



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Webert Aurino da Silva

Recife, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Relatório apresentado à
Coordenação do curso de
Bacharelado em Zootecnia, da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos
requisitos da disciplina Estágio
Supervisionado Obrigatório
(ESO).

Webert Aurino da Silva

Recife, 2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

A comissão de avaliação do ESO aprova o Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório da(o) discente **Webert Aurino da Silva** por atender as exigências do ESO.

Recife, 05, de Dezembro de 2019

Comissão de avaliação

Prof.Dr. Júlio Cerazar dos Santos Nascimento
(Orientador/Departamento de Zootecnia/UFRPE)

Prof^a.Dr^a. Tayara Soares de Lima
(Departamento de Zootecnia/UFRPE)

Msc. Ana Carolina Ferreira dos Santos
(Departamento de Zootecnia/UFRPE)

DADOS DO ESTÁGIO

NOME DA EMPRESA OU ESTABELECIMENTO: Laboratório Federal de Defesa
Agropecuária

LOCAL DE REALIZAÇÃO: Recife

PERÍODO:

CARGA HORÁRIA: 330 h

ORIENTADOR: Júlio César dos Santos Nascimento

SUPERVISOR: Romulo Cesar de Oliveira

Carga Horária Total: 330



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA.
COORDENAÇÃO-GERAL DE LABORATÓRIOS AGROPECUÁRIOS
LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA EM PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

Ao Departamento de Zootecnia, UFRPE

Recife, 14 de Novembro de 2019.

DECLARAÇÃO

Eu, Romulo Cesar de Oliveira CPF 159.864.368/14 graduado em FARMÁCIA - BIOQUÍMICA cargo de AFPA declaro que Webert Aurino da Silva portador do CPF:108.277.354-99 realizou o Estágio Supervisionado Obrigatório no Laboratório de Defesa Agropecuária de Pernambuco na área de Microbiologia de alimentos no período correspondente a 28 de Agosto a 14 de Novembro de 2019. Perfazendo uma carga horária total de 330 horas.

DEDICATÓRIA

Honro o fechamento deste ciclo dedicando este trabalho aos meus avós, mãe e irmãos. Também dedico este trabalho a todas pessoas guerreiras qual convivi na UFRPE, que foram minha força e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, em especial minha tia Maria (In memorian), que onde ela esteja, está muito feliz por mim. Agradeço aos meus amigos, em especial Thayná Milano e Claudia Maciel pelo apoio emocional. Enorme agradecimento a Mike e Helter pelo apoio físico e emocional, onde sempre acreditaram no meu potencial, gratidão eterna. Á todos amigos do PET, pelos momentos de aprendizado e descontração. Agradeço ao LFDA-PE pela oportunidade de estágio. Agradeço a toda equipe do laboratório de microbiologia do LFDA-PE, que serviram como inspiração profissional para mim. Agradeço ao meu orientador Júlio Cerazar, pela orientação e paciência. Por fim agradeço a todos professores do Departamento de Zootecnia por servirem como uma inspiração diária.

SUMÁRIO

1.0 APRESENTAÇÃO.....	12
1.1 Funcionamentos do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária	12
2.0 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Local.....	15
2.2 Área Física.....	16
2.2.1 Sala de Recepção e Pesagem de amostras	16
2.2.2 Sala de processamento.....	18
2.2.3 Sala de leitura e continuidade I	21
2.2.4 Sala de leitura e continuidade II	23
2.2.5 Sala de análises especiais I	25
2.2.6 Sala de análises especiais II.....	28
2.2.7 Sala de incubação.....	29
2.2.8 Lavagem e descarte	30
2.3 Atividades desenvolvidas durante o estágio	32
2.3.1 Controle ambiental	32
2.3.2 Recebimento de amostras	33
2.3.3Análise microbiológica de ração a granel para cães.....	36
3.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
5.0 ANEXOS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Vista aerarea do LFDA/PE	15
Figura 2. A) Fachada do LFDA/PE B) Fachada do laboratório de microbiologia.....	16
Figura 3. A) Amostra recebida pelo óculo B) amostra de carne bovina recebida em embalagem com SIF	16
Figura 4. A) 325 gramas de carne bovina para análise de E.coli. B) 25 gramas de amostras para diluição ou detecção de Salmonella.....	17
Figura 5. A) Cortes coletados para análise microbiológica de frango B) Pesagem higienizada em fluxo laminar C) Amostras ja pesadas divididas por análises.....	18
Figura 6. Fluxo laminar	18
Figura 7. A) Plaqueamento de ágar Sabouraud em fluxo laminar B) Stomacher com carne bovina.	19
Figura 8. Frascos de salina peptonada.....	19
Figura 9. Água peptonada tamponada.....	19
Figura 10. Ágar sendo fundido em micro-ondas.....	20
Figura 11. A) Câmara fria B) Armazenamento de ágar na câmara	21
Figura 12. Sala de leitura e continuidade I.	21
Figura 13. Equipamento VIDAS	22
Figura 14. Equipamento BAX.....	23
Figura 15. Placas para contagem de coliformes e enterobacterarias.....	24
Figura 16. Leitura de placas	24
Figura 17. Equipamento e Sistema VITEK 2	25
Figura 18. Carregamento de cartões e amostras para análises.	26
Figura 19. Riboprinter.	26
Figura 20. Ultracongelador.....	27
Figura 21. Produção de culturas para controle de bacterarias, fungos e leveduras.....	27
Figura 22. Estufa para secagem de placas.....	28
Figura 23. Placas XLD e Rambach prontas para leitura de Salmonella.....	28
Figura 24. Amostras de E.coli previamente incubadas.	29
Figura 25. Sala de incubação.....	30
Figura 26. A) Interior da autoclave B) Latões para autoclave C) Sacos identificados como contaminantes para descarte	31
Figura 27. Área de lavagem de materiais reutilizáveis.....	31

Figura 28. Placas de TSA e Sabouraud que serão expostas e placas que serão encubadas após exposição.....	33
Figura 29. Placa exposta em estufa com presença de duas colônias de fungo.	33
Figura 30. Amostras recepcionadas em diferentes embalagens.....	34
Figura 31. Frequência de matrizes recebidas no laboratório, no período de 15 de março a 4 de novembro de 2019.	35
Figura 32. 25 gramas de ração pesada para análise.....	37
Figura 33. Ração com água peptonada tamponada	37
Figura 34. Incubação da ração para crescimento microbiano.	38
Figura 35. Transferência de cultura encubada para caldo RVS e MKTTn.	38
Figura 36. Colônias típicas de Salmonella.	39
Figura 37. Colônias de bactérias que cresceram no meio XLD e Rambach	39
Figura 38. Presença e ausência de coliformes	40
Figura 39. Utilização do Vitek 2 para identificação de bacterianas presente nas rações....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados referente ao programa PNCP em carne bovina	13
Tabela 2. Análises realizadas pelo LFDA/PE.....	13
Tabela 3. Relação entre patógeno, tempo para resultado e Kit, utilizando o equipamento VIDAS.....	22
Tabela 4. Bacterias encontradas nas rações.....	41

ANEXOS

Anexo 1. Solicitação oficial de amostra.....	46
Anexo 2. Termo de rejeição de amostras	47

1.0 APRESENTAÇÃO

O presente relatório corresponde às atividades realizadas durante o período de estágio supervisionado obrigatório, realizado na área de Microbiologia do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco. As atividades foram referentes ao acompanhamento de análises microbiológicas de alimentos recebidos por inspeção federal e análise microbiológica de rações para cães coletadas em bairros do Recife.

1.1 Funcionamentos do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária

Os LFDA's, (Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária), anteriormente chamados de LANAGROS (Laboratórios Nacionais Agropecuários), são laboratórios vinculados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que tem como objetivo monitorar, controlar e fiscalizar insumos, bebidas e alimentos produzidos no Brasil. As informações geradas pelos laboratórios são de grande importância para manter a qualidade dos serviços de fiscalização, incorporando as análises, cooperações, estudos e projetos (MAPA, 2016). Os deveres dos LFDA's consistem em realizar análises oficiais, ser referência nacional em assuntos laboratoriais, realizar ações de pesquisa para atuar no desenvolvimento e inovação de estudos analíticos e realização de auditorias em laboratórios credenciados (MAPA, 2016). Há seis LFDA's por todo país, sendo um na região Sul em Porto Alegre/RS, um na região Centro-Oeste em Goiânia/GO, um na região Norte em Belém/PA e um na região Nordeste em Recife/PE e outros em São Paulo e Minas Gerais (MAPA, 2016). O público alvo desses laboratórios envolve estabelecimentos de produtos de origem animal e vegetal sob Inspeção Federal, indústrias de produtos de uso veterinário, fábricas de fertilizantes, estabelecimentos produtores de bebidas e vinagres e importadores e exportadores de produtos agropecuários.

Em 2013 houve a instituição da Comissão Científica Consultiva em Microbiologia de Produtos de Origem Animal pela Portaria nº 17 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) /MAPA (Brasil, 2013), que possibilitou a elaboração de programas como o PACPOA (Programa de Avaliação de Conformidade de Produtos de Origem Animal) e o PNCP (Programa Nacional de Controle de Patógenos), atuando juntamente com universidades e órgãos especiais. Esta parceria entre Academia-MAPA, criou um ambiente onde foi possível planejar as ações de controle de patógenos, como controle de *Salmonella spp.* em carnes, *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo e *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina (STEC). O setor de microbiologia do LFDA/PE atende esses

programas, onde o PNCP tem como objetivo a redução de microrganismos patogênicos nos produtos de origem animal fiscalizados pelo SIF, reavaliação das ações de controles adotados pelos estabelecimentos e controlar os riscos, a fim de preservar a segurança alimentar. Por outro lado, o PACPOA tem o objetivo de obter dados para verificar o índice de conformidade de produtos de origem animal, auxiliar a avaliação dos controles de produtos e de processos realizados pelos estabelecimentos, bem como subsidiar o gerenciamento de risco do DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal). As tabelas abaixo mostram resultados referentes a resultados do programa PNCP:

Tabela 1. Resultados referente ao programa PNCP em carne bovina

Patógenos	Analisadas	Número de amostras positivas
<i>Salmonella spp.</i>	1310	21
<i>E. coli STEC</i>	1310	2
<i>E. coli O157:</i> <i>H7</i>	1310	0

Fonte: MAPA.

A Tabela 1 mostra que das 1.310 amostras analisadas em 2017, nenhuma apresentou resultado positivo para a *E. coli O157:H7*. No entanto, foi observada a presença de STEC em duas amostras coletadas. Referente ao programa de PACPOA são realizadas seguintes análises microbiológicas no LFDA/PE, podendo varias de acordo com a matriz a ser analisada:

Tabela 2. Análises realizadas pelo LFDA/PE

Código das Análises	Análises
M01	Contagem Presuntiva de <i>Bacillus cereus</i>
M03	Contagem Total de <i>Clostridium perfringens</i>
M06	Contagem de Coliformes Termotolerantes a 45°C
M07	Contagem de Coliformes Totais
M12A	Contagem de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
M12	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>
M15	NMP de Coliformes Termotolerantes a 45°C

M20	Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>
M26	Detecção de <i>Salmonella spp</i>
M29	Prera-incubação a $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 a 7 dias enlatados - Teste de Esterilidade Comercial
M12	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>
M30	Prera-incubação a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias enlatados - Teste de Esterilidade Comercial

Fonte: Adaptado MAPA.

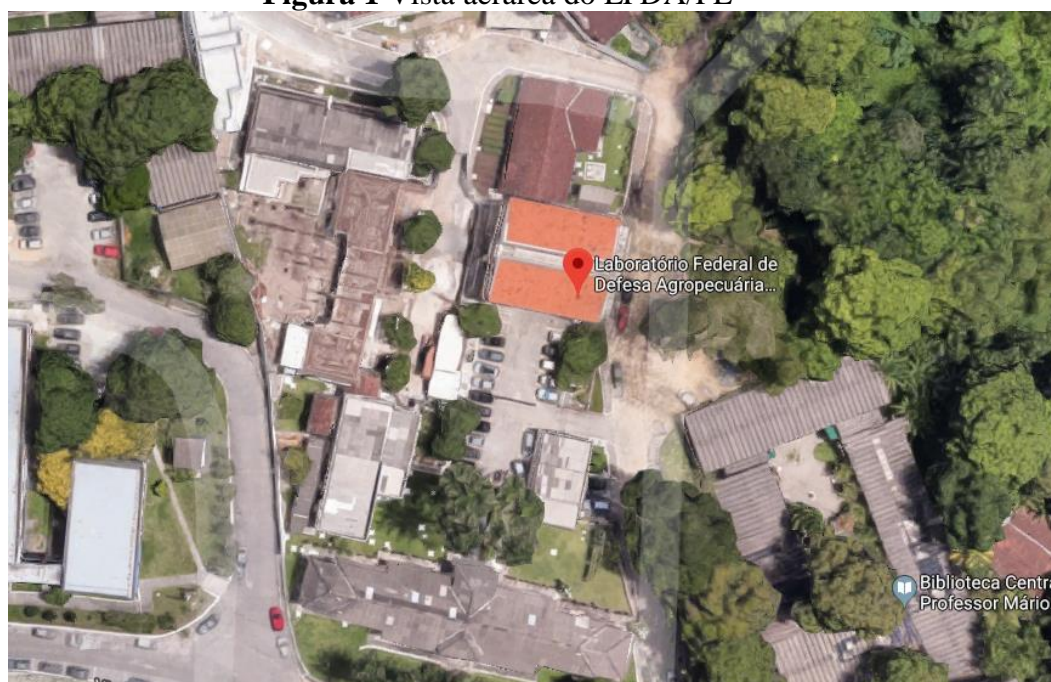
Desta forma, o presente relatório tem o objetivo de descrever as atividades realizadas no LFDA/PE que seguem os programas do MAPA, o PNPCP e PACPOA e também análises microbiológicas referentes a rações para cães vendidas em bairros do Recife.

2.0 DESENVOLVIMENTO

2.1 Local

O estágio foi realizado no setor de Microbiologia do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco (Figura 1) localizada na cidade de Recife-PE, no Bairro de Dois irmãos, durante o período de 28 de Agosto à 14 de Novembro do ano de 2019, perfazendo uma carga horária de 330 horas.

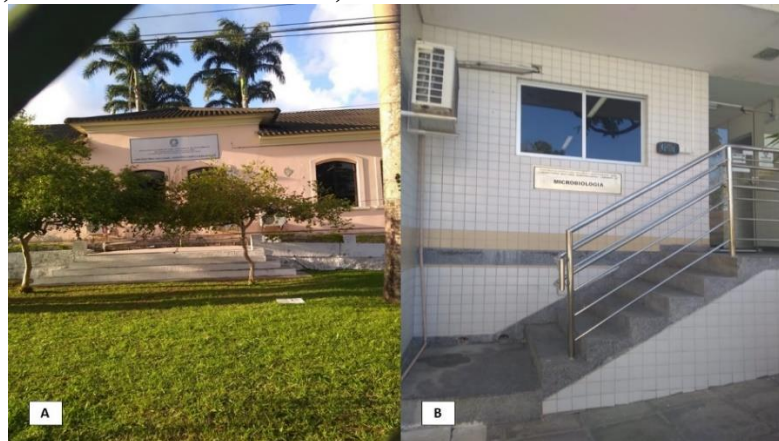
Figura 1 Vista aerarea do LFDA/PE



Fonte: Google Maps

O laboratório de microbiologia do LFDA/PE (Figura 2) está localizado no município de Recife, que está disposto nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 8° 04'03''S; longitude 34°55'00'' O; e com altitude meradia em relação ao nível do mar de 4 metros. Segundo classificação de Köppen, o clima da região era do tipo As' – tropical quente e úmido, com verão seco e chuvas de outono-inverno. Apresenta temperatura meradia anual de 25°C e umidade relativa do ar meradia anual de 80%, com baixas amplitudes terarmicas.

Figura 2. A) Fachada do LFDA/PE B) Fachada do laboratório de microbiologia



Fonte: Acervo pessoal

2.2 Área Física

2.2.1 Sala de Recepção e Pesagem de amostras

Todo material que era postado dentro do laboratório passava pelo óculo, a fim de evitar contaminações externas. As amostras encaminhadas pelos fiscais federais, são recebidas na sala de recepção e pesagem, através do óculo, para que em seguida fossem realizadas as análises microbiológicas (Figura 3A), toda amostra que chega no laboratório deve vir acompanhada pela SOA, contendo todas as informações previamente preenchida pelo fiscal, contendo o registro do SIF do produto, quais ensaios seriam realizados e as condições de armazenamento do produto. O recebimento era registrado no livro de recebimentos com a data, situação do recebimento (aprovado ou reprovado), se essa amostra seria armazenada em temperatura ambiente, resfriada ou congelada.

Figura 3. A) Amostra recebida pelo óculo B) amostra de carne bovina recebida em embalagem com SIF



Fonte: Acervo pessoal

Após o registro de recebimento, as amostras são retiradas de onde foram armazenadas para pesagem para seguirem para o processamento. A pesagem era feita dentro de um fluxo laminar, higienizado posteriormente, onde irá reduzir o risco de contaminação da amostra a ser pesada. Em meradia era usado 25 gramas da amostra para análises requeridas, com exceção de amostras destinadas a análises de *Escherichia coli*, que são pesadas 325 gramas (Figura 4).

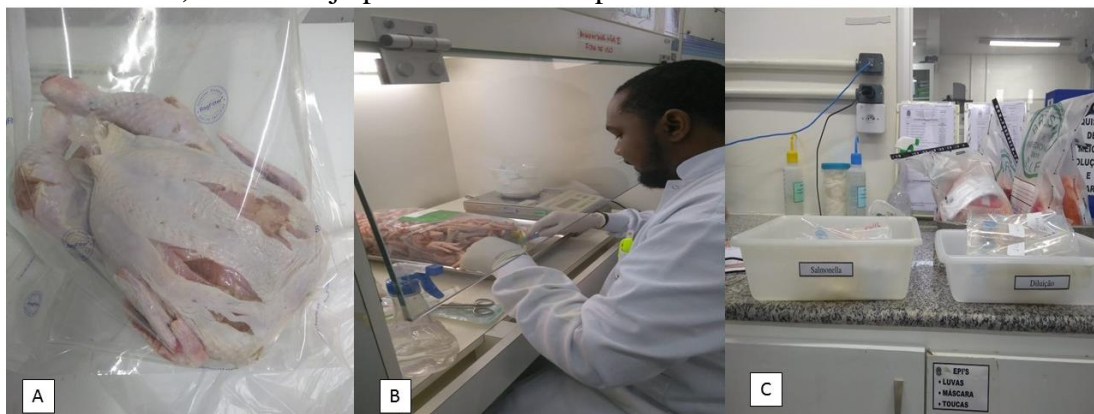
Figura 4. A) 325 gramas de carne bovina para análise de *E.coli*. **B)** 25 gramas de amostras para diluição ou detecção de *Salmonella*.



Fonte: Acervo pessoal.

Para a pesagem dos produtos eram usadas pinças, tesouras, espátulas e bisturis esterilizados em autoclave. Para amostras de frango ou produtos cárneos inteiros, são feitos cortes específicos. Caso os microrganismos estivessem dentro de estruturas bastante internas, as amostras podem ser cortadas em pequenos pedaços antes do processamento. Esses cortes eram dispostos em sacos esterareis Stomacher® para homogeneização no processamento (Figura 5).

Figura 5. A) Cortes coletados para análise microbiológica de frango B) Pesagem higienizada em fluxo laminar C) Amostras já pesadas divididas por análises.



Fonte: Acervo Pessoal

2.2.2 Sala de processamento

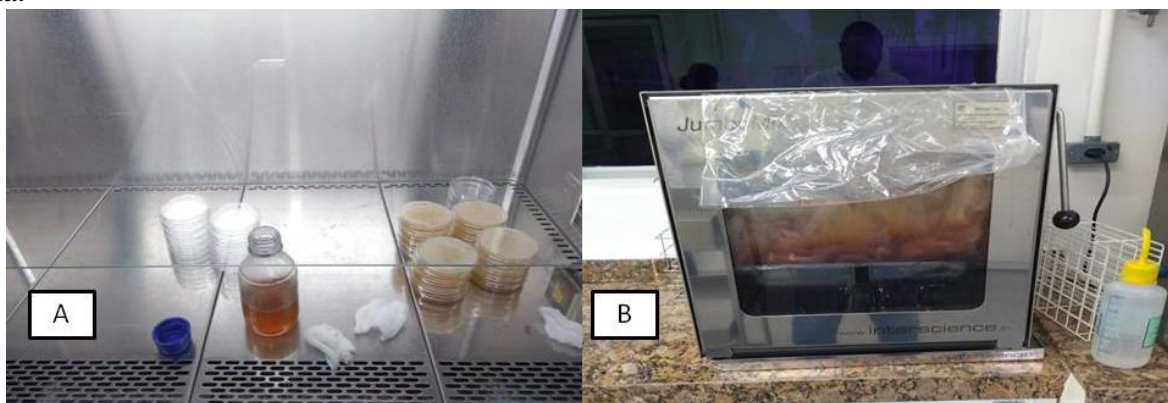
A sala de processamento era composta por fluxos laminares (Figura 6) para manusear os meios para plaqueamento (Figura 7 A), para manipulação de amostras processadas, e de homogeneizadores stomacher (Figura 7 B), que tem a função de fazer com que a amostra seja homogeneizada juntamente com o caldo ou água peptonada diluente para prosseguir com análise.

Figura 6. Fluxo laminar



Fonte: Acervo pessoal

Figura 7. A) Plaqueamento de ágar Sabouraud em fluxo laminar B) Stomacher com carne bovina.



Fonte: Acervo pessoal

As amostras que eram pesadas, em seguidas são homogenizadas por diferentes componentes, a salina peptonada (Figura 8) era usada para diluição, a água peptonada tamponada, (Figura 9) era utilizada para o prera-enriquecimento não seletivo de *Salmonella* em alimentos e o caldo Demi-Fraser era utilizado para o enriquecimento seletivo de *Listeria*.

Figura 8. Frascos de salina peptonada



Figura 9. Água peptonada tamponada



Fonte: Acervo Pessoal

Os meios de culturas chegavam ao laboratório em forma líquida ou sólida e precisavam ser fundidos para ganhar sua forma gelatinosa. O ágar era formado por extrato

de algas marinhas, funde-se em torno do ponto de ebulição da água, formando uma solução transparente que permanece no estado líquido a cerca de 40°C. Sendo fundido em micro-ondas (Figura 10), podendo ser adicionado em tubos de ensaio ou placas de Petri.

Figura 10. Ágar sendo fundido em micro-ondas.



Fonte: Acervo Pessoal

Dentre os meios de cultura usados no laboratório, se destacam os agar: Saboraud, rainbown, sangue, TSA, Rambach, XLD e ágar nutriente. Maioria desses meios são armazenados na câmara fria do laboratório. (Figura 11)

Figura 11. A) Câmara fria B) Armazenamento de ágar na câmara



Fonte: Acervo pessoal

2.2.3 Sala de leitura e continuidade I

Figura 12. Sala de leitura e continuidade I.



Fonte: Acervo pessoal

Nesta sala era realizada a triagem de ensaios automatizados. Encontravam-se os equipamentos VIDAS e o BAX. O VIDAS (Figura 13) era um sistema de imunoenaios automatizados baseado nos princípios de teste fluorescente ligado a enzimas, para detecção de patógenos alimentares.

Figura 13. Equipamento VIDAS



Fonte: Acervo Pessoal

A identificação do patógeno dependia do kit usado no equipamento como era mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Relação entre patógeno, tempo para resultado e Kit, utilizando o equipamento VIDAS.

Patogeno	Tempo para resultado	Kit
<i>Salmonella</i> spp	48 horas	VIDAS® <i>Salmonella</i> (SLM)
<i>Listeria</i> spp & <i>L.monocytogenes</i>	48 horas	VIDAS® <i>Listeria</i> DUO (LDUO)
<i>E. coli</i> O157 (incl. H7)	Mesmo dia	VIDAS® UP <i>E. coli</i> O157
<i>Campylobacter</i> spp	48 horas	VIDAS® <i>Campylobacter</i> (CAM)
Staphylococcus enterotoxinas A a E	Mesmo dia	VIDAS® Staphylococcal Enterotoxinas 2 (SET 2)

Fonte: Adaptação site Biomeriux

O outro equipamento era o BAX System® da Dupont/Qualicon, que se baseia na automação das análises de alimentos por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). A PCR apresenta um potencial para uma rápida e definitiva detecção de patógenos e apesar de ser uma tecnologia já bastante difundida e utilizada em diversos laboratórios, e recentemente vem se disponibilizado testes comerciais, assim tornando as análises mais rápidas e

eficientes. Este equipamento permite detecção rápida, descartando várias etapas de subculturas, e como era fundamentado na análise de DNA pode ser considerado definitivo, desconsiderado o método tradicional para detecção (BAILEY, 1998). No laboratório era usado para a confirmação de *E.coli* e Salmonela.

Figura 14. Equipamento BAX.



Fonte: Acervo Pessoal

2.2.4 Sala de leitura e continuidade II

Nesta sala era feita a leitura de ensaios analíticos, confirmações e isolamentos. Leituras de placas de enterobacterias, coliformes totais e termotolerantes (Figura 15), contagem de micro-organismo em geral (Figura 16).

Figura 15. Placas para contagem de coliformes e enterobacterias.



Fonte:Acervo Pessoal

Figura 16. Leitura de placas



Fonte: Acervo Pessoal

2.2.5 Sala de análises especiais I

Nesta sala era realizada análise para confirmação automatizada, e produção, manutenção e armazenamento de cepas referência. O equipamento encontrado na sala, era o VITEK 2, (Figura 17) que fazia as identificações microbiológicas proporcionadas pelo sistema fundamentadas em reações bioquímicas das cepas microbiológicas, frente a 64 substratos, o que propicia um maior poder discriminação para identificar diferentes micro-organismos.

Figura 17. Equipamento e Sistema VITEK 2



Fonte: Acervo pessoal

Após o isolamento do organismo principal a ser analisado, era colocado o inóculo no cassete VITEK[®] 2, no qual o cartão VITEK[®] 2 e a amostra eram vinculados virtualmente. Após o carregamento do cassete, a incubação e a leitura de cada cartão eram gerenciados pelo sistema sem intervenção (Figura 18).

Figura 18. Carregamento de cartões e amostras para análises.



Fonte: Acervo pessoal

A sala era equipada com um Riboprinter (Figura 19), adotado pela rede dos laboratórios do MAPA desde 2006, ele tinha como função, produzir uma fotografia generativa e fazer as comparações com mais de 6.000 padrões de seu banco de dados para identificar possíveis micro-organismos patogênicos. No momento do estágio o Riboprinter estava fora de uso no laboratório de Microbiologia.

Figura 19. Riboprinter.



Fonte: Acervo Pessoal

Era usado um ultracongelador (Figura 20) para armazenar cepas referências para criar amostras controles. O ultracongelador permitia o armazenamento de artigos profundamente congelados. A temperatura deveria ser abaixo de -70°C .

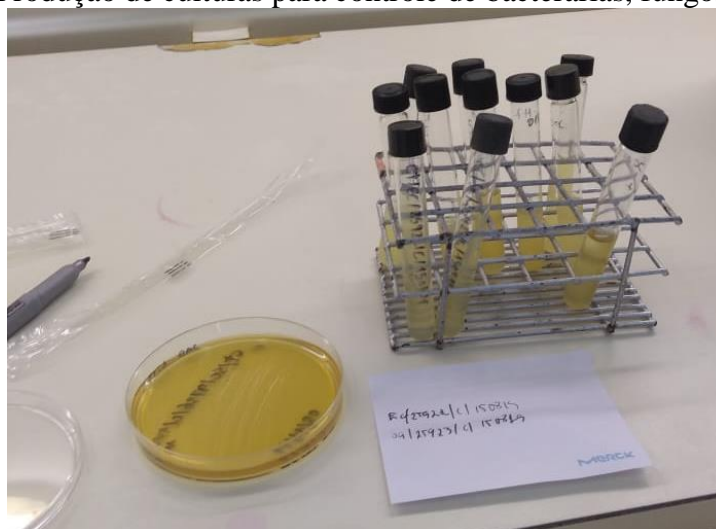
Figura 20. Ultracongelador



Fonte: Acervo pessoal

A produção de culturas de referência era feita a partir micro-organismos definidos pelo menos para o gênero e espécie, catalogados e descritos de acordo com suas características e, de preferência que ateste a origem. Normalmente eram obtidas a partir de uma coleção reconhecida nacional ou internacionalmente.

Figura 21. Produção de culturas para controle de bacterianas, fungos e leveduras.



Fonte: Acervo pessoal

Na sala de análises especiais I, também havia uma estufa de 45°C (Figura 22), para secagem de placas. Placas que são armazenadas em geladeiras, obtêm umidade, podendo fazer com que

o meio seja destruído no momento de estriamento de micro-organismo. Em meradia a secagem pode durar de 10-15 minutos, dependendo do tamanho e quantidade de placas na estufa.

Figura 22. Estufa para secagem de placas.

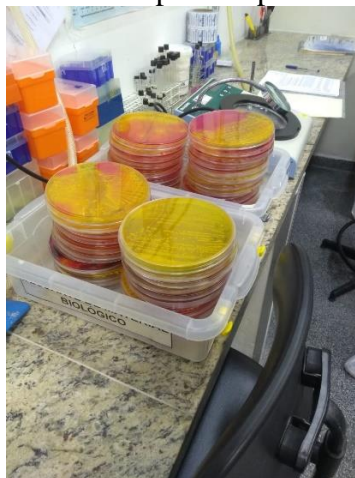


Fonte: Acervo pessoal

2.2.6 Sala de análises especiais II

Nesta sala ocorre a preparação de amostrar para análises automatizadas. Era realizada a leitura de placas para identificação de colônias características de *Salmonella* em ágar XLD (Ágar de desoxicolato-lisina-xilose) e ágar Rambach, em seguida eram repassadas para ágar nutriente e em seguida para análise automatizada para confirmação.

Figura 23. Placas XLD e Rambach prontas para leitura de *Salmonella*.



Fonte: Acervo pessoal

A preparação de amostras que foram incubadas (Figura 24), e que seriam passadas para caldos ou placas também era realizada nesta sala.

Figura 24. Amostras de *E.coli* previamente incubadas.



Fonte: Acervo pessoal

2.2.7 Sala de incubação

A sala de incubação (Figura 25) era composta por 8 estufas bacteriológicas destinadas para auxiliar a crescimento de microrganismos. O equipamento proporciona o aquecimento e também o controle da temperatura. A sala era composta por três estufas de 35°C, duas de 37°C, uma de 25°C, uma de 42°C e uma de 30°C. Essa variação de temperatura das estufas está ligado com a exigência de temperatura pelos micro-organismos para se desenvolverem. Para cada micro-organismo, existe parâmetro de temperatura mínima, máxima e ótima. E baseado na temperatura ótima, que se pode classificar os microrganismos, como termófilos, cujo temperatura ótima se localiza em torno de 60°C; psicrófilos, ótimo em 10°C; mesófilos, ótimo está entre 20 e 40°C; e psicrotróficos, com temperatura ótima entre 25 e 30°C (FRANCO, 2003).

Figura 25. Sala de incubação



Fonte: Acervo pessoal

2.2.8 Lavagem e descarte

O correto descarte de materiais contaminados não afeta diretamente a qualidade das análises, mas era tido como aspecto de boas práticas do laboratório. Em cada sala era encontrado cesto de lixos, seja para lixo comum e para infectante, diariamente esse lixo era recolhido, sendo o infectante, primeiramente autoclavado para poder ser descartado.

Os descartes eram divididos em:

- Descarte não contaminado e que podiam ser descartados em lixo comum;
- Bisturis, agulhas, facas e vidros quebrados;
- Material contaminado para autoclavação e reutilização;
- Material contaminado para autoclavação e descarte, ou apenas para descarte caso o material fosse incinerado.

A incineração de materiais contaminados e seus recipientes eram realizadas na autoclave em latões(Figura 26 A e B). Os materiais contaminantes que iam para autoclavagem eram inseridos em sacos identificados como contaminantes (Figura 26C), como manda a legislação ambiental.

Figura 26. A) Interior da autoclave B) Latões para autoclave C) Sacos identificados como contaminantes para descarte



Fonte: Acervo pessoal

Dentro da sala de análises especiais II, havia uma área para lavagem (Figura 27) de materiais reutilizáveis, que só eram lavados após a descontaminação em autoclave. Após a lavagem os materiais reutilizáveis deveriam estar livres de resíduos que pudessem ocasionar em crescimento microbiano, era utilizada solução de ácido peracético ou hipoclorito de sódio.

Figura 27. Área de lavagem de materiais reutilizáveis



Fonte: Acervo pessoal

2.3 Atividades desenvolvidas durante o estágio

2.3.1 Controle ambiental

Todos os ambientes estão propensos à micro-organismos. Cada vez mais resistência desses micro-organismo era ampliada, devido a uma seleção que acontece progressivamente de clones resistentes, podendo ser transmitidos aos seus descendentes e a outros que sejam da mesma espécie e espécies distintas (CARNEIRO et al., 2008). Desde do momento que se mostrou atividades referentes para o âmbito da saúde, os seres humanos se encontram com o fator de infecção. Com o passar do tempo as necessidades de limpeza, bom estado ambiental e alimentar e higiene, evoluíram para desinfecção e esterilização de materiais, sendo estes fatores importantes para a não ocorrência de crescimento microbiano (KALIL; COSTA, 1994).

Para se ter um controle e monitoramento ambiental era necessário um banco de dados que esteja completo e detalhado incluindo medições que possam servir de suporte. A higiene pode ser uma forma de contenção de contaminações e para isso estudos são realizados avaliando as condições microbiológicas antes e depois dos processos de limpeza (ANDRADE et al., 2000).

No laboratório de Microbiologia do LFDA, era feito controle biológico diariamente, onde todo o laboratório era limpo com solução ácido peracético a 3%. Semanalmente era realizado o controle de fluxos e estufas, e quinzenalmente o controle das salas. O controle consiste na exposição de placas abertas com os meios específicos. Sabouraud e TSA (Ágar Tripton de Soja). O meio Sabouraud possibilita o crescimento de fungos, enquanto o TSA possibilita o crescimento de bacterianas. As placas são identificadas de acordo com o local ou equipamento, e são expostas sem tampa, por 15 minutos, após a exposição, essas placas eram encubadas. As placas para bacterianas eram encubadas em estufa a 30°C por 72 horas e as placas para fungos eram encubadas a 20°C por pelo menos 5 dias. Após o tempo de incubação, era realizada a contagem de colônias que devem ser registradas no livro de controle ambiental, sendo permitida em meradia 20 colônias para ambiente e 10 para estufas e 1 para fluxos laminares. Quando os números ultrapassam esses valores, medidas corretivas eram tomadas, que pode ser a limpeza com aumento do teor do desinfetante.

Figura 28. Placas de TSA e Sabouraud que serão expostas e placas que serão encubadas após exposição.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 29. Placa exposta em estufa com presença de duas colônias de fungo.



Fonte:Acervo pessoal

2.3.2 Recebimento de amostras

Seguindo o conceito de que análise se inicia com a colheita da amostra, as ações de inspeção e investigações devem estar bem ajustadas com os laboratórios, devendo haver sincronismo entre a remessa e a capacidade do laboratório em executar as análises (MAPA, 2017). As amostras para análises (Figura 30) chegam acompanhadas da SOA (Anexo 1), acondicionadas em embalagens limpas e íntegras, sem perfurações ou rachaduras, muitas das vezes em sua embalagem original, e quando não era possível mantê-las em sua embalagem de origem, eram mantidas em embalagens adequadas, vedadas, sem sinais de violação, lacradas e sem sinais de vazamento ou rupturas. Sendo todas as amostras recebidas, avaliadas na recepção que devem cumprir os respectivos criterios de aceitação:

- Adequadamente lacradas e sem sinais de violação;
- Em embalagens e recipientes adequados;

- Em estado de conservação aceitável;
- Dentro do prazo de validade;
- Em quantidade suficiente;
- Com documentação adequada e devidamente preenchida.

As amostras que forem vistas como não conformes em relação aos criteriosos de recebimento eram descartadas, onde se gera um Termo de Rejeição de Amostras (TRA) (Anexo 2) que será encaminhado ao serviço responsável pela coleta, por via eletrônica

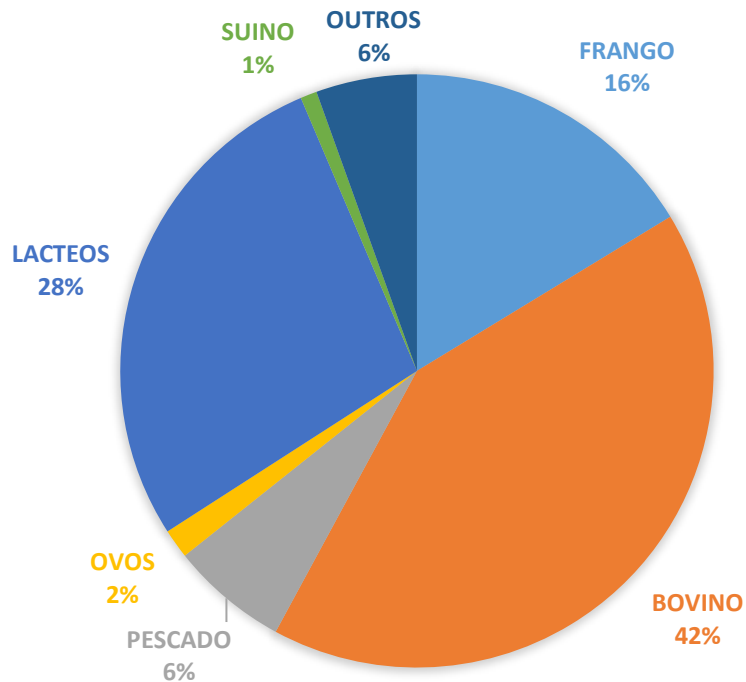
Figura 30. Amostras recepcionas em diferentes embalagens



Fonte: Acervo pessoal

Foi realizado um levantamento sobre os principais tipos de amostras que chegaram no laboratório no periodo entre 15 de Março e 4 de Novembro e os resultados foram os seguintes:

Figura 31. Frequência de matrizes recebidas no laboratório, no período de 15 de março a 4 de novembro de 2019.



Fonte: Laboratório de Microbiologia- LFDA/PE

ERA possível observar que alimento de origem bovina compreendem quase a metade das amostras que chegaram nesse período, isto está relacionado com a demanda de análises para *E.coli*, onde muitas vezes era utilizada carne de cabeça de bovinos. Ficando em segundo como produtos que mais chegam no laboratório, os lácteos devido as demandas de *Listeria*, em terceiro frango e seus derivados em terceiro, devido à alta taxa de solicitação de análise de *Salmonella*. O item outros representa produtos de origem vegetal, bebidas não lácteas e água.

2.3.3 Análise microbiológica de ração a granel para cães

A consolidação da ligação entre humanos e animais tem alavancado a preocupação com o bem-estar de animais de companhia, tal como a segurança e qualidade de alimentos direcionados a estes animais. (GAZZOTTI et al., 2015). Tem se visto um aumento na qualidade das rações, portanto, não adianta um alimento palatável, balanceado, digestível, de boa aceitabilidade, ter uma embalagem atrativa, se ele estiver com contaminações (GÓES, 2011). A matéria prima das rações está propensa a contaminações, desde a colheita ao processamento e comércio como produto finalizado. De forma geral grãos apresentam grande predisposição a serem acometidos por micro-organismos, pois quando encontram ambiente favorável para seu desenvolvimento, pode comprometer toda matéria prima, podendo desencadear diversos problemas na saúde do animal (LÁZARRI, 1993).

Um agente importante que pode prejudicar a qualidade da ração, era sua exposição ao ambiente, que pode acarretar o contato da ração com portadores de micro-organismos, como insetos e roedores. Klowden & Greenberg (1976) verificaram a multiplicação de *Salmonella* em baratas. KOPANIC et al. (1994) viram que baratas infectadas por *Salmonella spp.* podiam contaminar outras baratas e alimentos nos quais tiveram contato, mostrando o potencial desses insetos na transmissão de micro-organismos patogênicos.

Tendo em vista a preocupação com o estado microbiológico de rações comercializadas em Recife, foram coletadas 10 amostras de rações, sendo de marcas diferentes e coletadas em bairros diferentes. De acordo com o escopo da Área de Microbiologia em Alimentos e Água, rações e ingrediente para rações, eram requeridos apenas análises microbiológicas de *Salmonella spp.*, e contagem de enterobacterias e coliformes termotolerantes.

As rações foram pesadas, 25 gramas de cada (Figura 32), sendo uma pesagem para encubação (possível crescimento de Salmonela) e outra para a diluição, sendo assim armazenadas em saco de stomacher, totalizando em 20 amostras pesadas, e em seguidas amostras foram para o processamento.

Figura 32. 25 gramas de ração pesada para análise.



No processamento foram utilizadas água peptonada tamponada para amostras que iam verificar a presença de *Salmonella*, e salina peptonada para diluição para quantificar enterobacterias e coliformes termotolerantes (Imagem 33).

Figura 33. Ração com água peptonada tamponada



Fonte: Acervo pessoal

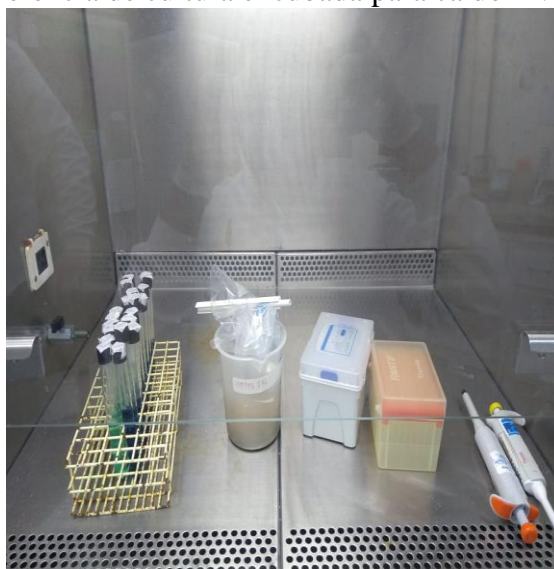
A análise de *Salmonella* foi baseado na ISO 6579-1 de 2007, que consiste em detecção e isolamento e confirmação bioquímica e sorológica. A ração foi homogeneizada com a água tamponada e em seguida incubada a 37°C, por 16 a 20 horas (Imagem 34). A partir da cultura de prera-enriquecimento foi transferida 0,1 mL para um tubo contendo 10 mL de caldo

Rappaport- Vassiliadis Soya (RVS) e incubada a 42°C por 24 horas. Outra porção de 1 mL foi transferida para um tubo contendo 10mL Tetrionato-Muller Kaufmann novobiocina e incubada a 36°C por 24 horas (Figura 35).

Figura 34. Incubação da ração para crescimento microbiano.



Figura 35. Transferência de cultura encubada para caldo RVS e MKTTn.



Após a incubação um inoculo de cada caldo foi transferido para placas ágar XLD e ágar Rambach, 10 de cada meio, sendo incubadas a 36°C por 24 horas, tendo como finalidade o crescimento de colônias, a fim de identificar colônias características de *Salmonella* para isolamento e confirmação. Não houve o aparecimento de colônias características de *Salmonella* (Figura 36) para nenhuma das rações, sendo assim considerada ausente para

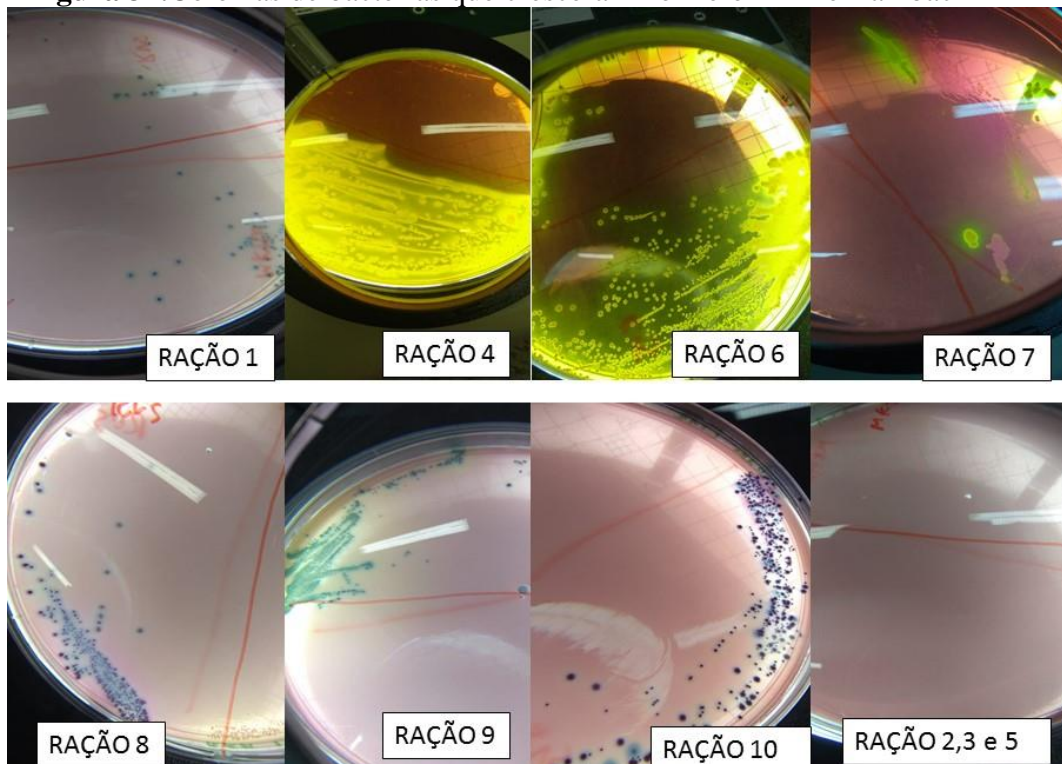
todas, sendo assim dispensado o teste bioquímico e sorológico para confirmação. Mas houve crescimento de outras colônias em com exceção das rações 2, 3 e 5 (Figura 37).

Figura 36. Colônias típicas de *Salmonella*.



Fonte: BBL Mundial

Figura 37. Colônias de bactérias que cresceram no meio XLD e Rambach

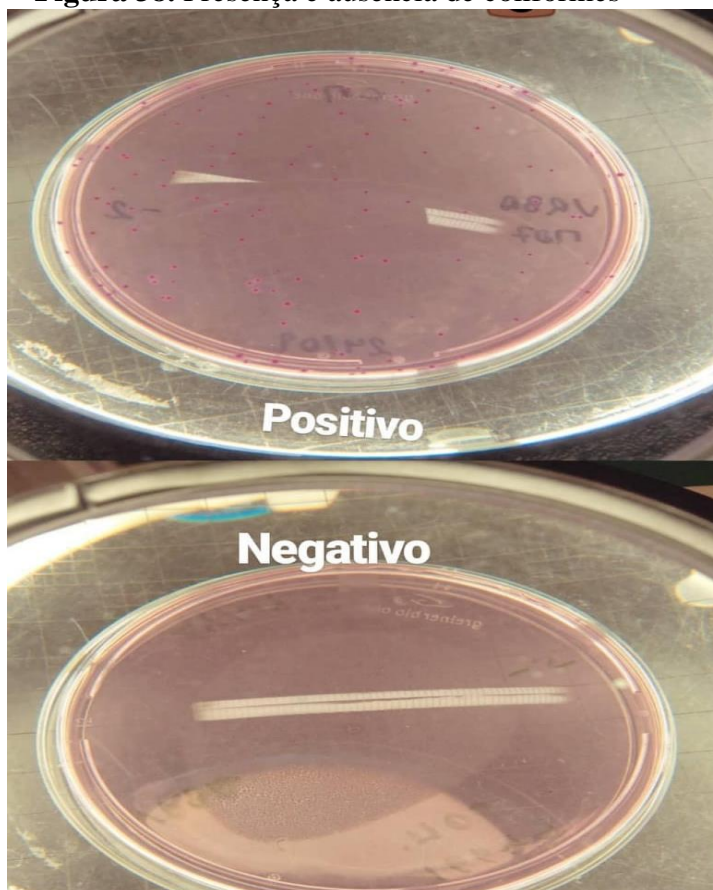


Fonte: Acervo pessoal

Para a contagem de coliformes, se utilizou o meio Ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA) que era um meio seletivo para detectar e enumerar coliformes, onde foi inoculada por profundidade a ração homogeneizada na água peptonada. Os microrganismos que fermentam a lactose degradam a lactose do meio, produzindo colônias púrpuras. Não houve

nenhuma caracterização significativa da presença de coliformes. Para a identificação de enterobacterias se usa o mesmo método, mudando apenas o meio, usando o ágar Violeta Vermelho Bile Glicose (VRBG), onde também não foi quantificado nenhum volume considerável de enterobacterias (Figura 38).

Figura 38. Presença e ausência de coliformes



Fonte: Acervo pessoal

As colônias não características de *Salmonella* que apareceram nas placas de XLD e Rambach foram selecionadas a partir de colônias de diferentes morfologias, transferidas para ágar nutriente, e em seguida levadas para identificação no equipamento Vitek (Figura 39), foram no total 20 colônias selecionadas, para que houvesse a identificação de quais bacterias estão presentes nas rações, o resultado está expresso na tabela 4.

Figura 39. Utilização do Vitek 2 para identificação de bacterias presente nas rações



Fonte: Acervo pessoal

Tabela 4. Bacterias encontradas nas rações.

Ração	Bacterias
1	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>
2	Não houve crescimento de bacterias
3	Não houve crescimento de bacterias
4	<i>Enterobacter aerogenes</i>
5	Não houve crescimento de bacterias
6	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>
7	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>
8	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> ; <i>Enterobacter aerogenes</i>
9	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>
10	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> <i>Raoultella ornithinolytica</i> ,

Foi evidente a presença da *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, em quase todas as rações. A *Klebsiella* pertence à família das enterobacterias, mesmo não aparecendo em grandes quantidades para contagem a presença dessa bacteria, indica uma provável contaminação fecal ou ambiental, uma vez que *K. pneumoniae* pode ser isolada tanto de fezes como da água. A presença dessas bacterias pode indicar falhas higiênicas ao longo da obtenção, do processamento ou da conservação da ração. Assim destacando a importância de manter um rigoroso cuidado sobre o manuseio das materias primas recebidas por indústrias de ração

para cães, visando sempre o controle sanitário-higiênico no processo de fabricação e, especialmente, o armazenamento dessas rações, tendo em vista que esta pode ter sua qualidade comprometida quando comercializada a granel, exposta ao ambiente.

3.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização do estágio supervisionado obrigatório no laboratório de Microbiologia do LFDA-PE foi possível vivenciar novas experiências, meses onde pude aprimorar conhecimentos adquiridos na graduação, que vão servir para minha formação pessoal e como Zootecnista.

Integrar uma equipe com profissionais altamente qualificados, em um órgão público me fez ter uma visão de futuro ampla. Conviver com as pessoas que integram a equipe do laboratório de Microbiologia do LFDA-PE, me permitiu não só adquirir conhecimentos sobre ensaios microbiológicos, mas entender sobre normas, leis, que acercam a inspeção agropecuária e segurança alimentar.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, D.; ANGERAMIA, E.L.S; PANDOVANI, C.R.; Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Revista De Saúde Pública**, v.34, nº2, p.163-9, 2000.
- BAILEY, J. S. Detection of Salmonella cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX System. **Journal of Food Protection**, Des Moines v. 61, n. 7, p. 792-795, jul., 1998.
- BRASIL. Ministerario da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 17, de 25 de janeiro de 2013. Cria, junto ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministerario da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a Comissão Científica Consultiva em Microbiologia de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2013.
- CARNEIRO, L.C.; CARVALHES, T.T.; FEITOSA, S.B.; FILHO, J.E.; OLIVEIRA, M.A.C.; PESQUEIRO, M.A.; QUINTANA, R.C; Identificação de Bacterias Causadoras de Infecção Hospitalar e Avaliação da Tolerância a Antibióticos. **Revista News Lab**, edição 86, 2008. Disponível em:http://www.newslab.com.br/ed_anteriores/86/art03/art03.pdf v.86, 2008.Acesso em 20 de novembro de 2019.
- FRANCO, B.D.G.M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu; p. 33-71. 2002.
- FRANCO, B.D.G.M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2º edição – São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- GAZZOTTI, T.; BIAGI, G.; PAGLIUCA, G.; PINNA, C.; SCARDILLI, M.; GRANDI, M.; ZAGHINI, G. Occurrence of mycotoxins in extruded commercial dog food. **Animal Feed Science and Technology**, v. 202, p. 81–89, 2015.
- GÓES, E. M. Segurança Alimentar e Qualidade de Alimentos para Cães e Gatos. **Mais Notícias**, 2011.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579**: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of Salmonella spp. 4th ed. Geneva, 2002. Amendment 1: 15 jul. 2007.
- KALIL, E.M.; COSTA, A.J.F.; Desinfecção e esterilização, 1994. **Revista Acta Ortop brasileira**. 1994.

KLOWDEN, M.; GRENNBERG, B. Salmonella in the American cockroach: evaluation of vector potential through dosed feeding experiments. **Journal of Hygiene**, Londres, v.77, n.1, p.105-111, 1976.

KOPANIC JR, R. J.; SHELDON, B. W.; WRIGHT, C. G. Cockroaches as vectors of Salmonella: Laboratory and field trials. **Journal of Food Protection**, v.57, n.2, p.125-132, 1994.

LAZARRI, F. A. **Simpósio de Proteção de Grãos Armazenados**. Anais Embrapa – CNPT, p. 62- 68, 1993.


MAPA. **Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

MAPA. **Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

MAPA. **Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

5.0 ANEXOS

Anexo 1. Solicitação oficial de amostra

 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - SDA DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL - DIPQA SOLICITAÇÃO OFICIAL DE ANÁLISE		01-LABORATÓRIO: <input type="checkbox"/> Microbiologia <input type="checkbox"/> Físico-Química		03-Nº DA SOLICITAÇÃO/ANO	
		02-SERVIÇO RESPONSÁVEL PELA COLETA		04-Nº DO SIF / ER	
05-PRODUTO		06-REGISTRO PROD.		07-MARCA	
08-ESTABELECIMENTO		09-ENDEREÇO			
11-DATA FABRICAÇÃO		12-DATA VALIDADE		13-Nº DO LOTE	
14-TAMANHO DO LOTE		15-DATA E HORA COLETA DA AMOSTRA			
16-LACRE Nº - AMOSTRA		17-LACRE Nº - CONTRAPROVA LANAGRÓ / SIF 1 * 1		18-LACRE Nº - CONTRAPROVA EMPRESA 1 * 1	
19-PRP (INFORMAÇÕES ADICIONAIS)					
ANO	CICLO	AMOSTRA	AM. SUPERVIAO	HORA DO INICIO DO TURNO	TURNO
					<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3
			Linha		VOLUME DE ABATE-TRA
			<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3		
20-TEMPERATURA - CONDIÇÕES DA AMOSTRA NA COLETA					21-DATA DA REMESSA
TEMPERATURA	°C	CONGELADO SÓLIDO <input type="checkbox"/>	CRISTAIS DE GELO <input type="checkbox"/>	RESFRIADO <input type="checkbox"/>	AMBIENTE <input type="checkbox"/>
					/ /
22-ANÁLISE(S) REQUERIDA(S) - CÓDIGOS:					
23-OBSERVAÇÕES					
24-SIGNATURA E IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELA COLETA			25-SIGNATURA E IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELO ESTABELECIMENTO		
26-DATA E HORA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA			27-Nº DO REGISTRO NO LABORATÓRIO		
/ /					
28-TEMPERATURA - CONDIÇÕES DA AMOSTRA NO RECEBIMENTO					
TEMPERATURA	°C	CONGELADO SÓLIDO <input type="checkbox"/>	CRISTAIS DE GELO <input type="checkbox"/>	RESFRIADO <input type="checkbox"/>	AMBIENTE <input type="checkbox"/>
				DECOMPOSIÇÃO <input type="checkbox"/>	
29-OBSERVAÇÕES					
30-SIGNATURA E IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELO RECEBIMENTO					
DOCUMENTO EM 2 VIAS - 1 - SIF - 2 - LABORATÓRIO (P/173 DE SÃO PAULO EM APROVAÇÃO DO INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA) ***** RECORTAR ***** RECORTAR ***** RECORTAR ***** RECORTAR ***** ***					
 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - SDA DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL - DIPQA SOLICITAÇÃO OFICIAL DE ANÁLISE		31-Nº SOLICITAÇÃO/ANO			
32-PRODUTO		33-Nº SIF		34-Nº LACRE	
35-ANÁLISE(S) REQUERIDA(S) - CÓDIGOS:					
36-SIGNATURA E IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELA COLETA					

Fonte: MAPA

Anexo 2. Termo de rejeição de amostras

 <p>MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA COORDENAÇÃO DE APOIO LABORATORIAL DIVISÃO DE ENSAIOS QUÍMICOS</p> <p>LABORATÓRIO: ENDEREÇO: TELEFONE/FAX: E-MAIL:</p>	NÚMERO DE REGISTRO DA AMOSTRA NO LABORATÓRIO:
	TERMO DE REJEIÇÃO DE AMOSTRAS
TERMO Nº:	VIA Nº: <<VIA_Nº>>
DATA: <<DATA_EMISSAO>>	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA: <IDENTIFICACAO >>
MOTIVO DA REJEIÇÃO PARA DESCARTE	
ESTADO DE CONSERVAÇÃO NÃO ACEITÁVEL	SOA SEM ASSINATURA/CARIMBO DO RESPONSÁVEL PELA COLHEITA
QUANTIDADE INSUFICIENTE	CINTA DE IDENTIFICAÇÃO AUSENTE
MATRIZ AUSENTE	CINTA DE IDENTIFICAÇÃO DANIFICADA OU ILEGÍVEL
MATRIZ INADEQUADA	AMOSTRA SEM LACRE
EM CONTATO COM O GELO/ DEGELO	SOA NÃO CORRESPONDE À AMOSTRA
LACRE VIOLADO	LACRE INADEQUADO
SOA AUSENTE	OUTROS (ESPECIFICAR):
EMBALAGEM INADEQUADA / DANIFICADA	
AMOSTRA COM PRAZO DE VALIDADE VENCIDO	
ERRO NO PREENCHIMENTO DA SOA	
Informação Complementar:	
_____ Responsável pela Rejeição da Amostra Assinatura e Carimbo	_____ Verificado por (Responsável pela unidade): Assinatura e Carimbo

Fonte: MAPA