscila Capelari Orsolin (UNIPAM)
Rosiane Gomes Silva Oliveira (UNIPAM)

Rossana Pierangeli Godinho Silva (UNIPAM)
Sady Alexis Chavauty Valdes (UNIPAM)
Stéphane Cristyne de Oliveira Estevão (UNESP Jaboticabal)
Walter Vieira da Cunha (UNIPAM)

Pareceristas ad hoc - Volume 2

Caio Silva Quirino (SEAGRO Paracatu)
Fabiana Ferreira (ICA UFMG)
Maria Rejane Borges de Araújo
Nayara Júnia de Souza Bontempo

Revisão

Geovane Fernandes Caixeta
Rejane Maria Magalhães Melo

Diagramação e Formatação

Lorrany Lima Silva

SUMÁRIO

Desempenho produtivo e econômico de frangos alimentados com rações submetidas a diferentes formas de processamento na fase final.....	09
Horácio Júnio Corrêa de Araújo	
Alexandre Mendes Bento	
Cristiovane Silva Júnior	
Cristiane Quitéria Caldeira	
Julyana Machado da Silva Martins	
Luiz Fernando Rocha Botelho	
Análise microbiológica de três tipos de linguiça suína artesanal em diferentes períodos de armazenamento.....	19
Natália Rafaela Silva	
Jefferson Geraldo Pereira	
Maria Clara Grossi Andrade	
Presença de <i>Clostridium</i> sulfito redutor em equipamentos de açougues do município de Patos de Minas (MG).....	27
Laressa Layla Ferreira	
Juliana Borges Pereira	
Eneida César Mastrantonio	
Qualidade de ovos comercializados em Patos de Minas (MG).....	35
Mariana Lemar Cardoso	
Cristiane Quitéria Caldeira	
Luiz Fernando Rocha Botelho	
Laura Abadia de Faria Furtado	
Gizelle Souza Silva	
Efeito modulador do gluconato de clorexidina em células epiteliais de <i>Drosophila melanogaster</i>.....	43
Adriene Rodrigues da Silva	
Mirley Alves Vasconcelos	
Rosiane Gomes Silva Oliveira	
Ocorrência de anticorpos anti <i>Neospora caninum</i> em cães criados em fazendas na região de Lagoa Formosa, Minas Gerais.....	51
Vanusa Palminda Silva Santos	
Nadia Grandi Bombonato	

Investigação da paratuberculose em rebanhos de fêmeas bubalinas..... 60

Josimar dos Reis Santana

Breno Vinícius Gonçalves da Silva

Fellipe Caldas Rodrigues

João Paulo Ferreira Gomes

Mariana Assunção de Souza

Alterações renais em cães diagnosticados com leishmaniose visceral canina em Patos de Minas - MG..... 70

Tayná Mariane dos Anjos Rocha

Nicolle Pereira Soares

Nadia Grandi Bombonato

Vanessa Pereira

Normas da ISO 17025 para certificação de um laboratório de diagnóstico de Anemia Infeciosa Equina no Centro Clínico Veterinário do UNIPAM..... 80

Carolina Veríssimo Queiroz Silva

Mariana Assunção de Souza

Desempenho produtivo e econômico de frangos alimentados com rações submetidas a diferentes formas de processamento na fase final

Productive and economic performance of broilers chickens fed with rations subjected to different forms of processing in the final phase

Horácio Júnio Corrêa de Araújo¹; Alexandre Mendes Bento¹; Cristiovane Silva Júnior¹; Cristiane Quitéria Caldeira²; Julyana Machado da Silva Martins³; Luiz Fernando Rocha Botelho⁴

1 Bacharel em Zootecnia. Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

E-mail: juniohoracio@gmail.com (autor correspondente).

2 Mestre em Zootecnia. Agente Local de Inovação Rural - Sebrae/GO.

3 Doutora em Zootecnia. Docente na Universidade do Estadual de Minas Gerais, Unidade Ituiutaba.

4 Mestre em Zootecnia. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

Resumo: A avicultura é uma das atividades da produção animal que mais se desenvolveu nos últimos anos. Isso se deve, basicamente, à busca de novos sistemas de criação, que objetivam a maior produtividade no menor tempo possível. O experimento foi conduzido no aviário da Escola Agrotécnica Afonso Queiroz em Patos de Minas, Minas Gerais, com o objetivo de avaliar o desempenho produtivo e econômico de frangos de corte alimentados com rações submetidas a diferentes formas de processamento na fase final. Foram utilizados 220 pintos mistos, da linhagem comercial Ross, submetidos a um delineamento inteiramente casualizado, composto de dois tratamentos (ração farelada e ração triturada), com dez repetições. Aos 42 dias de idade, foram avaliadas as variáveis de desempenho produtivo e econômico. Os frangos que foram alimentados com a ração triturada apresentaram maior ganho de peso ($P = 0,0052$), peso vivo ($P = 0,0181$) e ganho de peso diário ($P = 0,0051$). Entretanto, na avaliação econômica, a ração farelada demonstrou um menor custo de ração por quilograma de peso vivo ganho ($P = 0,0267$) e índice de custo, e consequentemente maior índice de eficiência econômica. Concluiu-se que, no período em que o experimento foi realizado, a ração triturada apresentou melhores resultados produtivos, porém com menor eficiência econômica que a ração farelada.

Palavras-chave: avicultura; eficiência alimentar; fator de produção; ração triturada.

Abstract: Poultry farming is one of the animal production activities that has developed the most in recent years. This is mainly due to the search for new breeding systems that aim at higher productivity in the shortest possible time. The experiment was conducted in the poultry house of the Afonso Queiroz Agrotechnical School in Patos de Minas, Minas Gerais, with the objective of evaluating the productive and economic performance of broiler chickens fed with rations subjected to different forms of processing in the final phase. 220 mixed chicks from the commercial Ross lineage were used, subjected to a completely randomized design, composed of two treatments (pelleted and crumbled feed), with ten replications. At 42 days of age, productive and economic performance variables were evaluated. Broiler chickens fed with crumbled feed showed higher weight gain ($P = 0.0052$), live weight ($P = 0.0181$) and daily weight gain ($P = 0.0051$). However, in the economic evaluation, the pelleted feed demonstrated a lower cost of feed per kilogram of live weight gain ($P = 0.0267$) and cost index, and consequently a higher economic

efficiency index. It was concluded that, during the period in which the experiment was carried out, crumbled feed showed better productive results, but with lower economic efficiency than pelleted feed.

Keywords: poultry farming; feed efficiency; production factor; crumbled feed.

1 INTRODUÇÃO

O processamento das rações, como peletização, extrusão e expansão, juntamente com a utilização de complexos de enzimas exógenas, é considerado uma técnica que visa aumentar a digestibilidade dos nutrientes pelas aves. Nesse contexto, as enzimas exógenas têm sido incorporadas às rações dos animais com o propósito de melhorar a utilização dos nutrientes pouco disponíveis e proporcionar melhor desempenho às aves e, com isso, aumentar a rentabilidade no sistema de produção (LARA *et al.*, 2008).

No entanto, são necessários esclarecimentos a respeito dos benefícios dos diferentes processamentos de ração, em especial a extrusão, sobre o desempenho de frangos de corte, além da necessidade de adequação dos níveis nutricionais para essas rações. Rações peletizadas (ou triturada, se moída posteriormente) proporcionam vantagens como maior uniformidade do tamanho das partículas da ração, redução da segregação dos ingredientes durante manuseio, transporte e estocagem, redução ou eliminação de microrganismos como *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* (NILIPOUR, 1993), menor tempo gasto com alimentação (JENSEN *et al.*, 1962) e melhora na digestibilidade dos nutrientes (MORAN, 1987).

Os benefícios da peletização e trituração, que, por sua vez, nada mais é que a peletizada, triturada em fragmentos menores, podem ser resumidos em

maiores ganhos de peso em função do maior consumo, reflexo de melhor palatabilidade e preferência das aves, facilidade de apreensão, que leva à menor movimentação e menor tempo gasto com alimentação, além de melhor digestibilidade dos nutrientes e, conseqüentemente, melhor aproveitamento da energia (LARA *et al.*, 2008).

Nesse sentido, Freitas *et al.* (2008) observaram que pintos de corte alimentados com rações trituradas durante a primeira semana de criação utilizaram melhor os nutrientes, aumentando a energia disponível para o ganho de peso. Para Moran (1987), esses benefícios ocorrem pela combinação de umidade, calor e pressão durante o processo industrial, melhorando a utilização dos carboidratos pelas aves, uma vez que ocorre nos ingredientes da ração desagregação dos grânulos de amilose e amilopectina. Também, ocorre melhora da digestibilidade das proteínas em função da alteração de suas estruturas terciárias naturais. Segundo Avila *et al.* (1997), a utilização de rações trituradas para frangos de 1 a 21 dias de idade promoveu melhor desempenho em relação às fareladas.

A energia metabolizável (EM) é o fator nutricional de maior custo na ração e influi no desempenho dos frangos de corte. Zanusso *et al.* (1999) administraram rações com teor de EM entre 2850 a 3150 kcal/kg para frangos de corte de 1 a 21 dias e verificaram melhor desempenho para o nível de 3075 kcal/kg

para os machos. A peletização atua como um poupador de energia, uma vez que a ave utiliza a ração peletizada com maior eficiência em comparação com a ração farelada (PENZ JÚNIOR, 1997). Nesse sentido, Bertechini *et al.* (1991) verificaram que rações trituradas promovem melhor desempenho, sendo esse benefício pronunciado nas rações com baixo nível de EM. No entanto, Greenwood *et al.* (2004), trabalhando com frangos de corte de 14 a 30 dias, e Maiorka *et al.* (2005), com frangos de 21 a 42 dias, não verificaram interação entre forma física da ração e níveis de EM empregados.

Objetivou-se com o trabalho avaliar o desempenho produtivo e econômico de frangos de corte alimentados com rações submetidas a diferentes formas de processamento na fase final.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), com o número do protocolo 88/19. O experimento foi conduzido na Escola Agrotécnica Afonso Queiroz, localizada no município de Patos de Minas, Minas Gerais. Teve como período experimental 42 dias durante os meses de junho e julho de 2019.

Foram utilizados 220 pintos mistos de um dia, da linhagem comercial Ross, devidamente vacinados contra a doença de Marek, obtidos de incubatório comercial, que foram alojados em galpão experimental de alvenaria com piso cimentado, dividido internamente em 20 unidades experimentais, cada uma medindo um metro de comprimento por um metro de largura (1 m²), com 0,50

metro de altura divididas entre si por duas camadas de papelão, com a cama de maravalha. A densidade de alojamento em cada unidade foi de 11 aves por metro quadrado.

Cada unidade era provida de um comedouro e um bebedouro. Na primeira semana, composto por um bebedouro infantil tipo pressão com capacidade de cinco litros, um comedouro tubular e campanula elétrica. A partir do 8^o, os comedouros e os bebedouros infantis foram substituídos por bebedouros pendulares automático e comedouros tubulares. Diariamente, foram feitos ajustes de altura dos comedouros e bebedouros de acordo com o tamanho das aves. Foi utilizada iluminação artificial durante 24 horas até o 15^o dia, a partir do 16^o foi retirada a campânula e utilizada apenas iluminação natural.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, composto por dois tratamentos de acordo com o tipo de processamento da ração (ração farelada e ração triturada fornecidas durante a fase final), com dez repetições de 11 aves, totalizando 20 unidades experimentais.

O programa alimentar foi dividido em período inicial de 1 a 27 dias de idade (ração farelada para todas as aves) e final de 28 a 42 dias de idade. Foram utilizadas rações comerciais, formuladas conforme as exigências nutricionais e energéticas para cada fase. As rações constituíam-se de farelo de soja, sorgo integral moído, cloreto de sódio (sal comum), calcário calcítico, farinha de carne e ossos, casca de soja moída, protenose, milho integral moído, ácido fólico, fitase, hidróxido de tolueno butirato, biotina, cloreto de colina, metionina, lisina, iodato de cálcio, coccidiostático (monensina), monóxido

DESEMPENHO PRODUTIVO E ECONÔMICO DE FRANGOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES
SUBMETIDAS A DIFERENTES FORMAS DE PROCESSAMENTO NA FASE FINAL

de manganês, niacina, pantotenato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobre, de ferro, de zinco, vitaminas A, B1, B12, B2, B6, D3, E e K3, e caulim. A composição nutricional (níveis de garantia) das rações utilizadas na fase final está disposta na Tabela 1.

Tabela 1: Níveis de garantia por quilograma do produto das rações utilizadas na fase final

Composição nutricional	Nível de garantia
Umidade (máx.)	120,00 g
Proteína bruta (mín.)	170,00 g
Extrato etéreo (mín.)	30,00 g
Matéria fibrosa (máx.)	80,00 g
Matéria mineral (máx.)	70,00 g
Cálcio (mín.)	8.000,00 mg
Cálcio (máx.)	12,00 g
Fósforo (mín.)	3.600,00 mg
Vitamina A (mín.)	5.000,00 UI
Vitamina B1 (mín.)	3,70 UI
Vitamina B2 (mín.)	4,70 UI
Vitamina B6 (mín.)	8,00 UI
Vitamina B12 (mín.)	14.000,00 UI
Vitamina E (mín.)	10,00 UI
Vitamina D3 (mín.)	1.000,00 UI
Vitamina K3 (mín.)	1,60 UI
Ácido fólico (mín.)	0,80 mg
Ácido pantotênico (mín.)	18,00 mg
Biotina (mín.)	0,20 mg
Niacina (mín.)	0,54 mg
Colina (mín.)	1.290,00 mg
Lisina (mín.)	7.940,00 mg
Metionina (mín.)	3.980,00 mg
Cobre (mín.)	47,00 mg
Ferro (mín.)	18,00 mg
Iodo (mín.)	0,80 mg
Magnésio (mín.)	1.650,00 mg
Manganês (mín.)	45,00 mg
Selênio (mín.)	0,22 mg
Sódio (mín.)	1.810,00 mg
Zinco (mín.)	35,00 mg
Antioxidante (mín.)	130,00 mg
Fitase (mín.)	333,00 mg
Monensina (mín.)	73,00 mg

Aos 42 dias de idade, foram avaliadas as variáveis de desempenho produtivo (ganho de peso, peso vivo, ganho de peso diário, eficiência alimentar, consumo de ração, viabilidade criatória e fator de produção) e econômico. Para tal, foram conduzidas pesagens das aves, da oferta e sobra de rações semanalmente e registrado o número e peso das aves mortas diariamente.

O peso vivo (g/ave) foi obtido dividindo-se o peso total das aves da parcela experimental pelo número total de aves. O ganho de peso (g/ave) foi calculado pela diferença entre o peso final e inicial das aves; o ganho de peso diário (g/ave), pelo ganho de peso dividido pelo total de dias avaliados. Para tanto, as aves foram mantidas em jejum de 4 horas para a realização das pesagens, voltando a alimentação normal ao final do manejo.

O consumo médio de ração (g/ave) foi obtido pela diferença da ração oferecida e a sobra, dividido pelo número de aves no período. A conversão alimentar foi calculada através da divisão do consumo médio de ração (g) pelo ganho de peso médio (g) das aves; e a eficiência alimentar pela razão entre o ganho de peso médio (g) e o consumo de ração (g). A viabilidade criatória foi calculada como porcentagem das aves sobreviventes em relação ao número inicial de aves alojadas.

O fator de produção (FP) foi avaliado por meio do seguinte cálculo: $FP = GMD \times VB \times EA \times 100$, em que: GMD = ganho de peso médio diário; VB = viabilidade criatória; EA = eficiência alimentar. Os índices de classificação de fator de produção estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2: Índices de classificação de fator de produção avicultura industrial

FP < 200	200 < FP < 220	221 < FP < 230
Péssimo	Ruim	Regular
231 < FP < 240	241 < FP < 250	FP > 250
Bom	Ótimo	Excelente

Para verificar a viabilidade econômica das rações farelada e triturada, determinou-se o custo da ração por quilograma de peso vivo ganho (Y_i), segundo Bellaver *et al.* (1985), pela fórmula:

$$Y_i = \frac{Q_i \times P_i}{G_i}$$

Em que Y_i é custo da ração por quilograma de peso vivo ganho no i -ésimo tratamento; Q_i , quantidade de ração consumida no i -ésimo tratamento; P_i , preço por quilograma da ração utilizada no i -ésimo tratamento; e G_i , ganho de peso do i -ésimo tratamento. Considerou-se o preço de cada ração conforme o mercado comercial, nos meses de junho e julho de 2019 na região de Patos de Minas, Minas Gerais.

Em seguida, foram calculados o índice de eficiência econômica (IEE) e o índice de custo (IC), propostos por Fialho *et al.* (1992), conforme segue:

$$IEE = \frac{M_{Ce} \times 100}{C_{Tei}}$$

$$IC = \frac{C_{Tei} \times 100}{M_{Ce}}$$

Em que M_{Ce} é o menor custo da ração por quilograma ganho observado entre os tratamentos e C_{Tei} , custo do tratamento i considerado.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste F ao nível

de 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional SISVAR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frangos alimentados com ração triturada apresentaram maior ganho de peso ($P = 0,0052$), peso vivo ($P = 0,0181$) e ganho de peso médio diário ($P = 0,0051$) do que os frangos alimentados com ração farelada (Tabela 3).

Tabela 3: Ganho de peso (GP), peso vivo (PV) e ganho de peso médio diário (GMD) de frangos de corte alimentados com rações submetidas a diferentes formas de processamento (Proc.) na fase final

Proc.	GP (g)	PV (g)	GMD (g)
Ração farelada	1.098 b	2.605 b	78,39 b
Ração triturada	1.246 a	2.725 a	88,96 a
CV (%)	8,86	3,87	8,87

P calculado 0,0052 0,0181 0,0051
 Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

Isso provavelmente pode ter ocorrido devido aos benefícios do processamento da ração triturada, que, segundo Lorençon *et al.* (2007), facilita o transporte, reduz o pó, evita a seleção de partículas pelas aves, melhora a digestibilidade de nutrientes como carboidratos e proteínas, destrói fatores antinutricionais termolábeis e reduz a contaminação por agentes patogênicos.

Turner (1995) verificou que o processo térmico em que passa a ração para ser peletizada e posteriormente triturada pode aumentar o ganho de peso em até 10% e a eficiência alimentar em 5%.

Resultado semelhante foi verificado por Vargas (2001), em que as

aves, aos 42 dias de idade, que receberam ração triturada foram estatisticamente superiores àquelas que receberam ração farelada. Esses resultados concordam com aqueles encontrados por Munt *et al.* (1995), que alimentaram os frangos de corte de 21-42 dias de idade com rações peletizadas/trituradas e fareladas; e verificaram também que os frangos que consumiram dietas peletizadas/trituradas tiveram maior peso corporal do que aquelas que receberam dietas fareladas.

Esses resultados estão de acordo também com aqueles encontrados por Botura (1997) e Brum *et al.* (1998), que observaram que as aves que receberam ração peletizada/triturada na fase final tiveram maior ganho de peso que aquelas alimentadas com ração farelada nesse período.

Não houve diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos para consumo de ração, eficiência alimentar e conversão alimentar (Tabela 4).

Tabela 4: Consumo de ração (CR), eficiência alimentar (EA) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte alimentados com rações submetidas a diferentes formas de processamento na fase final

Processamento	CR (g)	EA (g/g)	CA (g/g)
Ração farelada	2.351	0,468	2,169
Ração triturada	2.427	0,513	1,991
CV (%)	5,98	11,21	10,96
P calculado	0,2448	0,0804	0,0980

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

Como demonstrado, o ganho de peso e o peso vivo foram maiores com a ração triturada, apesar de não ocorrer aumento do consumo de ração, o que pode justificar as possíveis vantagens da

ração triturada em relação à melhora da digestibilidade da ração. Moran (1987) mostrou que a combinação de umidade, calor e pressão durante o processamento industrial da ração melhora a digestibilidade de carboidratos e proteínas pelas aves em função não só da gelatinização do amido, mas também da alteração das estruturas antinutricionais das proteínas.

Nir *et al.* (1994) verificaram que o tamanho das partículas e a forma física da ração podem influenciar o consumo de alimento e a digestão dos ingredientes por alterarem a anatomia do trato digestório e/ou as secreções digestivas. Influências da granulometria dos ingredientes das rações e da peletização no desenvolvimento do trato digestório dos frangos de corte também foram relatadas por Shamoto e Yamauchi (2000), Jensen (2001), Engberg *et al.* (2002), Dahlke *et al.* (2003) e López e Baião (2004).

Os resultados encontrados para conversão alimentar estão de acordo com aqueles encontrados por Nir *et al.* (1995), que não observaram diferença na conversão alimentar quando compararam aves alimentadas com rações peletizadas em relação às fareladas, e com os encontrados por Plavnik e Sklan (1995), que não verificaram melhoras na conversão alimentar quando trituraram a ração peletizada, evidenciando que esse processo aboliu os efeitos positivos da peletização.

Não se verificou diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos para fator de produção e viabilidade criatória (Tabela 5). Os resultados encontrados para fator de produção são resultados excelentes para a avicultura industrial.

Ambos os resultados de viabilidade criatória estão abaixo de 3%

de mortalidade total. Segundo Furtado *et al.* (2003), os índices de mortalidade em aviários onde não há controle de temperatura a taxa de mortalidade considerável boa é de 3 a 4%.

Tabela 5: Fator de produção e viabilidade criatória de frangos de corte alimentados com rações submetidas a diferentes formas de processamento na fase final

Processamento	Fator de produção (%)	Viabilidade criatória (%)
Ração farelada	313,6	97,27
Ração triturada	338,4	97,27
CV (%)	10,39	5,49
P calculado	0,1175	0,9975

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

Parsons *et al.* (2003) observaram maior mortalidade nas aves alimentadas com dietas peletizadas em relação às fareladas. Nir *et al.* (1995) mencionaram aumento da mortalidade, três vezes a mais, nas aves alimentadas com rações peletizadas, do que aquelas que receberam rações fareladas, indicando que essa alta mortalidade poderia ser provavelmente resultado de uma menor atividade, devido ao fato de que os frangos alimentados com rações peletizadas são menos ativos, permanecendo mais tempo deitados do que caminhando.

A Tabela 6 apresenta o custo da ração por quilograma de peso vivo e o índice de eficiência econômica. Notou-se que o custo da ração por quilograma de peso vivo ganho ($P = 0,0267$) e o índice de custo foi menor para a ração farelada e consequentemente o índice de eficiência econômica foi melhor.

Tabela 6: Custo da ração (Y_i) por quilograma de peso vivo ganho, índice de eficiência econômica (IEE) e índice de custo (IC) de frangos de corte alimentados com rações submetidas a diferentes formas de processamento na fase final

Processamento	Y_i/kg PV	IEE (%)	IC (%)
Ração farelada	2,19	100,00	100,00
Ração triturada	2,23	98,25	101,75
CV (%)	10,32		
P calculado	0,0267		

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste F a 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

Isso pode ser explicado pelo alto custo para se processar a ração peletizada e posteriormente o processo de trituração, esse alto custo foi relatado por Biagi (1990), Nilipour (1993), Capdevila (1997) e Toledo *et al.* (2001), demonstrando a desvantagem relacionada ao alto custo de manutenção dos equipamentos utilizados no processo de peletização e maior gasto de energia elétrica.

4 CONCLUSÃO

A utilização da ração triturada no período de 28 a 42 dias de idade determinou um melhor desempenho produtivo dos frangos de corte, porém demonstrou menor eficiência econômica que a ração farelada.

REFERÊNCIAS

- AVILA, V. S.; ROSA P. S.; RUTZ, F. Desempenho de frangos de corte submetidos a diferentes formas físicas de ração criados no inverno. *In*: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1997, São Paulo. **Abstracts [...]**. p. 2.

- BELLAVER, C.; FIALHO, E. T.; PROTAS, J. F. S.; GOMES, P. C. Radícula de malte na alimentação de suínos em crescimento e terminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 8, p. 969-974, ago. 1985.
- BERTECHINI, A. G.; ROSTAGNO, H. S.; FONSECA J. B. Efeitos da forma física e níveis de energia da ração sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v. 20, p. 229-240, 1991.
- BIAGI, J. D. Tecnologia da peletização da ração. In: SIMPÓSIO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 3., 1990, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p. 37-59, 1990.
- BOTURA, A. P. **Efeito da forma física da ração e características de carcaça de frangos de corte fêmeas criados no período de inverno**. 1997, 71 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1997.
- BRUM, P. A. R.; LIMA, G. J. M.; MAZZUCO, H.; FIALHO, F. B.; GUARENTI, E. M. Efeito do nível de trigo na dieta, percentual de grãos germinados e a forma física da ração sobre o desempenho de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, São Paulo. **Anais [...]**. São Paulo: FACTA, p. 10, 1998.
- CAPDEVILA, J. Efectos de la granulación sobre la formulación de raciones en avicultura. **Selecciones Avícola**, [S. l.], v. 39, p. 465-474, 1997.
- CARNEIRO, S. L.; FONSECA, H. N.; FEIJÓ, J. C. Redes de referências para agricultura familiar do estado do Paraná. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 41-60, jan./abr. 2012.
- DAHLKE, F.; RIBEIRO, A. M. L.; KESSLER, A. M.; LIMA, A. R.; MAIORKA, A. Effect of corn particle and physical form of the diet on the gastrointestinal structures of broiler chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 61-67, 2003.
- ENGBERG, R. M.; HEDEMANN, M. S.; JENSEN, B. B. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. **British Poultry Science**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 569-579, 2002.
- FIALHO, E. T.; BARBOSA, H. P.; FERREIRA, A. S.; GOMES, P. C.; GIROTTO, A. F. Utilização da cevada suplementada com óleo de soja para suínos em crescimento e terminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 10, p. 1467-1475, 1992.
- FREITAS, R. E.; SAKOMURA, K. N.; DAHKEL, F.; SANTOS, R. F.; BARBOSA, A. N.; Desempenho, eficiência de utilização dos nutrientes e estrutura do trato digestório de pintos de corte alimentados na fase pré-inicial com rações de diferentes formas físicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 1, p. 73-78, jan. 2008.
- FURTADO, D. A.; AZEVEDO, P. V.; TINÓCO, I. F. F. Análise do conforto térmico em galpões avícolas com diferentes sistemas de

- acondicionamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, n. 3, p. 559-564, 2003.
- GREENWOOD, M. W.; CRAMER, K. R.; CLARK, P. M.; BEHNKE, K. C.; BEYER, R. S. Influence of feed form on dietary lysine and energy intake and utilization of broilers from 14 to 30 days of age. **International Journal of Poultry Science**, [S. l.], v. 3, p. 189-194, 2004.
- JENSEN, L. S., MERRIL, L. H., REDDY, C. V. Observation on eating patterns and rate of food passage of birds fed pelleted and unpelleted diets. **Poultry Science**, [S. l.], v. 41, p. 1414-1419, 1962.
- JENSEN, L. S. Influência da peletização nas necessidades nutricionais das aves. In: ENCONTRO TÉCNICO SOBRE AVICULTURA DE CORTE DA REGIÃO DE DESCALVADO, 5., 2001, Descalvado. **Anais [...]**. Descalvado: Associação dos Criadores de Frangos da Região de Descalvado, 2001. p. 6-46.
- LARA, L. J. C.; BAIÃO, N. C.; ROCHA, J. S. R.; LANA, A. M. Q.; CANÇADO, S. V.; FONTES, D.O.; LEITE, R. S. Influência da forma física da ração e da linhagem sobre o desempenho e rendimento de cortes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 970-978, 2008.
- LÓPEZ, C. A. A.; BAIÃO, N. C. Efeitos do tamanho da partícula e da forma física da ração sobre o desempenho, rendimento de carcaça e peso dos órgãos digestivos de frangos de corte. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 214-221, 2004.
- LORENÇON, L.; NUNES, V. R.; POZZA, C. P.; POZZA, S. S. M.; APPELT, D. M.; SILVA, M. T. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 151-158, 2007.
- MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; PENZ, A. M.; KESSLER, A. M. Diets formulated on total or digestible amino acid basis with different energy levels and physical form on broiler performance. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 7, p. 47-50, 2005.
- MORAN, E. T. Pelleting: affects feed and its consumption. **Poultry Science**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 30-31, 1987.
- MUNT, R. H. C.; DINGLE, J. G.; SUMPAM, G. Growth, carcass composition and profitability of meat chickens given pellets, mash or free-choice diets. **British Poultry Science**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 277-284, 1995.
- NILIPOUR, A. La peletización mejora el desempeño?. **Industria Avícola**, [S. l.], p. 42-46, 1993.
- NIR, I.; HILLEL, R.; PTICHI, I.; SHEFET, G. Effect of particle size on performance. 3. Grinding pelleting interactions. **Poultry Science**, [S. l.], v. 74, n. 5, p. 771-783, 1995.
- NIR, I.; TWINA, Y.; GROSSMAN, E.; NITSAN, Z. Quantitative effects of pelleting on performance, gastrointestinal tract and behavior of

meat-type chickens. **British Poultry Science**, [S. l.], v. 35, n. 4, p.589-602, 1994.

PARSONS, A. S.; MORITZ, J. S.; BLEMINGS, K. P. Effect of grain particle size and feed texture on broiler performance and carcass quality. **Poultry Science**, [S. l.], v. 82, suppl. 1, p. 26, 2003.

PENZ JÚNIOR, A. M. Ração peletizada para frangos: critérios técnico-econômicos para a sua adoção. *In*: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1997, São Paulo. **Abstracts [...]**. p. 285-303.

PLAVNIK, I.; SKLAN, D. Nutritional effects of expansion and short time extrusion on feeds for broilers. **Animal Feed Science Technology**, [S. l.], v. 55, n. 3-4, p. 247-251, 1995.

SHAMOTO, K.; YAMAUCHI, K. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. **Poultry Science**, [S. l.], v. 79, n. 5, p. 718-723, 2000.

TOLEDO, R. S.; VARGAS JUNIOR, J. G.; ALBINO, L. F. T. Aspectos práticos da

nutrição pós-eclosão: níveis nutricionais utilizados, tipos de ingredientes e granulometria da dieta. *In*: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: FACTA, p. 153-167, 2001.

TURNER, R. Achieving optimum pellet quality. **Feed Management**, [S. l.], v. 46, n. 12, p. 30-33, 1995.

VARGAS, G. Efeito da forma física da ração sobre o desempenho de frangos de corte machos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas - RS, v. 7, n. 1, p. 42-45, 2001.

ZANUSSO, J. T.; OLIVEIRA, R. F. M.; DONZELE, J. L.; FERREIRA, R. A.; VALÉRIO, S. R. Níveis de energia metabolizável para pintos de corte mantidos em ambiente de conforto térmico. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre. **Abstracts [...]**. CD-ROM.

Análise microbiológica de três tipos de linguiça suína artesanal em diferentes períodos de armazenamento

Microbiological analysis of three types of artisan pork sausage during different storage periods

Natália Rafaela Silva¹; Jefferson Geraldo Pereira²; Maria Clara Grossi Andrade²

1 Bacharel em Medicina Veterinária. Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

E-mail: nataliars@unipam.edu.br (autora correspondente).

2 Médica Veterinária. Mestre em Ciência Animal. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

Resumo: O aumento da demanda por alimentos processados aumenta também a preocupação com a segurança dos alimentos, devido à manipulação excessiva durante a fabricação, a possibilidade de contaminação do produto e, conseqüentemente, menor tempo de prateleira. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o crescimento de bactérias deteriorantes pela contagem total de bactérias mesófilas e *Pseudomonas* spp., em três tipos de linguiça suína artesanal frescal: padrão, apimentada e bacon com queijo, produzidas de forma artesanal no município de Patos de Minas. Foram avaliadas nove amostras em três diferentes tempos de armazenamento, sendo três do dia de produção (dia zero), três do terceiro dia pós-produção e três amostras do sexto dia pós-produção. Os resultados obtidos em relação ao crescimento de bactérias mesófilas variaram de $1,1 \times 10^2$ UFC/g a $8,3 \times 10^6$ UFC/g de acordo com o tipo de linguiça e o tempo após a produção, sendo que, a partir do dia 3 pós-produção, os valores eram superiores aos padrões permitidos pela legislação atual. Para *Pseudomonas* spp. houve o aumento expressivo da contagem microbiana no sexto dia pós-fabricação, tanto na linguiça padrão quanto na de bacon e queijo. A linguiça apimentada apresentou pouco crescimento microbiano nos três períodos avaliados. Concluiu-se que, a partir do terceiro dia após a produção dos embutidos, a contagem total de mesófilos apresentou valores acima dos considerados seguros pela legislação vigente em todos os tipos de linguiça estudados, sugerindo que o tempo de prateleira desses produtos não deve ser superior a dois dias.

Palavras-chave: bactérias; deterioração; produtos cárneos; tempo de prateleira.

Abstract: The increasing demand for processed foods also increases concern about food safety due to excessive handling during manufacturing, the possibility of product contamination, and consequently, a shorter shelf life. The objective of this study was to evaluate the growth of deteriorating bacteria by total mesophilic bacteria and *Pseudomonas* spp. count in three types of artisan fresh pork sausages: standard, spicy, and bacon with cheese, produced by hand in the municipality of Patos de Minas. Nine samples were evaluated at three different storage times, with three samples taken on the day of production (day zero), three on the third day post-production, and three samples on the sixth day post-production. The results obtained regarding the growth of mesophilic bacteria ranged from 1.1×10^2 CFU/g to 8.3×10^6 CFU/g depending on the type of sausage and the time after production, and from the third day post-production, the values were higher than the standards allowed by current legislation. For *Pseudomonas* spp., there was a significant increase in microbial count on the sixth day post-fabrication, in both standard and bacon and cheese sausages. The spicy sausage had little microbial growth in all three periods evaluated. It was concluded that, from the third day after the production of the sausages, the total

mesophilic count presented values above those considered safe by current legislation in all types of sausages studied, suggesting that the shelf life of these products should not exceed two days.

Keywords: bacteria; deterioration; meat products; shelf life.

1 INTRODUÇÃO

Embutidos cárneos são produtos elaborados com carnes ou outros tecidos comestíveis, podendo ou não ser curados, defumados ou dessecados, envoltos por membranas ou plástico apropriado (BRASIL, 2017). Nos embutidos frescos, a qualidade está diretamente ligada à qualidade da matéria-prima e às boas práticas de manufatura e armazenamento (JAWETZ; ADELBERG, 2006). Entre os embutidos, a linguiça é um dos produtos cárneos mais produzidos no Brasil, possivelmente porque sua produção utiliza poucos aparelhos e que são de baixo custo (MILANI *et al.*, 2003).

Entende-se que linguiça é o produto cárneo obtido de carnes cominuídas das diferentes espécies animais, condimentado, com adição ou não de ingredientes, embutidos em envoltório natural ou artificial e submetido a processo tecnológico específico (BRASIL, 2017). Os embutidos artesanais são produtos cárneos produzidos de maneira artesanal em domicílios e pequenas indústrias (RITTER *et al.*, 2003).

Com o aumento do consumo desse tipo de produto, aumenta também a preocupação com a segurança de alimentos, visto que podem se tornar um veículo de doenças com risco à saúde pública. Cada vez mais o consumidor procura alimentos com qualidade microbiológica, fazendo com que a cadeia produtiva produza alimentos seguros com excelente qualidade (BEZZERA; MARTINS, 2008).

A deterioração da carne e dos produtos cárneos deve-se principalmente ao crescimento bacteriano em sua superfície. As condições de estocagem determinam o tipo de microrganismo deteriorante que se desenvolverá nos produtos resfriados. Apesar de aumentarem o tempo de estocagem das carnes, as baixas temperaturas (sem o congelamento) ainda permitem o desenvolvimento de algumas bactérias psicrotróficas (HOLLEY; GILL, 2005).

A contagem em placas de microrganismos mesófilos é utilizada como indicador de qualidade de alimentos, indicando as condições de boas práticas durante a fabricação e informações sobre sua vida útil e possíveis alterações sensoriais. A maioria dos microrganismos patogênicos também fazem parte do grupo dos mesófilos (SILVA, 2002).

Em temperaturas baixas, sob condições aeróbias, a microbiota envolvida na deterioração da carne é tomada por bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. (LAWRIE, 2005). São bactérias Gram negativas, bastonetes móveis que, quando se multiplicam no alimento cárneo, podem resultar em odores e sabores questionáveis, mesmo em pequenas quantidades (HOLLEY; GILL, 2005).

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), os estabelecimentos que fabricam produtos de origem animal só podem expedir ou comercializar produtos que estejam devidamente rotulados e de

forma visível (BRASIL, 2017). No caso das linguiças artesanais produzidas e comercializadas em açougues, em muitos casos, os produtos são expostos nos balcões a granel, sem a adequada rotulagem e sem informações sobre data de fabricação e prazo de validade.

De acordo com a Resolução Estadual SES 6693/2019, os estabelecimentos que fabricam produtos artesanais devem fabricar os produtos para venda diária no próprio estabelecimento, sendo vedado o congelamento para venda posterior (MINAS GERAIS, 2019). A legislação municipal estabelece que produtos artesanais produzidos com carne suína devem ser produzidos e comercializados em, no máximo, dois dias (PATOS DE MINAS, 2018).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o desenvolvimento microbiano em três tipos de linguiça suína artesanal produzidas em açougues de Patos de Minas (MG), através da avaliação da microbiota responsável pela deterioração de derivados cárneos, *Pseudomonas* spp. e bactérias mesófilas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas três amostras de três variedades de linguiça suína artesanal: picante, padrão e bacon com queijo, cujos ingredientes utilizados estão descritos na Tabela 1.

As amostras foram avaliadas no dia de fabricação (dia zero) e após armazenamento por três e seis dias sob refrigeração.

As amostras foram coletadas no dia de produção, caracterizado como dia 0 (zero). Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas, lacradas e

identificadas, em câmara fria do próprio estabelecimento até serem levadas ao laboratório. No transporte, foram mantidas sob refrigeração em caixa térmica com gelo até serem encaminhadas ao Laboratório do Bloco D, de Microbiologia do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Tabela 1: Ingredientes presentes nas amostras de diferentes tipos de linguiças suína artesanal produzidas em açougue no município de Patos de Minas

Ingrediente	Linguiça		
	Picante	Padrão	Bacon e queijo
Alho	X	X	X
Sal	X	X	X
Pimenta bode	X		
Bacon			X
Queijo Minas			X

X = Contém o ingrediente na composição da linguiça.

Nos dias da análise, foram pesados 25 g de cada amostra, adicionados a 225 ml de água peptonada e homogeneizados por aproximadamente 60 segundos com o auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, foram feitas diluições seriadas em tubos contendo 9 ml de água peptonada, caracterizando as diluições até 10^{-3} .

A metodologia utilizada foi a prevista pela APHA 08:2015 para contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos. De cada diluição preparada, 0,1 ml foram pipetados em placas de Petri contendo ágar *Plate Count Agar* (PCA) e posteriormente espalhados com o auxílio de alça de Drigalsky. Em seguida, foram incubados em estufa a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h, para posterior leitura dos

resultados com o auxílio de um contador de colônias.

Para a contagem presuntiva de *Pseudomonas* spp., utilizou-se a metodologia prevista pela ISO 13720:2010. Das três diluições previamente preparadas, realizou-se plaqueamento em superfície de 0,1 ml de cada diluição, em placas de Petri contendo ágar *Pseudomonas* suplementado com Cefalotina, Fusidato e Ceftriaxona (CFC). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C ±1°C por 48 horas. A confirmação foi avaliada pela contagem do crescimento de colônias fluorescentes a partir da leitura em câmara própria.

Os resultados foram avaliados por meio de estatística descritiva através de gráficos e tabelas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a análise de bactérias mesófilas das amostras de linguiça suína artesanal frescal foram obtidas contagens de $1,1 \times 10^2$ UFC/g a $8,3 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 2).

Tabela 2: Contagem total de bactérias mesófilas (UFC/g) em três tipos de linguiças suína artesanal produzidas em açougue e avaliadas em três dias diferentes após a produção

Tipo de Linguiça	Dia 0	Dia 3	Dia 6
Picante	$1,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^4$	$6,4 \times 10^5$
Padrão	$3,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$
Bacon e queijo	$7,8 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$

Os resultados apresentaram variações de crescimento desde o dia 0 no qual foi feita a produção das linguiças até o sexto dia após sua produção. De acordo com os resultados obtidos, as amostras de linguiça acrescida de bacon e queijo

tiveram o maior crescimento de colônias, principalmente no sexto dia após sua produção, quando comparadas às amostras 1 e 2.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 724/2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o limite de contagem total de mesófilos para embutidos crus está 10^5 - 10^6 UFC/g dentro do plano de três classes. Valores superiores a esses já se supõem apresentar riscos de estar deteriorado ou se deteriorando, além de ter suas características nutricionais e sensoriais prejudicadas, o que torna o alimento impróprio para comercialização e consumo.

Pelos resultados expressos em Base log ilustrados na Figura 1, pode-se observar que houve um aumento mais expressivo da contagem de mesófilos entre os dias pós-produção nas linguiças picantes. Já a linguiça acrescida de queijo e bacon apresentou uma alta taxa de contaminação inicial e teve crescimento menos expressivo durante os dias estudados.

A ação antimicrobiana de alguns tipos de pimenta e seus compostos em produtos cárneos já são bem estudadas, mas esse efeito dependerá do tempo e forma de armazenamento, da contaminação inicial e do tipo de pimenta (OLIVAS-MÉNDEZ *et al.*, 2022).

O armazenamento em condições higiênico-sanitárias inadequadas, assim como as condições de higiene precárias dos locais de abate, processamento, exposição e comercialização, bem como dos manipuladores em geral, também são fatores que contribuem para a contaminação das carnes e seus derivados (SABIONI *et al.*, 1999; LUNDGREN *et al.*, 2009).

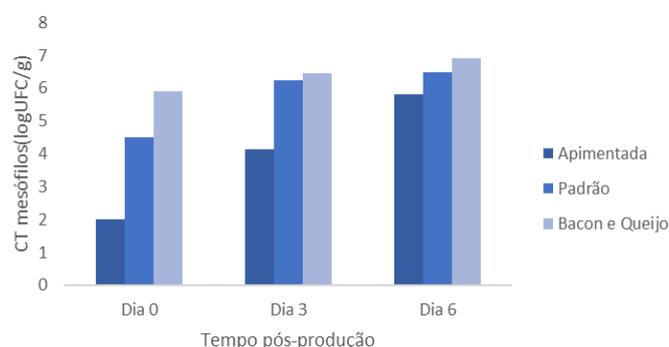


Figura 1: Contagem de Bactérias Mesófilas em UFC/g em três tipos de linguiça suína artesanal fabricadas em açougue, referente aos dias 0, 3 e 6 após a produção

Produtos cárneos embutidos comumente apresentam carga microbiana elevada de microrganismos mesófilos devido ao intenso manuseio e aos equipamentos e condimentos potencialmente contaminados. Alimentos que não contém padrões estabelecidos para contagem microbiana total devem ser analisados e mantidos sob refrigeração constante. Aqueles destinados ao consumo humano com populações microbianas da ordem de 10^6 UFC/g tem maior possibilidade de apresentar microrganismos deterioradores e/ou patógenos e alterações sensoriais (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Nutrientes presentes nas carnes apresentam condições satisfatórias para um excelente meio para o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e organismos patogênicos (HOLLEY; GILL, 2005). Em temperaturas de resfriamento, em torno de zero e 4°C e sob condições aeróbias, a microbiota deteriorante da carne é dominada por *Pseudomonas* spp. (LAWRIE, 2005).

Na Tabela 3, tem-se o resultado da contagem de *Pseudomonas* spp., em UFC/g.

Tabela 3: Contagem total em UFC/g de bactérias *Pseudomonas* spp. em três tipos de linguiça suína artesanal produzidas em açougue e avaliadas nos dias 0, 3 e 6 após a produção

Tipo de linguiça	Dia 0	Dia 3	Dia 6
Picante	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
Padrão	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$5,4 \times 10^6$
Bacon e queijo	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$>5,6 \times 10^6$

A amostra de linguiça picante apresentou crescimento irrelevante no período estudado. Porém, as amostras de linguiça padrão e de bacon e queijo obtiveram aumento no crescimento do microrganismo no sexto dia pós-produção conforme ilustrado na Figura 2.

As bactérias *Pseudomonas* spp. são bactérias comumente encontradas no solo e na água e muito encontradas em carnes. Porém, hoje representam menos de 7% dos microrganismos responsáveis pela deterioração da carne, já que muitas espécies foram transferidas para pelo menos 13 outros gêneros bacterianos (JAY *et al.*, 2009). Um dos fatores importantes para o crescimento dos *Pseudomonas* na linguiça se dá por esse alimento ser mantido refrigerado e conservado em condições de aerobiose.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE TRÊS TIPOS DE LINGUIÇA SUÍNA ARTESANAL EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

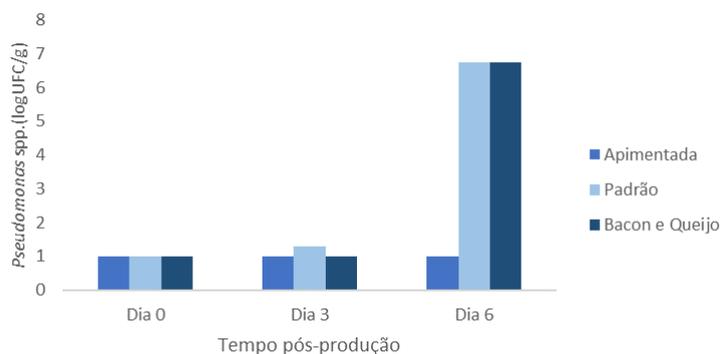


Figura 2: Contagem de *Pseudomonas* spp. em UFC/g em três tipos de linguiça suína artesanal fabricadas em açougue, referente aos dias 0, 3 e 6 após a produção

As linguiças picantes foram produzidas com um alto teor de pimenta bode e, nessa amostra, foi observado o crescimento irrelevante quando comparado às amostras de linguiça padrão e bacon e queijo. Isso pode ser explicado devido às propriedades antimicrobianas apresentadas por algumas pimentas, como a utilizada nesse estudo, que é parte do gênero *Capsicum* (CARVALHO *et al.*, 2010; KAPPEL, 2007).

O potencial crescimento de bactérias na amostra bacon acrescida de queijo pode estar relacionado principalmente por esses ingredientes já estarem provavelmente com alta carga microbiana, além de serem excelente fonte de nutrientes juntamente com a carne (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; SALOTTI *et al.*, 2006).

Na região de Minas Gerais, onde o trabalho foi desenvolvido, o consumo de queijo fabricado com leite cru é muito difundido, como o queijo minas artesanal e, como foi esse o tipo de queijo utilizado nos ingredientes para a produção desse tipo de linguiça, esse também pode ser um fator que explica o maior crescimento microbiano na amostra contendo queijo.

De acordo com as legislações estadual e municipal, os estabelecimentos que fabricam produtos artesanais devem

fabricar os produtos para venda diária ou no máximo até dois dias e no próprio estabelecimento.

4 CONCLUSÃO

Concluiu-se que, a partir do terceiro dia após a produção dos embutidos, a contagem total de mesófilos apresentou valores acima dos considerados seguros pela legislação vigente em todos os tipos de linguiça estudados. Sugere-se que o tempo de prateleira desses produtos não seja superior a dois dias.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 274, de 6 de julho de 2022.** Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. Brasília, 2022.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington DC: Amer Public Health Assn. 5. ed. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº**

9.013 de 31 de março de 2017.

Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Brasília, 2017.

BEZZERA, W. I.; MARTINS, T. D. D. Análise dos Pontos Críticos em uma unidade frigorífica de abate de suínos em Igarassu - PE. *In: JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA*, 3., 2008, Bananeiras - PB. **Anais [...]**. Bananeiras - PB: Editora Verde, 2008.

CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M.; CRUZ, F. T. Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 8-12, jan. 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

HOLLEY, R. A.; GILL, C. O. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES*, 3., 2005, São Paulo. **Anais [...]**. São Paulo: ITAL, 2005.

ISO 13720. Meat and meat products: enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp. 1. ed. Suíça: The International Organization for Standardization, 2010.

JAY, J.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 5. ed. Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 2009.

JAWETZ, M.; ADELBERG, E. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KAPPEL, V. D.; COSTA, G. M.; SCOLA, G.; SILVA, F. A.; LANDELL, P. V.; SOUZA, D. G.; VANZ, D. C.; REGINATTO, F. H.; MOREIRA, J. C. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. pendulum at different maturity stages. **Journal of Medicinal Food**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 267-274, 2007.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005. 384 p.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LUNDGREN, P. U.; SILVA, J. A.; MACIEL, J. F.; FERNANDES, T. M. Profile of the hygienic-sanitary quality of bovine meat marketed at free markets and public markets of João Pessoa/PB-Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 1, p. 113-119, 2009.

MARTINS, E. S.; REIS, N. E. V. Determinação de coliformes e *Staphylococcus coagulase* positiva em queijos Minas Frescal. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa - PR, v. 6, n. 2, p. 842-851, 2012.

MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M.; PAZ, P. B.; BELLÉ, M.; TERRA, N. N. Bioproteção de linguiça de frango. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 161-166, maio 2003.

- MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. **Resolução SES/MG nº 6693, de 29 de março de 2019**. Regulamento Técnico de Boas Práticas para estabelecimentos que realizam comércio varejista de carnes, no âmbito do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2019.
- PATOS DE MINAS. Secretaria Municipal de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Sustentável. **Decreto 4493, de 3 de agosto de 2018**. Dispõe sobre a normatização da produção de produtos cárneos no município de Patos de Minas. Patos de Minas, 2018.
- RITTER, R.; SANTOS, D.; AGOSTINI, F. S.; CARBONI, A. N.; BERGMANN, G. P. Microbiologia contaminante e patogênica de linguiça (salame) colonial, analisadas em quatro períodos distintos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 113, p. 60-66, 2003.
- SABIONI, J. G.; MAIA, A. R. P.; LEAL, J. A. Avaliação microbiológica de linguiça fresca comercializada na cidade de Ouro Preto - MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 31, p. 110-113, abril/maio 1999.
- SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.
- SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema *simplate***. 2002. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- OLIVAS-MÉNDEZ, P.; CHÁVEZ-MARTÍNEZ, A.; SANTELLANO-ESTRADA, E.; ASOREY, L. G.; SÁNCHEZ-VEJA, R.; RENTERÍA-MONTEERRUBIO, A. L.; CHPAVEZ-FLORES, D.; TIRADO-GALLEGOS, J. M.; MÉNDEZ-ZAMORA, G. Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and garlic (*Allium sativum*) essential oils and chipotle pepper oleoresin (*Capsicum annum*) on beef hamburgers. **Foods**, [S. l.], v. 11, n. 14, p. 1-15. 2022.

Presença de *Clostridium* sulfito redutor em equipamentos de açougues do município de Patos de Minas (MG)

Presence of sulfite-reducing Clostridium in butcher shop equipment in the municipality of Patos de Minas (MG)

Laressa Layla Ferreira¹; Juliana Borges Pereira²; Eneida César Mastrantonio³

1 Bacharel em Medicina Veterinária. Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

2 Mestre em Ciências. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

4 Doutora em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

E-mail: enemastrantonio@yahoo.com.br (autora correspondente).

Resumo: A indústria da carne ocupa lugar de destaque na produção de alimentos prontos para o consumo ou semipreparados. A responsabilidade atribuída à manutenção da higiene nos estabelecimentos transformadores ou beneficiadores de produtos de origem animal deve ser severa para evitar riscos à saúde dos consumidores. Portanto, o presente estudo objetivou-se detectar a presença de *Clostridium* sulfito redutor em equipamentos de uso rotineiro em açougues do município de Patos de Minas (MG). Foram coletadas 12 amostras para análise, da superfície de mesa para corte de carnes e dos moedores de carne. Foi utilizado swab estéril (20cm²) para coleta das amostras, em seis açougues do município de Patos de Minas (MG). O estudo bacteriológico foi realizado em laboratório terceirizado através da técnica de cultura para *Clostridium* sulfito redutor (SILVA *et al.*, 2001). Todas as amostras avaliadas foram positivas para a presença de *Clostridium* sulfito redutor. Das amostras referentes à mesa de cortes de carnes, uma (16,7%) apresentou resultado superior a 1,0x10² UFC/g. Já nas amostras referentes ao moedor de carne, duas (33,3%) foram acima de 1,0x10²UFC/g. O restante das amostras (75%) mostrou resultados com valores <1,0x10²UFC/g. Concluiu-se que, nos seis açougues investigados, há presença de *Clostridium* sulfito redutor em valores que variaram de <1,0x10²UFC/g a 2,0x10²UFC/g. Como não existe legislação vigente quanto à presença e quantificação do *Clostridium* sulfito redutor em equipamentos e utensílios utilizados no processamento de carnes em açougues — nesse estudo foi detectada a presença desse microrganismo em todas as amostras avaliadas —, é necessária uma atenção maior na higienização da mesa para cortes de carnes e no moedor de carne. Fazem-se necessárias normativas mais rígidas para um eficiente controle das condições higiênico-sanitárias nesses estabelecimentos, evitando infecções ou toxinfecções alimentares.

Palavras-chave: clostridioses; *Clostridium perfringens*; contaminação cruzada; saúde pública.

Abstract: The meat industry plays a prominent role in the production of ready-to-eat or semi-prepared food. The responsibility attributed to the hygiene maintenance in establishments that transform or or benefit animal-origin products should be severe to avoid health risks to consumers. Therefore, this study aimed to detect the presence of sulfite-reducing *Clostridium* on routinely used equipment in butcher shops in the municipality of Patos de Minas (MG). Twelve samples were collected for analysis, from the surface of the meat cutting table and the meat grinders. A sterile swab (20cm²) was used to collect the samples in six butcher shops in the municipality of Patos de Minas (MG). Conducted in a third-party laboratory using the culture technique for sulfite-reducing *Clostridium* culture technique (SILVA *et al.*, 2001). All evaluated samples were positive for the presence of sulfite-reducing *Clostridium*. Of the samples referring

to the meat cutting table, one (16.7%) showed a result higher than 1.0×10^2 CFU/g. In the samples referring to the meat grinder, two (33.3%) were above 1.0×10^2 CFU/g. The remaining samples (75%) showed results with values $< 1.0 \times 10^2$ CFU/g. It was concluded that in the six investigated butcher shops, there is the presence of sulfite-reducing *Clostridium* in values ranging from $< 1.0 \times 10^2$ UFC/g to 2.0×10^2 UFC/g. As there is no current legislation regarding the presence and quantification of sulfite-reducing *Clostridium* in equipment and utensils used in meat processing in butcher shops, and this study detected the presence of this microorganism in all evaluated samples, greater attention is necessary in the cleaning of the meat cutting table and the meat grinder. Stricter regulations are necessary for effective control of hygienic-sanitary conditions in these establishments, avoiding food infections or intoxications.

Keywords: *Clostridium* sp; *Clostridium perfringens*; cross-contamination; public health.

1 INTRODUÇÃO

A carne resfriada é um excelente meio para o desenvolvimento microbiano, por apresentar condições como a elevada atividade de água, pH favorável ao crescimento e elevado percentual de proteínas, minerais e vitaminas. Essas características tornam a carne altamente perecível, podendo haver contaminação microbiológica ocorrida durante o abate, o processamento, a manipulação e o armazenamento, favorecendo assim a multiplicação de diferentes bactérias e protozoários, podendo ser patogênicos, transmitir doenças e também, em um curto espaço de tempo, alterar as características do produto (OLIVEIRA, 2010).

Os alimentos são importantes na cadeia epidemiológica de doenças transmissíveis, sendo fundamental observar sua conservação em condições não adequadas, favorecendo a multiplicação de microrganismos causando alterações e/ou produzindo sintomas de intoxicação alimentar nos consumidores (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

As enfermidades causadas por alimentos contaminados constituem um dos problemas sanitários mais difundidos atualmente. As doenças são causadas por

agentes microbiológicos transmitidos principalmente por manipuladores, equipamentos e utensílios mal higienizados (SILVA JÚNIOR, 2001).

As Doenças de Transmissão Alimentar (DTAs) podem desencadear um quadro clínico leve, severo ou até mesmo a levar morte, principalmente no caso de grupos de risco, como crianças, idosos e/ou pessoas imunodebilitados (SILVA JÚNIOR, 2005).

A Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, por meio da Portaria nº 326-SVS/MS, de 30 de julho de 1997, aprovou o regulamento técnico sobre as condições higiênicos-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos. Nesse regulamento constam os princípios exigidos nas boas práticas, bem como os requisitos de higiene pessoal dos manipuladores (BRASIL, 1997).

Devido à grande influência na saúde pública, insere-se a importância do estudo dessas bactérias por profissionais da área, como médicos veterinários com a produção, inspeção e comercialização de produtos cárneos, os quais têm a responsabilidade de assegurar aos consumidores um produto de qualidade, viável ao consumo e que não cause

quaisquer prejuízos à saúde (GERMANO; GERMANO, 2008).

As bactérias patogênicas que compõem esse gênero causam doenças basicamente por dois mecanismos: produção de toxinas e invasão de tecidos. Os clostrídios penetram no organismo na forma esporulada, por meio de alimento contaminado, feridas ou por inalação. As toxinas são produzidas no organismo do animal ou são ingeridas pré-formadas. Entre as toxinas de origem clostridial, destacam-se as neurotoxinas botulínicas, tetânicas e a toxina épsilon produzida por *C. perfringens* (LOBATO *et al.*, 2023).

As bactérias do gênero *Clostridium* são bastonetes, Gram-positivos, anaeróbicos e possuem uma alta capacidade de esporulação da maioria das bactérias patogênicas desse grupo. As infecções e intoxicações causadas pelo gênero *Clostridium*, conhecidas por clostridioses, são de difícil erradicação (LOBATO *et al.*, 2023).

Os clostrídios sulfito redutores são bactérias de morfologia bacilar, Gram positivas, anaeróbias estritas, capazes de formar esporos e com atividade sulfito redutora. O método baseia-se em contar o número de colônias de bactérias, formadas dos esporos, com capacidade sulfito redutora. A amostra é submetida a um tratamento térmico e esse tratamento tem como objetivo inativar as células microbianas vegetativas, permanecendo viáveis os esporos (KAMWWA, 2012).

O *Clostridium perfringens* é uma das bactérias que facilmente pode ser isolada em alimentos, tanto crus, quanto processados. Alimentos à base de carne bovina e de frango têm sido os principais causadores de intoxicação alimentar (GERMANO; GERMANO, 2008).

O presente estudo teve como objetivo verificar a presença de

Clostridium sulfito redutor em equipamentos com uso rotineiro que podem causar toxinfecções nos consumidores de carne, na região de Patos de Minas (MG).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de resíduos de material orgânico em equipamentos utilizados na rotina comercial de seis açougues do Município de Patos de Minas (MG). Em cada açougue, foram coletadas duas amostras: um referente à mesa para cortes de carnes; outra, ao moedor de carne. Foram, portanto, 12 amostras.

Os açougues pesquisados foram selecionados de forma aleatória, sendo eles de alta comercialização e localizados em setor comercial, no município de Patos de Minas (MG). Os açougues receberam identificação com letras (A, B, C, D, E e F), de acordo com a ordem de coletas.

Inicialmente, foi apresentado aos proprietários dos estabelecimentos um termo de autorização para coleta das amostras para a pesquisa e logo após foi dado início as coletas. O horário de coleta do material foi realizado no final da tarde, próximo ao encerramento das atividades.

Imediatamente, a coleta das amostras foi realizada com a utilização de "swabs" estéreis com haste de plástico. O material coletado foi acondicionado em caixa térmica com presença de gelo reutilizável rígido com controle de temperatura a 10°C, de acordo com a recomendação do laboratório onde as análises ocorreram.

Posteriormente, o material acondicionado foi encaminhado ao Laboratório CELASA ANÁLISES LTDA., em Patos de Minas (MG), onde as análises

microbiológicas foram realizadas de acordo com a técnica de cultura para *Clostridium* sulfito redutor. O método de plaqueamento utilizado foi o da American Public Health Association (APHA) 33.72:2015, com uso do Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC), sistema de geração de anaerobiose e estufas incubadoras reguladas a 46°C e 35°C, respectivamente (SILVA *et al.*, 2001).

Os resultados foram avaliados por meio de estatística descritiva apresentando a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFG/g) de *Clostridium* sulfito redutor nas amostras analisadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 12 amostras foram submetidas ao teste de microbiológico. Foram identificados *Clostridium* sulfito redutor positivo em cem por cento (100%), sendo que, nas amostras da mesa para cortes de carnes, somente em uma amostra (16,7%), o resultado foi superior a $1,0 \times 10^2$ UFC/g. Já nas amostras referentes ao moedor de carne, em duas amostras (33,3%), o valor foi acima, sendo $1,0 \times 10^2$ UFC/g. Os resultados apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) das amostras coletadas

Açougue	Mesa (UFC/g)	Moedor (UFC/g)
A	$< 1,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$
B	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$
C	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
D	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$
E	$< 1,5 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$
F	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$

No Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de

Alimentação (SILVA *et al.*, 2001), para calcular o número de UFC/g em função do número de colônias típicas, são necessárias a diluição inoculada e a percentagem de colônias confirmadas. Amostras cujo resultado foi de $< 1,0 \times 10^2$ UFC/g significa que foi impossível fazer a contagem das colônias, pois o limite de quantificação é de 100 colônias.

Os clostrídios reduzem sulfito a sulfeto, que reage com o ferro e precipita na forma de sulfeto de ferro, produzindo colônias pretas. Para confirmação, é necessário realizar teste para coloração de Gram e o teste de catalase (SILVA *et al.*, 2001).

O Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2001), os limites de *Clostridium* sulfito redutor para carnes e/ou produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (hambúrgueres, almôndegas, quibe e similares) são de 3×10^3 UFC/g. Esse valor não se aplica à pesquisa, pois ela teve como objetivo avaliar a presença em equipamentos da rotina de açouques.

Rossi e Bampi (2015) avaliaram 318 análises microbiológicas de derivados de carne; destas, 6% das amostras estavam impróprias para consumo humano, apenas 2,5% das amostras apresentaram valores superiores aos estabelecidos pela RDC nº 12 de janeiro de 2001 para *Clostridium* sulfito redutor.

Tussi *et al.* (2008) avaliaram amostras de salame colonial e 100% apresentaram resultados satisfatórios para *Clostridium* sp. Olsen *et al.* (2000) realizaram uma pesquisa nos Estados Unidos e identificaram no país alguns surtos causados por essa bactéria, associados ao consumo de carne moída cozida. Esses estudos confirmam que a presença de *Clostridium* sulfito redutor em equipamentos e utensílios afetam

diretamente a qualidade dos alimentos e podem causar as DTAs.

Do grupo dos clostrídios sulfito redutor, *Clostridium perfringens* é o principal representante. A temperatura de refrigeração em que o produto é armazenado, aliada a competição exercida pela microbiota psicrotrofica acompanhante, pode dificultar o crescimento do microrganismo (FORSYTHE, 2002). A determinação de clostrídio sulfito redutor a 46°C tem por objetivo a indicação de *Clostridium perfringens*. Caso seja determinada a presença de *C. perfringens*, deve-se constatar o resultado no laudo analítico (BRASIL, 2001).

De acordo com Franco e Landgraf (1996), as doenças de origem alimentar podem ser subdivididas em duas grandes categorias: intoxicações e infecções alimentares. As intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas. As infecções alimentares são ocasionadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos, que aderem e se proliferam colonizando a mucosa do intestino.

Para Germano e Germano (2011), as carnes bovinas e de aves cruas, frequentemente, apresentam-se envolvidas em surtos de toxinfecções devido à ingestão de carne contaminada, sendo estes as enterobactérias, estafilococos e clostrídios, em destaque temos o *C. perfringens*, *S. aureus* e a *Salmonella* spp.

A carne também é um excelente meio para a multiplicação microbiana, devendo receber um rigoroso controle higiênico-sanitário. Dessa maneira a preocupação com a carne e seus derivados estão frequentemente

envolvidos em casos de toxinfecção alimentar devido à possibilidade de contaminação ocorrer desde as operações de abate, armazenamento e distribuição, tendo sua intensidade dependente das medidas higiênicas adotadas (SILVEIRA, 1994).

O perfil higiênico-sanitário dos estabelecimentos deve ser adotado através da observação das instalações físicas e higiene dos manipuladores de alimentos. Deve ser caracterizado com base na lista de verificação em Boas Práticas de Manipulação, segundo a Resolução nº 216 (BRASIL, 2004).

Para Oliveira *et al.* (2008), quando uma peça de um equipamento é difícil de higienizar, esterilizar e sanificar, é mais provável que essas etapas não sejam realizadas, ocasionando assim acúmulo de restos de alimentos e bactérias patogênicas ou deterioradoras, formando assim biofilmes. Tem-se, assim, o aumento do risco de contaminação cruzada em toda área destinada ao processamento.

A presença de biofilmes em áreas de processamento de alimentos é caracterizada, inicialmente, pelo acúmulo de materiais orgânicos e inorgânicos em superfícies sobre as quais comunidades bacterianas podem se desenvolver. Os biofilmes podem aderir fortemente à superfície de equipamentos e, posteriormente, partes deles podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios. Microrganismos em biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização, representando fonte original de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e

veiculação de toxinfecções alimentares (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) são os requisitos mínimos para a obtenção de alimentos seguros e devem ser utilizadas por todas as indústrias alimentícias que desejam produzir alimentos que sejam de boa qualidade se os procedimentos forem corretamente executados (BRASIL, 2005).

A *Clostridium perfringens* é uma bactéria que causa vários tipos de doenças, incluindo a gastroenterite. Algumas cepas causam gastroenterite leve à moderada que melhora sem tratamento, enquanto outras cepas causam doença grave que pode lesionar o intestino delgado e, por vezes, causar morte (FORSYTHE, 2002).

Como não existe legislação vigente quanto à presença e quantificação do *Clostridium* sulfito redutor em equipamentos e utensílios utilizados no processamento de carnes, os achados demonstram preocupação em relação a contaminações cruzadas e alerta em questão da saúde da população. Torna-se necessária a instituição de normativas mais rígidas, para melhor controle das condições higiênico-sanitárias nesses estabelecimentos, evitando infecções ou toxinfecções alimentares.

4 CONCLUSÃO

No presente estudo, a presença de *Clostridium* sulfito redutor foi detectada nos equipamentos dos açougues investigados do município de Patos de Minas (MG). Tornam-se necessárias novas investigações e melhorias nas condições higiênico-sanitárias que venham a contribuir para a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **MAPA Circular nº. 175**. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 275, de 21 de outubro de 2002**. Regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Brasília, DF, 22 ago. 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasil, n. 7-E, p. 46-53, 10 jan. 2001. Seção I.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. **Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997**. Aprova o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bsv/saudelegis/s/svs1/1997/prt0326_30_07_1997.html.
- BRASIL. **Resolução n. 216 de 15 de setembro de 2004**. Dispõe sobre o “Regulamento Técnico de Boas Práticas para serviços de Alimentação”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 set. 2004.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (Concórdia, SC). **Central de Inteligência de Aves e Suínos**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-eaves/cias/estatisticas>.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ed Atheneu, 1996.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. **S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Manoele, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. **S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

KAMWWA, E. B. **Biossegurança, higiene e profilaxia: abordagem teórico-didática e aplicada**. 2. ed. Belo Horizonte: Nandyala, 2012.

LOBATO F.C.F.; SALVARANI, F. M.; GONÇALVES, L. A.; PIRES, P. S.; SILVA, R. O. S.; ALVES, G. G.; NEVES, M.; OLIVEIRA JÚNIOR, C. A.; PEREIRA, P. L. L. Clostridioses dos animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 20, p. 29-48, 2023.

NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R.; CARDOSO, M. D. O.; RIBEIRO, A. R.; SCHUCH, D. M. T.; SILVA, A. B. Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. In: SIMPÓSIO GOIÂNIA DE AVICULTURA, 2., 1996, Goiânia. **Anais [...]**. Goiânia: Associação Goiana de Avicultura, 1996. p. 13-17.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; MENDONÇA, A. T.; PICCOLI, R. H. Condições higiênicas sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1893-1898, nov. 2008.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULDING, J. S.; BEAN, N. H.; SLUTSKER, L. **Surveillance for foodborne disease outbreaks**, United States, 1993-1997. **MMWR** 49: 151, 2000.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; DOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Goiânia: Ed. UFG, 1995. 586 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

ROSSI, P.; BAMPI, G. B. Qualidade microbiológica de produtos de origem animal produzidos e comercializados no Oeste Catarinense. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 748-757, 2015.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2001. 480 p.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. São Paulo: Varela, 2005. 623 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.

SILVEIRA, T. F. Embalagem de embutidos versus estilo de vida. **Revista**

Nacional da Carne, Rio de Janeiro, v. 18, n. 206, p. 21-26, 1994.

TUSSI, E. K.; LOCATELLI, P. P.; ALFARO, A. T.; BEUX, S. **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do salame colonial comercializado em São Jorge D'Oeste - PR**. Syn UTFPR. 2008.

Qualidade de ovos comercializados em Patos de Minas (MG)

Quality of eggs marketed in Patos de Minas (MG)

Mariana Lemar Cardoso¹; Cristiane Quitéria Caldeira²; Luiz Fernando Rocha Botelho³; Laura Abadia de Faria Furtado⁴; Gizelle Souza Silva⁵

1 Bacharel em Zootecnia. Analista de Processo Pleno na Seara Alimentos.

E-mail: marianalemar@hotmail.com (autora correspondente).

2 Mestre em Zootecnia. Agente Local de Inovação Rural - Sebrae/GO.

3 Mestre em Zootecnia. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

4 Bacharel em Zootecnia. Representante Técnica de Vendas na Franquia Nutron | Cargill - Leite.

5 Médica Veterinária. Clínica Garras & Patas.

Resumo: O ovo se destaca no mercado por apresentar valor acessível, além de ser considerado um dos alimentos naturais de maior valor biológico. Vários fatores podem influenciar a qualidade interna e externa de ovos, como o tempo de armazenamento prolongado ocasionando alterações nas características físico-químicas e funcionais do albúmen e da gema dos ovos inteiros. Objetivou-se avaliar a qualidade física interna e externa dos ovos comercializados em Patos de Minas, Minas Gerais. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos (distintos locais de comercialização: ovos caipiras comercializados no mercado municipal; ovos de granja comercializados em supermercados; ovos caipiras comercializados em feira-livre), cada tratamento com 36 repetições (ovos), totalizando 108 amostras experimentais. Foram avaliados parâmetros de qualidade externa (peso do ovo; peso, espessura e porcentagem da casca) e qualidade interna (peso, altura e porcentagem de albúmen; peso, diâmetro, altura e porcentagem da gema; densidade). Os ovos provenientes da feira-livre obtiveram os mesmos resultados internos que os de supermercado, diferenciando apenas no diâmetro de gema, a qual foi maior para supermercado. Os ovos provenientes de supermercados tiveram maiores resultados na qualidade externa, para espessura e peso de casca, possivelmente por ter origem em empresas de postura com controle de qualidade, controle nutricional e padronização racial.

Palavras-chave: espessura de casca; feira-livre; peso de albúmen; porcentagem de gema.

Abstract: Eggs stand out in the market for being affordable and considered one of the natural foods with the highest biological value. Several factors can influence the internal and external quality of eggs, such as prolonged storage time causing changes in the physicochemical and functional characteristics of the egg albumen and yolk. The aim of this study was to evaluate the internal and external physical quality of eggs commercialized in Patos de Minas - MG. A completely randomized design was used, consisting of three treatments (different commercialization sites: free-range eggs sold at the municipal market; farm eggs sold in supermarkets; free-range eggs sold in a street market), each treatment with 36 replicates (eggs), totalling 108 experimental samples. External quality parameters (egg weight, shell weight, thickness, and percentage) and internal quality parameters (albumen weight, height, and percentage; yolk weight, diameter, height, and percentage; density) were evaluated. Eggs from the street market had the same internal results as those from supermarkets, differing only in yolk diameter, which was larger for supermarkets. Eggs from supermarkets had higher external quality results, in terms of shell thickness and weight, possibly due to their origin from layer companies with quality control, nutritional control, and breed standardization.

Keywords: shell thickness; street market; albumen weight; yolk percentage.

1 INTRODUÇÃO

O ovo, por ser um alimento natural, equilibra baixo custo e alto teor de proteínas de excelente qualidade, além de fornecer os aminoácidos essenciais que o organismo não produz. Além disso, oferece outros nutrientes essenciais, vitaminas, minerais e ácidos graxos. É de fácil digestão, sendo empregado habitualmente na alimentação das mais variadas faixas etárias (SOUSA, 2018).

Como os demais produtos de origem animal, o ovo tende a perder sua qualidade ao longo do tempo, caso não sejam adotadas medidas adequadas de conservação. Essa depreciação é contínua, inevitável e começa logo após a postura, devendo, portanto, ser minimizada por meio do controle de temperatura, umidade relativa, estado nutricional da poedeira e pela redução do tempo decorrido entre a postura até o consumo final (ARRUDA *et al.*, 2019).

Vários são os parâmetros de qualidade avaliados, sendo que esses parâmetros têm maior peso de acordo com o público em questão. Para os produtores, um parâmetro muito importante é o peso do ovo e a resistência da casca, enquanto para os consumidores o prazo de validade e algumas características visuais, como cor da gema e casca, são parâmetros principais de avaliação. Além dessas características visuais, para a indústria alimentícia, também é relevante a facilidade de retirar a casca, com a separação da gema e da clara (ROSSI; POMPEI, 1995). Todavia, na hora de selecionar os critérios de qualidade a serem avaliados, é preciso levar em consideração os parâmetros

para todos os públicos (ALLEONI; ANTUNES, 2001).

Entre os fatores que podem influenciar na qualidade interna do ovo tem-se o tempo de armazenamento prolongado, o qual pode causar alterações nas características físico-químicas e funcionais do albúmen e da gema dos ovos inteiros. Em consonância, a temperatura, a umidade relativa do ar e movimento de dióxido de carbono do albúmen através da casca também influenciam nessas características físico-químicas, visto que influenciam diretamente a velocidade dessas alterações (ALLEONI; ANTUNES, 2001; 2006), em consequência de um gradiente negativo de concentração (KEENER *et al.*, 2001).

De acordo com essas exigências sobre a qualidade do ovo comercializado, o objetivo, neste trabalho, foi avaliar a qualidade física dos ovos comercializados em diferentes locais em Patos de Minas, Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em Patos de Minas, Minas Gerais, no mês de agosto de 2018. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos (distintos locais de comercialização: ovos caipiras comercializados no mercado municipal; ovos de granja (classificados como grande, e tipo A) comercializados em supermercados; ovos caipiras comercializados em feira-livre na cidade de Patos de Minas, Minas Gerais) e 36 repetições (ovos), totalizando 108 amostras experimentais.

Os ovos foram adquiridos no mesmo dia em comércio local, pela manhã, e levados para o Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia do Centro Universitário de Patos de Minas, localizado em Patos de Minas, Minas Gerais, para avaliações dos parâmetros de qualidade externa, que incluíram: peso do ovo (gramas); peso (gramas), espessura (milímetros) e porcentagem da casca (%). Para a qualidade interna, foram avaliados o peso (gramas), altura (milímetros) e porcentagem de albúmen (%); peso (gramas), diâmetro (milímetros), altura (milímetros) e porcentagem da gema (%); densidade (kg/m^3). Para determinação dos parâmetros foram utilizados, balança analítica Gehaka Bg4000 com precisão de 0,0001 mg e paquímetro digital 150 mm resolução digimess.

Para estabelecer a unidade Haugh, ovo foi pesado em balança analítica e, em seguida, quebrado sobre uma superfície plana para mensuração da altura do albúmen com auxílio de paquímetro digital. A medida foi feita no ponto médio entre a extremidade da gema e a extremidade externa do albúmen mais espesso. Os valores da unidade Haugh levam em consideração a relação logarítmica entre altura do albúmen denso e o peso do ovo. Para o cálculo, aplicou-se a seguinte equação: $HU = 100 \text{ Log} (H + 7,57 - 1,7 W^{0,37})$, em que H é a altura do albúmen em milímetros e o W é o peso do ovo em gramas (SOUZA *et al.*, 1994).

Para as avaliações internas, a metade dos ovos (18 ovos) de cada tratamento foi quebrada, e separados cuidadosamente a gema e o albúmen, com um separador doméstico de ovos; logo em seguida pesados individualmente. A outra metade dos ovos foi direcionada para medição de

diâmetro e altura de gema e altura do albúmen. Após as avaliações, as cascas dos ovos foram lavadas com água corrente e colocadas em estufa de circulação forçada a 65°C por 12 horas; em seguida, a espessura da casca (milímetros) foi estabelecida por meio da mensuração de três partes equatoriais da casca, utilizando também um paquímetro digital. Fez-se então a determinação dos valores, obtendo-se a média.

A porcentagem da clara foi determinada pela fórmula “peso de albúmen \times 100 / peso do ovo”. A porcentagem de gema dos ovos foi obtida considerando peso de gema \times 100 / peso do ovo.

A densidade foi determinada segundo o princípio de Arquimedes, em que utiliza os dados do peso do ovo no ar e o peso do ovo na água quando completamente submerso (FREITAS *et al.*, 2004). A densidade do ovo em relação à água foi calculada pela seguinte equação: $D = \text{peso do ovo} / \text{peso do ovo na água}$, expresso em kg/m^3 .

A análise de variância (ANOVA) dos resultados foi realizada por meio do SISVAR (FERREIRA, 2000); posteriormente as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ovos de granja adquiridos em supermercados obtiveram melhores resultados para peso do ovo ($P < 0,01$), quando comparados aos ovos adquiridos no mercado, para peso de casca ($P < 0,01$), quando comparados com os outros dois estabelecimentos, possivelmente pelo fato de geralmente ter controle nutricional e padronização racial nas aves poedeiras (Tabela 1).

Tabela 1: Qualidade externa de ovos provenientes do mercado municipal, dos supermercados e da feira-livre

Locais de comercialização	Mercado municipal	Supermercado	Feira-livre	*CV	P calculado
Peso (g)	50,09 b	56,73 a	56,55 a	9,47	< 0,01
Espessura da casca (mm)	0,36 b	0,40 a	0,34 b	9,72	0,48
Peso da casca (g)	5,05 b	5,57 a	5,07 b	11,71	< 0,01
Casca (%)	10,04 a	9,86 a	9,00 b	9,84	< 0,01

* CV = Coeficiente de variação; Letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05\%$).

A influência dessa variação é confirmada por Carvalho *et al.* (2007). Os pesquisadores observaram a influência da idade e linhagem das poedeiras quanto à proporção de componentes do ovo, os quais, por sua vez, indicam a condição de qualidade dos ovos, atribuindo o aumento do tamanho do ovo e o avançar da idade das poedeiras à piora na qualidade dos ovos avaliados.

Esse resultado já era esperado, devido à variedade de fontes dos ovos disponíveis no mercado municipal e na feira-livre, uma vez que são oriundos de galinhas caipiras, as quais apresentam grande variação genética, e não há um controle rígido de qualidade, o que justifica, portanto, a superioridade da casca dos ovos oriundos do supermercado.

Foram analisadas diferenças significativas para os valores da espessura da casca ($P = 0,48$). Nos ovos provenientes dos supermercados, obteve-se espessura de casca maior (0,40mm) — esses valores foram maiores do que o encontrado por Vilela *et al.* (2016), 0,33 mm. Já Barbosa Filho (2004) encontrou valores médios para espessura de casca de 0,41 mm para animais da raça Hy-Line Brown.

Segundo Vilela *et al.* (2016), fatores como linhagem, idade, manejo, nutrição das poedeira, estado sanitário do

plantel e fatores ambientais podem influenciar diretamente na qualidade dos ovos, dando maior ênfase na nutrição como fator determinante da qualidade, visto que nutrientes como o cálcio podem atuar diretamente na espessura da casca. Os ovos de granja tiveram um resultado melhor, possivelmente devido ao fato de as poedeiras receberem alimentação adequada e terem um controle nutricional, influenciando numa maior espessura de casca quando comparada à dos ovos caipiras.

Não houve diferença ($p > 0,05$) para peso de gema e densidade entre os ovos provenientes de distintos locais de comercialização em Patos de Minas. Todavia, verificou-se maior peso do albúmen ($P < 0,01$), porcentagem de albúmen ($P < 0,01$) e gema ($P < 0,01$) e altura de gema ($P < 0,01$) para ovos comercializados no supermercado e na feira, e maior diâmetro de gema ($P < 0,01$) para ovos de mercado e supermercado (Tabela 2).

Também houve diferença significativa para os valores de altura de albúmen ($P = 0,03$) e de gema ($P < 0,01$), apresentando nos ovos oriundos de supermercado e da feira-livre valores foram maiores que os obtidos do mercado. Segundo Lana *et al.* (2017), devido ao gradiente de pressão osmótica entre albúmen e gema no momento da

postura há um aumento na porcentagem de gema, o que reflete em melhor qualidade, já que a fluidificação do

albúmen e da gema é um sinal de perda da qualidade.

Tabela 2: Qualidade interna de ovos provenientes do mercado municipal, dos supermercados e da feira-livre

Locais de comercialização	Mercado municipal	Supermercado	Feira-livre	*CV	P calculado
Peso do Albúmen (g)	12,53 b	15,71 a	16,59 a	13,50	< 0,01
Peso da gema (g)	9,04	8,44	8,66	12,14	0,48
Albúmen (%)	27,72 b	27,69 a	28,64 a	7,11	< 0,01
Gema (%)	17,91 b	14,86 a	14,98 a	11,51	< 0,01
Altura da gema (mm)	6,44 b	8,09 a	8,10 a	14,55	< 0,01
Altura do albúmen (mm)	2,13 b	3,00 ab	3,16 a	30,78	0,03
Diâmetro de gema (mm)	22,66 a	22,66 a	20,22 b	8,93	< 0,01
Densidade (kg/m ³)	1,00	1,00	1,00	0,19	0,35
Unidade Haugh	65,24 b	76,82 a	78,19 a	18,72	< 0,01

* CV = Coeficiente de variação; Letras distintas na linha diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05%).

De acordo com Moreng e Avens (1990), as enzimas presentes no albúmen hidrolisam as cadeias de aminoácidos, liberando água ligada a grandes moléculas de proteínas, o que provoca a fluidificação do albúmen e a perda da viscosidade do albúmen mais denso (AUSTIC; NESHEIM, 1990). Essa hidrólise é dependente do período e da temperatura de armazenamento (SELEIM; EL-PRINCE, 2000; CARVALHO *et al.*, 2003) e apresenta maior velocidade durante os primeiros dias após a postura (CARBÓ, 1987).

O peso e a porcentagem de albúmen e o peso de gema dos ovos obtidos em supermercado e na feira-livre tiveram os mesmos resultados, porém foram superiores aos ovos obtidos no mercado. O contrário ocorreu para a porcentagem de gema, que foi maior nos ovos obtidos no mercado. Essas diferenças de valores podem estar relacionadas com a idade da poedeira, visto que poedeiras mais velhas apresentam maior proporção de gema, enquanto as mais jovens possuem maior

proporção de albúmen e menor proporção de gema (SANTOS, 2014). Outro fator que pode influenciar nesses resultados é o tempo de armazenamento, já que, com o passar do tempo, a porcentagem de albúmen diminui e o peso da gema aumenta (SEIBEL; SOARES, 2003).

Para a variável altura de albúmen, o coeficiente de variação foi elevado, indicando assim maior diferença entre as amostras analisadas. Entre os fatores que alteram a altura de albúmen, tem-se a idade e a linhagem da poedeira, bem como o tempo de armazenamento, portanto, o ideal é o consumidor optar pelo produto com data mais recente, buscando assim ovos de melhor qualidade (ALCÂNTARA, 2012).

Os ovos comercializados no mercado apresentaram piores índices de qualidade interna. Isso demonstra que os ovos comercializados em feiras e supermercados são melhores no que diz respeito a esse parâmetro, o que pode estar associado ao tempo, à maior

rotatividade do produto nas prateleiras ou ao ambiente mais estável.

Para a variável densidade, não se observou diferença estatística ($P = 0,35$), o que pode ser explicado pela câmara de ar que fica dentro do ovo entre a membrana interna e externa, quanto mais fresco o ovo, menor ela é. Esse aumento da câmara ocorre devido à evaporação de água que ocorre através da casca, fazendo com que sobre mais espaço e a câmara de ar se expanda, diminuindo assim naturalmente a densidade do ovo (SARCINELLI *et al.*, 2007). Então a densidade total do ovo fresco é maior do que a do ovo mais velho, pois estes últimos contêm maior volume ocupado por gás que baixa consideravelmente a densidade total (PASTORE *et al.*, 2012).

As amostras caracterizadas como ovos comercializados no mercado municipal tiveram média de 65.24 unidades Haugh, inferior ($P < 0,01$) aos demais locais de comercialização estudados. Um fator que pode explicar esse resultado seria um provável maior tempo de armazenamento e condições inadequadas (expostos ao sol e vasilhas abafadas). O armazenamento inadequado pode influenciar diretamente a qualidade interna dos ovos. Fato este justificado por Cherian *et al.* (1990), que afirmam que, quando os ovos são armazenados por longos períodos, pode ocorrer também a redução do peso do ovo devido à evaporação da água e à centralização da gema.

Os demais tratamentos ovos comercializados em supermercados e ovos comercializados em feira-livre na cidade de Patos de Minas (MG) apresentaram resultados semelhantes entre si e superiores aos ovos oriundos do mercado municipal, sendo 76.82 e 78.19

respectivamente, sendo provavelmente os mais frescos.

4 CONCLUSÃO

Os ovos, provenientes da feira-livre, do mercado municipal e de supermercados, apresentaram valores pouco distintos para os parâmetros internos e para os externos. Esses resultados podem ser explicados pelas alterações que os ovos sofrem, continuamente, desde a ovoposição até o consumo.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, J. B. **Qualidade físico-química de ovos comerciais: avaliação e manutenção da qualidade.** Seminário. Goiânia, 2012.

ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 681-685, 2001.

ARRUDA, M. D.; GOUVEIA, J. W. F.; LISBOA, A. C. C.; ABREU, A. C. L.; ABREU, A. K. F. Avaliação da qualidade de ovos armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Craibeiras de Agroecologia**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 7681-7687, 2019.

AUSTIC, R. E.; NESHEIM, M. C. **Poultry production**. 13. ed. Londres: Lea Febiger, 1990.

BARBOSA FILHO, J. A. D. **Avaliação do bem-estar de aves poedeiras em diferentes sistemas de produção e condições ambientais, utilizando**

- análise de imagem**. 2004. 123 p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Universidade de São Paulo; Piracicaba, 2004.
- CARBÓ, C. B. **La gallina ponedora**. Madrid: Mundi-Prensa, 1987. p. 379-424.
- CARVALHO, F. B. C.; STRINGHINI, J. H.; JARDIM FILHO, R. M.; LEANDRO, N. S. M. PADUA, J. T.; DEUS, H. A. S. B. Influência da conservação e do período de armazenamento sobre a qualidade interna e de casca de ovos comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, supl. 5, p. 100, 2003.
- CARVALHO, F. B.; STRINGHINI, J. H.; JARDIM FILHO, R. M.; LEANDRO, N. S. M.; CAFÉ, M. B.; DEUS, H. A. S. B. Qualidade interna e de casca para ovos de poedeiras comerciais de diferentes linhagens e idades. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 1, p. 25-29, 2007.
- CHERIAN, G.; LANGEVIN, C.; AJUYAL, A.; LIEN, K.; SIM, J. S. Research note: effect of storage conditions and hard cooking on peelability and nutrient density of white and brown shelled eggs. **Poultry Science**, [S. l.], v. 69, p. 1614-1616, 1990.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. *In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria*. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258, jul. 2000.
- FREITAS, E. R.; SAKAMOURA, N. K.; GONZALEZ, M. M.; BORBOSA, N. A. A. Comparação de métodos de determinação da gravidade específica de ovos de poedeiras comerciais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 509-512, 2004.
- KEENER, K. M.; LACROSSE, J. D.; BABSON, J. K. Chemical method for determination of carbon dioxide content in egg yolk and egg albumen. **Poultry Science**, [S. l.], v. 80, n. 7, p. 983-987, 2001.
- LANA, S. R. V.; LANA, G. R. Q.; SALVADOR, E. L.; LANA A. M. Q.; CUNHA, F. S. A.; MARINHO, A. L. Qualidade de ovos de poedeiras comerciais armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 18, n. 1, p. 140-151, 2017.
- MORENG, R. E.; AVENS, J. S. **Ciência e produção de aves**. São Paulo: Roca, 1990. p. 227-249.
- OLIVEIRA, G. E. **Influência da temperatura de armazenamento nas características físico-químicas e nos teores de aminos bioativas em ovos**. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- PASTORE, S. M., OLIVEIRA, W. D., MUNIZ, J. C. L. Panorama da coturnicultura no Brasil. **Revista Eletrônica Nutritime**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 2041-2049, 2012.
- ROSSI, M.; POMPEI, C. Changes in some egg components and analytical values

due to hen age. **Poultry Science**, [S. l.], v. 74, p. 152-160, 1995.

SANTOS, I. L. **Influência do peso dos ovos de reprodutoras pesadas com diferentes idades sobre as características dos ovos incubáveis e pintos de um dia**. 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SARCINELLI, M. F., VENTURINE, K. S., SILVA, L. C. **Características dos ovos**. Boletim Técnico. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Espírito Santo. 2007.

SELEIM, M. A.; EL-PRINCE, E. Effect of storage and boiling on some quality characteristics of eggs. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, Assiut, v. 31, n. 4, p. 1-15, 2000.

SEIBEL, N. F.; SOARES, L. A. de Souza. Avaliação física de ovos de codorna em

diferentes períodos de armazenamento. **Vetor**, Rio Grande, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2003.

SOUSA, D. G. **Avaliação da qualidade de ovos armazenados em diferentes temperaturas**. 2018. 40 p. Monografia (Curso Superior de Tecnologia em Agroecologia), Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2018.

SOUZA, H. B. A.; SOUZA, P. A.; BROGNONI, E.; ROCHA, O. E. Influência da idade sobre a qualidade dos ovos. **Científica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 217-226, 1994.

VILELA, D. R.; CARVALHO, L. S. S.; FAGUNDES, M. S.; FERNANDES, E. A. Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais com cascas normal e vítrea. **Ciência Animal Brasileira**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 509-518, out. 2016.

Efeito modulador do gluconato de clorexidina em células epiteliais de *Drosophila melanogaster*

Modulatory effect of chlorhexidine gluconate on epithelial cells of Drosophila melanogaster

Adriene Rodrigues da Silva¹; Mirley Alves Vasconcelos²; Rosiane Gomes Silva Oliveira³

1 Bacharel em Medicina Veterinária. Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

2 Doutora em Genética e Bioquímica. Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

3 Doutora em Genética e Bioquímica. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

E-mail: rosianegso@unipam.edu.br (autora correspondente).

Resumo: O gluconato de clorexidina é um antisséptico amplamente utilizado na área da saúde, devido a sua potente ação antimicrobiana; além disso, estudos recentes demonstram que esse composto é capaz de interferir nos mecanismos apoptóticos e na proliferação celular. Portanto, avaliar a ação da clorexidina no processo da carcinogênese justifica a realização do presente estudo, que teve por objetivo principal avaliar o efeito anticarcinogênico do antisséptico gluconato de clorexidina na carcinogênese induzida pela doxorubicina (DXR), utilizando o Teste de Tumor Epitelial (ETT) em células epiteliais de *Drosophila melanogaster*. Para a realização do experimento, foram utilizados um controle negativo (água de osmose reversa), um controle positivo (Doxorubicina DXR - 0,4mM) e três diferentes concentrações de clorexidina (5, 10 e 20 %) associadas à doxorubicina (DXR - 0,4mM). O tratamento foi realizado com larvas de 72 horas descendentes do cruzamento de fêmeas *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*. Os resultados revelaram que a clorexidina, nas concentrações testadas, foi capaz de reduzir, significativamente, a frequência de tumores induzidos pela doxorubicina quando comparado ao controle positivo. Concluiu-se que, nas presentes condições experimentais, a clorexidina apresentou efeito modulador, pois foi capaz de reduzir os danos induzidos pela DXR.

Palavras-chave: carcinogênese; doxorubicina; efeito modulador.

Abstract: Chlorhexidine gluconate is an antiseptic widely used in the health field due to its potent antimicrobial action. Recent studies have also shown that this compound is capable of interfering with apoptotic mechanisms and cell proliferation. Therefore, evaluating the action of chlorhexidine on the carcinogenesis process justifies the present study, which aimed to evaluate the anticarcinogenic effect of chlorhexidine gluconate in the carcinogenesis induced by doxorubicin (DXR), using the Epithelial Tumor Test (ETT) in *Drosophila melanogaster* epithelial cells. For the experiment, a negative control (reverse osmosis water), a positive control (Doxorubicin DXR - 0.4 mM), and three different concentrations of chlorhexidine (5, 10, and 20%) associated with doxorubicin (DXR - 0.4 mM) were used. The treatment was performed with 72-hour larvae descending from the cross of *wts/TM3* females with *mwh/mwh* males. The results showed that chlorhexidine, at the tested concentrations, was able to significantly reduce the frequency of tumors induced by doxorubicin compared to the positive control. It was concluded that under the present experimental conditions, chlorhexidine presented a modulating effect, as it was able to reduce the damage induced by DXR.

Keywords: carcinogenesis; doxorubicin; modulating effect.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença crônica que, nas últimas décadas, tem apresentado aumento significativo na frequência de novos casos, tornando-se um problema de saúde pública mundial (VIEIRA *et al.*, 2013). Dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o triênio de 2023 a 2025, apontam para a ocorrência de 704 mil novos casos por ano no Brasil (INCA, 2023). Essas informações são ainda mais alarmantes quando se trata do cenário mundial, pois, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), o número estimado de casos incidentes no mundo, entre os anos de 2020 a 2040, saltará de 19,3 milhões para 28,9 milhões (WHO, 2023).

Embora não se tenham estatísticas precisas sobre a prevalência e incidência de câncer em escala nacional na área da saúde animal (FLORES, 2016), sabe-se que o número de afecções neoplásicas na população animal vem aumentando consideravelmente (NARDI *et al.*, 2012), sendo uma das causas mais frequentes de morbidade e mortalidade em animais de companhia (TOGNI *et al.*, 2018). Os tumores são ainda mais comuns em animais idosos (BENTUBO *et al.*, 2007; LUZ, 2018).

Devido à gravidade dessa patologia, existe um potencial extraordinário em busca da descoberta de novos produtos farmacológicos anticarcinogênicos que possam combater o câncer e/ou melhorar efetivamente o tratamento de pacientes (COSTA-LUTOFO *et al.*, 2010).

Nesse contexto, ressalta-se o antisséptico gluconato de clorexidina, um composto antimicrobiano potencialmente eficaz e muito utilizado na área da saúde

(ANGELIERI, 2015). Esse antisséptico apresenta ainda, como característica desejável, a biocompatibilidade, ou seja, não causa irritação à pele do animal, podendo ser usado por qualquer paciente oncológico sem causar danos (BONAN; BATISTA; HUSSINE, 2011).

Estudos revelam ainda a associação positiva entre a clorexidina e o aumento da frequência de apoptoses, bem como sua ação nas alterações na propriedade de membrana de mitocôndrias (GIANNELLI *et al.*, 2008), na proliferação e morfologia celular (FARIA *et al.*, 2009); eventos estes que podem estar associados à redução de tumores. Diante do exposto, torna-se relevante uma avaliação que busque investigar a relação entre a clorexidina e seu efeito sobre a carcinogênese. A escolha da *Drosophila melanogaster* como organismo teste é justificada tanto pela facilidade de manipulação das linhagens (VIEIRA, 2018), quanto pela sua semelhança com características genéticas dos mamíferos, dentre elas a homologia entre o gene supressor de tumor *WTS*, presente na mosca, com o gene *LAST1*, presente em seres humanos (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

Nesse contexto, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito anticarcinogênico do antisséptico gluconato de clorexidina, por meio do Teste de Tumor Epitelial (ETT) em *Drosophila melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

O cloridrato de doxorubicina (DXR), com fórmula molecular $C_{27}H_{29}O_{11}HCl$ (CAS 25316-40-9), é um fármaco que está presente no mercado

com vários nomes comerciais, entre eles, Adriblastina® RD, sendo este fabricado e embalado por Activis Italy S.p - Nerviano, Milão/Itália. É registrado, importado e distribuído por Pfizer Laboratório Ltda. É apresentado sob forma de ampolas de 50mg com os seguintes compostos em sua constituição: cloridrato de doxorrubicina, manitol e lactose. Neste experimento, a DXR foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,4mM (SILVA; SANTOS; ORSOLIN, 2017).

O Gluconato de clorexidina (Clorex) tem vários nomes comerciais, entre eles o Riohex 2%, fabricado pela empresa Bioquímica. É apresentado em forma de refil, frasco com 800mL. Foram utilizadas 03 concentrações do gluconato de clorexidina (5, 10 e 20%) associadas à Doxorrubicina (0,4mM), sendo diluídas em água de osmose reversa. O controle negativo foi com água de osmose reversa.

2.2 TESTE DE TUMOR EPITELIAL (ETT) EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

O teste foi realizado mediante cruzamento de duas linhagens de *D. melanogaster* (*wts* e *mwh*). A linhagem *wts* foi disponibilizada pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana, Estados Unidos, com o número de registro: Bloomington/7052. Já a linhagem *mwh/mwh* foi cedida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland), sendo mantida em estoque pelo LABCIM, Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas.

Para obtenção de larvas heterozigotas (*wts+/+mwh*) foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens

wts/TM3, Sb¹, com machos *mwh/mwh*. Após 48 horas, tanto os machos quanto as fêmeas foram transferidos para o meio de postura, para que as fêmeas depositassem seus ovos.

As larvas de 72 horas, descendentes desse cruzamento foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batata (SPANÓ *et al.*, 2001) e hidratadas com clorexidina em três concentrações (5, 10 e 20%), associadas a doxorrubicina (0,4mM). As concentrações do referido antisséptico foram definidas a partir do trabalho de Reis e Vasconcelos (2018). Além dessas três concentrações, foram incluídos os grupos controle: grupo controle positivo com DXR 0,4 mM e o grupo controle negativo com água de osmose reversa. Após esse procedimento, as larvas ficaram expostas aos agentes químicos por cerca de 48 horas, até ocorrer a empupação. As moscas que eclodiram das pupas foram coletadas e armazenadas em frascos, devidamente identificados, contendo etanol 70%.

Após o período de coleta, procedeu-se à análise. Por meio da lupa estereoscópica, foram analisadas apenas moscas de pelos longos e finos, por serem portadoras do gene *WTS*. Para tanto, foi utilizada uma placa escavada contendo glicerina, em que as moscas foram analisadas individualmente para detecção da presença de tumores. A frequência de tumores foi registrada em planilha padrão, onde foi feita a descrição do número de tumores por área do corpo da *Drosophila melanogaster*.

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores no grupo experimental (nas concentrações testadas) e nos controles (negativo e positivo) foram calculadas utilizando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-

Whitney, empregando o nível de significância $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Teste de Tumor Epitelial foi realizado para avaliar o potencial anticarcinogênico do Clorex quando associado à DXR no organismo teste *Drosophila melanogaster*. As diferentes concentrações do Clorex utilizadas em

combinação com DXR foram selecionadas com base em ensaio de sobrevivência (Figura 1).

Os dados de sobrevivência validaram o uso das três concentrações de Clorex (5, 10 e 20%) em combinação com DXR, que foram testadas em dois experimentos independentes. Os dados foram agrupados após verificação de que não havia diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre as repetições.

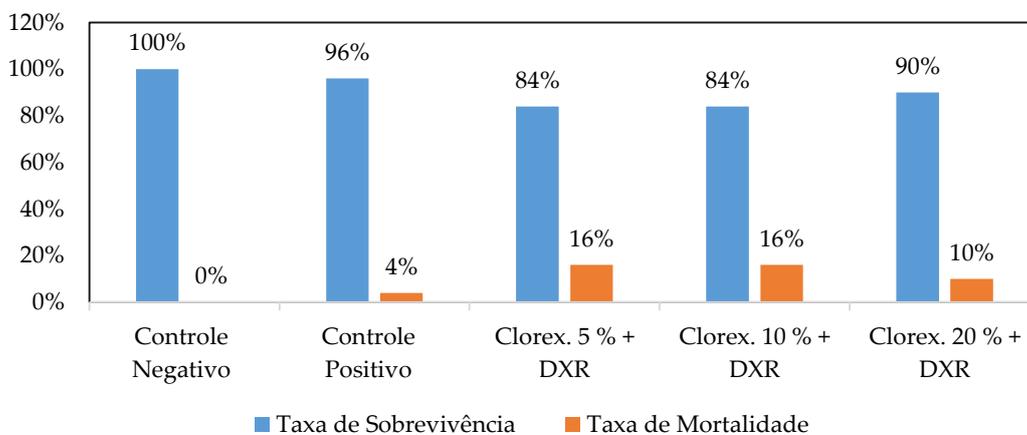


Figura 1: Taxas de mortalidade e sobrevivência de *Drosophila melanogaster* expostas ao controle negativo (água osmose reversa), ao controle positivo doxorrubicina (DXR - 0,4mM) e em três diferentes concentrações do antisséptico gluconato de clorexidina (Clorex) associadas à DXR

A Tabela 1 mostra a frequência de tumores nos segmentos do corpo de *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de Clorex em combinação com DXR. Nos indivíduos tratados com controle positivo (DXR 0,4 mM), a frequência observada foi de 3,84 tumores por moscas, demonstrando que o organismo modelo foi sensível à indução tumoral, visto que a frequência de tumores foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior que no controle negativo. Esse resultado corrobora os resultados de Silva, Santos e Orsolin (2017), Santos e Oliveira (2018) e Pereira, Ramos e Vasconcelos (2019), que também

utilizaram a DXR nessa mesma concentração, como controle positivo.

Os indivíduos tratados somente com o controle negativo (água em osmose reversa) apresentam uma frequência de 0,27 tumores por moscas. De acordo com Alves e Nepomuceno (2012), essa discreta indução tumoral se deve a fatores de predisposição genética intrínseca do organismo modelo utilizado no presente experimento.

Embora os mecanismos pelos quais o gluconato de clorexidina exerce sua ação protetora reduzindo a frequência de tumores induzidos pela DXR não tenham sido diretamente avaliados nesta pesquisa, é possível que

tal efeito possa estar associado aos mecanismos de indução de morte celular. Faria *et al.* (2009) relataram, em estudo, que quando injetada na região subplantar da pata traseira de camundongos, a clorexidina induziu alterações necróticas na epiderme, derme e tecido subcutâneo em associação com uma resposta inflamatória reacional. Os autores relataram ainda que, em cultura de fibroblastos, a clorexidina induziu a diminuição da proliferação celular,

causou morte celular por apoptose e necrose, desestruturação do citoesqueleto, alteração da morfologia celular e estresse do retículo endoplasmático rugoso como consequência do acúmulo de proteínas nas cisternas. Além disso, a clorexidina causou o aumento da expressão de Hsp 70, de Grp78 (indicadores de estresse celular) e de BCL-2 (proteína anti-apoptótica).

Tabela 1: Frequência de clones tumores epiteliais observado em *Drosophila melanogaster* (n = 200), heterozigoto para o gene supressor de tumor *WTS*, tratadas isoladamente com os controles negativo (água), positivo doxorrubicina (DXR - 0,4mM) e três diferentes concentrações do antisséptico gluconato de clorexidina (Clorex) associado à DXR

		Clorex (0%) + DXR (0,0 mM)	Clorex (0%) + DXR (0,4 mM)	Clorex (5%) + DXR (0,4 mM)	Clorex (10%) + DXR (0,4 mM)	Clorex (20%) + DXR (0,4 mM)
Número de tumores analisados	Olho	0,01(2)	0,02(4)	0,005(1)	0,05(1)	0,00(0)
	Cabeça	0,05(9)	0,46(92)	0,11(22)	0,13(25)	0,14(27)
	Asa	0,03(5)	1,52(303)	0,63(125)	0,29(58)	0,19(31)
	Corpo	0,14(27)	0,85(170)	0,17(33)	0,24(48)	0,27(53)
	Perna	0,05(9)	0,82(164)	0,27(53)	0,09(18)	0,13(25)
	Halter	0,01(2)	0,16(32)	0,02(4)	0,015(3)	0,02(4)
	Total	0,27(54)	3,84(767)	1,19(238)	1,77(153)	0,70(140)
	Frequência (nº de tumores / mosca)	0,27(54)	3,84(767) *	1,19(238) **	0,77(153) **	0,70(140) **
Redução (%)			68,98	80,05	81,75	

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p \leq 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo ($p \leq 0,05$).

DXR, doxorrubicina.

Wyganowska-Swiatkowska *et al.* (2016), por sua vez, demonstraram, em um estudo *in vitro*, o efeito da clorexidina em cultura de células da linhagem CCD16 de fibroblastos humanos. Segundo os autores, a clorexidina causou diminuição gradual das células avaliadas, evidenciando alterações apoptóticas; indicando, portanto, influência negativa

da clorexidina tanto na proliferação quanto na morfologia celular.

Em adição, Widbiller, Althumairy e Diogenes (2018) avaliaram os efeitos clorexidina sobre a sobrevivência de células tronco da papila apical de humanos e concluíram que a clorexidina induziu efeito deletério sobre as células avaliadas, quando comparado ao grupo controle.

Nonami *et al.* (2016), por sua vez, correlacionaram a ação citotóxica da clorexidina com as propriedades eletroquímicas de membrana. Os autores verificaram que a despolarização de membranas atenuou a ação citotóxica da clorexidina em linfócitos tímicos de ratos. Contudo, manipulações para induzir a exposição da fosfatidilserina na superfície externa da membrana aumentaram a ação citotóxica da clorexidina, indicando que mudanças na propriedade eletroquímica das membranas afetaram a ação citotóxica da clorexidina. Assim, a clorexidina pode matar células submetidas fisiologicamente a apoptose, resultando em morte celular necrótica.

Por outro lado, Giannelli *et al.* (2008), ao estudarem diferentes linhagens celulares (osteoblásticas, endoteliais e fibroblásticas), constataram que, além do efeito tóxico da clorexidina na indução de morte celular, a clorexidina foi capaz de interferir na integridade do potencial de membrana de mitocôndrias e desencadear aumento do cálcio intracelular e estresse oxidativo.

Nesse contexto, é possível que a redução na frequência de tumores verificada na presente pesquisa tenha sido causada pelo aumento do estresse oxidativo, visto que um dos mecanismos de ação da DXR é a geração de radicais livres; possivelmente a combinação entre clorexidina e DXR aumentou a toxicidade celular. Contudo, outro mecanismo que pode estar relacionado com a redução na frequência de tumores é a capacidade do gluconato de clorexidina de alterar propriedades da membrana. Assim, é possível que a clorexidina tenha dificultado a entrada da DXR nas células, resultando redução na frequência de tumores.

4 CONCLUSÃO

Nas presentes condições experimentais, o antisséptico gluconato de clorexidina apresentou, em *D. melanogaster*, efeito modulador sobre a carcinogênese induzida pela doxorubicina. Tal efeito pode estar relacionado às diversas propriedades oncoprotetoras exercidas por esse antisséptico.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 9, n. 2, p. 125-40, 2012.
- ANGELIERI, B. M. **Aplicações da clorexidina na saúde médica, odontológica e veterinária – revisão de literatura**. 2015. 40 f. Monografia (Especialização em Endodontia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2015.
- BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, jul. 2007.
- BONAN, R. F.; BATISTA, A. U. D.; HUSSINE, R. P. Comparação do uso do hipoclorito de sódio e da clorexidina como solução irrigadora no tratamento endodôntico: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 237-244, 2011.

COSTA-LOTUFO, L. V.;
MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N.
N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.;
MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A.
Contribuição dos produtos naturais
como fonte de novos fármacos
anticâncer: estudos no Laboratório
Nacional de Oncologia Experimental da
Universidade Federal do Ceará. **Revista
Virtual de Química**, [S. l.], v. 2, n. 1, p.
47-58, 2010.

FARIA, G.; CARDOSO, C. R. B.; LARSON,
R. E.; SILVA, J. S.; ROSSI, M. A.
Chlorhexidine-induced apoptosis or
necrosis in L929 fibroblasts: a role for
endoplasmic reticulum stress. **Toxicology
and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 234,
n. 2, p. 256-265, 2009.

FLORES, M. M. **Aspectos
epidemiológicos do câncer em cães da
região central do Rio Grande do Sul: 50
anos (1964-2013)**. 2016. 91 f. Tese
(Doutorado em Medicina Veterinária),
Universidade Federal de Santa Maria,
Centro de Ciências Rurais, Santa Maria,
2016.

GIANNELLI, M.; CHELLINI, F.;
MARGHERI, M.; TONELLI, P.; TANI, A.
Effect of chlorhexidine digluconate on
different cell types: a molecular and
ultrastructural investigation. **Toxicology
in Vitro**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 308-317,
2008.

INCA. Instituto Nacional do Câncer.
Estimativa. Disponível em:
[https://www.gov.br/inca/pt-
br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/i
ntroducao](https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/introducao).

LUZ, A. C. A. **Neoplasias orais em cães
diagnosticadas no Laboratório de**

**Patologia Animal do Hospital
Veterinário da Universidade Federal de
Uberlândia: estudo retrospectivo**. 2018.
26 f. Trabalho de Conclusão de Curso
(Graduação em Medicina Veterinária),
Faculdade de Medicina Veterinária,
Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia, 2018.

NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.;
COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.;
RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ,
C. H. Prevalência de neoplasias e
modalidades de tratamentos em cães,
atendidos no Hospital Veterinário da
Universidade Federal do Paraná, Curitiba
- Paraná. **Archives of Veterinary Science**,
[S. l.], v. 7, n. 2, p. 15-26, 2012.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI,
T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IIDA, S.;
MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.;
HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H.
A. Human homolog of *Drosophila warts*
tumor suppressor, *h-warts*, localized to
mitotic apparatus and specifically
phosphorylated during mitosis. **FEBS
Letters**, [S. l.], v. 459, n. 2, p. 159-165, 1999.

NONAMI, K.; SAITOH, S.;
NISHIMURA-DANJOBARA, Y.;
ISHIDA, S.; OYAMA, Y. Chlorhexidine
possesses unique cytotoxic actions in rat
thymic lymphocytes: its relation with
electrochemical property of membranes.
**Environmental Toxicology and
Pharmacology**, [S. l.], v. 48, p. 17-21,
2016.

PEREIRA, R. C. R.; RAMOS, M. P. O.;
VASCONCELOS, M. A. Prospecção
química do extrato alcoólico das folhas
de *Antonia Ovata Pohl (Loganiaceae)* e
avaliação do seu efeito carcinogênico em
células somáticas de *Drosophila*

- melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 1, n. 16, p. 237-249, 2019.
- REIS, G. P. A.; VASCONCELOS, M. A. Avaliação do efeito carcinogênico do antisséptico Gluconato de Clorexidina por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Anais do COMEIA**, Patos de Minas, n. 11, 2018, p. 356.
- SANTOS, M. G. S.; OLIVEIRA, R. G. S. Efeito modulador do óleo de rícino, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 15, n. 1, p. 252-268, 2018.
- SILVA, C. S.; SANTOS, J. C.; ORSOLIN, P. C. Efeito redutor do viagra (Citrato de Sildenafil) sobre a frequência de tumores epiteliais induzidos pela doxorrubicina em *Drosophila melanogaster*. **Revista USP**, Ribeirão Preto, v. 50, n. 6, p. 365-370, 2017.
- SPANÓ, M. A.; FREI, H.; WÜRGLER, F. E.; GRAF, U. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, [S. l.], v. 16, p. 385-394, 2001.
- TOGNI, M.; CURTIS, A.; VARGAS, D. P.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; FIGHERA, R. A. Causas de morte e razões para eutanásia em gatos na Região Central do Rio Grande do Sul (1964-2013). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 741-750, abr. 2018.
- VIEIRA, G. B.; SOUSA, R. M.; SANTO, F. H. E.; TEIXEIRA, E. R. Impacto do câncer na autoimagem do indivíduo: uma revisão integrativa. **Revista Baiana de Enfermagem**, Salvador, v. 26, n. 2, p. 533-540, 2013.
- VIEIRA, N. M. **Expressão do gene codificador da Proteína HP1 em *Drosophila melanogaster***. 2018. 42 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia), Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- WIDBILLER, M.; ALTHUMAIRY, R. I.; DIOGENES, A. Direct and indirect effect of chlorhexidine on survival of stem cells from the apical papilla and its neutralization. **Regenerative Endodontics**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 156-160, 2018.
- WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. **Número estimado de casos incidentes de 2020 a 2040, todos os cânceres**. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=0&sexes=0&mode=population&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=0&cancers=39&populations=903_904_905_908_909_935.
- WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA, M.; URBANIAK, P.; SZKARADKIEWICZ, A.; JANKUN, J.; KOTWICKA, M. Effects of chlorhexidine, essential oils and herbal medicines (Salvia, Chamomile, Calendula) on human fibroblast *in vitro*. **Central European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 1-7, 2016.

Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães criados em fazendas na região de Lagoa Formosa, Minas Gerais

Occurrence of anti-Neospora caninum antibodies in dogs raised on farms in the Lagoa Formosa region, Minas Gerais

Vanusa Palminda Silva Santos¹; Nadia Grandi Bombonato²

1 Bacharel em Medicina Veterinária. Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

2 Doutora em Ciências Veterinárias. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

E-mail: nadiavet57@yahoo.com.br (autora correspondente).

Resumo: A neosporose canina é descrita desde 1984 quando ocorreram os primeiros relatos de cães afetados pela doença, cujos sinais eram semelhantes aos de encefalite e miosite. Em 1998, o cão foi descrito como hospedeiro definitivo, desempenhando papel fundamental na epidemiologia da neosporose, já que são capazes de eliminar oocistos pelas fezes e infectar hospedeiros intermediários (bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, equinos, cervídeos, raposas e felinos), através da ingestão de água ou alimentos contaminados, sendo assim um dos principais responsáveis pela disseminação do parasita nos diferentes ecossistemas. O objetivo deste trabalho foi determinar, por meio do teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da área rural de Lagoa Formosa (MG). A pesquisa foi realizada em 10 propriedades rurais sem histórico da presença de *N. caninum*; em cada propriedade, foi escolhido um cão de forma aleatória. Esses animais são de ambos os sexos, sem raça definida, com idade entre 7 meses a 10 anos, sem apresentação de qualquer sintomatologia clínica característica da enfermidade. Todos os cães do estudo tinham contato com os bovinos das propriedades, apesar de serem domésticos e não serem usados para pastoreio. As amostras foram coletadas por venopunção da jugular ou da veia cefálica, após assepsia prévia, com o auxílio de agulhas estéreis (30 x 8 mm), em tubos de "Vacutainer" estéreis sem anticoagulante, totalizando 10 ml de sangue por animal. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 2000g, para obtenção de soros límpidos que foram conservados a -20°C, em alíquotas, até o momento da realização das provas sorológicas. Dos 10 cães analisados, apenas um apresentou anticorpos anti-*N. caninum*, porém esse animal não apresentava nenhum sinal clínico, estando aparentemente saudável. A enfermidade não tem predileção por raça, idade e sexo, sugerindo que machos e fêmeas da espécie canina estão submetidos às mesmas condições de risco.

Palavras-chave: encefalite; neosporose; oocistos.

Abstract: Canine neosporosis has been described since 1984 when the first reports of dogs affected by the disease, whose signs were similar to those of encephalitis and myositis, occurred. In 1998, the dog was described as a definitive host, playing a fundamental role in the epidemiology of neosporosis, since they are capable of eliminating oocysts through feces and infecting intermediate hosts (cattle, buffaloes, goats, sheep, horses, deer, foxes, and cats), through the ingestion of contaminated water or food, being one of the main responsible for the spread of the parasite in different ecosystems. The objective of this study was to determine, by means of the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), the presence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from the rural area of Lagoa Formosa (MG), Brazil. The survey was conducted on ten

rural properties without a history of the presence of *N. caninum*; in each property, one dog was randomly chosen. These animals are of both sexes, mixed-breed, aged between seven months and ten years, without any characteristic clinical symptoms of the disease. All dogs in the study had contact with cattle from the properties, although they were domestic and not used for herding. Samples were collected by venipuncture of the jugular or cephalic vein, after previous asepsis, using sterile needles (30 x 8 mm), in sterile Vacutainer tubes without anticoagulant, totaling 10 ml of blood per animal. After clot retraction, the samples were centrifuged for ten minutes at 2000g, to obtain clear sera that were stored at -20°C, in aliquots, until the time of serological testing. Of the ten dogs analyzed, only one had anti-*N. caninum* antibodies, but this animal did not present any clinical signs, being apparently healthy. The disease has no preference for breed, age, and sex, suggesting that male and female dogs are subjected to the same risk conditions.

Keywords: encephalitis; neosporosis; oocysts.

1 INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença parasitária de distribuição mundial, tendo como agente etiológico *Neospora caninum*, um protozoário parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, família *Sarcocystidae*, subfamília *Toxoplasmatinae* (DUBEY *et al.*, 1988a). Essa enfermidade é estudada em vários países, inclusive no Brasil e pode acometer canídeos selvagens, domésticos, ruminantes, equinos e outros herbívoros, causando distúrbios neurológicos em cães, além de ser responsável por um grande número de abortos em bovinos (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Os parasitos são encontrados em células do sistema nervoso, do endotélio vascular, fibroblastos, macrófagos, miócitos, hepatócitos e células do epitélio dos túbulos renais dos animais infectados (HEMPHIL; GOTTSTEIN, 1996).

No ciclo do parasita, oocistos não esporulados de *N. caninum* são excretados no ambiente pelas fezes dos hospedeiros definitivos (canídeos infectados); através das condições ambientais favoráveis, esses oocistos se tornam esporulados, sendo ingeridos pelo hospedeiro intermediário (canídeos,

bovinos, cervídeos, caprinos, ovinos e animais silvestres) (GUIMARÃES, 2011). Quando atingem a luz intestinal, são liberados nas células da parede do intestino, passando a se chamar de taquizoítos, que se dividem rapidamente por endodiogenia e podem atingir quaisquer células do organismo do hospedeiro. Com a resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, forma de multiplicação lenta contidas em cistos teciduais, e uma queda da imunidade do hospedeiro pode provocar reativação dos bradizoítos e rompimento do cisto. Quando ocorre a ingestão desses cistos pelo hospedeiro definitivo, os bradizoítos iniciam o processo de penetração no epitélio intestinal dando origem às formas resultantes da multiplicação assexuada e sexuada do parasito. Em seguida, ocorre a liberação de oocistos não esporulados no ambiente, reiniciando o ciclo (CARDOSO, 2010).

A transmissão vertical ou congênita é uma das formas de infecção mais importantes, e cadelas com infecção subclínica podem transmitir para os seus fetos o parasito. Essa mesma fêmea pode parir sucessivas ninhadas infectadas (DUBEY; LINDSAY, 1996). A transmissão horizontal ocorre com mais frequência

em áreas rurais, já que os animais têm mais contato com vísceras, fetos e carnes contaminadas (PATITUCCI *et al.*, 2001).

Cães de qualquer idade podem se infectar com *Neospora caninum*, manifestando forma generalizada. Filhotes infectados congenitamente apresentam paralisia ascendente, tendo os membros posteriores como mais afetados, hiperextensão rígida ou flácida, possivelmente consequência de poliradiculoneurite e miosite decorrentes da infecção (DUBEY *et al.*, 1988b; DUBEY *et al.*, 1990). Os animais também podem apresentar cegueira, paralisia da mandíbula, dificuldade de deglutição, incontinência urinária e fecal, flacidez e atrofia muscular, falha cardíaca e convulsões (LINDSAY *et al.*, 1999; DUBEY; SCHARE; ORTEGA-MORA, 2007). Em animais adultos, apresenta-se pneumonia, miocardite e dermatite piogranulomatosa, além do quadro neuromuscular. Apesar de cães sobreviverem por meses com meningoencefalite, paralisia progressiva, complicações pulmonares e insuficiência cardíaca, grande parte desses animais necessitam ser submetidos à eutanásia (BARBER; TREES, 1998; DUBEY; SCHARE; ORTEGA-MORA, 2007).

A fim de prevenir a infecção por *N. caninum*, deve-se ficar atento às medidas de controle, como evitar que os cães contaminem o alimento e a água dos bovinos com as fezes. Deve ser preferida a alimentação com rações comerciais para cães e isolar esses animais do contato com o gado, para evitar que os cães se alimentem com a placenta e outros tecidos bovinos. Os cães de zona urbana, apesar de não terem contato com restos placentários, como medidas de prevenção à infecção, não devem ser alimentados com carne crua (DUBEY, 2003). Para a

prevenção da transmissão vertical ou transplacentária, ainda não existe nenhuma vacina ou droga eficaz. Já no tratamento da neosporose canina, podem ser usadas as sulfonamidas e/ou pirimetamina e clindamicina, que apresentam sucesso parcial no tratamento (DUBEY; LINDSAY, 2000).

Considerando-se a distribuição cosmopolita e rural do *N. caninum*, objetivou-se neste trabalho determinar a soroprevalência do *N. caninum* em cães, criados em fazendas no município de Lagoa Formosa (MG).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), sob Protocolo n. 124/19.

A pesquisa foi realizada em 10 propriedades rurais da região de Lagoa Formosa, Minas Gerais, que têm como principal atividade a pecuária leiteira, com sistema de produção extensivo, raças leiteiras variadas e sem muita tecnificação. A maioria das propriedades possuía histórico de aborto, porém sem investigação da causa ter sido por *N. caninum*.

Foram utilizados 10 cães, 1 animal de cada propriedade, escolhidos de forma aleatória, sem raça definida, de ambos os sexos (9 machos e 1 fêmea) e com idade entre 7 meses a 10 anos, sem apresentação de qualquer sintomatologia clínica característica da enfermidade. Todos os cães do estudo tinham contato com os bovinos das propriedades, apesar de serem domésticos e não serem usados para pastoreio.

A coleta de sangue dos animais foi feita com a permissão dos

proprietários das fazendas selecionadas. As amostras foram coletadas por venopunção da jugular ou da cefálica, após assepsia prévia, com o auxílio de agulhas estéreis (30 x 8 mm), em tubos de vacutainer estéreis sem anticoagulante, totalizando 10 mL de sangue por animal. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 2000g, para obtenção de soros límpidos que foram conservados a -20°C, em alíquotas, até o momento da realização das provas sorológicas.

Cada animal foi registrado em uma ficha contendo nome do proprietário, nome do animal, idade e sexo. A pesquisa de anticorpos para *N. caninum* foi realizada pela prova de imunofluorescência indireta para neosporose canina, no Laboratório TECSA, situado em Belo Horizonte (MG). Testaram-se os soros dos cães em uma diluição inicial de 1:50, sendo empregada como ponto de corte, como proposto por Dubey *et al.* (1988a).

Para a análise de dados, foi utilizada a estatística descritiva, através de frequência absoluta e relativa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras de soro canino analisadas, apenas 10% (1/10), na titulação 1:50, apresentaram anticorpos anti-*Neospora caninum*. O animal soropositivo não apresentava nenhum sinal clínico e estava aparentemente saudável, e na propriedade em que ele é criado, não havia histórico de abortos em bovinos. A infecção pelo protozoário *N. caninum* pode apresentar a forma assintomática, o que dificulta o diagnóstico clínico e ressalta a importância da confirmação laboratorial (BERTOCCO; BERTOCCO, 2008).

O diagnóstico da neosporose deve ser feito baseado em sinais clínicos através de uma boa anamnese, aliada a exames *ante-mortem*, sorologia e outros exames laboratoriais. Tais resultados estão próximos aos relatados por Lathe (1994), Sawada *et al.* (1998) e Cheadle (1999). Em estudos preliminares com cães (CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2003; AGUIAR *et al.* (2006), não foi observada correlação entre valores dos títulos de anticorpos (1:50 a 1:3200) e sinais clínicos; todos os cães reagentes apresentaram-se sadios, porém, de acordo com Dubey (2003), alguns estudos mostraram que cães com títulos de anticorpos elevados na RIFI apresentaram sintomas mais graves de neosporose, incluindo problemas neurológicos e fraqueza muscular. A presença de anticorpos em um animal indica a exposição ao parasito ou a um parasito estritamente relacionado, passível da reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa (VARDELEON *et al.*, 2001). Segundo Aguiar (2004), dados referentes aos animais, como procedência, manejo, soropositividade ou não a outros agentes abortivos, assim como a profilaxia deles, poderiam interferir no percentual de animais sororreagentes.

A faixa etária dos cães analisados neste estudo variou de 7 meses a 10 anos. Segundo Bresciani *et al.* (2006), não há diferenças na ocorrência de neosporose entre as faixas etárias, sugerindo que os cães adquirem a infecção nos primeiros meses de vida ou essa aquisição pode estar ocorrendo pela via vertical, antes mesmo do nascimento. Cadelas infectadas subclínicamente podem transmitir o parasito para os seus fetos, e ninhadas sucessivas podem nascer infectadas (DUBEY; LINDSAY,

2000). Souza *et al.* (2002) encontraram tendência crescente na associação entre os níveis de prevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e o avançar da idade dos cães.

Com relação à variável sexo, 90% (9/10) dos animais analisados eram machos, e apenas 10% (1/10) fêmea. De acordo com Varandas *et al.* (2001), Souza *et al.* (2002) e Teixeira *et al.* (2006), machos e fêmeas da espécie canina estão submetidos às mesmas condições de risco. Muitos cães soropositivos para *Neospora caninum* são assintomáticos, e a neosporose congênita, muitas vezes, é subdiagnosticada. Barber e Trees (1998) recomendam que fêmeas soropositivas sejam castradas ou impossibilitadas de se reproduzirem, uma vez que pode ocorrer a transmissão vertical.

Por ser hospedeiro definitivo do *Neospora caninum*, o cão desempenha papel fundamental na epidemiologia da neosporose (LINDSAY *et al.*, 1999; McALLISTER *et al.*, 1998). Geralmente a maioria dos cães é assintomática, porém podem apresentar sinais clínicos quando há uma grande carga parasitária ou quando o animal está imunossuprimido. Em propriedades rurais, há um contato muito próximo de diversas espécies animais; os cães, na maioria das vezes, vivem soltos, podem ser os principais responsáveis por carregar e disseminar esses parasitos no pasto e na água, a qual pode servir para consumo humano (LABRUNA *et al.*, 2006).

Assim como os coiotes (GONDIM *et al.*, 2004), os cães são capazes de eliminar oocistos pelas fezes e infectar hospedeiros intermediários (bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, equinos, cervídeos, raposas e felinos), através da ingestão de água ou alimentos contaminados pelos mesmos (MCALLISTER *et al.*, 1998), sendo assim

um dos principais responsáveis pela disseminação do parasita nos diferentes ecossistemas.

Em propriedades em que a principal atividade é a pecuária, há uma grande preocupação com neosporose e a transmissão horizontal dos cães para os bovinos. A neosporose em bovinos causa aborto, podendo provocar também morte embrionária e reabsorção, redução na produção de leite, nascimento de bezerros com anormalidades congênitas e menor taxa de crescimento dos animais jovens. As perdas econômicas por neosporose em bovinos não apenas se limitam apenas a abortamentos, mas também envolvem descarte prematuro de matrizes, mortalidade neonatal de bezerros, gastos indiretos, incluindo honorários profissionais, gastos com estabelecimento do diagnóstico e reposição de animais (DUBEY, 2003; OSHIRO *et al.*, 2007; KATO, 2009; LLANO, 2013).

Em estudo realizado com cães do meio rural, Cunha Filho *et al.* (2008) constataram que o risco de bovinos se infectarem por *N. caninum* foi 2,8 vezes maior em propriedades de gado de corte do que nas de gado de leite. Isso pode ser explicado pelo fato de as propriedades de gado de leite possuírem maior controle sanitário do rebanho. No mesmo estudo, observaram que cães utilizados para o pastoreio apresentaram maior prevalência do que os de companhia ou guarda; esse resultado reflete o fato de que, quanto mais contato dos cães com os bovinos, mais chances de aquisição do *N. caninum*.

Ainda não há estudos suficientes que possam associar a ocorrência de anticorpos anti-*N. caninum* em cães e a dieta oferecida a eles. Em estudo, Cañón-Franco *et al.* (2003) não encontraram efeito

da dieta sobre a ocorrência do *N. caninum*. Já Patitucci *et al.* (2001) observaram que cães que tiveram acesso a animais abatidos de forma clandestina, ou foram alimentados com carne crua, tiveram um risco 2,6 vezes maior de serem soropositivos, em comparação a cães que se alimentavam à base de comida caseira ou comercial. Os cães deste estudo eram alimentados com comida caseira e com carne crua de bovinos abatidos nas propriedades.

4 CONCLUSÃO

Apenas 10% dos animais avaliados foram positivos para *Neospora caninum*, pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os cães, mesmo os assintomáticos, são os principais responsáveis pela transmissão de *Neospora caninum* para os bovinos, causando inúmeros prejuízos para a bovinocultura de leite.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. **Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti-*Lepstospira spp* em bovinos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia: estudo de possíveis fatores de risco.** 2004. 118 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; RODRIGUES, A. A. R.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; ERNEY, P. C.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 142, n. 1-2, p. 71-77, 2006.
- BARBER, J. S.; TREES, A. J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 57-64, 1998.
- BERTOCCO, B. P.; BERTOCCO, C. P. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**, Garça - SP, ano VI, n. 10, p. 1-8, jan. 2008.
- BRESCIANI, K. D. S.; NUNES, C. M.; MOURA, A. B.; SERRANO, A. C. M.; STOBBE, N.; PERRI, S. H. V.; GENNARI, S. M.; COSTA, A. J. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães de região urbana de Araçatuba, SP. **Parasitology Research**, [S. l.], 2006.
- CAÑON-FRANCO, W. A.; BERGAMASCHI, D. P.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; SOUZA, S. L. P.; SILVA, J. C. R.; PINTER, A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 115, n. 1, p. 71-74, 2003.
- CHEADLE, M. A. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 85, p. 235-330, 1999.
- CARDOSO, J. M. S. **Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista.** 2010. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina

- Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CUNHA FILHO, N. A.; SILVA, A. L.; PAPPEN, F. G; RAGOZO, A. M. A.; GENNARI, S. M.; JUNIOR, T. L.; FARIAS, N. A. R. Fatores de risco e prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães urbanos e rurais do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal - SP, v. 17, n. 1, p. 301-306, set. 2008.
- DUBEY JP, KOESTNER A, PIPER RC. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 197, p. 857-860, 1990.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; LAPINN, M. R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: GREENE C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2006. p. 768-774.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p. 1-59, 1996.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 323-367, abr. 2007.
- DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988b.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) são altamente suscetíveis à infecção oral com oocistos de *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 86, p. 165-168, 2000.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, E. A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 192, p. 1269-1285, 1988a.
- GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 159-161, 2004.
- GUIMARÃES, M. S. **Ciclo silvestre de *Neospora caninum* e sua importância na epidemiologia para os animais domésticos**. 2011. 26 f. Seminário (Seminários Aplicados do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal), Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- HEMPHIL, A.; GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 882, p. 497-504, 1996.
- KATO, D. M. P. **Neosporose bovina**. 2009. 33 f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Bovinos),

- Universidade Castelo Branco, Piracicaba, 2009.
- LABRUNA, M. B.; PENA, H. F. J.; SOUZA, S. L. J.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R. RAGOZO, A. M. A.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 183-193, abr. 2006.
- LATHE, C. L. *Neospora caninum* in British dogs. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 134, n. 20, p. 532, 1994.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 82, n. 4, p. 327-333, 1999.
- LLANO, H. A. B. **Neosporose bovina**. 2013. 46 f. Seminário (Seminários Aplicados do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal), Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLS, R. A.; MACGUIRE, A. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 28, n. 9, p. 1473-1478, set. 1998.
- OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F. C.; OLIVEIRA, J.; MONTEIRO, L. A. R. C.; ANDREOTTI, R. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 133-138, 2007.
- PATITUCCI, A. N.; PÉREZ, M. J.; ROZAS, M. A.; ISRAEL, K. F. Neosporosis canina: presencia de anticueros sericos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 227-232, 2001.
- SAWADA, M.; PARK, C. H.; MORITA, T.; SHIMADA, A.; YAMANE, I.; UMEMURA, T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, [S. l.], v. 60, n. 07, p. 853-854, 1998.
- SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES JR, J. S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Paraná, Brazil. **Journal of Parasitology**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 408-409, 2002.
- TEIXEIRA, W. C.; SILVA, M. I. S.; PEREIRA, J. G.; PINHEIRO, A. M.; ALMEIDA, M. A. O.; GONDIM, L. F. P. Frequência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 685-687, ago. 2006.
- VARDELEON, D.; MARSH, A. E.; THORNE, J. G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON, P. J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 95, n. 2-4, p. 273-282, 2001.
- VARANDAS, N. P., RACHED, P. A., COSTA, G. H. N., SOUZA, L. M.,

CASTAGNOLLI, K. C., COSTA, A. J.
Frequência de anticorpos anti-*Neospora*
caninum e anti *Toxoplasma gondii* em cães
da região nordeste do estado de São

Paulo: correlação com neuropatias.
Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.
22, n. 1, p. 105-111, 2001.

Investigação da paratuberculose em rebanhos de fêmeas bubalinas

Investigation of paratuberculosis in herds of buffalo females

Josimar dos Reis Santana¹; Breno Vinícius Gonçalves da Silva¹; Fellipe Caldas Rodrigues¹; João Paulo Ferreira Gomes¹; Mariana Assunção de Souza²

1 Bacharel em Medicina Veterinária. Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam

2 Doutora em Ciências Veterinárias. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

E-mail: marianaa@unipam.edu.br (autora correspondente).

Resumo: A paratuberculose é considerada uma doença de origem infecciosa de caráter crônico, que acomete ruminantes domésticos e selvagens. O agente causador dessa enfermidade, também conhecida como Doença de Johne, é o *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), que causa enterite granulomatosa nos animais infectados. As principais manifestações clínicas observadas são a diarreia crônica profusa e a perda de peso, sem redução do apetite. Objetivou-se com este estudo realizar a investigação da paratuberculose em rebanhos bubalinos leiteiros das regiões do Alto Paranaíba e Noroeste de Minas Gerais. Foram coletadas amostras em 54 búfalas, provenientes de cinco rebanhos de propriedades diferentes. De cada animal foram colhidas amostras de sangue, leite e fezes. Para a detecção de anticorpos anti-Map, utilizou-se o teste ELISA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IDEXX®. As amostras de fezes foram fixadas em lâminas de vidro e coradas através da técnica de Zielh Neelsen. Não foram detectados anticorpos anti-Map em nenhuma das amostras de leite ou soro sanguíneo e também não foi identificada a presença de bacilos álcool-ácido-resistentes nas amostras de fezes. São poucos os estudos a respeito da paratuberculose em rebanhos bubalinos. Em Minas Gerais ainda não foi relatada a infecção em búfalos, sendo necessário, portanto, mais estudos com maior quantidade de animais e de propriedades para que seja possível estabelecer a real prevalência da infecção no Estado.

Palavras-chave: búfalas; fezes; *Mycobacterium avium* subsp; *Paratuberculosis*.

Abstract: Paratuberculosis is considered a chronically infectious disease that affects domestic and wild ruminants. The causative agent of this disease, also known as Johne's disease, is *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (Map), which causes granulomatous enteritis in infected animals. The main clinical manifestations observed are chronic profuse diarrhea and weight loss without a reduction in appetite. The aim of this study was to investigate paratuberculosis in dairy buffalo herds in the Alto Paranaíba and Northwest regions of Minas Gerais. Samples were collected from 54 female buffaloes from five different herds. Blood, milk and fecal samples were collected from each animal. The IDEXX® *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA test was used to detect anti-Map antibodies. Fecal samples were fixed on glass slides and stained using the Zielh Neelsen technique. No anti-Map antibodies were detected in any of the milk or blood serum samples, and no acid-fast bacilli were identified in the fecal samples. There are few studies on paratuberculosis in buffalo herds. In Minas Gerais, infection in buffaloes has not yet been reported, necessitating further studies with a larger numbers of animals and herds to establish the true prevalence of the infection in the state.

Keywords: buffaloes; feces; *Mycobacterium avium* subsp; *Paratuberculosis*.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, é cada vez mais comum o consumo de produtos oriundos de bubalinos, como o queijo. Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB, 2022), observa-se crescimento anual de 20 a 30%. De acordo com Pignata *et al.* (2014), isso se deve à maior concentração de gordura, proteína, lactose e sólidos totais no leite das búfalas em relação ao leite de vacas, tornando-se, assim, possível produzir mais peças com menor quantidade de leite. Porém, é necessário que o rebanho tenha uma boa saúde. Entre as doenças que afetam a sanidade, destaca-se a paratuberculose.

Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, existem no Brasil 4 raças reconhecidas: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Carabao, sendo a raça Murrah considerada de maior aptidão leiteira; já as outras são de dupla aptidão (carne e leite). No ano de 2017, a população de búfalos no Brasil era de 1.381.395 cabeças de todas as raças. Na região Norte, há a maior quantidade de animais, sendo que o estado que lidera é o Pará, com 37,16%. Minas Gerais ocupa a sexta posição, com 66.613 cabeças de bubalinos, o que corresponde a 4,82% do rebanho nacional (IBGE, 2017).

Essa importante representatividade no mercado agropecuário alerta para adoção de medidas sanitárias como investigação de doenças nos rebanhos, para garantir competitividade e qualidade aos produtos. A paratuberculose, também conhecida como doença de John, é uma enfermidade que acomete mamíferos, geralmente ruminantes domésticos ou selvagens. É causada pelo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)

descrito como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (MOTA *et al.*, 2010). O lugar de preferência para replicação do Map são os macrófagos da lâmina própria do intestino delgado e grosso; sua principal característica é a enterite granulomatosa crônica e infecciosa. A eliminação do agente ocorre através de fezes, leite e colostro de animais infectados (SILVA FILHO *et al.*, 2018).

De acordo com Medeiros *et al.* (2012), a introdução do agente no organismo do animal geralmente ocorre de forma fecal-oral. Os primeiros 6 meses de idade é o período de maior risco de contrair a doença; animais nessa faixa etária se tornam alvos fáceis para o Map, pois, durante a amamentação, podem se infectar através de tetos e úberes sujos com fezes de fêmeas infectadas (MEGID, 2016). Outra forma de transmissão é pela via vertical, pois as fêmeas com sinais clínicos da paratuberculose podem passar aos fetos, que já nascem portadores do Map (FISS *et al.*, 2015).

As manifestações clínicas da paratuberculose são mais comuns em animais adultos. Geralmente surgem após 3 anos da infecção, porém o período de incubação pode variar de seis meses a quinze anos. A sintomatologia apresentada por um animal doente é principalmente a diarreia profusa e crônica, além de emagrecimento progressivo e morte, tornando-se vulneráveis ao aparecimento de novas doenças. Animais acometidos pela forma subclínica causam perda econômica para o produtor devido à queda da produtividade e à redução de fertilidade (YAMASAKI *et al.*, 2013).

A doença pode ser diagnosticada através de diagnóstico direto por meio de isolamento da bactéria, em amostras de fezes, leite ou tecidos; também pode ser

realizada baciloscopia e/ou técnicas moleculares. O cultivo microbiológico apresenta alta sensibilidade, porém o tempo para crescimento do agente varia de 6 a 12 semanas. O isolamento do bacilo nas fezes apresenta elevada especificidade, mas a eliminação do agente é afetada de acordo com o estágio (clínico/subclínico) da doença (MEGID, 2016).

Exames de necropsia e histopatológico podem ser empregados. Animais que apresentam parede intestinal espessa ou ondulada semelhantes a circunvoluções cerebrais são considerados suspeitos. A confirmação se dá através da identificação de infiltrados de células epitelioides e macrófagos na lâmina própria, placas de Peyer, vasos linfáticos ou linfonodos regionais, pois essas alterações são consideradas patognomônicas. A imunoistoquímica é outra alternativa de diagnóstico, sendo eficaz em estudos com bovinos de abatedouros, no entanto apresenta reações falso-positivas com certos actinomicetos (MEGID, 2016).

Métodos indiretos também são utilizados, como o teste imunoalérgico e os sorológicos. O teste imunoalérgico é realizado através da inoculação de PPD aviário na tábua do pescoço para verificação de resposta alérgica; é um exame fácil de ser realizado, mas pode resultar em reações falso-positivas devido a micobactérias ambientais. O teste sorológico de fixação de complemento é utilizado como método-padrão, entretanto, devido à sua especificidade relativa, os animais positivos deverão ser confirmados por cultura microbiana. O método de ELISA é indicado para monitoramento do rebanho e, devido à presença de outras micobactérias, pode-

se ter resultados falso-positivos (MEGID, 2016).

A paratuberculose na espécie bubalina foi descrita pela primeira vez no Brasil no estado de Pernambuco. Em estudo realizado por Mota *et al.* (2010), foram coletadas amostras de fezes de 5 animais com sintomatologia similar à da paratuberculose; após realizar esfregaço e coloração através da técnica de Ziehl-Neelsen (ZN), ficou comprovado que os animais estavam infectados.

Objetivou-se com este estudo realizar a investigação da paratuberculose em rebanhos leiteiros de fêmeas bubalinas provenientes da região do Alto Paranaíba e Noroeste de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CEUA

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), sob o Protocolo n. 13/19.

2.2 LOCAL E ANIMAIS

O estudo foi realizado em 5 rebanhos leiteiros bubalinos dos municípios de Presidente Olegário, São Gonçalo do Abaeté, Campos Altos e Córrego Danta – região do Alto Paranaíba e Noroeste, estado de Minas Gerais. Foram avaliadas búfalas, de diferentes raças e idades, que se encontravam em período de lactação. Os animais foram selecionados aleatoriamente, conforme a disponibilidade do produtor e da fazenda.

Ao todo foram coletadas 54 amostras, sendo que na região Noroeste

foram colhidas amostras de 39 animais de quatro fazendas. Em duas propriedades, a ordenha das fêmeas era realizada diariamente na parte da manhã; nas outras duas, o intuito da criação era voltado principalmente para carne; as fêmeas permitiam ser ordenhadas, porém, por opção dos proprietários, não era realizada todos os dias. Na região do Alto Paranaíba, foram realizadas 15 coletas em uma única propriedade cuja principal atividade era a produção de leite. Nessa fazenda, era realizada a ordenha mecânica nas búfalas, uma vez ao dia no período da manhã. Todos os animais da amostra eram criados em sistema extensivo.

2.3 AMOSTRAS

Para coleta das amostras biológicas, os animais foram contidos em bretes, com cordas e, posteriormente, coletados aproximadamente 5 mL de sangue por meio de punção da veia coccígea, mamária ou jugular, com tubo vacutainer sem anticoagulante, adaptador e agulha 25mm x 0,8mm, estéril. O sangue foi mantido sob refrigeração em caixas de isopor com gelo, em seguida encaminhado para o Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), onde foi centrifugado a 3.500rpm durante dez minutos para a extração do soro. As amostras de soro foram congeladas em tubo de polietileno com fundo cônico em uma temperatura de -20°C até a realização do exame.

Amostras de fezes foram colhidas diretamente na ampola retal; em seguida, realizado esfregaço em lâminas com auxílio de Swab. As lâminas prontas foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas e realizada a

coloração, através da técnica de Ziehl-Neelsen para identificação dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

As amostras de leite foram colhidas dos 4 tetos mamários da fêmea, excluindo o primeiro jato, sendo colocados diretamente em tubo coletor universal estéril. Após isso, as amostras de leite foram imediatamente acondicionadas em uma caixa de isopor com gelo. No mesmo dia das coletas, o leite foi congelado e retirado apenas no dia de realização do exame.

2.4 TESTES DE DIAGNÓSTICO

Para a detecção de anticorpos anti-Map nas amostras de soro e leite, utilizou-se o kit comercial de ELISA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Antibody Test - IDEXX®. Os testes foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras utilizadas como controles positivo (CP) e negativo (CN) foram diluídas em placa não impregnada na proporção 1:20 e pré-incubadas por 2 horas à temperatura de 22°C. Em seguida, transferidos 100µL do conteúdo das cavidades à placa impregnada, a qual foi incubada por 45 minutos. Posteriormente, o conteúdo líquido das cavidades foi removido e foram realizadas 4 lavagens com solução de lavagem própria do kit. Em seguida, adicionaram-se então 100µL do conjugado HRPO na proporção 1:100, e a placa novamente ficou incubada por 30 minutos. Após isso, realizou-se a remoção do conteúdo líquido e procedida lavagem por 3 vezes. Posteriormente, adicionaram-se 100µL do substrato TMB e a placa foi incubada durante 10 minutos.

Ocorreu parada da reação com a adição de 100µL de solução de interrupção. Os valores de densidade óptica (DO) das amostras e controles foram medidos em espectrofotômetro de placas a 450nm.

O cálculo dos resultados foi determinado pela relação: $100 \times [(Amostra A(450) / CN(DO 450)) / (CP \times CN(DO 450))]$. Para interpretação dos resultados considerou-se os seguintes parâmetros: amostras com relação A/P% $\leq 45\%$ Negativas; $45\% < A/P\% < 55\%$ Suspeitas e $A/P\% \geq 55\%$ Positivas.

2.5 COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

Os esfregaços de fezes foram fixados à chama em bico de Bunsen e, em seguida, cobertos pelo corante fucsina fenicada. Em seguida, realizou-se o aquecimento das lâminas em placa aquecedora até liberar vapores. Após serem lavadas em água corrente, a descoloração foi realizada durante dois minutos, com solução de álcool-ácido. Após isso, o esfregaço foi coberto com o corante azul de metileno por dois minutos. Outra lavagem foi realizada em água corrente e, em seguida, foram secadas em papel filtro. As lâminas foram examinadas no microscópio óptico com objetiva de imersão (100 x) (ZIMMER *et al.*, 1999).

A classificação dos esfregaços em negativos ou positivos foi feita de acordo com a presença ou ausência de BAAR característicos (ADÚRIZ, 1993): negativo - ausência de BAAR compatíveis com Map; e positivo - presença de BAAR de morfologia atípica ou de grande quantidade de BAAR de forma isolada ou presença de agregados de BAAR compatíveis com o agente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realização dos exames de ELISA para identificação de anticorpos Anti-Map em amostras de soro sanguíneo e leite, ficou constatado que nenhum animal foi reagente ao teste. Ao analisar as lâminas de esfregaço da mucosa retal dos animais, também não foi identificada a presença de BAAR.

O primeiro relato de paratuberculose foi descrito em uma vaca de 6 anos de idade na Alemanha, no ano de 1895, por Johne e Fronthingan, e atualmente é uma doença considerada de distribuição cosmopolita, e que acomete grandes e pequenos ruminantes. Acredita-se que a infecção esteja presente em 30 a 50% do rebanho de ruminantes do mundo (BRITO *et al.*, 2014). Na Colômbia, o primeiro relato de bubalino positivo foi descrito por Tuberquia *et al.* (2015).

Souza *et al.* (2021) avaliaram a situação epidemiológica da paratuberculose bovina (PTB) em rebanhos leiteiros localizados na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais. Amostras sanguíneas de 236 vacas, provenientes de 40 rebanhos, foram avaliadas por meio dos testes de ELISA. A soroprevalência de anticorpos anti-Map foi de 20% para os rebanhos e 6% para os animais. Os fatores de risco associados à doença foram: manejo de bezerros junto com adultos ($p < 0,0001$) e contato dos bezerros com fezes de animais adultos ($p = 0,0258$).

Costa *et al.* (2010) realizaram levantamento através da sorologia (ELISA indireto) em bovinos provenientes de 24 rebanhos do Espírito Santo. Ao todo reuniram 1.450 amostras em 4 mesorregiões do Estado. Após realização dos exames, obtiveram 165

amostras positivas, o que corresponde a 11,4% do total de animais avaliados. Entre as mesorregiões, em duas não foi encontrado nenhum bovino positivo.

Estudos realizados por Medeiros *et al.* (2012), em 734 amostras de caprinos, proveniente de 32 propriedades de 10 municípios do semiárido paraibano, identificaram 330 animais reagentes ao teste sorológico ELISA indireto, com prevalência de 44,96%; em uma das propriedades analisadas não encontraram nenhum caprino positivo.

A paratuberculose ainda tem poucos relatos de casos em búfalos no Brasil. O primeiro foi descrito por Mota *et al.* (2010) no Estado de Pernambuco, onde dos 100 animais da propriedade, 5 apresentavam sintomatologia característica da doença, nestes animais foi realizado esfregaço de fezes e identificado a presença de BAAR. Dois animais foram necropsiados e realizado o raspado da mucosa intestinal e *imprint* de linfonodos, em ambos se obteve resultados positivos.

No Rio Grande do Sul, em estudos realizados por Dalto *et al.* (2012) foram coletadas amostras sanguíneas de 136 búfalos, para realização do teste ELISA indireto a fim de detectar presença de anticorpos anti-Map no soro sanguíneo destes animais. O resultado obtido foi de 21 animais positivos, constatando prevalência de 15,45%. Na propriedade ainda havia 6 animais com sintomatologia compatível a da paratuberculose, os quais também foram incluídos nos exames e todos deram resultado positivo. Segundo relatos do proprietário da fazenda, desde 2004 havia animais com perda de peso progressiva e diarreia crônica.

Brito *et al.* (2016) identificaram rebanhos de bubalinos infectados nos

estados do Maranhão e Alagoas, em propriedades com histórico de animais que apresentavam sintomatologia característica da doença. Entre os fatores de risco da transmissão observados nessas propriedades, os autores citaram o acesso coletivo a áreas de pântanos, bezerros sendo alimentados coletivamente por uma única búfala e o livre comércio de animais na região.

Em estudo realizado por Souza *et al.* (2016), foi detectada a presença de BAAR em amostras de leite de cabras, submetidas ao teste PCR. Ainda não foi relatada a presença em leite de búfalas, porém Albuquerque (2018) identificou Map viável em queijo tipo coalho oriundo de leite de fêmeas bubalinas.

Ainda permanece a suspeita de que Map seja o agente causal da doença de Crohn em humanos. Essa doença é caracterizada por uma enterite inflamatória granulomatosa crônica, nas regiões do jejuno e íleo (MEGID *et al.*, 2016). Alguns autores relacionam as duas doenças, em estudos realizados por Martinho (2012) foi possível a detecção de Map em amostras sanguíneas de pacientes com a doença de Crohn.

A baixa prevalência de búfalos diagnosticados com paratuberculose pode ser explicada ao se comparar a outras espécies, pois os bubalinos são mais resistentes a essa infecção (SIVAKUMAR *et al.*, 2005). Em Minas Gerais, ainda não há estudos publicados sobre a ocorrência da infecção em bubalinos. Em estudo realizado com bovinos, por Carvalho (2008), no município de Viçosa (MG), foram identificados animais positivos. De 204 amostras colhidas para exame ELISA, duas amostras de soro sanguíneo tiveram resultado positivo, e no leite não foram

identificados anticorpos em nenhuma das amostras.

A transmissão da doença através da eliminação do agente por fezes dos bezerros é considerada rara. Porém, em estudo realizado por Wolf *et al.* (2015), pôde-se confirmar a presença do agente em amostras de fezes de bezerros. Caso a

doença tivesse sido diagnosticada neste trabalho, a aglomeração desses animais seria um risco iminente na disseminação da doença. Os fatores predisponentes puderam ser observados em uma propriedade leiteira do município de Córrego Danta (MG), 2019, onde foi realizado o estudo (Figura 1).



Figura 1: Fatores predisponentes: (A) aglomeração de bezerros em curral de manejo; (B) búfala amamentando mais de um bezerro; (C) aglomeração de búfalos adultos em local alagado

Os búfalos não suportam altas temperaturas, em dias mais quentes procuram lugares alagados para se refrescarem dentro da água, isto é um fator de risco muito importante na transmissão do agente, pois, além de ficarem aglomerados, ainda defecam na água, o que facilita a sua veiculação. Outros fatores importantes a serem levados em consideração é o bezerro ao pé da búfala durante a ordenha, pois, esses animais não aceitam serem ordenhados sem a presença do bezerro e há aceitação por parte da fêmea de mais de um bezerro (DALTO *et al.*, 2012).

3 CONCLUSÃO

Na região investigada, não foi observada a ocorrência de anticorpos anti-Map nos rebanhos bubalinos. No Brasil, são poucos os estudos a respeito da doença nessa espécie; em Minas Gerais, ainda não foi relatada a infecção em

búfalos. São necessários, portanto, mais estudos com maior quantidade de animais e de propriedades, para que seja possível estabelecer a real prevalência da infecção no estado.

REFERÊNCIAS

- ABCB. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. **Exportações e importações**. Disponível em: <https://bufalo.com.br/exportacoes-e-importacoes/>.
- ADÚRIZ, J. J. **Epidemiologia, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco**. 1993. Tese (Doutorado), Universidade de Zaragoza, Saragoça - Espanha, 1993.
- ALBUQUERQUE, P. P. F. **Ocorrência de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* viável do tipo Cattle**

subtipo Bison em queijo coalho de búfala proveniente de Alagoas, Brasil.

2018. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2018.

BRITO, M. F.; MOTA, R. A.;
YAMASAKI, E. M. **Paratuberculose:**
perguntas e respostas. 2014. Disponível
em:
<http://institucional.ufrj.br/sap/files/2014/12/cartilha-PARATUBERCULOSE-Perguntas-e-Respostas-out-2014.pdf>.

BRITO, M. F.; BELO-REIS, A. S.;
BARBOSA, J. D.; UBIALI, D. G.; PIRES,
A. P. C.; MEDEIROS, E. S.; MELO, R. P.
B.; ALBUQUERQUE, P. P. F.;
YAMASAKI, E.; MOTA, R. A.
Paratuberculosis in buffaloes in
Northeast Brazil. **Tropical Animal
Health and Production**, [S. l.], v. 48, p.
1497-1501, 2016.

CARVALHO, I. A. **Isolamento e
detecção molecular de Mycobacterium
avium subespécie paratuberculosis
(MAP) em rebanhos bovinos leiteiros
na região de Viçosa - MG.** 2008. 72 f.
Dissertação (Mestrado em Medicina
Veterinária), Universidade Federal de
Viçosa, Viçosa, 2008.

COSTA, J. C. M.; PIERI, F. A.; SOUZA, C.
F.; ESPESCHIT, I. F.; FELIPPE, A. G.;
SANTOS, G. M.; TOBIA, F. L.; SULVA
JUNIOR, A.; MOREIRA, M. A. S.
Levantamento sorológico de
Mycobacterium avium subesp.
paratuberculosis em bovinos leiteiros no
estado do Espírito Santo. **Arquivo
Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p.
1491-1494, dez. 2010.

DALTO, A. G. C.; BANDARRA, P. M.;
PAVARINI, S. P.; BOABAID, F. M.;
BITENCOURT, A. P. G.; GOMES, M. P.;
CHIES, J.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E.
F. Clinical and pathological insights into
Johnes' disease in buffaloes. **Tropical
Animal Health and Production**, [S. l.], v.
44, p. 1899-1904, 2012.

FISS, L.; SANTOS, B. L.;
ALBUQUERQUE, P. P. F.; MOTA, R. A.;
MARCOLONGO-PEREIRA, C.;
ADRIEN, M. L.; SOARES, M. P.;
SCHILD, A. L. Paratuberculose em
bovinos de corte na região Sul do Rio
Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária
Brasileira**, Pelotas, v. 5, n. 35, p. 437-442,
maio 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e
Estatística. **Tabela 3939 - efetivo dos
rebanhos, por tipo de rebanho.** 2017.
Disponível em:
<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>.

MARTINHO, A. P. A. **Rastreamento de
Mycobacterium avium subsp.
paratuberculosis na Doença de Crohn.**
2012. 47 f. Dissertação (Mestrado em
Ciências Farmacêuticas), Universidade
Fernando Pessoa, Porto, 2012.

MEDEIROS, J. M. A.; GARINO JUNIOR,
F.; MATOS, R. A. T.; COSTA, V. M. M.;
RIET-CORREA, F. Frequência de
anticorpos para paratuberculose em
bovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Patos -
PB, v. 8, n. 32, p. 697-700, ago. 2012.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.
**Doenças infecciosas em animais de
produção e de companhia.** Rio de
Janeiro: ROCA, 2016.

- MOTA, R. A.; PEIXOTO, P. V.; YAMASAKI, E. M.; MEDEIROS, E. S.; COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. M.; BRITO, M. F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Recife, v. 3, n. 30, p. 237-242, mar. 2010.
- PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S. A. A.; FERRÃO, S. P. B.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 226-233, set. 2014.
- SILVA FILHO, G. B.; CHAVES, H. A. S.; AIRES, L. D'A.; BRAGA, T. C.; RIBEIRO, D. P.; RIZZO, H.; CAMARGO, L. M.; BRITO, L. B.; SANTA ROSA, M. G.; EVENCIO NETO, J.; MENDONÇA, F. S. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em um rebanho de bovinos na Zona da Mata de Pernambuco. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 11, n. 4, p. 247-251, fev. 2018.
- SIVAKUMAR, P.; TRIPATHI, B. N.; SINGH, N. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 108, n. 3-4, jul. 1, p. 263-270. 2005.
- SOUZA, M. C. C.; LIMA, M. C.; BRAGA, I. F. E.; SCHWARZ, D. G. G.; RODRIGUES, A. P. S.; SALES, E. B.; FONSECA JUNIOR, A. A.; MOREIRA, M. A. S. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 140, p. 18-21, 2016.
- SOUZA, M. A.; SILVA, B. A.; NASCIMENTO, C. F.; REIS, I. J.; REIS, M. P.; JUNIOR FILHO, H.; AZEVEDO, A. L.; CASTRO, J. R.; LIMA, A. M. C. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and bovine leukemia virus seroprevalence and associated risk factors in dairy herds in Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 73, n. 2, p. 508-512, mar. 2021.
- TUBERQUIA, B. C.; URIBE, F. M.; RAMIREZ, N. A.; FERNANDEZ, J. Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y exploración de factores asociados en una población de búfalos del municipio de Gómez Plata, Antioquia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, [S. l.], v. 28, supl. 105, 2015.
- WOLF, R.; OSEL, K.; DE BUCK, J.; BARKEMA, H.W. Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 46, p. 71-79, 2015.
- YAMASAKI, E. M.; BRITO, M. F.; MOTA, R. A.; MCINTOSH, D.; TOKARNIA, C. H. Paratuberculose em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 33, p. 127-140, fev. 2013.
- ZIMMER, K.; DRAGER, K. G.; KLAWONN, W.; HESS, R. G. Contribution to the diagnosis of Johne's Disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen Staining,

Faecal Culture and a commercially available DNA-Probe® Test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces

from cattle. **Journal of Veterinary Medicine - Series B**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 137-140, 1999.

Alterações renais em cães diagnosticados com leishmaniose visceral canina em Patos de Minas (MG)

Renal alterations in dogs diagnosed with canine visceral leishmaniasis in Patos de Minas (MG)

Tayná Mariane dos Anjos Rocha¹; Nicolle Pereira Soares²; Nadia Grandi Bombonato³; Vanessa Pereira⁴

1 Médica Veterinária. Pós-graduada em Defesa Sanitária.

E-mail: taynamariane01@hotmail.com (autora correspondente).

2 Doutora em Ciências Veterinárias com ênfase em Patologia Animal. Patologista Veterinária.

3 Doutora em Ciências Veterinárias. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

4 Médica Veterinária. Coordenadora de Centro de Controle de Zoonoses de Patos de Minas - MG.

Resumo: A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença zoonótica de grande importância devido à sua alta letalidade. No Brasil, a LVC é causada pelo protozoário *Leishmania chagasi*, transmitida ao homem e a animais por meio de insetos da família dos flebotomíneos; a espécie *Lutzomyia longipalpis* é a principal responsável pela sua dispersão. A LVC tem uma característica multissistêmica, ou seja, tem a capacidade de afetar diversos órgãos, como os rins. As lesões renais são comuns em cães acometidos por essa doença, podendo ser a principal causa de morte desses animais. Foram utilizados cinco animais provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Patos de Minas (MG). Todos os animais deste trabalho foram considerados positivos para LVC de acordo com as técnicas de diagnóstico utilizadas pelo CCZ: teste rápido DPP® (Bio-Manguinhos) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Foram coletadas amostras de sangue para mensuração das concentrações de ureia e creatinina e fragmentos renais para processamento de lâminas histopatológicas. Os níveis de ureia e creatinina apresentaram-se aumentados em 60% e 40%, respectivamente. Na análise microscópicas, todos os animais apresentaram lesões renais, sendo a nefrite intersticial o tipo mais comum, presente em 100% (5/5) dos animais, seguido por glomerulonefrite membranosa em 80% (4/5) dos animais, glomerulosclerose em 60% (3/5) dos animais e glomerulonefrite membranoproliferativa em 20% (1/5) dos animais. Os resultados encontrados indicam um acometimento renal nesses animais causado pela *Leishmania*.

Palavras-chave: creatinina; glomerulonefrite; histopatológico; ureia.

Abstract: Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a zoonotic disease of great importance due to its high fatality rate. In Brazil, CVL is caused by the protozoan *Leishmania chagasi*, transmitted to humans and animals through insects of the Phlebotominae family; the species *Lutzomyia longipalpis* is primarily responsible for its spread. CVL has a multisystemic characteristic, meaning it has the ability to affect various organs, including the kidneys. Renal lesions are common in dogs affected by this disease and can be the leading cause of death in these animals. Five animals from the Zoonosis Control Center of Patos de Minas (MG) were used in this study. All animals included in this study were diagnosed as positive for CVL based on diagnostic techniques used by the ZCC: DPP® rapid test (Bio-Manguinhos) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Blood samples were collected to measure urea and creatinine concentrations, and renal fragments were processed for histopathological slides. Urea and creatinine levels were increased in 60% and 40% of the cases, respectively. Microscopic analysis revealed renal lesions in all

animals, with interstitial nephritis being the most common type, present in 100% (5/5) of the animals, followed by membranous glomerulonephritis in 80% (4/5) of the animals, glomerulosclerosis in 60% (3/5) of the animals, and membranoproliferative glomerulonephritis in 20% (1/5) of the animals. The results indicate renal involvement in these animals caused by *Leishmania*.

Keywords: creatinine; glomerulonephritis; histopathological; urea.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* sp, sendo eles tripanossomídeos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (BARATA *et al.*, 2005). A LVC é endêmica em mais de 98 países, acometendo mais de 1 milhão de pessoas por ano e ocasionando ameaças consideráveis à saúde pública (ELSHEIKHA, 2016).

A prevalência da LVC no Brasil varia de 4% a 75% e tal variação se dá aos sintomas inespecíficos, região, métodos de diagnóstico e subdiagnósticos (MARCONDES; ROSSI, 2013).

Os protozoários causadores da LVC, como descrito por Michalick e Genaro (2005), são organismos pleomórficos, ou seja, encontram-se na forma promastigota nos hospedeiros invertebrados e na forma amastigota (aflagelada) nos hospedeiros vertebrados. Além disso, apresentam um ciclo de vida heteróxico, isto é, necessita de dois hospedeiros, sendo um invertebrado (inseto vetor) e outro vertebrado para que seu ciclo de vida esteja completo (ROZE, 2005; TOMÁS; ROMÃO, 2008). No Brasil, existem duas espécies de flebotomos capazes de transmitir a doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, estando eles infectados pela *Leishmania chagasi* (BRASIL, 2014).

Por ser uma doença crônica, sua evolução é lenta nos cães, e o aparecimento das manifestações clínicas pode levar de meses a vários anos e variam do aparente estado sadio à caquexia no estágio final da doença (AGUIAR *et al.*, 2007; TARTAROTTI *et al.*, 2011).

Segundo Salzo (2008), a sintomatologia clínica mais comumente encontrada nos cães com LVC incluem perda de peso, anorexia, vômito, diarreia, epistaxe e melena. Já os principais achados do exame físico são a linfadenomegalia, caquexia, esplenomegalia, uveíte e conjuntivite (SALZO, 2008); de acordo com Aguiar *et al.* (2007), febre e apatia são também achados comuns no exame físico. Entretanto, Feitosa *et al.* (2000) observaram que, além dos achados descritos anteriormente, onicogribose é comumente encontrada em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.

As lesões renais são comuns em cães diagnosticados por LVC e podem ser uma das causas de morte natural nesses animais (MULLER *et al.*, 2001). Para avaliação da função renal, testes de mensuração da concentração plasmática de metabólitos normalmente excretados pelos rins, como a ureia e a creatinina, são considerados (LANIS *et al.*, 2008). Abreu-Silva *et al.* (2008), em um estudo avaliando ureia e creatinina em cães naturalmente infectados por *Leishmania*

chagasi, observaram um aumento de níveis plasmáticos de ureia; já a creatinina se manteve dentro da normalidade.

Achados como glomerulonefrite proliferativa difusa, aumento da celularidade dos tufo glomerulares e espessamento da cápsula de Bowman foram identificados em rins de cães com LVC; além do acometimento glomerular, alterações intersticiais e tubulares foram identificadas nesses cães (COSTA *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2005).

Por ser uma doença de alta letalidade e com capacidade de acometer diversos órgãos, principalmente os rins, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações bioquímicas (ureia e creatinina), as alterações macroscópicas e histológicas do rim de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal do Centro Universitário de Patos de Minas sob Protocolo n. 98/19.

Foram utilizados cinco animais provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Patos de Minas, Minas Gerais (CCZ), no período de março a julho do ano de 2019. Os animais foram selecionados de forma aleatória, de acordo com a casuística do CCZ. Todos animais deste trabalho foram considerados positivos para LVC de acordo com os métodos de diagnóstico utilizados pelo CCZ: teste rápido DPP® (Bio-manguinhos) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).

Os animais foram submetidos a exame clínico completo, e o sangue dos animais foi coletado na veia jugular, cefálica ou safena lateral, com auxílio de escalpe e seringas estéreis. As análises

bioquímicas de ureia e creatinina foram realizadas utilizando a máquina Microlab 300; a análise de creatinina foi realizada por calorimetria e da ureia por cinética.

Os animais foram eutanasiados de acordo com as normas de ética do CCZ, ou seja, foram devidamente contidos e posteriormente sedados com cloridrato de cetamina 10mg/kg e xilazina 1mg/kg por via intramuscular. Após esse procedimento, foi administrado tiopental na dose de 12,5mg/kg por via intravenosa. Após a verificação do status anestésico profundo, com perda de consciência, reflexo muscular e estímulos nocivos, foi administrado 1 a 2 mmol/kg de cloreto de potássio, com infusão rápida intravenosa. Posteriormente à eutanásia, os animais foram encaminhados para o Laboratório de Patologia Animal do Centro Clínico Veterinário (UNIPAM), onde foi realizada a necropsia. As alterações macroscópicas renais foram analisadas, fotografadas e registradas.

Amostras de aproximadamente 2cm³ dos rins direito e esquerdo foram coletadas, acondicionadas em formol 10% e fixadas por 48h. Posteriormente, foram encaminhadas ao laboratório de Histopatologia Animal para o processamento histológico de rotina do Centro Clínico Veterinário (CCV - UNIPAM).

O processamento histológico consistiu em etapas de desidratação em álcool etílico em concentração crescente (70 a 99,5%). Nos álcoois 70 e 85%, os tecidos permaneceram por 30 minutos seguidos de dois banhos de uma hora em álcool absoluto (99,5%). Para o clareamento ou a diafanização, as amostras foram imersas em xilol PA por 30 minutos, seguidos de dois banhos de 30 minutos cada um, em parafina líquida a 65°C. As amostras renais foram

incluídas em parafina líquida a aproximadamente 70°C. Após secagem, o bloco de parafina contendo o material biológico foi submetido a cortes de quatro micrômetros (µm) de espessura em micrótomo. Para secagem, as lâminas contendo o corte histológico permaneceram em estufa a aproximadamente 40°C por no mínimo duas horas. Os cortes histológicos foram corados em hematoxilina e eosina e analisados em microscópio utilizando objetivas de 10 e 40x.

As lesões renais microscópicas foram classificadas em proliferativas, membranosas, membranoproliferativas, glomeruloesclerose e nefrite intersticial (CHURG; BERNSTEIN; GLASSOCK, 1995; NEWMAN, 2013; COSTA *et al.*, 2003).

Utilizou-se estatística descritiva para apresentação das principais alterações bioquímicas e macroscópicas renais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos dos animais avaliados constam da Tabela 1.

Tabela 1: Dados epidemiológicos de cães diagnosticados com LVC, Patos de Minas (MG)

Animais	Raça	Idade	Sexo
1	SRD	9 anos	F
2	Poodle	4 anos	F
3	Pinscher	5 anos	M
4	Yorkshire	3 anos	M
5	Pastor Alemão	6 anos	M

Ciaramella *et al.* (1997) relataram que cães de raças miniaturas apresentam uma menor predisposição para essa doença, pelo fato de serem melhores

aceitos dentro das residências, evitando assim o contato com o vetor da doença.

Podem-se perceber variados sinais clínicos apresentados pelos animais. Dos cinco animais estudados, 60% (3/5) apresentaram mucosas hipocoradas, linfonodos aumentados de volume e hiperqueratose em região de pontas de orelhas, focinho e extremidades dos membros. Alopecia e onicogrifose foram notadas em 80% (4/5) dos animais. Outro sinal clínico encontrado foi conjuntivite, presente em 40% (2/5) dos animais.

De acordo com a literatura, os sinais clínicos em cães positivos para LVC são variáveis. Essa variação depende de vários fatores, como a resposta imune do animal, carga parasitária e outras doenças concomitantes que interferem na imunidade do animal (BARBOSA, 2011; MICHALICK; GENARO, 2005).

Os achados do exame físico descritos por Salzo (2008) são a linfadenomegalia, caquexia, esplenomegalia, uveíte e conjuntivite. Feitosa *et al.* (2000) observaram que, além dos achados descritos por Salzo (2008), são comumente encontradas alterações dermatológicas em cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp, como lesões em pontas de orelhas e focinho, alopecia. Além disso, hiporexia, onicogrifose, emaciação, mucosas pálidas, hipertermia, êmese e diarreia (FEITOSA *et al.*, 2000). Linfonodos aumentados de volume por alterações hipertróficas nas regiões corticais e medulares são outros achados clínicos comumente diagnosticados em cães sororreagentes para LVC (SILVA, 2007).

Quanto à análise macroscópica dos rins, foram identificadas áreas irregulares na superfície renal, áreas puntiformes de hemorragia em superfície

do órgão, estrias brancacentas em região de córtex renal e congestão (Tabela 2).

Essas alterações já foram descritas em estudos a priori (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; FERRARI *et al.*, 2010). Essas lesões macroscópicas

ainda sugerem, conforme Albuquerque *et al.* (2008) e Ferrari *et al.* (2010), nefrite intersticial. A nefrite intersticial ocorre quando agentes infecciosos se instalam nos túbulos renais e induzem uma resposta inflamatória.

Tabela 2: Alterações macroscópicas e microscópicas renais em cães diagnosticados com LVC em Patos de Minas (MG)

Animal	Macroscópicas	Microscópicas
1	Rim esquerdo e direito aumentados de tamanho, região medular avermelhada, região cortical pálida com estrias brancacentas	Nefrite intersticial intensa, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite membranosa, túbulos renais com núcleos de células em picnose, cariólise e cariorrexe, túbulos renais rompidos.
2	Sem definição da região córtico-medular, coloração pálida	Nefrite intersticial intensa, glomerulonefrite membranosa, glomeruloesclerose, túbulos renais com núcleos de células em picnose, cariólise e cariorrexe.
3	Áreas puntiformes esbranquiçadas	Glomeruloesclerose, necrose tubular (nefrose crônica), nefrite intersticial
4	Coloração pálida	Nefrite intersticial, glomerulonefrite membranosa, glomeruloesclerose, túbulos renais com núcleos de células em picnose, cariólise e cariorrexe.
5	Rim esquerdo e direito aumentados de tamanho, fluído sangue ao corte	Nefrite intersticial, glomerulonefrite membranosa, glomeruloesclerose, túbulos renais com núcleos de células em picnose, cariólise e cariorrexe.

A presença do parasita em órgão como o rim causa uma hipertrofia e hiperplasia das células do retículo endotelial, conseqüentemente causando o aumento destes órgãos (MALLA; MAHAJAN, 2006).

Em relação às alterações microscópicas, todos os cães apresentaram lesões renais, sendo a nefrite intersticial o tipo mais comum, presente em 100% (5/5) dos animais, seguido por glomerulonefrite membranosa em 80% (4/5) dos animais (Figura 1), glomeruloesclerose em 60% (3/5) dos animais (Figura 1) e glomerulonefrite membranoproliferativa em 20% (1/5) dos animais. A glomerulonefrite membranoproliferativa é a alteração mais comum relatada em

cães naturalmente infectados por LVC (WILSON *et al.*, 2017).

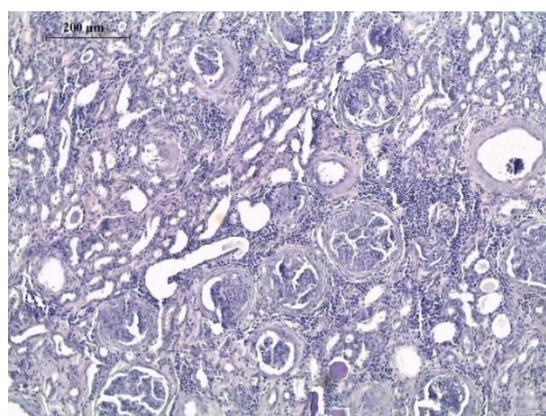


Figura 1: Fotomicrografia de rim de cão naturalmente infectado por Leishmaniose Visceral Canina. Glomerulonefrite e glomeruloesclerose, Patos de Minas (MG), 2019

Ainda, 80% (4/5) dos animais apresentaram túbulos renais com núcleos de células em picnose, cariólise e cariorrexe (Figura 2); 20% (1/5) dos animais revelaram túbulos renais rompidos e necrose tubular.

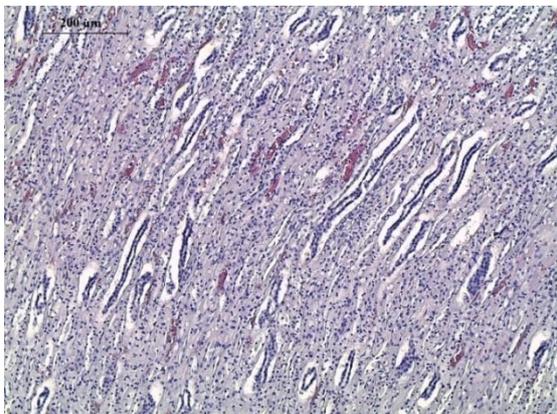


Figura 2: Fotomicrografia de rim de cão naturalmente infectado por Leishmaniose Visceral Canina. Túbulos renais com núcleos de células em picnose, cariólise e cariorrexe. Patos de Minas (MG), 2019

As glomerulonefrites membranosas são caracterizadas pelo espessamento e duplicação da membrana basal dos capilares glomerulares; entretanto, não há perda da arquitetura glomerular nem proliferação das células mesangiais (SOARES *et al.*, 2005).

No caso das glomerulonefrites membranoproliferativas, é possível visualizar alterações evidentes no mesângio e alças capilares glomerulares, causando principalmente espessamento e duplicação da parede dos capilares glomerulares e proliferação celular acentuada no tufo glomerular (COSTA *et al.*, 2003).

Já as características encontradas na glomerulonefrite proliferativa, como descrita por Costa *et al.* (2003), são proliferações globais e difusas de células mononucleadas no mesângio, ocasionando um aumento na matriz

mesangial. A glomeruloesclerose é caracterizada pela fibrose intersticial e periglomerular, contendo focos de infiltrado linfocitário e plasmocitário; nos glomérulos diminuem de tamanho e apresentam-se hialinizados pela presença de tecido conjuntivo fibroso, tornando-se afuncionais. Segundo Costa *et al.* (2003), a nefrite intersticial é caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório contendo principalmente linfócitos e histiócitos, o que está em conformidade com os achados deste estudo.

A presença da *Leishmania* no rim acarreta a deposição de imunocomplexos nos glomérulos, provocando uma glomerulonefrite crônica (SARIDOMICHELAKIS, 2009). Segundo Costa *et al.* (2000), essas condições de nefropatia nos animais podem ser causadas pela deposição de células T CD4+ na região glomerular e intersticial dos rins, tendo como consequência a insuficiência deles.

Segundo Feitosa *et al.* (2005), alterações morfológicas renais como picnose, cariólise ou cariorréxis são compatíveis com necrose isquêmica de células tubulares renais, causadas pela presença do agente etiológico da LVC no rim. A necrose ou nefrose tubular é um processo degenerativo tubular que leva à diminuição da filtração glomerular (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

As concentrações plasmáticas de ureia e creatinina apresentaram-se aumentadas em 60% (3/5) e 40% (2/5) dos animais, respectivamente (Tabela 3).

Sousa *et al.* (2011), avaliando 44 animais, verificaram que 15% dos cães infectados por *Leishmania chagasi* apresentavam os níveis de ureia aumentados, e em 11% níveis de creatinina aumentados, alterações essas que, em associação, configuram um

quadro de uremia, comprovando um comprometimento renal nos animais.

Tabela 3: Análise bioquímica de ureia e creatinina de cães diagnosticados com LVC, Patos de Minas (MG)

Animais	Ureia mg/dL	Creatinina mg/dL
1	22,10	0,66
2	232,60	2,38
3	69,20	0,80
4	283,00	2,31
5	32,10	1,22

* Valor de referência para espécie canina: ureia 21-60 mg/dL; creatinina 0,5-1,5 mg/dL (KANEKO, 1997).

No presente trabalho, os níveis de ureia apresentaram-se mais alterados em relação aos de creatinina. Esses achados são semelhantes aos descritos por Nieto *et al.* (1992), para quem as alterações nos níveis de ureia são mais comuns em relação à creatinina. Finco (1995) sugeriu que os níveis de ureia e creatinina estão relacionados com a taxa de filtração glomerular; entretanto, a excreção de ureia é dependente também da taxa do fluxo do filtrado.

4 CONCLUSÃO

A *Leishmania* sp. ocasiona importantes alterações macroscópicas e histopatológicas renais, como a glomerulonefrite intersticial crônica, levando a um aumento significativo dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina, comprometendo assim a funcionalidade dos rins e interferindo diretamente na qualidade de vida dos animais afetados.

REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A. L.; LIMA, T. B.;
MACEDO, A. A.; MORAES-JUNIOR, F.

J.; DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S.;
CALABRESE, K. S.; MORAES, J. L.;
REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. M. S. N.
C. Soroprevalência, aspectos clínicos e
bioquímicos da infecção por leishmania
em cães naturalmente infectados e fauna
de flebotomíneos em uma área endêmica
na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil.
**Revista Brasileira de Parasitologia
Veterinária**, Jaboticabal - SP, v. 17, supl.
1, p. 197-203, 2008.

AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.;
PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D. V.
V.; COSTA, R. L. G.; JULIÃO, F. S.;
SANTOS, W. L. C.; BARROUIN-MELO,
S. M. Quadro clínico de cães infectados
naturalmente por *Leishmania chagasi* em
uma área endêmica do estado da Bahia,
Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e
Produção Animal**, [S. l.], v. 8, p. 283-294,
2007.

ALBUQUERQUE, B. C. N. C.; MAIA, F.
C. L.; SILVA JÚNIOR, V. A.; LIMA, A.
M. A.; ALBUQUERQUE, E. R. C.;
PIMENTEL, D. de S.; ALVES, L. C.
Alterações estruturais em rins de caninos
naturalmente infectados por *Leishmania
(Leishmania) chagasi*. **Revista Brasileira
de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 15, n.
1, p. 3-5, 2008.

BARATA, R. A.; SILVA, J. C. F.;
MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.;
LOROSA, E. S.; FIÚZA, J. A.;
GONÇALVES, C. M.; PAULA, K. M.;
DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do
comportamento de flebotomíneos em
área endêmica de leishmaniose visceral,
Minas Gerais. **Revista da Sociedade
Brasileira de Medicina Tropical**,
Uberaba, v. 38, n. 5, p. 421-425, set. 2005.

- BARBOSA, S. D. N. **A leishmaniose canina e os condicionalismos determinados pelas respectivas alterações renais**. 2011. 139 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- CHURG, J.; BERNSTEIN, J.; GLASSOCK, R. J. **Renal disease: classification and atlas of glomerular diseases**. 2. ed. [S. l.]: Igaku-Shoin, 1995.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONI, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, [S. l.], v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.
- COSTA, C. H. N.; GOMES, R. B. B.; SILVA, M. R. B.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K. S.; SANTOS, R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MIGUIRE, J. H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 182, n. 3, p. 997-1000, 2000.
- COSTA, F. A. L.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C. B.; SILVA, S. M. M. S.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 677-684, 2003.
- ELSHEIKHA, Hany. Leishmaniasis in dogs and cats. **The Veterinary Nurse**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 260-267, 2016.
- FEITOSA, E. A. N.; TAHA, M. O.; FAGUNDES, D. J.; TAKIYA, C. M.; CARDOSO, L. R.; CAMPOS, D. M. Estudo da morfologia renal após a oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 178-182, jul. 2005.
- FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n. 28, p. 36-44, 2000.
- FERRARI, H. F.; CARREIRA, V. S.; MOREIRA, M. A. B.; MATTA, V. R.; HAGA, C. H.; LUVIZOTTO, M. C. R. Morphological, immunohistochemical and molecular study of renal lesions in canine visceral leishmaniasis (CVL). **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 123-131, 2010.
- FINCO, D. R. Evaluation of renal functions. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995. cap. 10. p. 216-228.
- KANEKO, J. K.; HARWEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic**

- animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- LANIS, A. B.; FONSECA, L. A.; ROESLER, T.; ALVES, A.; LOPES, B. Avaliação laboratorial das doenças renais em pequenos animais. **PUBVET**, Londrina, v. 2, n. 28, 39. ed. 2008.
- MALLA, N., MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. **Indian Journal of Medical Research**, [S. l.], v. 123, p. 267-274, 2006.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.
- WILSON, T. M.; MAGALHÃES, L. F.; SOUZA, R. R.; MEDEIROS-RONCHI, A. A.; LIMOMGI, J. E. Renal lesions in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 33, n. 4, p. 990-995, 2017.
- MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 56-72.
- MULLER, K.; VAN ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, [S. l.], v. 190, p. 73-76, 2001.
- NEWMAN, S. J. The urinary system. In: ZACHARY, J. F., AND MCGAVIN, M. **D. Pathologic basis of veterinary disease**. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 2013. p. 589-653.
- NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELLA, M. A. SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in Kidneys of dogs with natural leishmania infection. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 45, n. 1-2, p. 33-47, 1992.
- ROZE, M. Canineleishmaniasis. A spreading disease. Diagnostic and treatment. **European Journal of Companion Animal Practice**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 39-52, 2005.
- SALZO, P. S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nosso Clínico**, São Paulo, ano 11, n. 63, p. 30-34, 2008.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 5-6, p. 471-489, out. 2009.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha - MA, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.
- SOARES, M. J. V.; MORAES, J. R. E.; PALMEIRA, B. V.; MIYAZATO, L. G.; MORAES, F. R. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 579-593, out. 2005.

SOUSA, M. V. C.; CASTRO, I. P.;
MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A. V.;
SOARES, N. P.; NOLETO, P. G.;
BORGES, A. C.; LIMONGI, J. E.;
MEDEIROS, A. A. Níveis séricos de
ureia e creatinina em cães naturalmente
infectados por *Leishmania chagasi*.
PUBVET, Londrina, v. 5, n. 12, ed. 159,
art. 1078, 2011.

TARTAROTTI, A. L.; DONINI, M. A.;
ANJOS, C.; RAMOS, R. R. **Vigilância de**

reservatórios caninos. Boletim
Epidemiológico, Centro Estadual de
Vigilância em Saúde. Porto Alegre, v. 13,
n. 1, p. 3-6, 2011.

TOMÁS, A.; ROMÃO, S. F. Biologia do
Parasita. *In*: GOMES, G. M. S.;
FONSECA, I. M. P. da. **Leishmaniose
canina**. Lisboa: Chaves Ferreira
Publicações, p. 7-26, 2008.

Normas da ISO 17025 para certificação de um laboratório de diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina no Centro Clínico Veterinário do UNIPAM

ISO 17025 Standards for certification of Equine Infectious Anemia Diagnostic Laboratory at UNIPAM Veterinary Clinical Center

Carolina Veríssimo Queiroz Silva¹; Mariana Assunção de Souza²

1 Bacharel em Medicina Veterinária. Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

E-mail: carolinaverissimo@unipam.edu.br (autora correspondente).

2 Doutora em Ciências Veterinárias. Docente no Centro Universitário de Patos de Minas - Unipam.

Resumo: A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma patologia viral transmitida aos equídeos e requer notificação obrigatória. A fim de permitir a livre circulação dos equinos, é necessário que todos apresentem resultado negativo no exame de AIE. Além disso, os laboratórios que desejam realizar esse exame devem ser acreditados na ISO 17025, que estabelece as competências necessárias para garantir a qualidade dos ensaios laboratoriais. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento das normas e descrever o processo de elaboração de um manual de qualidade para a implementação da norma NBR ISO/IEC17025 em um laboratório localizado no Centro Clínico Veterinário do UNIPAM. Foi conduzido um estudo documental, no qual foram revisados oito trabalhos, em que a metodologia de pesquisa consistia em um questionário aos laboratórios acreditados ou que ainda estavam no processo de acreditação, para obter informações sobre os desafios enfrentados durante o processo de acreditação na ISO e as soluções encontradas para resolução desses problemas, incluindo a criação de um Manual de Qualidade. Os resultados foram tabulados e revelaram que as principais dificuldades estão relacionadas ao sistema de gestão e qualidade do laboratório. Diante dessas dificuldades, foi desenvolvido um Manual de Qualidade específico para auxiliar laboratórios que enfrentam esse processo.

Palavras-chave: doenças infecciosas; equinos; gestão da qualidade.

Abstract: Equine Infectious Anemia (EIA) is a viral disease transmitted to equids and requires mandatory reporting. In order to allow free movement of horses, it is necessary for all animals to test negative for EIA. Moreover, laboratories conducting EIA testing must be accredited to ISO 17025, which establishes the necessary competencies to ensure the quality of laboratory testing. The aim of this study was to review the standards and describe the process of developing a quality manual for the implementation of the NBR ISO/IEC 17025 standard in a laboratory located at the UNIPAM Veterinary Clinical Center. A documentary study was conducted, reviewing eight works in which the research methodology consisted of a questionnaire to accredited laboratories or those still in the accreditation process, in order to gather information about the challenges faced during the ISO accreditation process and the solutions found to resolve these issues, including the creation of a Quality Manual. The results were tabulated and revealed that the main difficulties are related to the laboratory's management and quality system. In light of these difficulties, a specific Quality Manual was developed to assist laboratories undergoing this process.

Keywords: infectious diseases; equines; quality management.

1 INTRODUÇÃO

A Organização Internacional para Padronização (ISO, do inglês *International Organization for Standardization*) é um conjunto de normas associadas ao Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) em colaboração com o Comitê Brasileiro de Qualidade (CB-25) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), com objetivo de certificar estabelecimentos e avaliar a credibilidade das atividades desenvolvidas, buscando alcançar um padrão adequado (INMETRO, 2018).

A acreditação é conduzida pela Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro (CGCRE) e estabelece a competência dos laboratórios de ensaio para desenvolver suas atividades de acordo com as normas estabelecidas em conjunto com o Conselho de Acreditação (CONAC). Seu objetivo é melhorar o desempenho, a produtividade e a eficiência dos laboratórios, por meio de avaliações regulares realizadas por organismos de acreditação, reduzindo assim a necessidade de auditorias e promovendo a organização dos procedimentos e normas (BARRADAS, 2012; MAEKAWA; CARVALHO; OLIVEIRA, 2013).

A norma ISO 17025 estabelece as competências necessárias para garantir qualidade e a validade dos resultados em laboratórios que realizam métodos de ensaio (procedimentos de medição em produtos ou materiais), calibração (sob padrões internacionais de validade) ou amostragem (coleta adequada de amostras para realizar os ensaios). No Brasil, existem atualmente 195 laboratórios acreditados na CRL ABNT NBR ISO / IEC 17025 na categoria de

Laboratórios de Ensaio na área de Saúde Animal. Até o momento da finalização deste trabalho, cinco laboratórios estavam em situação de suspensão parcial e nove em suspensão total (INMETRO, 2019).

De acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, o processo de certificação baseado na ISO 17025 envolve várias etapas. A primeira etapa consiste na elaboração do escopo de trabalho, ou seja, definir de forma clara em qual área o laboratório deseja obter a acreditação. Em seguida, o laboratório participa de um Programa de Ensaio de Proficiência, no qual seus métodos e desempenho são avaliados. Os principais objetivos desse programa são garantir a confiabilidade dos resultados gerados pelo laboratório e fornecer informações que levem a ações corretivas para melhorar os processos. Concluídas essas etapas, o laboratório pode solicitar a auditoria da CGCRE para avaliação do cumprimento das normas da ISO.

A Anemia Infeciosa Equina é uma patologia de origem viral transmitida a todos os equídeos e requer notificação obrigatória. Ela está incluída no Plano Nacional de Sanidade Equídea (PNSE) e é considerada uma enfermidade sem tratamento ou cura, resultando no abate sanitário dos animais afetados. Por se tratar de uma patologia constante na lista de doenças da Organização Internacional de Epizootias (OIE), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu, por meio da Instrução Normativa nº 57, que os ensaios para diagnóstico da AIE devem ser realizados em laboratórios com acreditação na ABNT NBR ISO/IEC 17025, garantindo a qualidade na implementação das técnicas laboratoriais (BORDIN, 2015).

O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento das normas e descrever o processo de elaboração de um manual de qualidade para a implementação da norma NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005), exigida para acreditação do laboratório de ensaio para diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina no Centro Clínico Veterinário do UNIPAM.

2 MATERIAL E MÉTODO

Foi conduzido um estudo documental com base no levantamento bibliográfico de artigos científicos, documentos, Instruções Normativas e normas relacionados à ISO 17025, com o objetivo de coletar dados e informações para fundamentar a presente pesquisa e fornecer orientações sobre o que é a ISO 17025 e suas normas aplicadas, desde o processo de implementação até a obtenção da acreditação (COCCO, 2015).

Esta pesquisa tem como finalidade sintetizar as normas necessárias para acreditação na ISO 17025 e facilitar o entendimento desse processo e dos requisitos para os laboratórios que desejam solicitar acreditação e realizar as devidas adequações em sua estrutura. Para isso, foram compiladas as instruções, normas e artigos de maior relevância, a fim de fornecer um conjunto de dados que auxiliem os laboratórios interessados em buscar acreditação.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi realizada a seleção de bibliografia de referência para o embasamento teórico dos principais conceitos relacionados ao tema. Além disso, foi conduzida uma pesquisa qualitativa, baseada em estudos de caso de organizações já acreditadas na ISO 17025, com foco nas perspectivas e

interpretações das pessoas envolvidas no processo. Isso contribuiu para ampliar o conhecimento sobre o assunto e estabelecer uma relação entre as melhorias e os resultados operacionais e estratégicos das instituições acreditadas.

O principal propósito do estudo documental foi identificar as dificuldades enfrentadas no processo de acreditação e na implementação das normas relacionadas à estrutura dos laboratórios de ensaio, incluindo instalações, equipamentos e preenchimento de documentos (COVA, 2001).

Além do estudo documental, também foi elaborado um Manual de Qualidade com o intuito de garantir uma gestão adequada do laboratório, desenvolvido de forma abrangente, englobando explicações e descrições sobre o laboratório e estabelecendo a rastreabilidade de todos os documentos relacionados, incluindo referências aos procedimentos principais e utilizando guias que auxiliam na criação de um Manual de Qualidade, bem como nas normas às quais ele se baseia. Assim, ele inclui:

- Procedimentos de Gestão, que estabelecem detalhes e asseguram a qualidade em todas as atividades do laboratório;
- Procedimentos Técnicos, que fornecem detalhamentos técnicos essenciais para a confiabilidade das análises;
- Instruções de Trabalho, que estão diretamente relacionadas aos ensaios;
- Formulários gerenciais e técnicos nos quais as atividades são registradas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 REVISÃO DOS TRABALHOS

Foram revisados oito trabalhos nos quais a metodologia de pesquisa consistia na aplicação de um questionário aos laboratórios acreditados na ISO 17025 ou que estavam passando pelo processo de acreditação. Esses questionários buscavam obter informações a respeito dos problemas encontrados durante o processo de acreditação e as soluções adotadas. Os dados coletados foram reunidos e apresentados nas Tabelas 1 e 2, para a discussão neste trabalho.

Tabela 1: Relação das dificuldades encontradas pelos pesquisadores no processo de acreditação da ISO 17025 para laboratórios de diagnóstico de AIE e a frequência da citação

Dificuldades encontradas	Frequência da citação (%)
Falha de planejamento / Manual de qualidade	17,39
Falta de treinamento e comprometimento	17,39
Custos financeiros	17,39
Equipamentos / materiais	13,04
Erro no preenchimento de documentos	13,04
Validação dos métodos de medição	13,04
Adequação cargos e salários	4,34
Falha de auditoria interna	4,34
Total	100

Os estudos de Cunha *et al.* (2011) e Machado (2008) identificaram problemas como falta de planejamento, preparação e conhecimento dos funcionários em relação às normas estabelecidas pela NBR/ISO. Essas dificuldades foram corroboradas por

ambos os autores e, além disso, foram apontadas questões como falta de informações no manual de qualidade e nos valores de medição, falta de técnica e experiência por parte dos funcionários, falhas no controle de documentos, inadequação dos equipamentos e inadequações na gestão das auditorias internas. Todos esses aspectos representam desafios para um processo de acreditação eficiente (CUNHA *et al.*, 2011; MACHADO, 2008).

Tabela 2: Relação dos fatores facilitadores encontrados pelos pesquisadores no processo de acreditação da ISO 17025 para laboratórios de diagnóstico de AIE e a frequência da citação

Fatores facilitadores	Frequência de citação (%)
Correção de não conformidades	23,52
Preenchimento correto de documentos	23,52
Adoção de sistema de gestão	11,76
Informatização do sistema	11,76
Treinamento e capacitação	11,76
Uso de recursos de financiamento	5,88
Criação de checklist	5,88
Criação de fóruns virtuais	5,88
Total	100

Em uma pesquisa descritiva, Ueta (2011) relacionou o nível de importância e concordância sobre as principais barreiras na implementação das normas, foram identificados os seguintes aspectos: falta de adequação nos cargos e salários, demora nos serviços e aquisições de materiais, falta de profissionais qualificados, burocracia excessiva no preenchimento de

documentos e altos custos financeiros relacionados à calibração e ajustes de equipamentos. Esses fatores são considerados críticos para acreditação, sendo que a desmotivação dos funcionários e a falta de treinamento e comprometimento foram identificados como fatores ainda mais significativos pelos laboratórios (UETA, 2011).

O estudo realizado por Grochau, Caten e Forte (2017) destacou a falta de recursos financeiros como uma das principais dificuldades enfrentadas na aquisição e manutenção de equipamentos laboratoriais, bem como para o treinamento e preparação dos funcionários visando às auditorias de acreditação.

No estudo conduzido por Coutinho (2004), um questionário foi enviado a 100 laboratórios que estavam passando pelo processo de acreditação, a fim de investigar as dificuldades enfrentadas nesse processo. Os resultados revelaram que as dificuldades mais indicadas estavam relacionadas aos métodos de ensaio, calibração e validação de métodos, equipamentos, sistema de qualidade e controle de documentos, respectivamente. Esses três tópicos abrangiam 57% das dificuldades apontadas pelos laboratórios.

No que diz respeito aos métodos de ensaio, calibração e validação de métodos, o maior empecilho está na incerteza da definição dos meios de medição adequados. Em relação aos equipamentos, a maior dificuldade está associada aos altos custos, falta de financiamento e necessidade de calibração periódica. Quanto ao sistema de qualidade e controle de documentos, a falta de procedimentos e registros adequados dos laboratórios pode levar a desajustes que afetam a conformidade.

Em pesquisa realizada por Souza Júnior (2015), foram apontados os desafios enfrentados por 10 laboratórios de ensaio para diagnóstico de AIE. Um dos principais obstáculos relatados é a gestão e elaboração de manuais de qualidade que abrangem os requisitos exigidos pela NBR/ISO, especialmente devido à falta de especificação dessas normas em relação às análises de saúde animal e às técnicas da medicina veterinária.

De acordo com Cunha *et al.* (2011), a falta de treinamento para lidar com as auditorias internas pode ser superada por meio de um sistema de gestão adequado, que inclui: o treinamento e capacitação dos funcionários, o preenchimento correto dos documentos a serem entregues, a implementação de ações corretivas para resolver não conformidades identificadas durante as auditorias e a elaboração de relatórios precisos.

Segundo Carvalho (2004), o preenchimento correto dos documentos de análise e a pronta identificação e correção das não conformidades relatadas nas auditorias contribuem para agilizar o processo de acreditação. Esses resultados também foram encontrados por Lima (2011) e Coutinho (2004), em trabalhos desenvolvidos em laboratórios que passaram pelo processo de implementação e auditorias. Foi concluído que a informatização das técnicas pode auxiliar no preenchimento e emissão de documentos em futuros trabalhos. Sugere-se a criação de um sistema de “perguntas frequentes” no site do Inmetro e fóruns de discussão para a participação dos laboratórios acreditados na ISO 17025, a fim de facilitar a comunicação e a resolução de problemas por meio virtual.

Os critérios destacados por Bordin (2015) como os mais relevantes no processo são: o treinamento e a constante capacitação dos funcionários, bem como a participação coletiva plena de todas as pessoas em todas as atividades envolvidas, especialmente aquelas relacionadas às normas de biossegurança. A criação de um *checklist* em forma de auditoria horizontal também é útil para inspecionar registros, equipamentos, relatórios e certificados.

Com relação aos fatores facilitados pela implementação das normas, são mencionados aspectos relacionados a tarefas, estrutura e ambiente, tais como a padronização de serviços, melhorias após auditorias, impactos na organização do laboratório e aumento na demanda de clientes. Esses resultados estão em consonância com os encontrados por Machado (2008), que destacou conquista de mercados, aumento da competência e aprimoramento técnico como vantagens. A motivação e o comprometimento das pessoas envolvidas diretamente nas atividades são contribuições significativas para um melhor desempenho no processo de acreditação, e a contratação de consultorias especializadas em laboratórios também pode ser benéfica (UETA, 2011).

3.2 CRIAÇÃO DO MANUAL DE QUALIDADE

A criação de um Manual de Qualidade (MQ) específico para cada laboratório é um importante contribuinte para a adequação das técnicas e procedimentos realizados. O conteúdo do

manual deve abranger os detalhes necessários para assegurar a qualidade nos processos, incluindo os procedimentos técnicos das análises, as instruções de trabalho dos ensaios e os formulários de registros de atividades (BORDIN, 2015).

O Manual de Qualidade deve ser elaborado de forma objetiva, abordando cada elemento da ISO 17025, e estabelecendo os responsáveis por cada operação realizada no laboratório. Além disso, é importante definir os pontos de controle e as ações que devem ser tomadas de acordo com as normas.

Uma das formas mais claras e simples de elaborar um Manual de Qualidade, especialmente em locais com estrutura pequena e poucos funcionários, é criá-lo de forma objetiva, levando em consideração a estrutura e administração do laboratório. Nesse manual, devem ser abordados os procedimentos técnicos realizados e os sistemas de qualidade adotados tanto pelo laboratório quanto pela organização à qual ele pertence (CARVALHO, 2004).

O documento deve conter uma capa identificada com nome e revisão, além de incluir a política de qualidade, o sumário, os objetivos, a folha de aprovação, os documentos complementares e as informações sobre as siglas utilizadas (REDETEC, 2008).

Com base nas informações obtidas e apresentadas na Tabela 3, foi desenvolvido um Manual de Qualidade personalizado para o laboratório de diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina no Centro Clínico Veterinário do UNIPAM. Ver APÊNDICE A.

Tabela 3: Tópicos a serem abordados para a criação do Manual de Qualidade do laboratório de diagnóstico de AIE no Centro Clínico Veterinário do UNIPAM, 2020

Tópicos do manual de qualidade	Itens abordados em cada tópico
Organização	Estrutura, instalação e gerenciamento
Sistema de gestão	Procedimentos técnicos utilizados
Controle de documentos	Procedimentos utilizados na elaboração e controle dos documentos
Aquisição de produtos e serviços	Procedimento para compra de materiais ou contratação de serviços externos
Melhorias	Procedimentos de registro de ações para garantir melhorias técnicas e de gestão
Ação corretiva, reclamações e não conformidades	Tratamento de reclamações, não conformidades nos resultados gerados pelos ensaios e satisfação dos clientes.
Auditorias internas	Periodicidade e procedimentos para recebimento de auditorias internas e verificação da adesão dos requisitos
Controle de registros	Procedimentos de coleta, acesso e armazenamento de todos os registros técnicos e de qualidade

Fonte: Guia para elaboração de manual da qualidade para laboratório - revisão 3, 2008.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se a partir deste estudo que as principais dificuldades encontradas na certificação da ISO 17025 estão relacionadas ao sistema de gestão e qualidade do laboratório. No entanto, com a criação de um manual de qualidade específico, o processo de acreditação pode ser facilitado.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Cb / 0-25 ISO/IEC 17025**. Novembro de 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Instrução normativa nº 52**, de 26 de novembro de 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Instrução normativa nº 57**, de 11 de dezembro de 2013.

BARRADAS, J. A. S. **A importância da certificação segundo a norma ISO 9001 e da acreditação segundo a norma ISO/IEC 17025 num laboratório de metrologia**. 2012. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Guimarães, 2012.

BORDIN, R. **Acreditação e credenciamento de laboratórios de ensaios para diagnóstico de anemia infecciosa equina**. 2015. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências Ambientais), Centro de Ciências Exatas e da Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

CARVALHO, A. D. **Implementação da norma NBR ISO/IEC 17025: uma proposta para reduzir o tempo de acreditação**. 2004. 154 p. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Gestão), Laboratório de Tecnologia, Gestão de Negócios e Meio Ambiente,

Universidade Federal Fluminense,
Niterói, 2004.

COCCO, J. F. **Análise das soluções para adequação de um laboratório de análise de sementes de uma instituição de ensino superior aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 2015. 38 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Produção), Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

COUTINHO, M. A. O. **Implementação dos requisitos da norma ABNT ISO/IEC 17025 a laboratórios**: uma a proposta de ações para reduzir a incidência de não conformidades nos processos de concessão e manutenção da acreditação pela CGCRE/INMETRO. 2004. 122 p. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Gestão), Laboratório de Tecnologia, Gestão de Negócios e Meio Ambiente, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

COVA, W. C. R. M. **Credenciamento de laboratórios de ensaio de construção civil segundo a NBR ISO/IEC 17025**: avaliação das dificuldades e não conformidades envolvidas no processo. 2001. 149 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

CUNHA, A. P.; MOREIRA, V. C.; TAVARES, R. M.; AZEVEDO, R. N. Diagnóstico de implantação da NBR ISO 17025:2005 na divisão de instrumentos de medição no âmbito da saúde e do meio ambiente (DISMA) do INMETRO para fins de acreditação pela CGCRE. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE

METROLOGIA, 6., 2011, Natal. **Anais [...]**. Natal: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2011. 3 p.

GROCHAU, I. H.; CATEN, C. S.; FORTE, M. M. C. Proposta de estratégias para acreditação de laboratórios de universidade conforme ISO/IEC 17025. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE METROLOGIA, 9., 2017, Fortaleza. **Anais [...]**. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2017. 5 p.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio que aderiram ou visem aderir ao programa do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Norma no nit-dicla-056 rev. No 04 aprovada em maio de 2018 página 01/06.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Sistema de Consulta aos Escopos de Acreditação dos Laboratórios de Análises Clínicas (ISO 15189) e Laboratórios de Ensaio (ISO/IEC 17025) Acreditados (Rede Brasileira de Laboratórios de Ensaio - RBLE)**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/>.

LIMA, A. J. **Implementação referencial ISO 17025 a laboratórios de ensaio não destrutivos**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto - Portugal, 2011.

MACHADO, M. P. **Projeto de implantação da ISO/IEC 17025 no PDA/UFPR laboratório de pesquisas e**

desenvolvimento industrial, ambiental e em qualidade. 2008. 75 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão da Qualidade), Centro de Pesquisa de Administração Geral e Aplicada, Setor de Ciências Sociais e Aplicadas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MAEKAWA, R.; CARVALHO M. R.; OLIVEIRA O. J. Um estudo sobre a certificação ISO 9001 no Brasil: mapeamento de motivações, benefícios e dificuldades. *Gestão & Produção*, São Carlos - SP, v. 20, n. 4, p. 763-779, 2013.

REDETEC. Rede de Tecnologia e Inovação do Rio de Janeiro. **Guia para elaboração:** manual da qualidade para

laboratório. 3. ed. rev. ampl. Rio de Janeiro: REDETEC, 2008.

SOUZA JÚNIOR, E. P. Acreditação de laboratórios de ensaio de anemia infecciosa equina-desafios e oportunidades. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METROLOGIA*, 8., 2015, Bento Gonçalves - RS. **Anais [...]**. Bento Gonçalves - RS: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2015. 4 p.

UETA, M. C. C. **Fatores críticos na implementação da norma NBR ISO/IEC 17025:** estudo de caso de um laboratório de P&D governamental. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Taubaté, Taubaté - SP, 2011.

APÊNDICE A: MANUAL DE QUALIDADE DO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

1 ESCOPO

A equideocultura movimenta em média R\$ 7,3 bilhões por ano, e o estado de Minas Gerais é o maior criador em número de equídeos do país, sendo o berço da criação de importantes raças como o Mangalarga Marchador, Mangalarga, Campolina e Jumento Pêga.

Minas Gerais também é o centro cultural de diversos eventos equestres como exposições e esportes, a exemplo disso, temos o maior evento de equinos da América Latina: a exposição nacional. O trânsito interestadual de equídeos está condicionado à apresentação de exame negativo para Anemia Infecciosa Equina, emitido por laboratório oficial ou credenciado, que tem prazo de validade de 60 dias para a emissão do Guia de Trânsito Animal (GTA).

Este Manual descreve o Sistema de Gestão e Qualidade do Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), objetivando referenciar as principais normas exigidas no processo de acreditação da ISO/IEC 17025 para auxiliar o laboratório de ensaio no diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina.

2 REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Para implementação deste manual, foram aplicados os requisitos dos seguintes Sistemas de Gestão: ABNT NBR ISO 17025 e Programa Nacional de Sanidade de Equídeos (IN 52, 26 de novembro de 2018 - Requisitos de critérios para diagnóstico de AIE).

3 SIGLAS

- CPA - Comissão Própria de Avaliação;
- DA - Documento Avulso;
- FEPAM - Fundação Educacional de Patos de Minas;
- IT - Instrução de Trabalho;
- SGI - Sistema de Gestão Integrada;
- SGQ - Sistema de Gestão da Qualidade;
- AIE - Anemia Infecciosa Equina;
- IDGA - Imunodifusão em Gel de Ágar;
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- CRMV - Conselho Regional de Medicina Veterinária;
- RT - Responsável Técnico.

4 ORGANIZAÇÃO

4.1 CENTRO CLÍNICO VETERINÁRIO E LABORATÓRIO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

O Centro Clínico é utilizado como uma unidade de ensino, pesquisa e extensão em Medicina Veterinária. Oferece suporte necessário à realização de aulas práticas do curso, de estágios e de cursos de capacitação. Além disso, presta serviços à comunidade, como atendimentos nas áreas de clínica médica e cirúrgica de pequenos e grandes animais, de diagnóstico por imagem, de patologia clínica, de anatomia patológica e de medicina veterinária preventiva. No ambiente, também são desenvolvidos projetos de controle da população canina

e felina, trabalhos de iniciação científica e de conclusão de curso.

Pensando nessa infraestrutura, foi criado um Laboratório de Doenças Infecciosas dentro do Centro Clínico Veterinário do Unipam, cujo objetivo é realizar ensaios de Anemia Infecciosa Equina em Patos de Minas e região.

4.2 ESTRUTURA E INSTALAÇÃO DO LABORATÓRIO

A estrutura do laboratório consiste em áreas de recepção e de circulação, varanda, sanitários, sala de exames, lavagem e esterilização.

A recepção e a circulação são áreas conjuntas e separadas fisicamente das da sala de exame e lavagem e esterilização; nelas, estão os equipamentos necessários para realizar o controle, o registro de documentos e os recebimentos de amostras, como um computador, telefone e arquivo com chave.

Na sala de exames, há duas geladeiras, centrífuga de 10 ml, micro-ondas, banho-maria, bico de Bunsen com ponto de gás, PHmetro, iluminador, balança, mesa de exames e armários com bancadas.

Na área de lavagem e esterilização os equipamentos encontrados são autoclave, destilador, lavatório e armários. Os ambientes da sala de exames e lavagem e esterilização possuem refrigeração por ar condicionado.

Equipamentos: balança analítica ou semianalítica; banho-maria; geladeira; freezer a -20º; centrífuga clínica; pH de teste; autoclave; destilador de água.

Materiais: antígeno padrão para anemia infecciosa equina; soros a testar; micropipetador de 25 µL ou de volume

ajustável; ponteiras; lâminas de vidro; cuba com água sanitária; câmara úmida; caixa com luz indireta para leitura; soro controle positivo; cortador padrão.

5 SISTEMA DE GESTÃO

5.1 SEQUÊNCIA EXECUTIVA DO ENSAIO DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR (IDGA)

Meios e soluções: preparo do tampão borato: 2g de NaOH 2g; 9g de H₃BO₃, água destilada q.s.p 1.000 mL. Observações: as substâncias a serem utilizadas na preparação das soluções deverão ser padrão pró-análise (p. a.). O tampão borato deverá ter seu pH entre 8,5 e 8,7.

Preparo do gel a 1%: ágar Noble ou agarose 1g - tampão borato 100mL. Aquecer em banho-maria ou vapor fluente até a completa fusão do ágar. O gel deverá ser dividido em alíquotas de acordo com a demanda do laboratório. Não devem ser efetuadas sucessivas fusões do gel, desprezando-se o volume não utilizado.

Preparo de lâminas: adicionar 4,5mL do gel ainda quente em cada lâmina de vidro para microscópio medindo 25x75mm; aguardar a solidificação do gel > cortar o gel utilizando um cortador padrão, com sete furos de 4mm de diâmetro, distanciados no máximo 3 mm entre si > remover o cilindro de ágar de cada poço, usando uma agulha 25 x 0.8mm > utilizar as lâminas imediatamente após o corte. As lâminas não utilizadas devem ser desprezadas. Se houver presença de umidade nas cavidades, as lâminas não deverão ser utilizadas até a sua evaporação.

Realização da prova: colocar as amostras de soro a ser testado em poços alternados ao redor do poço central em um volume aproximado de 25µL por poço, utilizando uma micropipeta e ponteiros individuais descartáveis. Colocar nas cavidades laterais, alternadamente, 25 microlitros do soro controle positivo (SCP). O poço central deve ser preenchido com 25µL do antígeno padrão, utilizando ponteira e micropipeta > deixar as lâminas em repouso durante 5 minutos; incubá-las à temperatura entre 20°C e 25°C em câmara úmida > em ambiente escuro e com o auxílio de um foco de luz forte, em feixe estreito, ajustável e contra um fundo preto, realizar a leitura do teste com 24, 48 e 72 horas após incubação > anotar os resultados.

6 CONTROLE DE DOCUMENTOS

Os relatórios de ensaio gerados pelo laboratório devem conter: identificação do laboratório, número de credenciamento do MAPA, do relatório, do registro da amostra e do documento encaminhado junto com a amostra, identificação do proprietário do animal, identificação do médico veterinário solicitante (com CRMV), identificação do animal (nome, raça, sexo, endereço da propriedade), identificação da amostra (data de coleta e de recebimento), método de ensaio utilizado, identificação do kit de ensaio utilizado (nome, fabricante, data, lote), resultados obtidos com a data de finalização, data de validade dos resultados e assinatura do RT com local e data.

- Os relatórios de ensaio devem ser mantidos arquivados no laboratório por, no mínimo, cinco anos.

- Os relatórios de ensaio podem ser enviados por meio eletrônico, em arquivo não editável, devendo guardar uma 2ª via prontamente disponível em seus arquivos para fins de auditoria.

- Os resultados devem ser emitidos juntamente com a requisição para diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina

- Se realizadas duas técnicas de ensaio (ELISA e IDGA), devem ser emitidos os resultados em um único relatório.

- Deve ser enviado um relatório mensal de atividades operacionais em modelo disponibilizado pela CGAL/SDA, e uma das vias arquivada no laboratório.

7 AQUISIÇÃO DE PRODUTOS E SERVIÇOS

O UNIPAM define os requisitos para os produtos oferecidos aos clientes com base em pesquisas mercadológicas, as quais também identificam os requisitos não especificados pelo cliente, mas necessários para o bom desempenho do produto. Esses requisitos estão estabelecidos e documentados em cada PPC.

A fim de assegurar o atendimento aos requisitos legais e aos requisitos próprios da instituição, incluindo os requisitos do SGI, o UNIPAM implementa e mantém processo apropriado para avaliar e documentar a conformidade de suas ações.

Essa avaliação e o registro são realizados, anualmente, por meio de auditorias de conformidade legal, as quais registram, monitoram e acompanham o atendimento dos requisitos em sistema específico.

8 MELHORIAS

O UNIPAM assegura a melhoria contínua do SGI e de sua eficácia, levando em consideração a satisfação do cliente, o atendimento aos requisitos, a política do SGI e seus objetivos, os resultados de auditorias (internas e externas), a análise dos dados, as ações corretivas e as oportunidades de melhoria.

- Manipulação de amostras somente na área de ensaio.

- Amostras recebidas devem ser armazenadas resfriadas, em temperatura de 2° a 8°C por até 8 dias e, após, congeladas a -10°C.

- A água utilizada nos ensaios deverá ser água grau laboratório (destilada ou deionizada).

- No caso de recebimento de sangue, deverá ser centrifugado, e o soro receberá o tratamento dos itens anteriores.

- A amostra a ser testada deverá ser conservada sob refrigeração até a realização da prova e destruída após a realização do exame.

- As amostras destinadas a contraprova deverão ser estocadas em congelador a -20°C, devendo ser mantidas estocadas durante um período de 30 dias após a realização dos exames.

- O antígeno, quando não estiver em uso, precisa permanecer sempre entre 2°C e 8°C.

- Em caso de sua utilização para realizar um pequeno número de testes, dividi-lo em alíquotas e retirar da geladeira apenas a quantidade a ser utilizada a cada dia, evitando, assim, a perda de sensibilidade pelo constante resfriamento/aquecimento do antígeno.

- A temperatura de execução desejável será em torno de 22°C ± 4°C,

devendo-se evitar temperaturas muito abaixo ou muito acima desse valor.

- As lâminas e as pipetas devem ser limpas com água corrente logo após o uso. Imergi-las em uma solução de detergente neutro por duas horas ou, de preferência, durante a noite. Em seguida, lavá-las em água corrente e, na sequência, em água destilada. Secar em estufa ou à temperatura ambiente.

- Em todos os testes, deverá ser simultaneamente testado o soro controle positivo.

- Deverão ser respeitadas as normas de segurança biológica em todos os procedimentos realizados com o material de exame.

- As amostras destinadas à prova e à contraprova serão destruídas após decorrido o prazo estabelecido para sua estocagem, obrigatoriamente através de autoclavação a 120°C, com uma libra de pressão durante 30 minutos.

9 AÇÃO CORRETIVA, RECLAMAÇÕES E NÃO CONFORMIDADES

O UNIPAM implementa e mantém processos para determinar e gerenciar não conformidades a partir de ações corretivas que são tomadas para eliminar a causa da não conformidade e analisar a abrangência e a magnitude do problema encontrado.

As ações corretivas incluem:

- Reação Forte positiva ou Reação Inespecífica na leitura do ensaio > deve ser repetido o ensaio; no caso da reação forte positiva, a amostra pode ser diluída na repetição.

- Se a linha formada pelo Soro Controle Positivo (SCP) não estiver tendo base para leitura > deve ser repetido o ensaio.

- Amostras com evidência de contaminação ou com alto grau de hemólise > devem ser descartadas por meio de autoclavação a 120° por 30 minutos.

- No caso de descarte de amostra > informar o Médico Veterinário responsável para ser feita uma nova coleta.

- Formulários de requisição que apresentarem campos em branco ou incompletos, com rasuras ou ilegíveis > devem ser rejeitados e solicitado um novo formulário.

- Dispositivos que forem encontrados fora do estado de calibração ou inadequado ao uso > providências imediatas são tomadas para retirada de uso do equipamento e análise da disposição dos produtos afetados.

10 CONTROLE DE REGISTROS

- As amostras deverão estar devidamente identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas.

- As amostras deverão estar acompanhadas de requisição de exame assinada por médico veterinário com sua identificação profissional.

- Não serão recebidas amostras com evidência de contaminação.

- As amostras serão registradas em livro próprio, conforme modelo indicado pela CLA.

- As amostras serão obrigatoriamente divididas em duas alíquotas de 2ml e identificadas, uma para prova e outra para contraprova, na presença do Médico Veterinário requisitante ou seu portador nomeado.

- A declaração de contraprova será preenchida e assinada pelo Médico Veterinário requisitante ou seu portador nomeado.

- A tarjeta de identificação da contraprova será preenchida e lacrada juntamente com as amostras para contraprova; o lacre será plástico, numerado e inviolável.

- As amostras de contraprova deverão ser armazenadas congeladas, identificadas e lacradas, à temperatura de -10°C ou inferior, por no mínimo 60 dias.

- Recebimento de amostras somente se acompanhadas do formulário de requisição específico.

- São mantidos registros de calibração e de verificação, além dos certificados de calibração emitidos por provedores externos especializados e qualificados.

11 AUDITORIAS INTERNAS

O UNIPAM planeja, estabelece, implementa e mantém programas de auditorias internas do SGI, as quais são conduzidas pelo PS-9.2.0/01 (Auditoria Interna).

Essas auditorias têm como objetivo avaliar a conformidade do SGI e seus resultados, levando em consideração os resultados pretendidos.

A programação de auditorias internas se dá com base na situação atual e na importância do processo a ser verificado. Além disso, considera que

- as auditorias sejam executadas por pessoal independente daquele que tem responsabilidade direta pelo processo a ser auditado;

- os resultados sejam registrados e levados ao conhecimento do pessoal que tem responsabilidade pelo processo auditado;

- o responsável pelo processo auditado deve tomar, em tempo hábil,

ações corretivas referentes às deficiências encontradas;

- a implementação e eficácia das ações corretivas são verificadas e registradas.

O UNIPAM estabelece e mantém procedimentos documentados de

inspeção e monitoramento das características dos materiais controlados e dos produtos resultantes dos serviços de execução controlados, a fim de verificar a conformidade.