



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO
TOCANTINS

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

YRON MOREIRA RODRIGUES

**Qualidade microbiológica de produtos de origem animal clandestinos e
prevalência de brucelose em bovinos de abate do estado do Tocantins**

ARAGUAÍNA
2021

YRON MOREIRA RODRIGUES

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL
CLANDESTINOS E PREVALÊNCIA DE BRUCELOSE EM BOVINOS DE ABATE DO
ESTADO DO TOCANTINS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à UFNT – Universidade Federal do Norte do Tocantins – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Curso de Medicina Veterinária para a obtenção do título de Médico Veterinário, sob orientação do Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior.

ARAGUAÍNA
2021

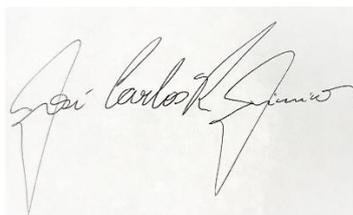
YRON MOREIRA RODRIGUES

Qualidade microbiológica de produtos de origem animal clandestinos e prevalência de brucelose em bovinos de abate do estado do Tocantins

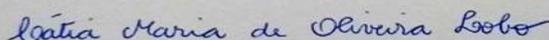
Trabalho de conclusão de curso apresentado à UFNT – Universidade Federal do Norte do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína, Curso de Medicina Veterinária foi avaliado para a obtenção do título de Médico Veterinário e aprovado em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Aprovado em: 12 de julho de 2021

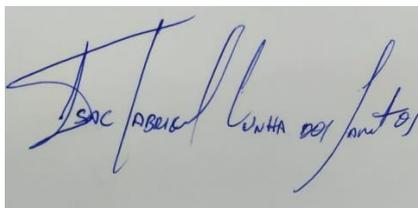
Banca examinadora:



Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior. Orientador – UFNT



Profª. Dr.ª Catia Maria de Oliveira Lobo. Examinadora 1 – UFNT



Msc. Isac Gabriel Cunha dos Santos. Examinador 2 – UFNT

AGRADECIMENTOS

A primeira pessoa a quem gostaria de agradecer é minha mãe, minha base e minha força para continuar, à ela todo meu esforço e dedicação para honrar seu nome e lhe trazer orgulho.

Em segundo, aos amigos e colegas de graduação em que tive a oportunidade de conviver, crescer e compartilhar a formação, passando longas horas do nosso dia estudando pelos cantos do campus.

Um especial agradecimento a minha amiga Cristiane por todos seus ensinamentos e pela grande amizade construída durante os períodos de estágio no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da universidade.

Ao meu orientador, pelas oportunidades a mim oferecidas e por toda a paciência em ensinar. Obrigado pelos puxões de orelha, por todas as vezes em que o senhor estava “ensinando” e não “brigando”, e, principalmente, por se preocupar com minha formação, o admirarei e serei sempre grato.

À turma “Rédea Curta” e em memória de meu amigo e colega de turma Kleciouan Soares, a quem tive a oportunidade de juntamente começar a graduação mas que já não está mais entre nós, tenho certeza de que Deus o tem em um bom lugar.

Aos professores da graduação que despertam o respeito e admiração por nós alunos, que nos motivam e que nos mostram os caminhos que podemos percorrer se um dia nos dedicarmos tão quanto eles se dedicaram um dia. A estes meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O Estágio Curricular Supervisionado ocorreu no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Norte do Tocantins, localizado na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFNT. A área de enfoque trabalhada foi a de Inspeção de Produtos de Origem Animal, no período de 11 de maio a 09 de julho de 2021, sob supervisão de Ézio Machado Rodrigues, Médico Veterinário e Mestrando do laboratório. Ao todo, contabilizaram-se 345 horas de estágio supervisionado, sob orientação do prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior. Durante este período, realizou-se o acompanhamento da rotina laboratorial e a realização de métodos analíticos para determinação de riscos microbiológicos em alimentos de origem animal clandestinos de projetos de pesquisa dos discentes graduandos e pós graduandos. A utilização da microbiologia de alimentos como um instrumento para obtenção de dados a respeito da qualidade e higiene alimentar mostra ser eficaz e fundamental para prevenção de doenças e prejuízos econômicos. Também foi realizado o trabalho de conclusão de curso no qual foi determinada a prevalência de brucelose em bovinos de abate do norte do Tocantins, com abordagem de pesquisa. Foi observada prevalência de brucelose em 312 (10%) dos 3.122 animais avaliados, indicando a brucelose como uma importante zoonose, que segundo os dados obtidos, vem sendo negligenciada na região norte do Tocantins e desta forma conclui-se que medidas sanitárias devem ser adotadas desde a produção até a comercialização de carne bovina a fim de reduzir os riscos à saúde pública.

Palavras chaves: *Brucella abortus*, Saúde Pública, Microbiologia, Doenças Transmissíveis por Alimentos.

ABSTRACT

The Supervised Curricular Internship occurred at the Food Microbiology Laboratory of the Federal University of Northern Tocantins, located at the School of Veterinary Medicine and Zootecnia, in the municipality of Araguaína, Tocantins. The area of focus was Animal Products Inspection, in the period of May 11 to July 9, 2021, under the supervision of Ézio Machado Rodrigues, Veterinarian and MSc student of the post graduation. At all, 345 hours of supervised internship were counted, under the supervision of Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior. During this period, the laboratory routine was monitored and analytical methods were used to determine microbiological risks in clandestine foodstuffs of animal origin from the research projects of undergraduate and postgraduate students. The use of food microbiology as a tool for obtaining data on the quality and hygiene of foodstuffs shows that it is effective and fundamental in preventing disease and economic losses. It was also performed the work of course completion in which it was determined the prevalence of brucellosis in slaughter cattle in northern Tocantins, with research approach. The prevalence of brucellosis was observed in 312 (10%) of the 3,122 animals evaluated, indicating brucellosis as an important zoonosis, which, according to the data obtained, has been neglected in the northern region of Tocantins and thus it is concluded that sanitary measures should be adopted from the production to the commercialization of bovine meat in order to reduce the risks to public health

Key words: *Brucella abortus*, Public Health, Microbiology, Foodborne illness.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Pesagem da amostra para preparação das diluições.....	15
Figura 2 - Amostra após homogeneização em "bag" de "stomacher"	15
Figura 3 - Contagem de aeróbios mesófilos em Ágar de Contagem Padrão de amostra de carne móida.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição municipal de 3.122 amostras de soro de bovinos abatidos em um frigorífico de Araguaína, Tocantins.....	25
Tabela 2 - Distribuição de bovinos estado do Tocantins machos e fêmeas positivos para brucelose no teste confirmatório (2-mercaptoetanol -2ME)	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
APHA	American Public Health Association
BHI	Brain-Heart Infusion Broth
°C	Graus Celsius
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EC	EC Broth
ISO	International Organization for Standardization
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LST	Lauryl Sulfato Triptose
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
NMP	Número Mais Provável
PCA	Ágar Padrão para Contagem
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNCEBT	Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
Prof^a	Professora
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal
SC	Selenito Cistina
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SS	Salmonella Shigella
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TCBS	Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VBBL	Caldo Lactosado Verde Brilhante
2-ME	2-Mercaptoetanol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	13
3	ROTINA DO LABORATÓRIO	14
3.1	Análises microbiológicas	14
3.2	Procedimento de diluição das amostras	14
4	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	16
4.1	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.1.1	Método de análise	16
4.2	Contagem de aeróbios mesófilos	17
4.2.1	Método de análise	17
4.3	Contagem de psicrotróficos	18
4.3.1	Método de análise	18
4.4	Coliformes totais e <i>E. coli</i>	18
4.4.1	Método de análise	19
4.5	Pesquisa de <i>Vibrio</i> spp.	19
4.5.1	Método de análise	19
4.6	Pesquisa de <i>Listeria</i> spp.	20
4.6.1	Método de análise	20
4.7	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	21
4.7.1	Método de análise	21
5	Prevalência da brucelose em bovinos de abate na região tropical do Brasil	22
5.1	INTRODUÇÃO	22
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	23
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.4	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Causadas pela ingestão de patógenos e ou seus metabólitos tóxicos, as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) possuem como principal característica o desenvolvimento de sinais e sintomas entéricos nos pacientes. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação no Brasil são notificados em média, por ano, 700 surtos de DTA, com envolvimento de 13 mil doentes e 10 óbitos (SINAN, 2018).

No ano de 2017 foram notificados 12.503 surtos de DTA's (BRASIL, 2017), dentre os quais 3.196 foram confirmados laboratorialmente, onde em apenas 2.593 surtos foi possível a identificação dos agentes etiológicos causadores, identificando-se 92,2% de bactérias, 6,0% de vírus, 1,2% agentes químicos e outros, e 0,6% protozoários e helmintos.

Tais doenças causam prejuízos não apenas para a saúde pública, mas também para a economia, acarretando grandes perdas para as indústrias, o turismo e a sociedade (NASCIMENTO, 2000). Existem previsões para o aumento do problema no século 21, especialmente com as várias mudanças globais, como o crescimento da população, pobreza, exportação de alimentos e rações animais, que influenciam a segurança alimentar internacional (BRASIL, 2018).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018), os padrões microbiológicos são critérios utilizados para garantir a segurança e a higiene de alimentos, devendo ser atendidos até o último dia de validade do produto. Os padrões relacionados à segurança incluem os micro-organismos patogênicos, suas toxinas e metabólitos de relevância no produto. Já os padrões de higiene incluem os micro-organismos indicadores (BRASIL, 2019).

Como ferramenta para obtenção de dados, as análises microbiológicas são de fundamental importância pois fornecem informação sobre a qualidade, sanidade, higiene e segurança da produção de alimentos, sendo adotada pela indústria para realização do controle de qualidade.

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foi realizado na área de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal, no período de 10 de maio de 2021 a 09 de julho de 2021, totalizando 345 horas, sob orientação do Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior.

Para a escolha do local de estágio foi levada em consideração o papel do

Laboratório de Microbiologia de Alimentos na identificação de micro-organismos relacionados com infecções alimentares no município de Araguaína. O laboratório possui uma boa estrutura, equipe técnica capacitada e projetos de pesquisa de mestrado e doutorado sendo executados durante o semestre curricular, com horário de funcionamento de segunda-feira a sexta-feira das 08:00 às 12:00 horas e das 14:00 às 18:00 horas.

Além do relatório de estágio da rotina laboratorial acompanhada, faz parte o projeto de iniciação científica (PIBIC), desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, intitulado 'Prevalência de brucelose em bovinos na região tropical do Brasil', realizado no período de 17 de outubro a 26 de novembro de 2019.

O objetivo geral do projeto foi levantar informações epidemiológicas sobre a prevalência de brucelose em rebanhos bovinos abatidos na região tropical do Brasil. Onde foram coletadas 3.122 amostras de sangue bovino obtidas durante a sangria em um frigorífico do município de Araguaína, Tocantins.

Objetivou-se com o Estágio Curricular Supervisionado a implementação do desempenho profissional discente por meio da experiência e vivência das práticas educativas em laboratório promovendo o crescimento profissional.

2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Estágio Curricular Supervisionado foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos localizado na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Norte do Tocantins, no município de Araguaína, entre os dias 10 de maio de 2021 a 09 de julho de 2021, totalizando 345 horas de estágio supervisionado.

Durante o Estágio Curricular Supervisionado foram realizadas diversas atividades relacionadas à rotina laboratorial e execução dos projetos de pesquisa. A rotina consistia na preparação de materiais e meios de cultura para a realização de análises laboratoriais dos principais micro-organismos que podem comprometer a segurança microbiológica e o diagnóstico molecular para a identificação dos mesmos.

As análises acompanhadas fazem parte dos subprojetos de mestrado vinculados ao projeto de pesquisa “Perigos microbiológicos e micotoxigênicos à saúde pública dos alimentos de origem animal informalmente comercializados no norte do Tocantins”, sendo realizadas as pesquisas para: pesquisa de bactérias patogênicas dos gêneros *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp.; contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*, contagem de aeróbios mesófilos e contagem de psicrotóxicos.

3. ROTINA DO LABORATÓRIO

3.1 Preparação dos meios de cultura e soluções

Um meio de cultura consiste em uma formulação líquida (caldo), sólida (ágar ou gelatina) ou semi-sólida (gelatina ou pouco ágar) utilizada especificamente para o crescimento, armazenamento ou transporte de micro-organismos ou outros tipos de células (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

O meio de cultura atende às necessidades específicas do grupo, da família, do gênero ou da espécie cultivado, permitindo seu cultivo fora de seu “habitat” natural. Os meios e soluções utilizados foram formulados e produzidos seguindo-se os critérios dos métodos de análise utilizados para os gêneros pesquisados, em ambiente.

3.2 Procedimento de diluição das amostras

Para realização das análises era necessário a preparação das diluições das para obtenção das amostras, procedimento este que tem por objetivo reduzir a concentração de uma das substâncias através da adição de uma substância à outra.

A preparação e inoculação de diluições seriadas da amostra tem por objetivo reduzir o número de micro-organismos por unidade de volume, facilitando-se, na contagem de placas, a obtenção de placas com número de colônias entre 25 e 250, e na contagem pelo método do Número Mais Provável (NMP).

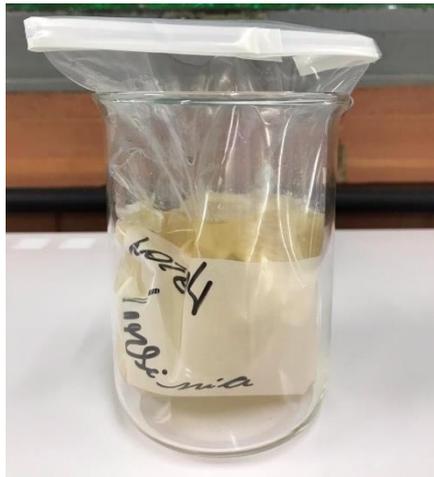
Os procedimentos de manuseio das amostras devem acontecer no interior de fluxos laminares e com materiais estéreis. Para a obtenção da diluição 10^{-1} deve-se pesar $25 \pm 0,2$ gramas adicionar esse conteúdo a uma “*bag*” de “stomacher” (homogeneizador automático) como ilustrado na figura 1. estéril e identificada. Posteriormente, completar o conteúdo da “*bag*” com meio de cultura indicado para o método de análise do micro-organismo e homogeneizar por 60 segundos em aparelho de stomacher. A figura 2 ilustra uma *bag* de stomacher contendo a amostra na diluição 10^{-1} homogeneizada.

Figura 1 Pesagem da amostra para preparação das diluições.



Fonte: Arquivo pessoal / Yron Moreira Rodrigues

Figura 2 Amostra após homogeneização em "bag" de "stomacher".



Fonte: Arquivo pessoal / Yron Moreira Rodrigues

Após a homogeneização, são retirados 1ml da amostra para realização das demais diluições. A quantidade retirada é adicionada a tubos contendo 9ml de solução salina peptonada 0,1% (pode-se utilizar solução salina peptonada 0,1% ou apenas solução salina, dependendo do método do utilizado) e homogeneizada em aparelho agitador "Vortex".

4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o transcorrido período de estágio foram analisados três produtos de origem animal sendo eles carne moída, linguiça suína frescal e camarão fresco. Destes, foram analisados em torno de 800 isolados em que os positivos foram confirmados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Além das atividades acompanhadas em laboratório, é apresentado o projeto de Iniciação Científica (PIBIC) como parte do trabalho de conclusão de curso, projeto este realizado entre 17 de outubro a 26 de novembro de 2019 no Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Foram coletadas 3.122 amostras de sangue bovino obtidas de animais durante a sangria em um frigorífico do município de Araguaína, Tocantins.

4.1 CONTAGEM DE *Staphylococcus aureus*

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* são quantificados seguindo-se o que preconiza a ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003. Como prova bioquímica foi realizado o teste da coagulase pelos *Staphylococcus* conforme Silva et al. (2017), utilizando-se plasma equino.

4.1.1 Método de análise

Para realização da quantificação de *Staphylococcus* foram utilizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} das diluições previamente preparadas para coliformes a 30°C e quantificação de *Staphylococcus*, onde inoculou-se 0,1ml em placas com Ágar Baird Parker (BP) e incubou-se as mesmas a 35°C por 48 horas. Em seguida, a contagem de colônias típicas e atípicas foi realizada para inoculação das mesmas em Ágar Padrão para Contagem (PCA) e seguinte incubação a 37°C por 24 horas.

A próxima etapa foi a prova da coagulase, em que foram inoculadas as colônias típicas de *Staphylococcus* em 0,5ml de plasma equino, seguido da incubação a 37°C por 24 horas. As amostras que demonstraram resultados positivos nesta prova (presença de coagulação do plasma) são instiladas em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) para posterior utilização na extração de DNA e realização de teste biomolecular, a PCR.

4.2 CONTAGEM DE AERÓBIOS MESÓFILOS

A contagem de aeróbios mesófilos é utilizada com intuito de obter de informações gerais sobre a qualidade de produtos, insumos utilizados, práticas de fabricação, manipulação dos alimentos e a vida útil de prateleira. As orientações para realização das análises foram obtidas do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001).

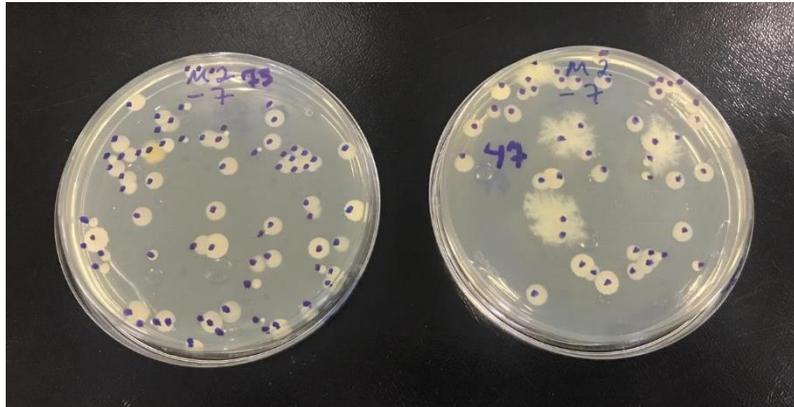
4.2.1 Método de análise

Para análise, $25 \pm 0,2$ gramas da amostra foram adicionados a uma “bag” estéril e identificada com o tipo de alimento analisado e sua respectiva numeração, seguido da adição de 225 ml de água peptonada e homogeneização por 180 segundos em aparelho de “stomacher”.

A inoculação foi realizada através do plaqueamento em profundidade em ágar PCA com 1ml de cada diluição contendo solução salina obtida da amostra, em duplicada, que posteriormente foram incubadas a 35°C por 48 horas para realização da contagem de micro-organismos.

As placas contendo entre 25 e 250 colônias foram utilizadas para contagem em contador de colônia. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro foi obtido pela multiplicação do número de colônias pelo inverso da diluição inoculada. Como foram utilizadas duas placas por diluição (duplicata), foi considerada a média aritmética da contagem obtida em cada uma das placas da duplicata. A figura 3 ilustra a contagem de colônias de aeróbios mesófilos de uma amostra de carne moída.

Figura 3 Contagem de aeróbios mesófilos em Ágar de Contagem Padrão de amostra de carne móida.



Fonte: Arquivo pessoal / Yron Moreira Rodrigues

4.3 CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS

Para contagem de psicotróficos também foram seguidas as orientações do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (COUSIN, 2001) em que é determinado o limite para a contagem das amostras dos mesmos em um intervalo de seis horas, a partir da coleta. A estocagem refrigerada permite a multiplicação e o tempo de geração de vários desses micro-organismos encontra-se dentro desse intervalo, portanto as análises eram feitas logo após a coleta das amostras.

4.3.1 Método de análise

Para realização do método o plaqueamento foi realizado em superfície utilizando ágar PCA como meio de cultivo e a incubação feita a 7°C por 10 dias.

4.4 COLIFORMES TOTAIS E *E. Coli*

Para realização destas análises foram utilizados as orientações, com algumas modificações, da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001).

4.4.1 Método de análise

Para obtenção e análise das amostras de coliformes são pesados $25 \pm 0,2$ gramas da amostra e adicionadas a uma “*bag*” estéril e identificada com o tipo de alimento analisado e sua respectiva numeração, onde em seguida são adicionados 225ml de água peptonada e feita a homogeneização por 180 segundos em aparelho de “*stomacher*”.

Seguido da homogeneização, as diluições seriadas pré-estabelecidas foram feitas a partir da amostra a 10^{-1} , em que foram pipetados 1ml da amostra para cada diluição partindo da 10^{-2} a 10^{-8} em tubos contendo 9ml de solução salina. De cada diluição foram pipetados 1ml para tubos contendo caldo Caldo Lauryl Sulfato Triptose (LST) em diluições da 10^{-2} a 10^{-8} incubados em seguida a 35°C por 24 horas.

Os tubos que apresentaram aspecto turvo e presença de gás, ou seja, positivos, tiveram suas três últimas diluições utilizadas para inoculação de $30\mu\text{l}$ para tubos contendo caldo Lactosado Verde Brilhante (VBBL) e outros $30\mu\text{l}$ para caldo EC Broth (EC) e incubados a $44,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As amostras positivas no caldo EC foram inoculadas por alçada em Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubadas a 37°C por 24 horas.

Por alçada, foram coletadas as colônias típicas de *E. Coli*, que possuem coloração verde, e instiladas em caldo BHI para posterior extração de DNA e realização da PCR.

4.5 PESQUISA DE *Vibrio* spp.

A pesquisa qualitativa de *Vibrio* spp. patogênicos foi realizada conforme o método recomendado pela APHA descritas na 5ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (PAOLA e JONES, 2015), com modificações. A partir dos isolados suspeitos, foi realizada a PCR confirmatória de genes que codificam a expressão dos fatores de virulência de *Vibrio* spp., em que foram confirmados 64 isolados.

4.5.1 Método de análise

Para obtenção e análise das amostras são pesados $25\pm 0,2$ gramas da amostra e adicionados a uma “*bag*” estéril e identificada com o tipo de alimento analisado e sua respectiva numeração, onde em seguida são adicionados 225ml de água peptonada alcalina e feita a homogeneização por 180 segundos em aparelho de “*stomacher*” para posterior incubação a 35°C por 24 horas.

Transcorrido o tempo de incubação, por alçada, as amostras são inoculadas em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) e as placas incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias típicas identificadas, de coloração verde, são coletadas e inoculadas em BHI para realização da extração de DNA posteriormente.

4.6 PESQUISA DE *Listeria* spp.

A pesquisa qualitativa dos micro-organismos do gênero *Listeria* nos alimentos de origem animal foi feita baseada na ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004, com algumas modificações. Dentre a totalidade de isolados obtidos, foram confirmados 24 isolados de *Listeria* spp.

4.6.1 Método de análise

Para realização da análise e obtenção de amostras são pesados $25\pm 0,2$ gramas da amostra adicionados a uma “*bag*” estéril e identificada com o tipo de alimento analisado e sua respectiva numeração, onde em seguida foram adicionados 225ml de caldo Fraser e feita a homogeneização por 180 segundos em aparelho de “*stomacher*”. Após homogeneização as amostras são incubadas a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\pm 2\text{h}$.

Após transcorrido o período de incubação são pipetados 0,1ml da amostra e adicionados a tubos com 10 ml de caldo Fraser e em seguida incubados a 37°C por 24 horas. Em seguida é feita a inoculação do enriquecimento em ágar *Listeria* seletivo e Oxford, com posterior incubação das placas a 37°C por 48 horas. As colônias típicas de *L. monocytogenes* são rodeadas por uma zona negra devido aos compostos fenólicos de ferro.

Cada colônia típica (preta) é repicada para caldo BHI para posterior etapa de extração de DNA e realização da PCR.

4.7 PESQUISA DE *Salmonella* spp.

A análise qualitativa de *Salmonella* spp., como indicador da segurança microbiológica, foi realizada seguindo as normas recomendadas pela ISO 6579:2002/Amd 1:2007, com modificações. A partir da recuperação das colônias em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Verde Brilhante (VB), todos os isolados típicos são encaminhados para análise em PCR gênero-específica.

Dentre os positivos foram confirmados 50 isolados de *Salmonella* spp.

4.7.1 Método de análise

Para realização da análise e obtenção de amostras foram pesados $25 \pm 0,2$ gramas da amostra adicionados a uma “bag” estéril e identificada com o tipo de alimento analisado e sua respectiva numeração, onde em seguida foram adicionados 225ml de água peptonada e feita a homogeneização por 180 segundos em aparelho de “stomacher”. Após homogeneização as amostras são incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Em seguida foram pipetados 1ml do pré-enriquecimento para tubos contendo 10ml de caldo Selenito Cistina (SC) e incubados a 37°C por 24 horas. Em tubos contendo 10ml de caldo Rappaport foram adicionados 0,1ml do pré-enriquecimento e os tubos em seguida incubados a $41,5^\circ\text{C}$ por 24 horas em banho maria.

Após o período de incubação as amostras típicas foram repicadas por alçada para ágares XLD e Salmonella Shigella (SS) e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Transcorrido o tempo de incubação as colônias típicas (de coloração preta) foram repicadas por alçada para caldo BHI para posterior extração de DNA e realização da PCR.

5. Prevalência da brucelose em bovinos de abate na região tropical do Brasil

5.1 INTRODUÇÃO

Caracterizada como uma doença infectocontagiosa cosmopolita, a brucelose é uma doença causada por micro-organismos do gênero *Brucella* spp. considerada uma zoonose, exceto naqueles países em que foi erradicada (LEAL FILHO, 2013). Resulta em significativas perdas econômicas na bovinocultura de leite e corte, possuindo grande impacto na saúde pública e à sanidade animal (BRASIL, 2006).

O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA), regulamentado no Decreto nº 9.013 e alterado pelo Decreto nº 9.069 de 2017 (BRASIL, 2017a), em seu Art. 180, determina que mesmo em carcaças de bovinos sabidamente soropositivos para brucelose, é possível a liberação para consumo direto desde que esses animais não estejam em estado febril durante o exame *ante-mortem* e, havendo a presença de sinais clínicos da doença, como a bursite brucélica ou nódulos inflamatórios nos órgãos reprodutivos, essas partes sejam removidas e condenadas.

Considerando que os bovinos são as principais fontes de infecção de *B. Abortus* e podem contaminar os seres humanos através do consumo de produtos de origem animal, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou em 2001 o Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (BRASIL, 2001), que visa a redução da frequência e prevalência da doença nos rebanhos bovinos até a sua erradicação, minimizando, indiretamente, também a transmissão da doença para os seres humanos.

O PNCEBT visa, em primeiro momento, a redução gradual dos casos brucelose entre os bovinos pela vacinação de fêmeas. Comercialmente são disponibilizados dois tipos de vacinas, ambas com cepas atenuadas de *B. abortus*, a cepa B19 ou RB51. As diferenças antigênicas entre as duas cepas fazem com que elas sejam recomendadas para vacinação de animais com idades diferentes (BRASIL, 2001).

A cepa B19, por se tratar de um antígeno rugoso e que leva a produção de imunoglobulinas G de longa ação, apresenta interferência nos testes sorológicos de diagnóstico, podendo-se encontrar animais falso positivos em até 21 meses depois

da vacinação. Dessa forma, a vacinação com essa cepa é recomendada somente para bezerras com até oito meses de idade, sendo que animais com idade superior a essa é obrigatória a vacinação com a cepa RB51 (BRASIL, 2017).

A região de Araguaína, norte do estado do Tocantins, concentra mais de seis frigoríficos sob o regime de inspeção federal, abatendo diariamente mais de 3 mil bovinos. Considerando sua posição estratégica, a região recebe para o abate animais de diferentes estados além do Tocantins, como do Pará e Maranhão, e exporta para mais de 10 países.

A amostragem de sangue de animais abatidos nesse município, portanto, pode indicar a situação epidemiológica em toda a região norte do estado do Tocantins. A determinação dos municípios onde há prevalência da doença no estado permitirá direcionar estratégias educativas para controle e fiscalização por parte da agência de defesa agropecuária estadual, reduzindo a ocorrência de novos casos e a circulação do agente bacteriano entre os bovinos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 3.122 amostras de sangue bovino obtidas de animais durante a sangria em um frigorífico do município de Araguaína, Tocantins, no período de 17 de outubro a 26 de novembro de 2019. As amostras de sangue foram coletadas após a insensibilização do animal por concussão cerebral pelo método percussivo penetrativo e sangria (abate), conforme fluxograma do estabelecimento, em dias alternados de acordo com a disponibilidade do frigorífico.

As amostras, naturalmente coaguladas, foram centrifugadas a 3.500 rpm para obtenção de alíquotas de 1 mL soro que foram separadas e acondicionadas em micro-tubos previamente identificados e estocadas a -20°C até sua análise sorológica.

Foi realizada a prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), no qual foram utilizados antígenos para *B. abortus* cedidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Minas Gerais. A prova do AAT consiste em uma soroglutinação em placa, na qual o antígeno é tamponado em pH baixo.

Esta acidificação do antígeno reduz a atividade da IgM, tornando a prova seletiva para identificação da subclasse IgG (MEGID, 2000). O teste é utilizado como prova de triagem em rebanhos e possui uma grande sensibilidade em animais

vacinados com a B19. Recomenda-se, porém, que os positivos nesta prova sejam retestados em provas complementares (MEGID, 2000).

Dessa forma, foi realizada a prova da soroaglutinação lenta e 2-mercaptoenol (2-ME) como testes confirmatórios. Todas as amostras reativas na triagem foram submetidas ao teste confirmatório. Para realização desta segunda etapa foram utilizadas as normas da Instrução Normativa nº 41, de 24 de novembro de 2006 (BRASIL, 2006) que determina como a prova deve ser executada. Esta parte do experimento foi realizada no Laboratório de Higiene e Saúde Pública da UFT.

Os resultados foram tabulados em Microsoft Excel v. 10 conforme os municípios e animais amostrados.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amostrados 3.122 animais, dos quais foi possível observar que o nível de infecção é de 10,0% (312 de 3.122) da totalidade de animais avaliados e confirmados na prova do 2ME. A distribuição das amostras de soro avaliadas conforme o município de origem do estado do Tocantins está representada na Tabela 1, assim como os resultados dos testes de triagem e confirmatórios dos animais de cada um dos municípios avaliados.

Tabela 1. Distribuição municipal de 3.122 amostras de soro de bovinos abatidos em um frigorífico de Araguaína, Tocantins, coletadas entre 17 de outubro a 26 de novembro de 2019 e resultados estratificados de amostras reagentes aos testes de triagem (Antígeno Acidificado Tamponado – AAT) e confirmatório (2-mercaptoetanol -2ME).

Municípios	Número de amostras	Testes laboratoriais		% de positivos
		Reativos AAT	Reativos 2-ME	
Bandeirantes	402	124	43	14,58
Ananás	382	214	42	10,99
Santa Fé do Araguaia	295	71	31	16,94
Araguaína	270	86	28	6,97
Couto Magalhães	205	58	20	33,90
Bernardo Sayão	189	42	14	12,84
Carmolândia	183	57	14	19,44
Aragominas	151	26	13	21,31
Nova Olinda	109	44	13	15,85
Xambioá	108	46	12	4,44
Pium	114	33	11	5,82
Arapoema	96	38	8	3,90
Filadélfia	54	29	8	14,81
Palmeirante	84	16	8	40,00
Itaporã	82	47	8	8,33
Babaçulândia	72	15	7	43,75
Piraquê	61	42	7	4,64
Muricilândia	60	34	5	4,39
Araguanã	59	22	4	4,76
Sítio Novo	18	11	4	20,00
Araguatins	36	13	3	16,67
Augustinópolis	20	11	3	15,00
Nazaré	20	31	3	8,33
Wanderlândia	20	6	2	3,33
Pau D'arco	16	36	1	0,93
Riachinho	16	3	0	0,00
Total Geral	3.122	1.155	312	

Fonte: elaborada pelo autor.

Entre os 312 positivos, 160 (51,3%) eram machos e 152 (48,7%) eram de fêmeas. No entanto, foram amostrados 2.337 (74,8%) machos e 785 (25,1%) fêmeas compondo esse estudo. Analisando-se separadamente, de acordo com o sexo, é possível constatar maior percentual de fêmeas positivas, uma vez que 7,14% dos machos avaliados foram positivos e 18,21% das fêmeas foram reativas, conforme pode ser verificado na Tabela 2. Esse maior percentual de

fêmeas positivas pode ser influenciado pela vacinação dos animais com a cepa B19. No entanto, nenhum animal amostrado nesse estudo tinha idade inferior à 24 meses.

Tabela 2. Distribuição de bovinos estado do Tocantins machos e fêmeas positivos para brucelose no teste confirmatório (2-mercaptoetanol -2ME) da totalidade de 3.122 amostras de soro coletadas entre 17 de outubro a 26 de novembro de 2019 em um frigorífico de inspeção federal.

Amostras	Positivo	(%)	Negativo	(%)	Inconclusivo	(%)	Total
Machos	160	6,8%	2.136	93,2%	41	1,7%	2.337
Fêmeas	152	19,3%	602	80,7%	31	3,9%	785
Total	312	10,0%	2.738	90,0%	72	2,3%	3.122

Fonte: elaborada pelo autor.

O estudo de Ogata et al. (2009) avaliou 20.908 fêmeas bovinas do estado do Tocantins e observou prevalência de 4,4% de brucelose, resultado quatro vezes menor em relação ao observado pelo presente trabalho.

Infelizmente, durante os dias que o estabelecimento disponibilizou-se a liberar a coleta de amostras, não houveram animais oriundos de outros estados, além do Tocantins. Os animais positivos foram mais incidentes nos municípios de Babaçulândia (43,7%), Palmeirante (40,0%), Couto Magalhães (33,9%), Aragominas (21,3%) e Sítio Novo (20,0%).

Não foram observados animais com sinais clínicos de brucelose e sabe-se que não foram observadas lesões *post-mortem* sugestivas de brucelose nas carcaças durante os dias de coleta. Tão pouco houve notificação ao estabelecimento de animais sabidamente positivos para brucelose. Isso pode sugerir que a inspeção *post-mortem* pode não ser suficiente para verificar a presença ou não de alterações causadas pela brucelose, onde há a falta de meios diagnósticos específicos utilizáveis pelos médicos veterinários de inspeção final de carcaças durante a rotina de trabalho que os permitam associar tais alterações com a infecção brucélica.

5.4 CONCLUSÃO

Foi possível observar que a ocorrência de brucelose, em animais de abate no estado do Tocantins é considerada alta. Isto pode estar relacionado à baixa eficiência na execução do PNCEBT. Deficiências na vacinação e a falta de controle zoonosológico animal são algumas das justificativas para os resultados encontrados, sendo de extrema importância a necessidade de implantar sistemas de gestão sanitária na bovinocultura de corte do Tocantins para melhorar a eficiência da execução do PNCEBT, reduzindo-se a ocorrência da enfermidade em animais de abate e, conseqüentemente, o risco à saúde pública.

Das análises microbiológicas acompanhadas foi possível concluir que a utilização da microbiologia de alimentos como um instrumento para obtenção de dados a respeito da qualidade e higiene alimentar mostra ser eficaz e fundamental para prevenção de doenças e prejuízos econômicos.

O período de estágio supervisionado obrigatório no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFNT permitiu ter uma visão melhor da importância das análises microbiológicas.

Foi possível também aprender e aprimorar as práticas laboratoriais, o cumprimento das legislações federais na área, assim como ter um melhor contato com umas áreas de atuação da Medicina Veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC Nº 12, 02 jan. de 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-12-de-2-de-janeiro-de-2001.pdf>>. Acesso em 28 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 2 de 10 de janeiro de 2001. Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 11 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de 24 de novembro de 2006. Aprova os “Critérios Específicos para o Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico da Brucelose Bovina e Bubalina”. Diário Oficial da União, Seção 1, nº 227, 28 de novembro de 2006, p. 86-89.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 10 de 03 de março de 2017. Estabelece o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 04 mar. 2017a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 30 mar. 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa n. 60 de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 26 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde, 07 Jun. 2018. Disponível em: <<https://bvsmis.saude.gov.br/07-6-seguranca-dos-alimentos-responsabilidade-de-todos-dia-mundial-da-seguranca-dos-alimentos/>>. Acesso em 02 Jul. 2021.

COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASAVADA, P.C. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 13, p.159-166.

FERREIRA, J. C. C.; RIBEIRO, T. M. P.; FRANCENER, S. F. Soroprevalência da brucelose em bovinos abatidos sob fiscalização estadual em Itacoatiara, Amazonas. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.12, p. 477-486, 2018.

ISO 6888-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and Other Species) – Part 1: Technique Using Baird-Parker Agar Medium, **International Organization for Standardization**, 1999, Amendment 1:2003.

ISO 11290-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* e Part 1: Detection Method. **International Organization for Standardization**, 1996, Amendment 1:2004.

ISO 6579. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for Detection of *Salmonella* spp. 4th ed., **International Organization for Standardization**, 2002, Amendment 1:2007.

LEAL FILHO, J. M. **Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso do Sul**. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

MEGID, Jane et al. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade de São Paulo**, v. 37, n. 5, p. 00-00, 2000. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/13395>>. Acesso em 02 Jul. 2021.

MORTON, R.D. Aerobic plate cont. In: DOWNES, F.P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 7, p. 63-67.

NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos sócio econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em pauta**, v. 40, p. 22-26, 2000.

OGATA, R.A; **Caracterização espacial da brucelose bovina no Estado do Tocantins**. 2009. 81 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

PAOLA, A.; JONES, J.L. Vibrio. In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M.L. (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 5th Ed. Washington: American Public Health Association, Chapter 40:527-573, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.T.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de Métodos Microbiológicos de Análise de Alimentos e Água**, 5ª ed, São Paulo: Blucher, 560 p., 2017.

SINAN, **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2018.

SOLA, M. C.; FREITAS, F. A. D.; SENA, E. L. D. S.; MESQUITA, A. J. D. **Brucelose bovina**: revisão. Enciclopédia Biosfera, v. 10, n. 18, p. 686-714, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.