

Aprimoramento na manutenção de animais de laboratório: avaliação microbiológica de rações irradiadas e autoclavadas oferecidas ad libitum para camundongos da linhagem C57BL/6J

Improvement in laboratory animal maintenance: microbiological evaluation of irradiated and autoclaved feeds offered ad libitum to C57BL/6J mice

DOI:10.34117/bjdv8n3-268

Recebimento dos originais: 14/02/2022

Aceitação para publicação: 21/03/2022

Viviane Santos de Barros Siqueira

Mestre em Ciências em Animais de Laboratório, pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - ICTB - Fiocruz/RJ

Instituição: Centro de Pesquisa INCA, Instituto Nacional de Câncer

Endereço: Rua André Cavalcanti, 37, Lapa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 20231-050

E-mail: vivisique17@gmail.com

Valéria de Mello Medeiros

Mestre em Vigilância Sanitária, pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz/RJ

Instituição: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz/RJ

Endereço: Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900

E-mail: valeria.medeiros@zpmail.com.br

Patrícia Reid Begossi Clinio

Mestre em Ciências em Animais de Laboratório, pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB - Fiocruz/RJ

Instituição: Centro de Pesquisa Inca/Instituto Nacional de Câncer

Endereço: Rua André Cavalcanti, 37, Lapa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 20231-050

E-mail: reidbegossi@gmail.com

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Doutora em Saúde Pública, pela Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca ENSP -Fiocruz/RJ

Instituição: Departamento de Ciências Biológicas - ENSP – Fiocruz/RJ

Endereço: Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, Prédio de Laboratórios da ENSP, sala 14 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 21040-900

E-mail: joseli@ensp.fiocruz.br

RESUMO

É comprovado que a qualidade da ração peletizada disponível para animais de laboratório irá influenciar a condição sanitária destes biomodelos. Mesmo havendo esterilização prévia das rações que serão utilizadas nos comedouros, estas podem se contaminar devido ao manuseio, estocagem e contato com o próprio animal e ambiente. Devido a estas possíveis vias de contaminação, este trabalho teve como objetivo verificar a qualidade microbiológica de rações irradiadas e autoclavadas e avaliar por quanto tempo elas

mantêm a qualidade higiênico-sanitária quando dispostas nos comedouros. Essa verificação se torna relevante já que, geralmente, as rações são trocadas integralmente semanalmente, mas poderiam somente ser repostas gerando economia. Para atingir esse objetivo foi realizada a pesquisa de microrganismos indicadores durante o período de manutenção da ração (7 e 14 dias) nas gaiolas dos camundongos. O experimento foi realizado com quatro grupos de camundongos da linhagem C57BL/6J para cada ração. As rações foram marcadas permitindo assim a sua diferenciação para comparação da sua qualidade/tempo de exposição. Após as análises microbiológicas das rações, os resultados apontaram ausência de *Salmonella* spp. e também contagem de microrganismos mesófilos totais, bolores, leveduras, coliformes totais e termotolerantes abaixo dos limites máximos estabelecidos na literatura. A análise mostrou que após todo o período de exposição, as rações mantiveram boa qualidade higiênico-sanitária e que é possível repor a ração por cima da previamente utilizada em até 14 dias sem prejuízo de sua qualidade.

Palavras-chave: qualidade higiênico-sanitária, análise microbiológica, ração, linhagem c57bl/6j.

ABSTRACT

The quality of pelleted feed available for laboratory animals is directly linked to the health condition of these biomodels. Even if there is previous sterilization of the rations that will be used in the feeders, they can be contaminated due to handling, storage and contact with the animal and the environment. Due to these possible routes of contamination, this work aimed to verify the microbiological quality of irradiated and autoclaved rations due to evaluating how long they maintain this hygienic-sanitary quality. This verification becomes relevant since, generally, the food is completely changed weekly, but it could just be re-added, generating savings. To achieve this objective an investigation of indicator microorganisms was carried out during the period of maintenance (7 and 14 days) of the feed in the mice cages. The experiment was carried out with four groups of C57BL / 6J mice for each diet. The feed were marked, thus allowing their differentiation to compare their quality / exposure time. After microbiological analysis of the diets, the results obtained were: absence of *Salmonella* spp. and counting of total mesophilic microorganisms, molds, yeasts, total and thermotolerant coliforms below the maximum limits established in the literature. Thus showing that, after the entire period of exposure, the feed maintained good hygienic-sanitary quality, and that it is possible to add animal feed on top of that previously used in up to 14 days, without compromising its quality.

Keywords: hygienic-sanitary quality, microbiological analysis, feed, line c57bl / 6j.

1 INTRODUÇÃO

Os animais de laboratório são muito importantes para a pesquisa e para o desenvolvimento da área de saúde e por isso, nos dias atuais, exige-se que esses tenham padrões sanitários e genéticos conhecidos. Para obter esses padrões são necessários: instalações apropriadas, equipamentos especializados e pessoal capacitado (Majerowicz, 2008). Assim, haverá um aumento na confiabilidade dos resultados, já que estes animais serão criados com qualidade (Andrade et al, 2006). Além disso, menos animais serão

necessários para atingir os resultados experimentais, reduzindo o tempo de pesquisa, diminuindo os custos, reduzindo os riscos para a saúde humana devido a zoonoses e proporcionando bem-estar e saúde para esses animais (Majerowicz, 2008).

Logo, é necessária a criação de barreiras sanitárias eficientes para que esses animais não sejam contaminados com microrganismos provenientes do meio externo. Um importante ponto crítico para o qual devemos dar total atenção é a sua alimentação, pois se a ração oferecida para esses biomodelos não estiver isenta de microrganismos patogênicos, poderá afetar a saúde desses animais, impactando assim no sucesso do desenvolvimento de um experimento (Reis, 2008; Shahhossein et al, 2019).

Portanto, para que os animais sejam criados com mais qualidade, as rações devem ser isentas de contaminantes químicos e microbiológicos (Lapchik et al, 2017), possuir nutrientes específicos para cada espécie, formulação conhecida e sem variações (NRC, 2010). Além disso, devem ser palatáveis e oferecidas diariamente, já que o bom desenvolvimento desses animais dependerá da composição da ração que eles consomem e da qualidade que esta possui (Carvalho et al, 2003).

Com base em nossa pesquisa na literatura, observa-se com consonância das opiniões de Santos e colaboradores (2000), Longo e colaboradores (2010) e Americano (2016), que existem poucos trabalhos referentes ao controle microbiológico das rações, ainda mais associados a animais de laboratório, gerando então, a necessidade de estudos que abordem este assunto, já que a qualidade deste tipo de alimentação e a forma como é provida comprometem o padrão sanitário desses animais. Segundo esses autores, os microrganismos que indicam a qualidade higiênico-sanitária de rações são: mesófilos totais, bolores, leveduras, coliformes totais e termotolerantes e a bactéria *Salmonella* spp.. Sendo a última de maior importância clínica veterinária e os coliformes termotolerantes, os melhores indicadores de contaminação fecal, pois o principal microrganismo deste grupo é a *Escherichia coli* (Santos et al, 2000; Longo et al, 2010; Americano, 2016).

Nos biotérios de criação, apesar das rações e de todo material que entra em contato com os animais ser esterilizado, não há consenso se a ração remanescente não utilizada no comedouro das gaiolas deva ser toda descartada no momento da limpeza da gaiola, só descartada se estiver muito roída ou com aspecto ruim, ou ser somente complementada (ração nova colocada por cima da antiga) e não totalmente trocada. Além disso, o seu manuseio, mesmo que indireto, durante a manutenção dos animais, a estocagem e o contato com os camundongos durante o período de consumo, pode levar a contaminação e possível problema na qualidade deste alimento. Os raros trabalhos encontrados não

consideram o tempo de exposição/reposição da ração, informação de extrema importância a ser analisada.

A partir deste cenário, este trabalho investigou a qualidade microbiológica das rações disponibilizadas para roedores de uma colônia de criação SPF (*Specific Pathogen Free*) ao longo do tempo de permanência padrão das rações nas gaiolas, e se realmente haveria a necessidade da troca total da ração semanalmente ou se o procedimento somente de reposição é suficiente, visando a manutenção do status sanitário dos animais, bem-estar, redução do número de animais criados, manutenção da qualidade da ração e economia. Para este fim, foram pesquisados microrganismos indicadores, como os mesófilos totais, coliformes totais e termotolerantes, bolores, leveduras e patogênicos, como *Salmonella* spp. (Lapchik et al, 2017; Girio et al, 2012; Chinchilla et al, 2021), durante todo o período de manutenção dos animais nas gaiolas, com o objetivo de verificar se a ração mantinha sua qualidade microbiológica mesmo sendo repostada apenas parcialmente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 RAÇÃO

O material utilizado em nossa pesquisa incluiu rações comerciais em forma de pellet: Nuvilab® CR1 - autoclavável e Nuvilab® CR1- irradiada, ambas fabricadas pela Quimtia Brasil.

A ração irradiada foi esterilizada por irradiação gama pela Companhia Brasileira de Esterilização na dose de 10 kGy, enquanto a ração autoclavável foi autoclavada no campus da Fiocruz Manguinhos, por 121°C/ 20 minutos em autoclave vertical de dupla porta da marca Getinge, modelo: PACS 2000 no Laboratório de Experimentação Animal - LAEAN/Bio-manguinhos/ FIOCRUZ.

2.2 ANIMAIS

Foram utilizados 40 animais da linhagem C57BL/6J, SPF (*Specific Pathogen Free*), de oito a doze semanas (CEUA INCA parecer: 001/19). O número amostral foi baseado nos trabalhos de Reis (2008), na RDC nº 12 da ANVISA (2001) e em Clarke e colaboradores (1977). Sendo 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) alimentados com ração irradiada e 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) com a autoclavada. Em cada gaiola foram colocados 5 animais, formando assim 4 gaiolas (grupos) por tipo de ração.

Os camundongos ficaram em mini-isoladores que foram colocados em racks ventilados (Alesco®) possuindo dupla filtragem com pré-filtro e filtro absoluto (HEPA).

Os animais foram adquiridos e mantidos na área de criação de recursos animais do Instituto Nacional de Câncer a uma temperatura de conforto de 21 a 24°C, umidade de 40 a 60% e com ciclo de iluminação de 12/12 horas (claro/escuro) seguindo as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

Foram utilizados animais de 8 a 12 semanas, que é a faixa etária mais utilizada no Inca, sendo que estes consumiam a ração autoclavada ou a ração irradiada desde o desmame.

A água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo experimento, sendo a água e gaiolas trocadas uma vez por semana durante a manutenção desses animais. As novas rações, previamente diferenciadas, foram adicionadas por cima da ração remanescente durante a manutenção desses animais. Todos os insumos componentes do microambiente foram esterilizados por autoclavagem 121°C por 20 minutos, sendo a troca de todos os materiais realizada em módulo de troca da Alesco®.

3 DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS

3.1 TESTE INICIAL DE ESTERILIDADE DA RAÇÃO

Esta análise foi realizada quando os sacos de rações (autoclavada e irradiada) foram abertos para verificar se o processo de esterilização foi eficaz. Quando não é utilizado todo o saco de ração este é lacrado e guardado em módulo de troca por no máximo uma semana. Para verificar se o manuseio e estocagem, após abertura das embalagens, não alterou seu conteúdo microbiológico foi retirada outra amostra para análise após uma semana do saco aberto. As amostras foram retiradas da parte de cima e do meio do saco e misturadas para análise, totalizando 10g para cada ensaio. Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica em módulo de troca utilizando-se luva estéril. As análises consistiram em testes de contagem de mesófilos, bolores e leveduras, seguindo as recomendações da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010).

3.2 MARCAÇÃO DAS RAÇÕES

Depois do teste de esterilidade, as embalagens de rações (ração autoclavada e ração irradiada) foram abertas em módulo de troca (Alesco®) e com o auxílio de um

pincel e luva estéril marcou-se todo o pellet com o corante alimentício líquido da marca Arcolor®.

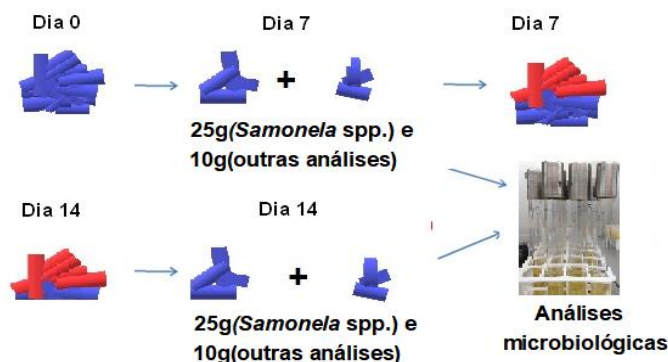
O corante foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm, utilizando-se, para cada *pellet* de ração, aproximadamente de 0,3 mL à 0,5 mL do corante previamente diluído 1:10, seguindo as recomendações de Siqueira e colaboradores (2020). De acordo com esses autores, o corante não influencia o crescimento bacteriano e as rações continuam palatáveis, não havendo entre os animais, preferência no consumo entre a ração normal e a marcada, nem entre as diferentes cores.

Sendo assim, esse corante foi usado para diferenciar através das cores as rações iniciais dispostas no comedouro e as subsequentes, facilitando a análise da qualidade microbiológica das mais antigas, sem haver incerteza na hora da coleta.

3.3 DISPOSIÇÃO E COLETA DAS RAÇÕES

Na primeira semana, foram colocadas em cada gaiola (4 gaiolas com ração irradiada e 4 gaiolas com ração autoclavada) 220 g de ração marcada com corante comestível tipo anilina na cor azul, que foi sendo consumida pelos animais durante 7 dias. Após esse período foram obtidas amostras para verificar a presença de microrganismos indicadores, de onde retirou-se de forma asséptica 25 g desta ração para análise de *Salmonella* spp. e 10 g para as outras análises (figura 1). As análises foram realizadas no Laboratório de análise microbiológica de alimentos e água, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS - Fiocruz), seguindo as determinações da Farmacopeia brasileira (ANVISA, 2010), de Feng et al (2018) e de Andrews et al (2018).

Figura 1. Esquema das análises microbiológicas das rações marcadas com corantes comestíveis.



No momento em que foram retiradas as alíquotas da ração colorizada de azul, para análise (1 semana após colocadas), foram colocadas por cima das rações remanescentes 110 g de ração colorizada em vermelho, completando assim o comedouro de ração, de acordo com a rotina que é realizada seguindo o POP (procedimento operacional padrão) de manutenção animal da área de recursos animais do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Após uma semana desta reposição, foram realizadas análises microbiológicas novamente dos pellets iniciais corados em azul, pois correspondiam às rações mais antigas da gaiola (14 dias no comedouro), seguindo o mesmo protocolo do procedimento anterior (figura 1). Esse procedimento foi realizado para verificar se o processo de completar o comedouro com ração nova, sem o descarte da antiga, poderia ser realizado. No entanto nos comedouros onde não havia amostra de ração azul (14 dias no comedouro) suficiente para análise, foi também retirado parte de ração vermelha (7 dias no comedouro) para que a quantidade necessária para a análise da qualidade da ração fosse atingida.

4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.1 PREPARO E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE RAÇÃO

Para pesquisa de *Salmonella* spp. foram adicionados 225 mL do diluente (cloreto de sódio – peptona com PH 7,0) à 25 g de ração (diluição 10^{-1}). Para a verificação da presença dos outros microrganismos, foram adicionados 90mL do diluente (cloreto de sódio – peptona com PH 7,0) em 10 g de ração (diluição 10^{-1}). A partir destas diluições foram preparadas diluições decimais sucessivas, pela transferência de 1 mL da diluição anterior em 9 mL de diluente, obtendo as diluições 10^{-2} e 10^{-3} (ANVISA, 2010; Feng et al, 2018; Andrews et al, 2018).

4.2 NMP-TESTE PRESUNTIVO PARA COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

Depois de realizadas as diluições seriadas das amostras de ração, foi retirado 1 mL de cada diluição e adicionado a uma série de três tubos contendo o meio LST (caldo lauril sulfato), ou seja, cada diluição foi realizada em triplicata para uma análise de três tubos, permitindo assim, que a avaliação do NMP (número mais provável) de coliformes presentes, fosse realizada (Feng et al, 2018). Os tubos com meio LST foram então incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24h e avaliados quanto ao crescimento e produção de gás.

Os tubos onde foi possível evidenciar a produção de gás foram registrados como positivos. Os tubos onde não se observou formação de gás foram novamente incubados por mais 24h para registro final (Feng et al, 2018).

4.3 TESTE CONFIRMATÓRIO PARA COLIFORMES TOTAIS

A partir de cada tubo LST em que houve produção de gás (positivo), foi transferida uma alíquota da suspensão para um tubo com caldo VBBL (caldo verde brilhante bile) para confirmação dos coliformes totais. Estes tubos foram então incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e examinados quanto a produção de gás em 48h. Com base na confirmação de tubos com gaseificação para três diluições consecutivas, foi calculado o NMP dos coliformes totais (Andrews et al, 2018).

4.4 NMP-TESTE CONFIRMATÓRIO PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES/*Escherichia coli*.

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

4.5 TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS DE *E. coli*

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

4.6 PESQUISA DE *Salmonella* spp.

Para verificar se havia presença de *Salmonella* nas amostras de ração dispostas no comedouro, as diluições iniciais com cloreto de sódio e peptona obtidas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Decorrido esse tempo, foi retirado 1 mL de cada diluição e colocado em um

tubo que continha 10mL do caldo tetrionato, 0,1 mL de verde brilhante a 0,1% e 0,2 mL de iodeto de potássio a 0,1%, e este foi incubado a 35°C por 24h. Foi colocado 0,1 ml das diluições também em tubo contendo o caldo Rappaport Vassiliadis e incubado a 42°C/24h (Feng et al, 2018). Após 24h foi transferido de cada um dos tubos contendo o caldo Rappaport Vassiliadis e caldo tetrionato, 0,1 mL para ser semeado nos meios, ágar Hektoen (HE) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). Esses meios foram então incubados por 24h e observados se havia colônias típicas de *Salmonella* spp. que devem apresentar-se transparentes, com ou sem centro preto, de cor rosa escuro nas placas contendo XLD e coloração verde azulada nas placas com HE. No caso de haver presença de colônias compatíveis com *Salmonella* spp. é indicado a realização de testes bioquímicos (TSI, LIA e ureia) e confirmação através de sorologia (Andrews et al, 2018).

5 RESULTADOS

5.1 CONSUMO DE RAÇÃO AUTOCLAVADA OU IRRADIADA

Na figura 2, pode-se observar o consumo da ração corada de azul após uma e duas semanas. Demonstrou-se também a retirada da amostra desta ração para as análises microbiológicas, bem como a ração vermelha colocada por cima da ração remanescente (azul). Onde observou-se que o máximo de tempo que a ração permaneceu no comedouro foi 14 dias, não havendo amostra suficiente de ração azul para análise depois desse período. Sendo o mesmo padrão observado em todas as gaiolas.

Figura 2. Ilustração do consumo de ração autoclavada e irradiada.



5.2 CONTAGEM DE MESÓFILOS, BOLORES E LEVEDURAS

A análise inicial das rações estéreis (irradiadas ou esterilizadas) após a abertura do saco (dia 0) indicou ausência total para quaisquer dos microrganismos testados. Após uma semana da ração aberta e armazenamento da embalagem dentro do modulo de troca (dia 7), o resultado permaneceu o mesmo da análise inicial (tabela 1).

Tabela 1. Presença de mesófilos, bolores e leveduras nas rações estéreis analisadas.

Ração	Dia 0		Dia 7	
	Mesófilos	Bolores e leveduras	Mesófilos	Bolores e Leveduras
Autoclavada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Irradiada	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

Em contrapartida, para as rações que estavam no comedouro (coradas em azul) sendo consumidas pelos animais (tabela 2), verificou-se que houve detecção de mesófilos totais em todas as placas. Sendo o número máximo encontrado $1,0 \times 10^3$ UFC/g, ficando a maioria dos resultados na faixa de 10^2 UFC/g. Já na contagem para bolores e leveduras o resultado obtido foi menor que $<10^{-2}$ UFC/g (considerado ausência de crescimento de bolores e leveduras) na maioria das amostras (tabela 2). Porém, em uma das amostras da segunda semana observamos $1,5 \times 10^2$ UFC/g (tabela 2).

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

Ração	Amostra/Gaiola	Mesófilos		Bolores e leveduras	
		7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Ração autoclavada	1	$2,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$<10^{-2}$	$<10^{-2}$
	2	$3,1 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$	$<10^{-2}$	$<10^{-2}$
	3	$6,0 \times 10^2$	$9,0 \times 10$	$<10^{-2}$	$1,5 \times 10^2$
	4	$6,0 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$	$<10^{-2}$	$<10^{-2}$
Ração Irradiada	5	$2,0 \times 10$	$2,2 \times 10^2$	$<10^{-2}$	$<10^{-2}$
	6	$4,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$<10^{-2}$	$<10^{-2}$
	7	$9,0 \times 10$	10×10	$<10^{-2}$	$<10^{-2}$
	8	$5,0 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$	$<10^{-2}$	$<10^{-2}$

Nota: Resultado em UFC/g (unidade formadora de colônias por grama)

5.3 PESQUISA DE *Salmonella* spp. E CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES (FECAIS)

Nenhuma das amostras analisadas evidenciou a presença de *Salmonella* spp.. A contagem do NMP para coliformes termotolerantes (fecais) foi menor que 3,0 NMP/g,

sendo consideradas todas negativas segundo a tabela de NMP (tabela 3). Em relação a coliformes totais (35°C), duas amostras apresentaram um resultado igual a 3,6 NMP/g (tabela 3).

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

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

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

6 DISCUSSÃO

Se a ração oferecida para os animais de laboratório não estiver isenta de microrganismos, poderá interferir não só na saúde animal (Reis, 2008), mas também nos resultados dos experimentos que vierem a utilizá-los (Majerowicz, 2008). Essa premissa, associada ao fato de existirem raros trabalhos associados ao controle microbiológico de ração de animais de laboratório, incorre na necessidade de mais estudos sobre o assunto, já que a alimentação compromete o padrão sanitário desses animais (Americano, 2016).

Partindo das recomendações da ANVISA (2010) e Bugno (2015), que amostras para serem consideradas estéreis devem apresentar ausência total de crescimento de microrganismos viáveis, podemos considerar, que ambos os processos de esterilização utilizados nesse estudo, foram inicialmente eficazes e o manuseio após a abertura dos sacos de rações foi adequado (tabela 1). No entanto, após serem dispostas nos comedouros e o consumo pelos animais ter-se iniciado, verificamos contagem positivas para presença de mesófilos totais em todas as placas (tabela 2).

Considerando que no Brasil não há legislação nem referência de valores para contagem de mesófilos totais em ração animal, utilizamos os padrões recomendados por Andriguetto e colaboradores (2002), que consideram quantificações menores que 10⁶UFC/g como um índice ideal. Esse valor vem sendo utilizado por diferentes autores como referência para contagem de mesófilos totais em ração e em outros alimentos (Americano, 2016; Girio et al., 2012; Neto et al., 2019).

Assim, nossa análise permitiu afirmar que os microrganismos detectados não são provenientes da ração ou sua matéria-prima, já que testes preliminares do controle de esterilidade foram realizados e não houve nenhum crescimento detectado. Além disso, como a contagem de mesófilos totais em nosso estudo foi abaixo do padrão estabelecido na literatura (tabela 2), as rações analisadas, apesar de não permanecerem estéreis, se conservaram próprias para o consumo dos animais, pois mantiveram um adequado padrão higiênico-sanitário.

Foi possível observar também, durante o experimento, que na maioria das amostras houve um aumento na contagem de mesófilos totais aos 14 dias, excetuando-se as amostras 3, 4 e 6 (tabela 2). Isso pode ter ocorrido, pois os animais destas gaiolas se alimentaram menos da ração azul (que permaneceu no comedouro por 14 dias) durante a última semana, dando preferência para a ração vermelha que era mais nova. O que não aconteceu com as outras gaiolas, onde a ração mais consumida continuou sendo a azul, pois estava mais perto da base do comedouro. A hipótese que consideramos para tal achado sugere que por estarem mais tempo expostos e mais roídos, esses pellets tiveram, portanto, maior contato com a saliva e patas dos animais, sendo mais manipulados pelos roedores. Esse resultado corroborou com o trabalho de Ponath e colaboradores (2016), que sugeriram ser a manipulação dos alimentos uma das principais causas de contaminação.

Apesar da presença de microrganismos, todos os índices de contagem ficaram abaixo do limite mínimo recomendado pela literatura, não afetando a qualidade higiênico-sanitária, segundo os padrões atuais.

Em relação a contagem de bolores e leveduras da ração disposta nos comedouros os valores encontrados nessa pesquisa (tabela 2) estão dentro do padrão aceitável para o consumo deste alimento que deve apresentar contagens abaixo de 10^4 UFC/ g da amostra. Segundo Rebonatto (2017), como não há legislação para limites de contagem para bolores e leveduras em ração animal utiliza-se o padrão utilizado nos Estados Unidos e em países da União Europeia para certificação de ração animal, que recomendam contagens inferiores a 10^4 UFC/g. Esses valores são utilizados como parâmetros pelas indústrias como indicativo da qualidade microbiológica das rações (Rebonatto, 2017).

De acordo com Souza e Souza (2019), a contaminação da ração por fungos é favorecida pelo contato da ração com o ar, o manuseio inadequado do produto, umidade, temperatura e o próprio processo de fabricação. Além disso, quando existe substrato

apropriado, ocorre a multiplicação dos microrganismos e produção de metabólitos tóxicos (Moura et al, 2014):

Esses metabólitos fúngicos podem causar toxicidade alimentar, visto que determinadas espécies de fungos, em condições de armazenamento e conservação inadequada produzem micotoxinas na superfície dos alimentos. Essas toxinas ao serem ingeridas pelo homem ou animal, podem causar problemas de saúde leves e até mesmo mais graves devido ao seu potencial carcinogênico (Moura et al, 2014). Segundo Chinchilla e colaboradores (2021), essas toxinas podem afetar enormemente a colônia de produção, já que tem efeito no sistema reprodutivo de camundongos. Como a contaminação por micotoxinas em rações é uma preocupação de segurança global, é necessário um controle eficaz desses compostos tóxicos (Muñoz-Solano e González-Peñas, 2020).

Para evitar essa contaminação, Hilmann e colaboradores (2015), recomendam que as rações oferecidas aos animais devem ser armazenadas em temperaturas de 21,5 a 23,6°C e umidade relativa do ar de 59 a 65%, preservando assim as matérias-primas. Como as rações analisadas no presente estudo foram armazenadas e consumidas pelos animais seguindo esses parâmetros, é possível que essa condição tenha dificultado o crescimento fúngico, o que possibilitou a manutenção do padrão higiênico-sanitário das rações. O que também foi relatado por Chinchilla e colaboradores (2021), que mantiveram as rações analisadas seguindo esses parâmetros e como resultado obtido foi ausência de metabólitos fúngicos. De qualquer forma, devido ao aumento da possibilidade de contaminação fúngica através do contato da ração com o ar, não é recomendado que a ração fique exposta por muito tempo, sem controle adequado.

Em relação à pesquisa de *Salmonella* spp., nenhuma das amostras analisadas evidenciou a presença dessa bactéria, corroborando com os estudos de Girio e colaboradores (2012), Americano (2016), Chinchilla e colaboradores (2021) que, ao analisarem rações comerciais, também não encontraram a presença desse microrganismo.

Apesar da transmissão dessa bactéria ser fácil, já que pode ser disseminada por via fecal-oral, fômites e algumas vezes verticalmente, o Laboratório Charles River (CRLI, 2009) relata que a probabilidade de identificar essa bactéria em colônias de roedores não é grande. Todavia, embora escassos, existem relatos de salmonelose em animais de laboratório e até mesmo a propagação zoonótica da doença infecciosa (Chinchilla et al, 2021). Além disso, as salmoneloses ocupam uma das posições mais destacadas em todo

o mundo, devido as suas características de endemicidade, morbidade e pela dificuldade de seu controle (Silva, 2018).

Há indicação internacional de que todos os animais diagnosticados com *Salmonella* spp. devem ser eutanasiados, já que à bactéria pode ser transmitida verticalmente e a rederivação por histerectomia pode não ser eficaz, o que traria um enorme prejuízo para a criação. Além disso, o seu potencial zoonótico poderia causar doenças graves ou até a morte nos bioteristas imunocomprometidos (CRLI, 2009). Portanto, a pesquisa desse gênero é recomendada nas avaliações de qualidade em alimentos destinados aos animais, já que a *Salmonella* spp. é um dos principais microrganismos contaminantes de rações de importância clínica veterinária (Cardozo, 2011, Chinchilla, 2021). Corroborando o trabalho de Pivatto e colaboradores (2020), acreditamos que a oferta de ração estéril de boa qualidade e a rigorosa manutenção sanitária dos animais no local de realização do estudo contribuíram para a ausência de contaminação por *Salmonella* spp. nas rações analisadas.

Por outro lado, na contagem de coliformes totais, duas das amostras apresentaram um resultado de 3,6 NMP/g, sendo assim consideradas positivas somente na diluição 10^{-1} . Considerando o que já foi explicitado, a legislação vigente não estabelece parâmetros microbiológicos para coliformes totais em alimentos (Americano, 2016), mas em contrapartida, os coliformes termotolerantes são considerados melhores indicadores de contaminação fecal, já que dentro deste grupo encontra-se a *Escherichia coli*. Portanto, a presença deste grupo bacteriano em rações indicaria, segundo Americano (2016) condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, devido a matérias-primas contaminadas, manipulação inadequada ou aplicação de calor insuficiente na peletização. Como houve ausência de *E. coli* e de outros coliformes fecais em todas as amostras analisadas, é possível afirmar então, que as rações avaliadas estavam com boa qualidade higiênico-sanitária (tabela 3).

Resultados semelhantes foram obtidos por Cappelli et al (2016), que ao analisarem 11 amostras de ração comercializada para cães e 11 para gatos, não observaram crescimento para coliformes termotolerantes. Todavia, detectaram crescimento de coliformes totais. Esse mesmo resultado foi observado nos experimentos de Brandão et al (2011).

De acordo com Girio et al (2012) a contaminação por coliformes totais e termotolerantes em todas as amostras das rações de sua pesquisa ocorreu devido ao acondicionamento inadequado e manipulação intensa. O que não ocorreu no nosso

estudo, já que as rações analisadas foram armazenadas em temperatura e umidade controladas e a sua manipulação realizada de forma asséptica, dentro de cabine de segurança biológica. Além disso, os animais que a consomem são criados em sistema com barreiras sanitárias controladas.

Como não há legislação específica, este trabalho poderá servir de orientação para definir parâmetros para a análise microbiológica de ração para animais de laboratório. Segundo Reis (2008), a ração fornecida aos animais merece toda a vigilância possível, já que a presença de microrganismos pode causar danos à saúde ou qualidade desses animais. Além disso, o estudo comprovou que mantidos os cuidados específicos, a ração nova pode ser disposta por cima da ração remanescente sem que haja contaminação da inicial, o que evitará um grande desperdício, já que não será necessário desprezar a ração inicial em todo procedimento de manutenção do animal. Como se trata de uma colônia SPF e não há parâmetros microbiológicos para análise de ração animal, os nossos resultados foram comparados com rações recentemente abertas que não haviam sido consumidas pelos animais.

7 CONCLUSÕES

Os microrganismos detectados na ração durante o experimento não afetam a sua qualidade higiênico-sanitária, pois não só ficaram quantitativamente abaixo dos limites estabelecidos na literatura, como não são patogênicos ou indicadores de baixa qualidade. Além disso, a pesquisa estabeleceu que rações novas podem ser dispostas por cima das antigas.

Portanto, os resultados nas condições do presente estudo demonstraram que a ração para camundongos pode ser mantida por até 14 dias no comedouro sem prejuízo da qualidade higiênico sanitária, não havendo necessidade de troca total da ração quando se realizar a troca da gaiola.

Apesar deste achado, recomenda-se o descarte das rações muito velhas (mais de 14 dias nos comedouros), que estiverem muito roídas e não mais sendo consumidas, já que esse experimento foi realizado com os pellets que permaneceram no comedouro por duas semanas, pois os animais do estudo consumiram toda a ração não excedendo esse período, o que não permitiu extensão do ensaio por mais tempo e impossibilitou garantir a manutenção de sua qualidade experimentalmente por períodos mais longos

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Nacional do Câncer e a Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio e suporte para a realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

1. Americano MMS. Qualidade microbiológica de ração para cães produzidas e comercializadas no Estado de Mato Grosso [Dissertação]. Cuiabá: Universidade de Cuiabá; 2016.
2. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006.
3. Andrews WH, Wang H, Jacobson A, Hammack T. *Salmonella*. chapter 5. In: *Bacteriological Analytical Manual* [internet]. U.S.A: Food and drug administration; 2018. [Acesso em 2019 fev 19]. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>.
4. Andriguetto JM, Perly L, Minardi I, Gemael A. As bases e os fundamentos da nutrição animal. 4ª ed. São Paulo: Nobel; 2002.
5. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 1, 5ª ed. Brasília, 2010.
6. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 12 de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União 10 de jan. 2001. [Acesso 2020 mar 9]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/anexos/anexos_res0012_02_01_2001.pdf
7. Brandão PA, Nascimento TR, Sobral FES, Freitas MRV, Brito ICA, Silva SG. Avaliação da Qualidade Bromatológica e Microbiológica de Rações para Cães. Rev. Cient. Prod. Anim. 2011; 13(1):71-74. doi:10.15528/2176-4158/rcpa.v13n1p71-74.
8. Bugno A, Lira RS, Oliveira WA, Almodovar AAB, Saes DPS, Pinto TJA. Application of the BacT/ALERT[®] 3D system for sterility testing of injectable products. Braz. J. Microbiol. 2015; 46(3): 743-747. doi:10.1590/S1517-838246320140587
9. Cappelli S, Lunedo P, Freitas CP, Raber HR, Manica E, Hashimoto JH, Oliveira V. Avaliação química e microbiológica das rações secas para cães e gatos adultos comercializadas a granel. RBHSA. 2016; 10(1):90-102. doi:10.5935/1981-2965.20160009.
10. Cardozo VM. *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* em farinhas de origem animal utilizadas na fabricação de rações e avaliação de aditivo na inibição de patógeno. [Dissertação] Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. São Paulo, 2011.
11. Carvalho RA, Carvalho AS, Mourão FRP, Brito MVH. Avaliação nutricional de ração comercial para camundongos (*Mus musculus*). Rev. para. Med. 2003; 17(2):2-28.
12. Chinchilla FG, Martínez CV, Murillo BG, Madrigal DA, Solano MR, Molina A. Microbiological safety and presence of major mycotoxins in animal feed for laboratory animals in a developing country: The case of Costa Rica. Animals. 2021; 11:1-20. doi:10.3390/ani11082389.
13. Clarke HE, Coates ME, Eva J, Kford DJ, Milner CK, O'donoghue PN, Scott PP, Wardr RJ. Dietary standards for laboratory animals: report of the Laboratory Animals

Centre Diets Advisory Committee. Lab. Anim. 1977; 11:1-28. doi:10.1258%2F00236777780959175.

14. CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2013. Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 18 dez. 2013; Seção I. [Acesso 2018 ago 15]. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_15_de_16122013.htm

15. CRLI - Charles River Laboratories International. *Salmonella* (S.enterica, various subspecies and serotypes)[internet]. USA; 2009. [Acesso 2019 jan 29]. Disponível em: <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/SalmonellaTechnicalSheet.pdf>

16. Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W. Administration Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Chapter 4. In: Bacteriological Analytical Manual [internet]. U.S.A: Food and Drug Administration; 2018. [Acesso 2019 fev 19]. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm#conventional>

17. Girio TMS, Filho NA, Junior ODR, Amaral LA, Girio RJS. Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel. *Ars veterinária*. 2012;28(1):036-040. doi: 0.15361/2175-0106.2012v28n1p036-040.

18. Lapchik VBV, Mattaraia VM, Ko GM. Cuidados e manejos de animais de laboratório. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2017.

19. Longo FA, Silva IF, Lanzarin MA. A importância do controle microbiológico em rações para aves. In: Anais do XI Simpósio Brasil Sul de Avicultura e II Brasil Sul Poultry Fair, 2010; Chapecó. p.36-66. [Acesso 2022 fev 11]. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_m1i34i2m.pdf

20. Majerowicz J. Boas práticas em biotérios e biossegurança. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

21. Moura AC, Tasca AC, Pinto FGS, Soares IA, Assumpção RB. Qualidade microbiológica de farinhas de trigo (*Triticum aestivum*) comercializadas na cidade de Cascavel (Paraná). *Segur. Aliment. Nutr.* 2014; 2(2): 499-504. doi:10.20396/san.v2i1i2.8634480.

22. Muñoz-Solano, B, González-Peñas, E. Mycotoxin determination in animal feed: an LC-FLD method for simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxins and zearalanone in this matrix. *Toxins (Basel)* 2020 Jun; 12(6): 374. doi:10.3390/toxins12060374.

23. NCR - National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals: committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: D.C: National Academy Press, 2010.

24. Neto JPS, Oliveira CC, Silva PA, Fonseca CR, Ciabotti ED. Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e *Salmonella* sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos. RCA. 2019; 4(1)e7717. [Acesso 2022 fev 11]. Disponível em: <https://www.seer.ufal.br/index.php/era/article/view/7717>
25. Pivatto L, Borniatti T, Fassina P. Controle e prevenção de contaminação por *Salmonella* spp. No processo de produção de Farinhas de origem animal de uma empresa do Rio Grande do Sul. Revista Destaques Acadêmicos, Lajeado, 2020. 12(3):405-419, doi:<http://dx.doi.org/10.22410/issn.2176-3070.v12i3a2020.2700>
26. Ponath FS, Valiatti TB, Sobral FOS, Romão NF, Alves GMC, Passoni GP. Avaliação da higienização das mãos de manipuladores de alimentos do Município de Ji-Paraná, Estado de Rondônia, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2016; 7(1): 63-69. doi: 10.5123/S2176-62232016000100008.
27. Rebonatto B. Ácidos orgânicos visando melhoria da estabilidade de rações peletizadas com melaço externo. [Dissertação]. Londrina: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2017.
28. Reis KT. Comparação do desenvolvimento de camundongos alimentados com ração comercial autoclavável de diferentes marcas [Dissertação]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
29. Santos EJ, Carvalho EP, Sanches RL, Barros BEB. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no Estado de Minas Gerais para produção de ração animal. Ciênc. Agropec. 2000; 24(2): 425-433.
30. Shahhossein G, Karimi A, Amanpour S, Mansouri MA. Effect of gamma irradiation on microbial decontamination, crude nutrient content and mineral nutrient composition of laboratory animal diets. Archives of Razi Institute. 2019; 74(2):175-182. doi:10.22092/ari.2017.116153.1160.
31. Silva RA. Infecção por *Salmonella Heidelberg* em Pintos de Corte Alimentados com Dietas Contendo Compostos Bioativos Comerciais. [Dissertação]. Areia: Universidade Federal da Paraíba, 2018.
32. Siqueira VSB, Abrantes JA, Clinio PRB, Nogueira JMR. Uso de corante alimentício na marcação de ração estéril para camundongos e seu emprego nas análises de controle microbiológico. São Paulo: Resbcal. 2020; 8(1):37-43. [Acesso 2022 fev 11]. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-27141>
33. Souza CCP, Souza SMO. Análise da qualidade microbiológica de rações para cães adultos, comercializadas à granel no distrito federal. Anais do 18º Simpósio de TCC e 15º Seminário de IC do Centro Universitário ICESP. 2019(18); 1635-1640. [Acesso 2020 mar 19]. Disponível em: http://nippromove.hospedagemdesites.ws/arquivos_up/documentos/867cd904dbcf7da5b63b21e860448770.pdf