

Neusa Sofia Coimbra dos Reis

DETEÇÃO DE DNA DE RUMINANTE POR RT-PCR EM ALIMENTOS PARA ANIMAIS

Implementação e validação do método PCR em tempo real na deteção proteínas
animais transformadas em alimentos para animais

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Senhor Professor Fernando Ramos e
pelo Dr. Miguel Santos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro de 2014



Dedicatória

Ao meu filho, Rafael dos Reis Rodriguês.

Agradecimentos

A realização do presente trabalho só foi possível pelo envolvimento de várias pessoas. A todas quero expressar o meu agradecimento, em especial:

Ao Dr. Miguel Santos e Professor Fernando Ramos pela orientação científica deste trabalho, pelo apoio durante a realização do trabalho experimental e elaboração da dissertação.

A Doutora Inês Guinote, ao Dr. Jacinto Gomes e Isabel Bacém, pelo incentivo, apoio e produtivas trocas de ideias.

Ao Doutor Jorge Barbosa e Eng^a Clara Cruz por me terem dado a oportunidade de realizar o meu trabalho experimental no INIAV.

A Doutora Teresa Albuquerque, Doutora Maria Helena Ferronha e Doutora Ana Botelho por disponibilizarem espaço e equipamentos para realização do trabalho experimental.

A todos do departamento de Controlo de Alimentos para Animais, pela hospitalidade e amizade: Dr. Gabriela Assis, Dr. Sara Moura, Dr. Rita Barbosa, Senhora Rosário Vilarinho, Senhora Filomena Crespo, Senhora Natividade Pedras, Senhora Cândida Traças, Senhora Ana Bela e Senhor Eduardo Oliveira.

A todos os meus amigos e familiares, pelo apoio incondicional e por me fazer acreditar que sou capaz, em especial: Wilson Rodriguês, Eufémio Reis, Amélia Coimbra, Elisangela Reis, Ivanilde Reis, Edmilson Reis, Odair Reis, Solange Reis e Emília Gonçalves.

Resumo

A encefalopatia espongiforme bovina é uma doença priónica que consiste numa desordem neurológica, progressiva e fatal, que afeta os bovinos. Conhecida na década de 1980 na Europa, na década de 90 chamou a atenção como nova variante da doença de *Creutzfeldt-Jakob* em seres humanos.

Encefalopatia espongiforme bovina tem uma origem alimentar, propagando-se através da incorporação de farinhas de carne e ossos contaminados, provenientes da reciclagem de restos de animais mortos expostos ao agente infeccioso (prião), nas rações.

Foram criadas medidas para garantir a proteção da saúde pública nomeadamente a remoção de matérias de riscos específicos e a restrição à utilização de certas proteínas animais transformadas na alimentação de animais de criação (*Feed Ban*) e, em paralelo, aplicaram-se os métodos para garantir o cumprimento das respetivas proibições. A microscopia clássica era até há pouco tempo o único método oficial utilizado para o controlo das proteínas animais transformadas em alimentos para animais de criação na Europa. Com a aprovação da utilização de monogástricos na alimentação dos peixes de aquacultura, o método da reação da polimerase em cadeia em tempo real, para deteção de proteínas animais transformadas ruminantes, foi aprovado como método oficial.

Este trabalho teve como objetivo o estudo dos limites de deteção do método da reação da polimerase em cadeia em tempo real na identificação de ácido desoxirribonucleico de ruminantes em rações de animais, em Portugal. Para tal procedeu-se à incorporação de farinhas de carne e ossos, em diferentes concentrações, em alimentos compostos para animais e em matérias-primas utilizadas na sua elaboração, simulando diferentes níveis de contaminação possíveis. Simultaneamente fez-se a análise de microscopia clássica, por forma a comparar estes resultados e limites de deteção.

Foi possível verificar um limite de deteção de 0,1% de incorporação para ambos os métodos.

Palavra-chave: Encefalopatia espongiforme bovina, proteínas animais transformadas e reação da polimerase em cadeia em tempo real.

Abstract

Bovine spongiform encephalopathy is a prion disease that is a neurological, progressive and fatal disorder that affects cattle. Known since the 1980s in Europe, in the 90s it gained attention as new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in humans.

Bovine spongiform encephalopathy has a food source, spreaded by incorporation of meat and bone meal contaminated from recycling remains of dead animals exposed to the infectious agent (prion) in diets.

Some measures were designed to ensure the protection of public health, in particular, the removal of specified risk materials and restriction of use of certain processed animal proteins in feed for farmed animals (Feed Ban) and, parallel, usage of methods to ensure compliance with the respective bans. The classical microscopy was until recently the only official method used for the control of processed animal proteins in feed for farmed animals in Europe. With the approval of the use of monogastric feeding fish aquaculture, real-time polymerase chain reaction method for detection of ruminant's deoxyribonucleic acid was approved as an official method.

This work aimed to study the detection limits of real-time polymerase chain reaction products in the identification of ruminant processed animal proteins in animal feed, in Portugal. To do so, meat and bones were incorporated in different concentrations in compound feeds and raw materials used in their manufacture, simulating different levels of possible contamination. Simultaneously, classical microscopy was performed in order to compare these results with those obtained through polymerase chain reaction in what concerns the detection limit.

It was possible to check a detection limit of 0.1% of incorporation for both methods.

Keywords: Bovine spongiform encephalopathy, processed animal proteins and real-time polymerase chain reaction.

Abreviaturas

BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina (“ <u>B</u> ovine <u>S</u> pongiform <u>E</u> ncephalopat <u>y</u> ”)
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jacob (“ <u>C</u> reutzfeldt- <u>J</u> acob <u>D</u> isease”)
CL	<u>C</u> romatografia <u>L</u> íquida
CRA-W	Centro de Pesquisa Agrícola Walloon (“ <u>W</u> alloon <u>A</u> gricultural <u>R</u> esearch <u>C</u> entre”)
CRL-AP	Laboratório Comunitário de Referência para as Proteínas Animais nos Alimentos para Animais (“ <u>C</u> ommunity <u>R</u> eference <u>L</u> aboratory for <u>a</u> nimal <u>p</u> roteins in <u>f</u> eeding <u>s</u> tuff <u>s</u> ”)
CWD	Doença Emaciante Crónica de veados (“ <u>C</u> ronic <u>W</u> asting <u>D</u> isease”)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (“ <u>D</u> eoxiribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid”)
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (“ <u>E</u> uropean <u>F</u> ood <u>S</u> afety <u>A</u> uthority”)
EURL-AP	Laboratório de Referência da União Europeia para as proteínas animais nos alimentos para animais (“ <u>E</u> uropean <u>U</u> nion <u>R</u> eference <u>L</u> aboratory for <u>a</u> nimal <u>p</u> roteins in <u>f</u> eeding <u>s</u> tuff <u>s</u> ”)
fCJD	Doença familiar de <u>C</u> reutzfeldt- <u>J</u> acob (“ <u>f</u> amilial <u>C</u> reutzfeldt- <u>J</u> acob <u>D</u> isease”)
FEFAC	<u>F</u> ederação <u>E</u> uropeia dos <u>F</u> abricantes de <u>A</u> limentos <u>C</u> ompostos
ELISA	Ensaio imunoenzimático (“ <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay”)
FCO	<u>F</u> arinha de <u>C</u> arne e <u>O</u> ssos
FFI	Insónia Familiar Fatal (“ <u>F</u> atal <u>F</u> amilial <u>I</u> nsomnia”)
FSE	Encefalopatia Espongiforme dos Felinos (“ <u>F</u> eline <u>S</u> pongiform <u>E</u> ncephalopat <u>y</u> ”)
FSI	Insónia Espontânea Fatal (“ <u>F</u> atal <u>S</u> pontaneous <u>I</u> nsomnia”)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSS	Síndrome de <u>G</u> ersmann- <u>S</u> traussier- <u>S</u> cheinker
iCJD	Doença de <u>C</u> reutzfeldt- <u>J</u> acob iatrogénica (“ <u>i</u> atrogenic <u>C</u> reutzfeldt- <u>J</u> acob <u>D</u> isease”)
INIAV	<u>I</u> nstituto <u>N</u> acional de <u>I</u> nvestigação <u>A</u> graria e <u>V</u> eterinária
MRE	<u>M</u> aterial de <u>R</u> isco <u>E</u> specífico

NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (“ <u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> iot <u>e</u> chnology <u>I</u> nformation”)
NIRM	Microscopia de infra vermelho próximo (“ <u>n</u> ear- <u>i</u> nfr <u>r</u> ed <u>m</u> icroscopy”)
PAT	Proteínas <u>A</u> nimais <u>T</u> ransformadas
PCR	Reação da polimerase em cadeia (“ <u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction”)
Prnp	Gene que codifica a PrP
PRNP	Gene humano que codifica a PrP
PrP	Proteína Priónica (“ <u>P</u> rion <u>P</u> rotein”)
PrP ^c	Proteína Priónica celular (“ <u>P</u> rion <u>P</u> rotein <u>c</u> elular”)
PrP ^{res}	Proteína Priónica resistente à protease (“ <u>P</u> rotease- <u>r</u> esistant <u>P</u> rion <u>P</u> rotein”)
PrP ^{sc}	Proteína Priónica Scrapie (“ <u>P</u> rion <u>P</u> rotein <u>s</u> crapie”)
RT-PCR	Reação da polimerase em cadeia em tempo real (<u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
sCJD	Doença esporádica de <u>C</u> reutzfeldt-Jacob (sporadic <u>C</u> reutzfeldt- <u>J</u> acob <u>D</u> isease)
SNC	<u>S</u> istema <u>N</u> ervoso <u>C</u> entral
TME	Encefalopatia Transmissível do “vison” (“ <u>T</u> ransmissible <u>M</u> ink <u>E</u> ncephalopat <u>y</u> ”)
TSE	Encefalopatia Espongiforme Transmissível (“ <u>T</u> ransmissible <u>S</u> pongiform <u>E</u> ncephalopat <u>y</u> ”)
vCJD	variante da doença de Creutzfeldt-Jacob (“ <u>v</u> ariant <u>C</u> reutzfeldt- <u>J</u> acob <u>D</u> isease”)

Índice de Figuras

Figura 1 - Produção europeia de alimentos para animais em 2012 (em milhões de toneladas).	2
Figura 2 - Produção europeia dos diferentes tipos de alimentos compostos para animais em 2012 (em %).	3
Figura 3 - Matérias-primas utilizadas na produção de alimentos compostos para animais.	3
Figura 4 - Corte de um cérebro infetado com TSE.	5
Figura 5 - Estrutura primária da PrP ^c .	7
Figura 6 - Estrutura tridimensional das duas isoformas da PrP.	7
Figura 7 - Modelo heterodímero.	8
Figura 8 - Modelo de Nucleação.	8
Figura 9 - As principais formas de transmissão das TSE.	9
Figura 10 - Transmissão de BSE a outras espécies.	14
Figura 11 - À medida que a reação da amplificação ocorre, a enzima Taq DNA polimerase quebra a ligação da sonda com a sequência, permitindo a emissão de luz.	20
Figura 12 - Microscopia infravermelho próximo com sistema de imagem.	21
Figura 13 - Esquema de ELISA <i>Sandwich</i> .	22
Figura 14 - Extração e preparação do sedimento.	28
Figura 15 - Preparação do sobrenadante.	29
Figura 16 - Observação do sobrenadante e do sedimento ao microscópio ótico.	29
Figura 17 - Suporte de separação magnética.	31
Figura 18 - Fotografia obtida por microscopia ótica composta à ampliação total de 100X, representativa dos fragmentos encontrados na farinha de peixe.	38
Figura 19 - Fotografia obtida por microscopia ótica composta à ampliação total de 100X, representativa dos fragmentos encontrados na farinha de aves.	38
Figura 20 - Fotografia obtida por microscopia ótica composta à ampliação total de 100X, representativa dos fragmentos encontrados na farinha de Mamíferos	39
Figura 21 - Curva de amplificação obtida para os calibrantes de 46, 177 e 680 cópias da subunidade α do precursor do recetor da acetilcolina bovina.	43
Figura 22 - Determinação do <i>cut-off</i> (x) baseado nos valores maiores das médias dos Cts dos diferentes ensaios.	45
Figura 23 - Eletroforese me gel de agarose a 2% em TBE 1x dos produtos amplificados por PCR em tempo real.	53

Figura 24 - Placa de ELISA após a mudança de cor em proporção do nível de troponina I específica do músculo de ruminante.

55

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de TSE em diferentes espécies de animais.	10
Tabela 2 - Exemplos dos diferentes TSE em Humanos.	12
Tabela 3 - Origem e natureza das amostras cedidas pelo INIAV e recolhidas em fábricas utilizadas no estudo.	24
Tabela 4 - Amostras cega cedidas pelo EURL-AP utilizadas no estudo.	26
Tabela 5 - Calibrantes produzidos a partir de uma sequência alvo de 85 pb determinado a partir da subunidade α precursor do recetor da acetilcolina bovina, fornecidos pelo EURL-AP.	30
Tabela 6 - Reagentes utilizados na extração do DNA.	31
Tabela 7 - Reagentes utilizados na purificação do DNA.	32
Tabela 8 - Reagentes utilizados na preparação da Mix.	32
Tabela 9 - condições racionais estabelecidas para a realização do método de PCR.	33
Tabela 10 - A aplicação dos reagentes na placa de ELISA.	36
Tabela 11 - Resumo dos resultados de análise da presença de PAT por microscopia clássica.	39
Tabela 12 - Resumo dos resultados obtidos das amostras pela microscopia clássica, após uma incorporação intencional de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos.	41
Tabela 13 - Resumo dos resultados obtidos das amostras pela microscopia clássica, com uma concentração de 0,025% (p/p) de FCO de mamíferos.	42
Tabela 14 - Representação dos valores resultante dos quatro ensaios realizados com os diferentes calibrantes (46, 177 e 680 cópias) da subunidade α do recetor da acetilcolina bovina.	44
Tabela 15 - Média dos Cts dos diferentes calibrantes para cada ensaio.	44
Tabela 16 - Resultado da amplificação das amostras cega.	46
Tabela 17 - Resumo dos resultados de análise da presença de PAT por PCR em tempo.	48
Tabela 18 - Resumo dos resultados obtidos das amostras, analisados por PCR em tempo real, após uma incorporação intencional de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos.	50
Tabela 19 - Tabela resumo dos resultados obtidos das amostras, analisados por PCR em tempo real, após uma incorporação intencional de 0,025% (p/p) de FCO de mamíferos.	52
Tabela 20 - Resumo dos resultados da leitura placa Elisa no Espectrofotómetro com filtro de 450 nm	56

Índice Geral

Parte I Revisão bibliográfica

1	Introdução geral	1
2	Alimentos para animais	2
2.1	Proteínas Animais transformadas	4
3	A Encefalopatia Espongiforme Transmissível	5
3.1	Agente infeccioso	5
3.2	Mecanismo de infeção	8
3.3	Via de transmissão	9
3.4	TSE Animal	10
3.5	TSE Humana	11
4	A Encefalopatia Espongiforme Bovina	13
4.1	Alimentação na origem da doença	13
4.2	Medidas de controlo da doença	14
4.2.1	<i>Feed Ban</i>	14
4.2.2	Materiais de Risco Específicos	16
4.2.3	Programas de Vigilância	16
4.2.4	Perspetivas Futuras	17
5	Métodos de identificação de Proteína animal transformadas	18
5.1	Métodos Oficiais na União Europeia	18
5.1.1	Microscopia	18
5.1.2	PCR em tempo real	19
5.2	Outros métodos de controlo laboratoriais	20
5.2.1	NIRM	20
5.2.2	ELISA	21

Parte II Trabalho Experimental

6	Material e métodos	24
6.1	Material biológico	24
6.2	Métodos	27

6.2.1 Microscopia	27
6.2.2 Reação de PCR em tempo real	29
6.2.3 Visualização dos produtos de amplificação de PCR em tempo real	33
6.2.4 ELISA	34
7 Resultados e Discussão	37
7.1 Caracterização das PAT por Microscopia	37
7.1.1 Caracterização morfologia das PATs em farinha de origem animal	37
7.1.2 Caracterização das amostras sob análise	39
7.1.3 Caracterização das amostras, com uma incorporação de 0,1% de FCO de mamíferos	40
7.1.4 Caracterização das amostras, com uma incorporação de 0,025% de FCO de mamíferos	42
7.2 Implementação do PCR em tempo real	43
7.2.1 Determinação do <i>Cut-off</i>	43
7.2.2 Validação do método	46
7.2.3 Caracterização das amostras por PCR em tempo real	47
7.2.4 Caracterização das amostras, por PCR em tempo real, com um incorporação de 0,1% de FCO de mamíferos	50
7.2.5 Caracterização das amostras, por PCR em tempo real, com uma incorporação de 0,025% de FCO de mamíferos	51
7.3 Estudo da sequência alvo	53
7.3.1 Visualização dos produtos de amplificação de PCR em tempo real	53
7.3.2 Identificação de sequência alvo no Centro Nacional de Informações Sobre Biotecnologia	53
7.4 Estudo complementar pela técnica ELISA	55

Parte III

Conclusão

8 Conclusão	57
-------------	----

Parte IV

Referência Bibliográfica

Referência Bibliográfica	59
--------------------------	----

Parte I
Revisão bibliográfica

1 Introdução Geral

2 Alimento para Animais

3 Encefalopatia Espongiforme Transmissível

4 Encefalopatia Espongiforme Bovina

5 Métodos de identificação de Proteína Animais Transformados

I Introdução geral

Uma série de crises relativas à alimentação humana e animal (Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), dioxinas, etc.) colocaram em evidência as falhas na conceção e na aplicação da regulamentação alimentar na União Europeia. Em resposta a essas crises alimentares, a Comissão Europeia publicou, em Janeiro de 2000, o Livro Branco sobre a segurança dos alimentos, reformulando a legislação europeia sobre a matéria (COM, 1999). A Comissão anunciou a criação de um quadro jurídico que iria abranger toda a cadeia alimentar, “do prado ao prato”, segundo uma abordagem global e integrada. De acordo com esta lógica, a segurança dos alimentos é um domínio que toca também a alimentação e a saúde dos animais, a proteção e o bem-estar dos animais, os controlos veterinários, as medidas sanitárias, os controlos fitossanitários e a preparação e higiene dos géneros alimentícios. O Livro Branco sublinha, igualmente, a necessidade de instaurar um diálogo permanente com os consumidores para fins de informação e educação (COM, 1999).

Em 2002 foi criada a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), cujo papel consiste em avaliar e comunicar os perigos ligados à cadeia alimentar (CE, 2002a). Emite opiniões e pareceres científicos de apoio às tomadas de decisão, propondo à Comissão Europeia e seus Estados-Membros, medidas de proteção aos consumidores eficazes e atempadas. Aborda todos os aspetos da cadeia alimentar na sua continuidade: análise de risco, princípio da precaução, rastreabilidade e sistema de alertas rápidas.

A segurança dos alimentos de origem animal começa com a segurança dos alimentos para animais. O Regulamento (CE) n.º 853/2004 assegura este princípio sendo referente aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e géneros alimentícios e às normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais (CE, 2004).

Dado ser o objetivo deste trabalho a avaliação de um método de análise para deteção de presença de proteínas animais transformadas (PAT), neste caso, reação da polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR), procedeu-se paralelamente à análise das rações e matérias-primas sob avaliação, pelo método de microscopia ótica, por forma a ter resultados comparáveis.

2 Alimentos para animais

O consumo de produtos alimentares de origem animal é uma parte inevitável da nossa dieta diária.

O mercado de alimentos para animais depende do mercado de produtos de origem animal. Segundo a Federação Europeia dos Fabricantes de Alimentos Compostos (FEFAC) em 2012, na União Europeia (UE) foram produzidas 47,5 milhões de toneladas (milhões t.) de carne (7,5 milhões t. de carne bovina, 21,9 milhões t. de carne suíno e 12,7 milhões t. de carne de aves de capoeira) e 141 milhões de ovos (FEFAC, 2012).

O consumo médio de carne na UE está estimado em cerca de 86 kg / habitante / ano (FEFAC, 2012).

Dentro da UE cerca de 470 milhões t. de alimentos (alimentos compostos, alimentos simples, forragens) são consumidos pelos animais de criação, onde 153,5 milhões t. são alimentos compostos provenientes das produções internas (Figura 1).

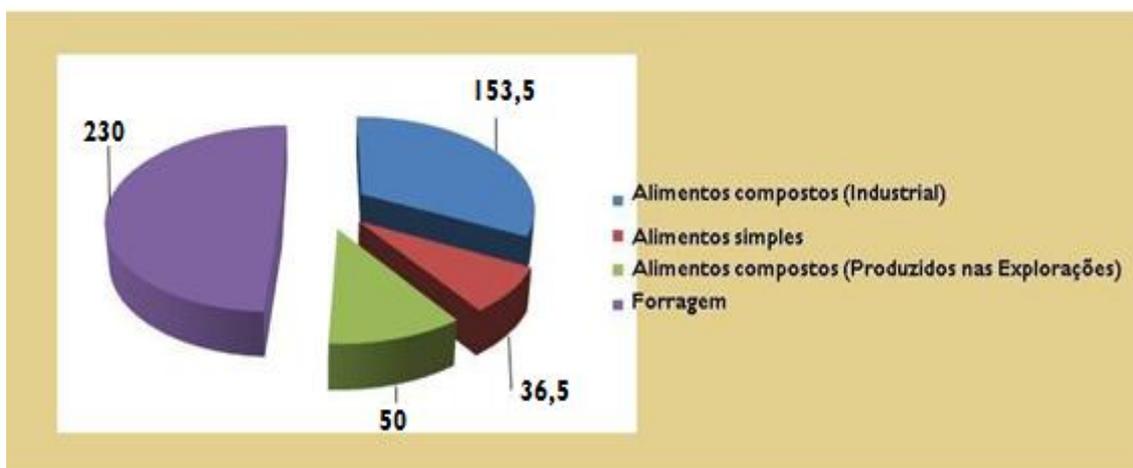


Figura 1 - Produção europeia de alimentos para animais em 2012 (em milhões de toneladas) (Fonte: FEFAC, 2012).

Na Figura 2 apresenta-se a produção de alimentos compostos para animais de acordo com as espécies mais representativas. A Alemanha foi o país da UE que mais produziu alimentos compostos para animais, seguida pela Espanha e França, ambos em segundo lugar. A Alemanha é o principal produtor de alimentação para ruminantes, Espanha para suínos e França para aves (FEFAC, 2012).

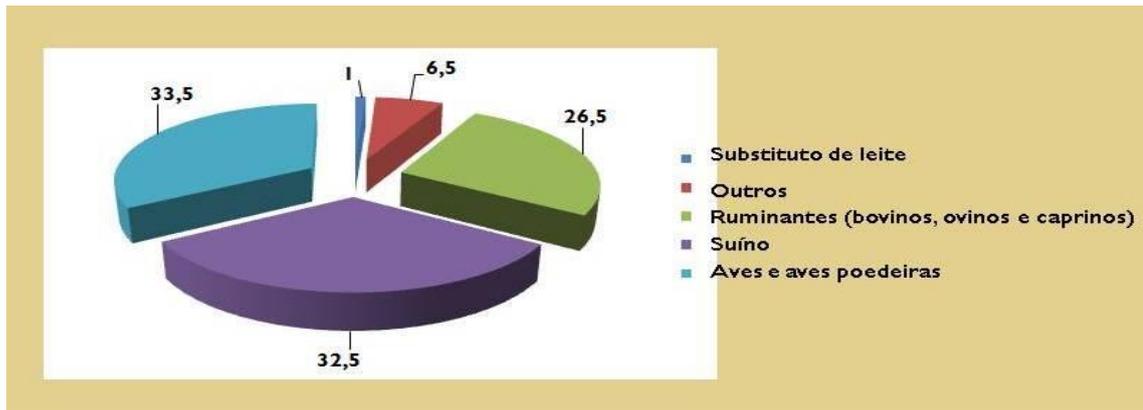


Figura 2 - Produção europeia dos diferentes tipos de alimentos compostos para animais em 2012 (em %) (Fonte: FEFAC, 2012)

Os alimentos compostos são fabricados a partir de matérias-primas obtidas através de uma grande variedade de fontes, conforme se pode observar na Figura 3. Algumas são obtidas a partir de subprodutos de indústrias alimentares e outros ingredientes, que não são cultivados em quantidades suficientes na UE, são importados de países terceiros (FEFAC, 2012).

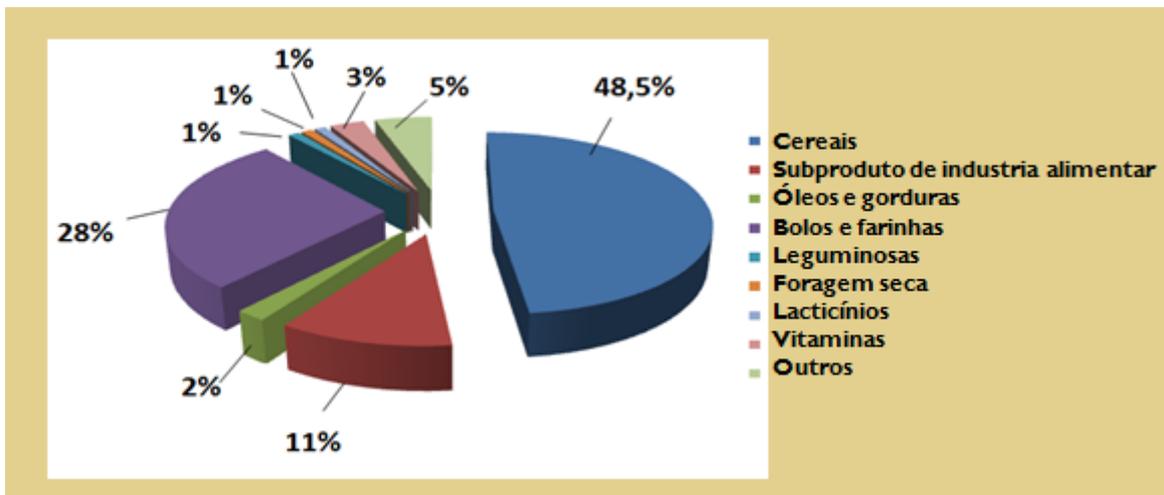


Figura 3 - Matérias-primas utilizadas na produção de alimentos compostos para animais (Fonte: FEFAC 2012)

2.1 Proteínas Animais transformadas

As proteínas são nutrientes essenciais na alimentação animal, uma vez que estão intimamente relacionadas com os processos vitais das células e, conseqüentemente, com o organismo. Elas podem ter origem animal ou vegetal e são, em regra, o componente que define o preço da matéria-prima. Na procura de alimentos ricos a nível nutricional, subprodutos tais como proteínas de origem animal foram considerados adequados como ingredientes a ser incorporados em alimentos compostos para animais de criação, considerando os padrões de alimentação natural de carnívoros e omnívoros. No entanto, a mesma estratégia foi aproveitada para herbívoros (van Raamsdonk, et al., 2007).

Os subprodutos animais proporcionam elevados níveis de gordura, fonte de energia, proteína, minerais (Ca e P), e de algumas vitaminas essenciais, quando comparados, por exemplo, com a soja. Apresentam ainda benefícios ambientais e económicos, principalmente no que diz respeito ao aproveitamento, reciclagem e transformação de resíduos (sangue, penas, etc.) de carne e peixe, de baixo valor nutritivo para alimentação humana, em farinha de carne e osso (FCO) de elevado valor nutritivo na alimentação animal. Para além disso, melhoram o odor, sabor e textura das rações, deixando-as mais atrativas aos animais (Aristoy e Toldra, 2004). Por essas razões tornou-se uma prática comum a incorporação de PAT em quantidades significativas, na alimentação de bovinos, ovinos, suínos e aves de capoeira (van Raamsdonk, et al., 2007)

Mas com o aparecimento de surtos de doenças com origem alimentar relacionados com encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE), foi preciso adotar algumas medidas básicas preventivas, que serão descritas no ponto 4.2, em relação a incorporação de proteínas de origem animal na alimentação animal (Baskakov, et al. 2000).

3. A Encefalopatia Espongiforme Transmissível

TSE ou doenças priônicas constituem uma família de doenças neurodegenerativas raras que afetam os seres humanos e animais (Bozzetta, et al., 2004). Apresentam como características comuns a acumulação de fragmentos de proteína parcialmente resistentes a protease K, alterações irreversíveis no cérebro (com acumulação de vacúolos), conferindo-lhe um aspecto de esponja (Figura 4), um longo período de incubação com sintomatologia exclusivamente nas fases finais da doença e ausência de tratamentos preventivo ou terapêutico, sendo sempre fatais (Doherr, 2007).

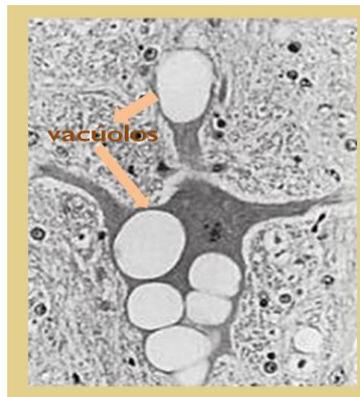


Figura 4- Corte de um cérebro infetado com TSE (Fonte: Hörnlimann, et al., 2007)

Entre as TSE humanas atualmente identificadas encontram-se o Kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insónia espontânea fatal (FSI) e insónia familiar fatal (FFI). Nos animais, estão identificadas: BSE, *scrapie* (em ovinos e caprinos), encefalopatia espongiforme felina (FSE) e encefalopatia transmissível do “vison” (TME) e doença emaciante crónica de veados (CWD) (Hörnlimann, et al., 2007).

Estas TSE podem surgir de forma espontânea, CJD esporádica (sCJD), serem hereditárias (FFI, GSS), ou transmitidas naturalmente ou acidentalmente (*scrapie*, Kuru, CWD e BSE, nova variante da CJD (vCJD)) (Doherr, 2003)

3.1 Agente infeccioso

Têm sido propostas diversas hipóteses sobre a natureza do agente infeccioso. Inicialmente, após observar que o agente responsável pelo *rida* (*Scrapie*) das ovelhas era filtrável e que apresentava um longo período de incubação, Sigurdsson (1954) pensou que fosse um vírus

lento. Mas a ausência de resposta inflamatória contra o agente viral e a grande resistência do agente nocivo a tratamentos que normalmente inativam vírus, como a radiação ultravioleta e ionizante fizeram com que esta teoria perdesse credibilidade. Em 1967, Griffith propôs a hipótese do agente ser uma proteína (Vana, et al., 2007). Prusiner, em 1982, propôs como agente infeccioso o “prião” (*prion – proteinaceous infectious particle*), uma vez que não tem genes, ao contrário das bactérias e vírus, mas é capaz de se auto-replicar. O grupo de Prusiner caracterizou o possível agente infeccioso a partir de cérebros infetados com *scrapie*, como sendo uma glicoproteína hidrofóbica parcialmente protease-resistente, a Proteína Priônica (PrP), com uma maior expressão no Sistema Nervoso Central (SNC) (Prusiner, al., 1982).

Mais tarde observou-se que a proteína, com a mesma sequência, encontrava-se presente tanto nos animais saudáveis como nos doentes (Hope, et al., 1986).

Através dos estudos espectroscópicos demonstrou-se que existem diferenças entre as duas proteínas, a normal e a patogénica, no que diz respeito às suas configurações tridimensionais (Cohen, et al., 1994).

A proteína que se encontra nos animais saudáveis é denominada Proteína Priônica Celular (PrP^c), enquanto a proteína presente nos animais doentes é designada por Proteína Priônica Scrapie (PrP^{sc}).

Em hámsteres e ratinhos a estrutura primária da PrP^c tem 254 aminoácidos (a.a.) (Figura 5), enquanto nos seres humanos temos uma PrP^c com 253 a.a.. Esta estrutura está ancorada a proteínas de superfície celular através da glicosilfosfatidilinositol (GPI). A região N-terminal com cerca de cem aminoácidos não está estruturada tridimensionalmente de forma sistematizável, havendo dentro desta região um segmento com cinco repetições de uma sequência de oito aminoácidos que interage fortemente com o catião cobre. A região C-terminal está organizada tridimensionalmente numa série de 3 hélices- α e 2 folhas- β , (Correia e Correia, 2005; Vana, et al., 2007).

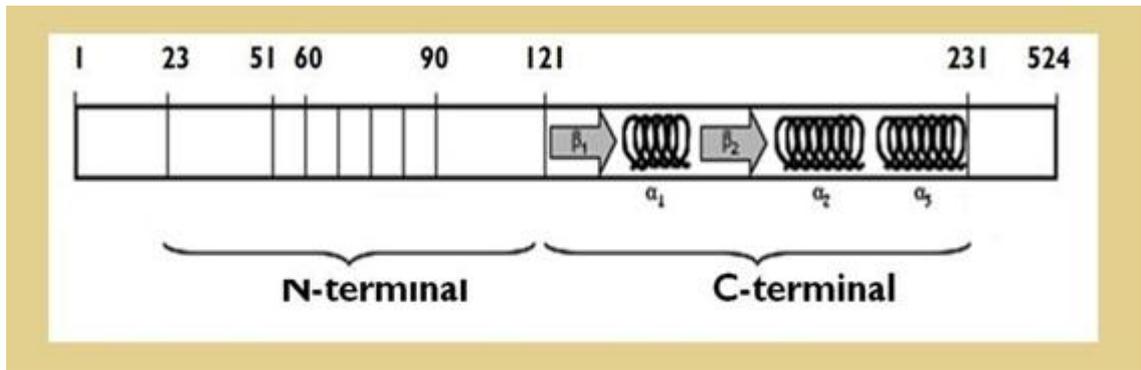


Figura 5-Estrutura primária da PrP^c (Vana, et al., 2007)

Muito embora a sequência seja comum, as estruturas tridimensionais das proteínas nativa e patogénica diferem: a PrP^c tem um elevado teor de hélices- α (42%), em relação às folhas- β (3%), enquanto a PrP^{sc} apresenta predomínio de folhas- β (45%) relativamente as hélices- α (30%) (Figura 6)(Vana, et al., 2007).

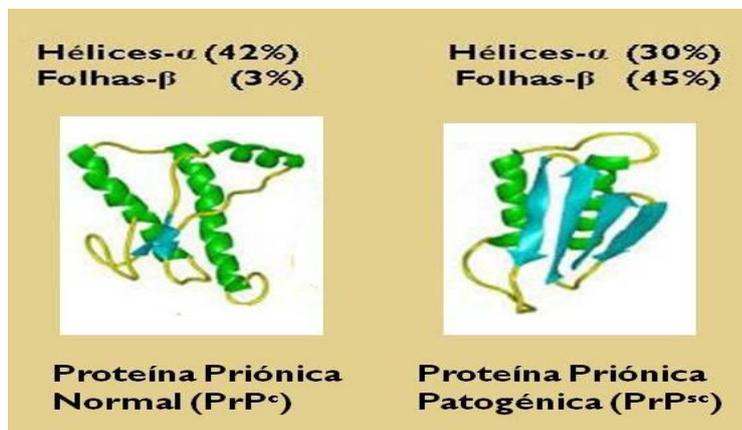


Figura 6- Estrutura tridimensional das duas isoformas da PrP (fontes: van Raamsdonk, et al., 2007; OMS, 2013)

É justamente a elevada proporção de folhas- β da PrP^{sc} que a torna insolúvel e parcialmente resistente à proteinase K(Doherr, 2003). A digestão PrP^{sc} com proteinase K gera um fragmento de 27-30 kDa, denominado Proteína Priónica Resistente à protease k (PrP^{res}) (Vana, et al., 2007) , enquanto a PrP^c é metabolizável pela enzima supra referida. Alguns autores utilizam PrP^{sc} (sc- scrapie) e PrP^{res} (res- resistência a protease K) como sinónimos quando se referem ao agente responsável pela TSE.

Tal como acontece com outras proteínas celulares a síntese da PrP^c é controlada pelo seu gene, identificado em 1985 e designado por *Prnp* nos animais e *PRNP* nos humanos (Oesch, et al. 1985)

3.2 Mecanismo de infecção

Com a descoberta de que o agente responsável pela TSE não possuía material genético, e que se trata de uma proteína existente em duas isoformas diferentes, PrP^C e PrP^{Sc}, começou-se a elaborar teorias quanto ao mecanismo de infecção.

De acordo com o “**modelo heterodímero**”, proposto Prusiner, ocorre uma interação direta entre um monómero de PrP^C e um monómero PrP^{Sc} exógena, com a formação de um heterodímero PrP^C-PrP^{Sc}, levando assim a alteração da conformação da PrP^C em PrP^{res}. O complexo formado separa-se e dá início a um novo ciclo de conversão onde PrP^C vai ser progressivamente convertido não só pela PrP^{Sc} exógena mas também pela PrP^{Sc} endógena (Fig. 4)(Doherr 2007).

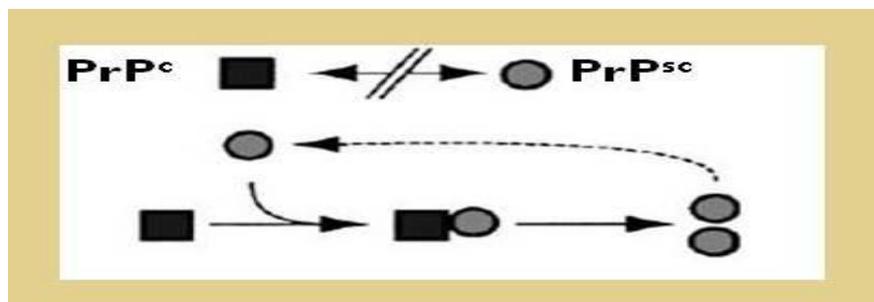


Fig. 7- Modelo heterodímero (fonte: (Weissmann, et al. 2002)

Segundo um modelo alternativo, o “**modelo de nucleação**”, a capacidade de PrP^{Sc} converter PrP^C em PrP^{Sc} depende da sua cristalização em fibrilas amiloides. Segundo este, a PrP^C encontra-se em equilíbrio com a PrP^{Sc} favorecendo fortemente PrP^C. As PrP^{Sc} se agregam formando um núcleo estável. Embora a formação dessa estrutura seja rara, uma vez formada tem capacidade de recrutar de forma rápida as monómeros de PrP^{Sc} formando um cristal com elevado peso molecular, fibras amiloides, adquirindo assim a capacidade de converter PrP^C em PrP^{Sc} (Fig.5) (Caughey, et al. 1995; Weissmann, et al. 2002)

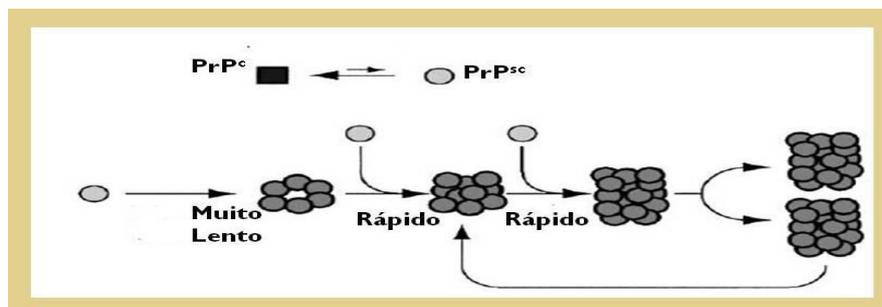


Figura 8- Modelo de Nucleação (Fonte: Weissmann, et al. 2002)

Alguns estudos tendem a postular a existência de uma proteína chaperone provisoriamente denominada proteína X, que ajudaria na conversão de PrP^c em PrP^{sc} (Doherr, 2003).

3.3 Via de transmissão

As TSE são transmissíveis por via oral (Kuru, EEB e vCJD) e parenteral sendo que a dose necessária para infectar o modelo rato através da via oral é 10 vezes superior à da via intracerebral (Weissmann, et al. 2002).

Doenças priônicas, como a CWD e *scrapie*, podem ainda ser transmitidas através de rotas ambientais indiretas, nomeadamente por ingestão de solo. Como os priões podem ligar-se a uma grande variedade de solos e minerais dos solos, mantendo a capacidade de se replicar, e permanecer infecciosos, têm no solo um reservatório para a transmissão do prião natural (Saunders, et al. 2012).

Na figura 9 encontram-se esquematizadas as principais formas de transmissão das TSE.

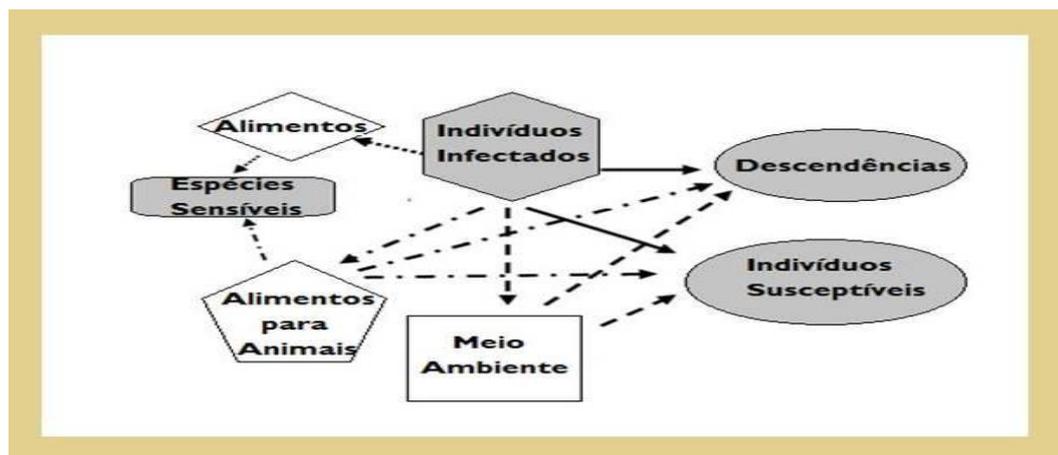


Figura 9- As principais formas de transmissão das TSE (Doherr, 2007):

- Transmissão direta vertical (de mãe para filhos, intrauterina) e horizontal (contacto direto)
- — Transmissão Indireta Horizontal, através do ambiente (Excreção, absorção), importante na transmissão de Scrapie e CWD
- . — Transmissão indireta horizontal através de alimentos para animais (reciclagem), importante na transmissão da BSE e doenças relacionadas
- Transmissão indireta horizontal através de alimentos (carnes contaminados), importante na transmissão da vCJD e Kuru

3.4 TSE Animal

Entre as TSE animais (Ver Tabela 1), *Scrapie* foi a primeira doença de priões a ser descoberta, sendo reconhecida como entidade clínica por volta 1730 (Doherr, 2003).

Apresenta elevada prevalência no gado ovino e caprino, apresentando como sinais clínicos:

- 1ª fase da doença: perda de qualidade da lã, apatia e alteração da locomoção. Esta fase demora cerca de 1 a 2 meses;
- 2ª fase da doença: perda de condição corporal, comichão, resposta ao toque e ao coçar ao longo da coluna, alteração na postura e locomoção, alteração de comportamento e hiperestesia;
- 3ª e última fase: tremores mais evidentes na cabeça e no pescoço, agravamento dos sinais anteriores, dificuldade em se levantar e por fim a morte.

Existem *scrapie* clássica e atípica, que se diferenciam pelo tipo e distribuição de lesões neuropatológicas e pelas características bioquímicas da PrP. A forma atípica de *Scrapie* foi diagnosticada pela primeira vez na Noruega em 1998, denominada de Nor98 e, desde então, vários países europeus, incluindo Portugal, confirmaram a sua existência (Orgeet al., 2004; Hausermann et al., 2010).

Tabela 1- Exemplos de TSE em diferentes espécies de animais (Fonte: Imran e Mahmood, 2011)

Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis Animal				
Forma	Doença	Hospedeiro Natural	Etiologia	Ano de descoberta
Adquirida (Transmitida)	Scrapie	Ovinos e Caprinos	Infeção por priões de origem desconhecida	1732
	Encefalopatia Espongiforme do vison (Transmissible Mink Encephalopathy, TME)	Vison	Infeção por priões oriundos de ovinos (<i>scrapie</i>)	1947
	Doenças emaciante crónica dos veados (Chronic Wasting Disease, CWD)	Veados e alces	Infeção por prião de origem desconhecida	1967
	Encefalopatia Espongiforme Bovina (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE)	Bovinos	Infeção por prião de origem desconhecida	1986
	Encefalopatia Espongiforme felina (Feline Spongiform Encephalopathy, FSE)	Gatos	Infeção por priões oriundos de Bovinos (BSE)	1990

A epidemia de BSE foi identificada pela primeira vez em 1986 no Reino Unido (Arsac, et al. 2007). Ao longo de quase duas décadas apenas se considerou a existência de uma estirpe de BSE em bovinos, a BSE clássica (*C-type*). No entanto, em 2004, duas estirpes diferentes, designadas por BSE atípicas, foram descritas em bovinos na França, BSE tipo-H, e na Itália, e BSE Tipo-L (*L-type*) (Konold, et al. 2012) (Priemer, et al. 2013), de acordo com a massa molecular da PrP^{sc} (Okada, et al. 2011). Esta última caracteriza-se por apresentar um peso molecular menor do que a BSE clássica, por isso a sua designação (L de *low*). A BSE Tipo-H (*H-type*) caracteriza-se por apresentar peso molecular mais elevado à BSE típica (designação H de *high*) (Brown, et al. 2006). A BSE atípica afeta principalmente o gado bovino com 8 anos de idade ou mais (Konold, et al. 2012).

3.5 TSE Humana

A CJD é a TSE mais comum em humanos (Tabela 2) (Varges, et al. 2013). São conhecidas quatro formas diferentes de CJD: esporádica (sCJD), genética ou familiar (fCJD), iatrogénica (iCJD) e a nova variante (vCJD) (Tschampa, et al., 2007).

A sCJD, a forma mais frequente, representa cerca de 85-90% dos casos (Varges et al., 2013). Esta doença afeta igualmente homens e mulheres; inicia-se em média pelos 60-70 anos, e é rara em pessoas com idade inferior a 40 anos ou superior a 80 anos (Johnson, 2005). Pacientes com sCJD normalmente apresentam uma progressão rápida na demência e sinais neurológicos focais, como ataxia cerebral ou motora e perda visual. A duração média da doença é de 6 meses, variando entre algumas semanas até dois anos (Tschampa, et al., 2007).

A fCJD está associada a uma mutação no gene que codifica a proteína priónica (*Prnp*), que é encontrada em cerca de 10-15% dos casos Europeus (Varges et al., 2013). Enquanto que a iCJD (<5% dos casos) resulta da transmissão acidental do agente causador através de tratamento médico ou cirúrgico com material contaminado, por exemplo, instrumentos cirúrgicos. A aparência clínica é semelhante à sCJD (Johnson, 2005; Tschampa, et al. 2007).

O aparecimento dos primeiros casos da vCJD em 1996 rapidamente chamou a atenção mundial para a importância das doenças priónicas, particularmente devido à ligação que é feita com a BSE (Will, et al. 1996). A vCJD tem sido associada ao consumo de carne bovina contaminada com BSE, levando a que muitos consumidores preocupados evitem comer carne de ruminantes (Rao e Hsieh 2007). Devido ao referido, esta doença tem tido um impacto significativo sobre a gestão nacional e internacional de doenças animais em geral,

bem como sobre a economia, o comércio, e questões de saúde pública relacionadas com a segurança alimentar (Salman, et al. 2012)

Tabela 2- Exemplos dos diferentes TSE em Humanos (Imran e Mahmood 2011)

Encefalopatia Espongiforme Transmissível Humana				
Forma	Doença	Hospedeiro	Etiologia	Ano de Descoberta
		Natural		
Genética (Herdadas)	Insónia Familiar Fatal (Fatal Familial Insomnia, FFI)	Humano	RPPN - 178N-129M (Substituição do ácido aspártico (D) por asparagina (N) ao nível do codão 178 em presença genótipo 129M no gene PRNP)	1986
	Síndrome Gerstmann-Strausler-Scheinker (GSS)	Humano	PRNP- 102L (Mutação ao nível do codão 102, em que se verifica a substitui�o de prolina (P) por leucina (L))	1936
	Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar (Creutzfeldt-Jakob Disease Familiar, fCJD)	Humano	Muta�o no gene PRNP (Diferentes muta�es por substitui�o e por inser�o. Muta�o na nível do codão 200, com substitui�o de ácido glut�nico (E) por lisina(K))	1924
Idiopática (Espontânea)	Ins�nia Esporádica Fatal (Fatal Spontaneous Insomnia, SFI)	Humano	conversão espontânea PrP ^C → PrP ^{Sc}	1999
	Doença Esporádica de Creutzfeldt-Jakob ((Sporadic Cruetzfeldt-Jacob Disease , sCJD)	Humano	Conversão espontânea PrP ^C → PrP ^{Sc}	1920
	Pr�o patog�nico prote�ase-sensível (variably protease-sensitive prionopathy VPSPr)	Humano	Conversão Espontânea PrP ^C → PrP ^{Sc}	2008
Adquiridas (Transmitida)	Doença de Creutzfeldt-Jakob latrog�nica (iCJD)	Humano	Infei�o pri�nica com origem em transplante de c�rnea ou duramáter de cadáveres de Humanos	1974
	Variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD)	Humano	A infe�o por priões da BSE	1996

4 A Encefalopatia Espongiforme Bovina

A BSE vulgarmente conhecida como doença das vacas loucas foi diagnosticada pela primeira vez na Grã-Bretanha em 1986 (Wells, et al. 1987) e considerada zoonose a partir de 1996 (Hausermann, et al. 2010).

O agente responsável pela doença foi introduzido na população por meio de suplementos alimentares que continham FCO contaminada (Yang, et al. 2008), tendo sua transmissão para os seres humanos levado a uma das mais importantes crises alimentares europeias, sublinhando a necessidade de regulamentação a nível europeu para combater a doença.

4.1 Alimentação na origem da doença

Estudos epidemiológicos identificaram as FCO na base da transmissão da BSE (Ducrot, et al. 2010), descartando a ligação da doença aos restantes produtos administrados aos animais, farmacêuticos, químicos, ou agrícolas. Verificaram ainda não haver qualquer ligação com movimentos de animais, importação de sémen, ou presença de ovinos na mesma exploração. O único fator em comum encontrado foi a ingestão de ração ou suplementos proteicos, sendo que cada caso surge como novo, sem evidências de transmissão direta entre bovinos. Daí se teorizou quanto à contaminação das rações com o agente do *scrapie* dos ovinos ou com uma estirpe já existente na população bovina, muito embora a incapacidade de identificação do mesmo (Wilesmith, Ryan e Atkinson, 1991).

A partir desta teoria postulou-se ainda que, na ausência da inativação do agente durante o processamento dos subprodutos provenientes de cadáveres de pequenos ruminantes contaminados com *Scrapie*, para produção de FCO, terá conseguido ultrapassar a barreira inter espécie, onde uma mutação o tornou patogénico para o gado bovino. A utilização posterior de animais infetados com BSE na produção de mais FCO terá amplificado a exposição da população bovina ao agente originando a epidemia (Brown, 2001).

Relativamente a ultrapassagem da barreira inter espécie (Figura 10), em 1990 foi identificado o primeiro caso FSE num gato doméstico no Reino Unido (Wyatt, et al. 1991), provocado pela ingestão de carne ou FCO contaminada com PrP^{sc} bovina (Collinge, et al. 1996).

A vCJD está ligada à epidemia de BSE em bovinos, uma vez que se presume ser causada pelo consumo de carne contaminada e outros produtos alimentícios derivados de bovinos contaminados.

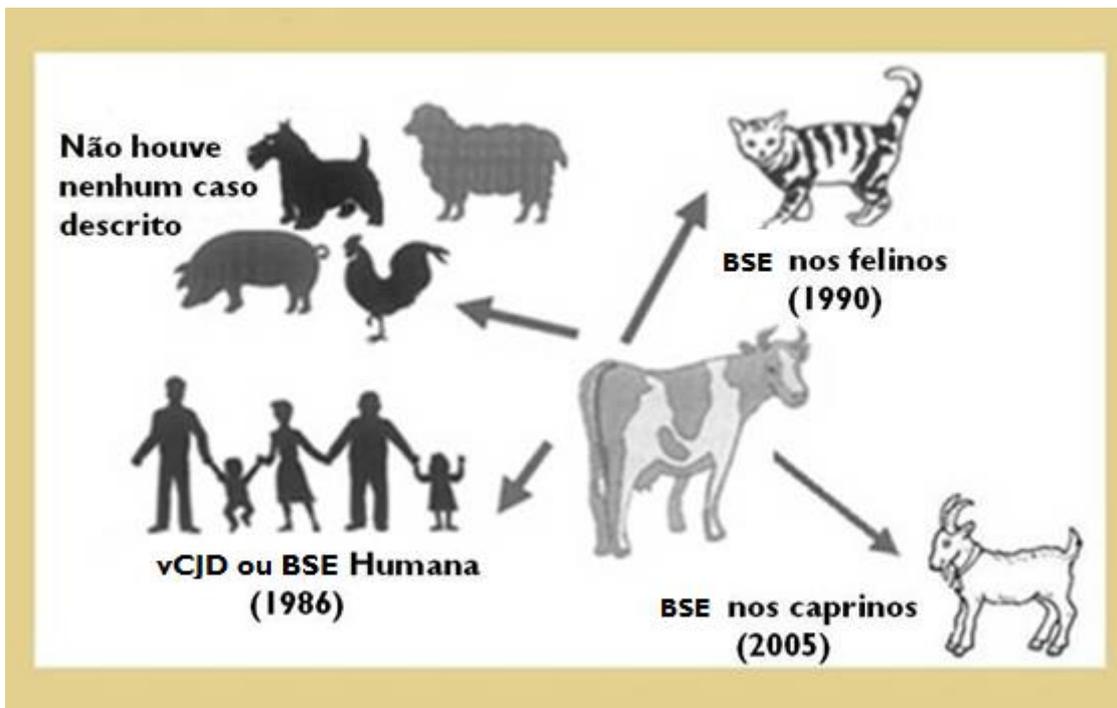


Figura 10- Transmissão de BSE a outras espécies (Adaptada de: Doherr 2003).

Em 2005 foi descrito o primeiro caso natural de BSE numa cabra em França. Apesar de vários outros casos reportados como suspeitos, nenhum outro foi confirmado até ao momento (Hausermann, et al. 2010).

4.2 Medidas de controlo da doença

A BSE teve um forte impacto sobre a indústria pecuária e saúde pública (Yamamoto, et al. 2006). A partir de 1990 foram adotadas uma série de medidas com vista à proteção da saúde humana e animal em relação ao risco de transmissão de BSE, entre as quais, a proibição do uso de PAT na alimentação de todos os animais de criação (*Feed Ban*), a remoção de Matérias de Risco Especificadas (MRE) na transformação de PAT utilizadas na alimentação animal, e o tratamento obrigatório das PAT identificadas a 133°C e 3 bar durante 20 minutos, bem como a adoção de programas de vigilância (Sala e Ru 2009).

4.2.1 *Feed Ban*

A propagação da BSE foi associada ao consumo de alimentos contaminados com PrP de ruminantes infetados na forma de PAT. Com base nestes resultados a proibição da utilização de proteínas de mamíferos transformadas para bovinos, ovinos e caprinos foi introduzida em Julho de 1994 (COM, 2010). Mais tarde, de acordo com a nova Diretiva do conselho nº

766/2000/CE (CE, 2000), foi ainda proibida a utilização de PAT como aditivo na alimentação dos animais de criação destinados à produção de alimentos. A única exceção foi a utilização de farinha de peixe, podendo ser incorporada em todos os alimentos para animais exceto os ruminantes (Aristoy e Toldra, 2004; Benedetto, et al. 2011)

Em 2001, a União Europeia proibiu a alimentação de todos os animais de criação, incluindo os ruminantes, com proteínas provenientes de mamíferos (*Feed Ban*), aplicando tolerância zero, excetuando apenas os alimentos para cães e gatos, (van Raamsdonk et al., 2007). Também foi proibida alimentação de ruminantes com gorduras fundidas provenientes de ruminantes. Com exceção dos produtos sanguíneos de origem bovina para alimentação dos ruminantes, as proibições não abrangem produtos provenientes de animais saudáveis, como leite, produtos à base de leite, gelatina produzida a partir de pele e couros, fosfato de cálcio sem vestígios de proteínas ou gorduras, plasma seco e outros produtos sanguíneos. (CE, 2001; Aristoy e Toldra, 2004; Benedetto et al. 2011).

Em 2002 foi proibido a alimentação de peixes de aquicultura e animais de criação, exceto animais destinados à produção de peles com pelo, com PAT derivados dos corpos, ou parte dos corpos da mesma espécie, e também os subprodutos animais foram classificadas em três categorias que correspondem a diferentes níveis de segurança (CE, 2002b). Em caso de levantamento de alguma proibição do uso de PAT, apenas matérias pertencentes à categoria três, que corresponde ao nível de menor risco, poderiam ser usados na alimentação dos animais.

O aparecimento de métodos diferenciadores de PAT de animais terrestres das de peixes, justificaram o fim da proibição de introdução de farinha de peixe nas rações para animais de criação pelo Regulamento (CE) nº1234/2003 (CE, 2003), excetuando os ruminantes como medida de prevenção, uma vez que são os principais alvos da doença (Boix et al. 2004)

A partir de 2008 foi permitida a utilização de proteínas derivadas de peixe exclusivamente como substituto do leite na alimentação de jovens ruminantes não desmamados como complemento ou substituto do leite pós-colostró antes de completado o desmame (CE, 2008).

Baseada em avaliações de risco, (COM, 2005) a Comissão Europeia receava um relaxamento em relação a proibição total, caso certas condições fossem cumpridas. Por esta razão, a análise da tendência da epidemia e o efeito das medidas de controlo foram consideradas as

grandes preocupações para as avaliações de risco e de gestão de risco nos próximos anos (Ducrot et al. 2010).

Segundo o Regulamento (UE) n° 56/2013 (UE, 2013a), foi aprovado o fim da proibição de PAT de não ruminantes na alimentação dos animais de aquicultura. Este fim só foi possível devido ao desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real que permite identificar PAT de ruminantes. Porém, na utilização da referida técnica, há que aplicar requisitos rigorosos durante a colheita, o transporte e transformação desses produtos, de forma a evitar qualquer risco de contaminação cruzada com proteínas ruminantes.

4.2.2 Materiais de Risco Específicos

A proibição da utilização de PAT na alimentação para os animais de criação por si só não foi suficiente para eliminar a BSE. O controlo sobre a epidemia começou apenas após a introdução de medidas complementares (Ducrot, et al. 2010), que consistem na obrigatoriedade da remoção de MRE, ou seja, na proibição de usar matérias, como sebo, gelatina, colagénio, fosfato cálcico e muitos outros especificados na lista de MRE e num nível elevado de precaução, na produção de produtos derivados para utilização em alimentos para consumo humano e animal (Arsac et al., 2007; Sala e Ru, 2009).

4.2.3 Programas de Vigilância

Desde o reconhecimento dos primeiros casos de BSE até 1998 apenas era obrigatório notificar e posteriormente investigar os casos clinicamente suspeitos (vigilância passiva) (Doherr, 2003). A partir de 1999, a UE validou testes de rastreio rápidos, tornando-os disponíveis como uma ferramenta de vigilância para grupos considerados de alto risco (vigilância ativa).

Em conformidade com a regulamentação europeia, Regulamento (CE) n° 999/2001 (CE, 2001), a vigilância ativa de BSE em bovinos adultos na Europa, tornou-se obrigatória para determinar com mais precisão a escala da epidemia e evitar o consumo de tecidos de bovinos infetados (Arsac, et al. 2007).

O sistema de vigilância ativa baseia-se na execução de testes rápidos em animais de risco (animais encontrados mortos, animais abatidos de emergência e animais com sinais clínicos quando da inspeção *ante mortem*) até aos 24 meses de idade e em bovinos saudáveis abatidos com mais de 30 meses de idade. Os dados gerados por este programa de vigilância têm

ainda sido valiosos em termos do controlo epidemiológico em diferentes países (Ducrot, et al. 2010).

4.2.4 Perspetivas Futuras

Atualmente, as PATs proibidas para fins de alimentação animal são utilizadas principalmente para produzir fertilizantes, composto ou carburante para cimenteiras.

Contudo, as PAT podem ser uma fonte de proteínas para animais de criação não ruminantes que têm de ser alimentados com proteínas de grande qualidade.

Considerando que o risco de transmissão de BSE de não ruminantes a não ruminantes é muito improvável, poderia ser considerado um levantamento da proibição da utilização das PAT de não ruminantes em alimentos destinados a não ruminantes, sem, todavia, levantar a proibição existente da reciclagem intra espécies (por exemplo, a FCO de aves de capoeira poderia apenas ser dada a suínos e a FCO de suínos a aves de capoeira). Além disso, a reintrodução das PATs em alimentos destinados a não ruminantes pode permitir à UE diminuir a dependência de outras fontes de proteínas segundo roteiro da TSE (van Raamsdonk et al. 2007). Isso só seria possível com o desenvolvimento de um método de diagnóstico validado que fosse capaz de detetar a presença de matérias de suínos ou de aves de capoeira nos alimentos para animais. Por conseguinte, seria possível controlar a aplicação correta da proibição da reciclagem intra espécies (EU, 2013a).

5 Métodos de identificação de proteína animal transformadas

A proibição de PAT na alimentação de animais de criação levou a uma redução significativa do número de casos de BSE. Porém precisavam ser tomadas medidas para controlar o cumprimento dessas proibições. Até 2012 a microscopia ótica era o único método de referência para a detecção de PAT disponível - e exigido pelo Regulamento (CE) n° 152/2009 (CE, 2009) - para o controlo oficial, muito embora há muito se procurassem outros métodos complementares à microscopia clássica, com a finalidade de proporcionar mais informação sobre a origem dos constituintes de origem animal. De acordo com o Regulamento (UE) n°51/2013 (EU, 2013b), um novo método de detecção foi validado como método de referência. Após um estudo de aplicação, organizado conjuntamente com os laboratórios nacionais de referência dos Estados Membros, o método de detecção de constituinte de origem animal com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi validado como suficientemente robusto para controlo oficial na União Europeia. Este método foi escolhido após vários estudos e comparação com outras técnicas como a microscopia de infravermelho próximo (NIRM) e de imagem e imunologia (ELISA), que atualmente são utilizados por alguns laboratórios para controlo de rotina.

5.1 Métodos Oficiais na União Europeia

5.1.1 Microscopia

A microscopia ótica é um dos métodos oficiais utilizado na UE e em muitos outros países para controlar a aplicação correta da legislação relativa à proibição de utilização de FCO (Baeten et al., 2005). Com este método é possível detetar contaminações de 1 g / kg (1g de FCO por 1 kg de ração), com quase nenhum resultado falso negativo ou falso positivo. Este método é predominantemente focado na presença de fragmentos de ossos, apesar de outras estruturas como fibras musculares, poderem fornecer evidências circunstanciais dos respetivos tipos de animais (van Raamsdonk et al., 2007).

A microscopia clássica é limitada no que diz respeito à discriminação entre vertebrados (e.g. mamíferos e aves). No entanto é capaz de discriminar entre PAT de peixes e PAT de animais terrestres (van Raamsdonk et al., 2007).

5.1.2 PCR em tempo real

PCR é uma técnica que revolucionou a investigação na biologia molecular e tem sido aplicada em diagnóstico de infecções microbianas e doenças genéticas, bem como na detecção de agentes patogênicos nos alimentos, fezes e amostras ambientais.

PCR é um método *in vitro* que se baseia na capacidade de uma polimerase amplificar sucessivamente um molde do ácido desoxirribonucleico (DNA) com auxílio de um par de *primers*. A região do DNA a ser amplificada e sua composição determinam a sensibilidade e a especificidade da detecção.

Para usar esta tecnologia, a sequência alvo a ser amplificada deve ser conhecida. A cada ciclo as cadeias complementares são desnaturadas e usadas individualmente como molde para amplificação o que resulta numa acumulação exponencial de base 2 da sequência alvo – a cada ciclo o fragmento de DNA alvo duplica a sua quantidade. Em geral, este processo é repetido aproximadamente 30 vezes (Turgeon, 2005).

Após a amplificação, a eletroforese em gel é utilizada para análise dos produtos amplificados por PCR o que torna a PCR convencional num método demorado (Pestana, et al. 2010). Há *kits* baseados em PCR comercialmente disponíveis para confirmação da presença ou ausência de agentes patogênicos específicos nos alimentos. A capacidade da PCR para amplificar, em milhões de vezes, qualquer fragmento conhecido de DNA a partir de material genético complexo, num curto espaço de tempo, torna-a num teste preferencial no que respeita à identificação de agentes contaminantes (Pina, 2005)

Ultimamente adaptou-se PCR por forma a torná-la quantitativa, designada por PCR em tempo real. Esta técnica é automatizada, simples, reprodutível e eficiente. Ao contrário de outros métodos de PCR, a PCR em tempo real não exige manuseio de amostras pós-PCR, evitando assim o potencial *carry-over* e contaminações (Heid, et al. 1996).

Os equipamentos, destinados à realização de PCR em tempo real associam um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reação de amplificação. Esta fluorescência ocorre devido a utilização da sonda TaqMan (ver figura 11), permitindo assim a detecção e quantificação do DNA. As sondas TaqMan são ideais quando o objetivo é detetar sequências muito pequenas de ADN (<100pb) pela especificidade adicional que introduzem no sistema de amplificação/detecção (Pegels, et al. 2013).

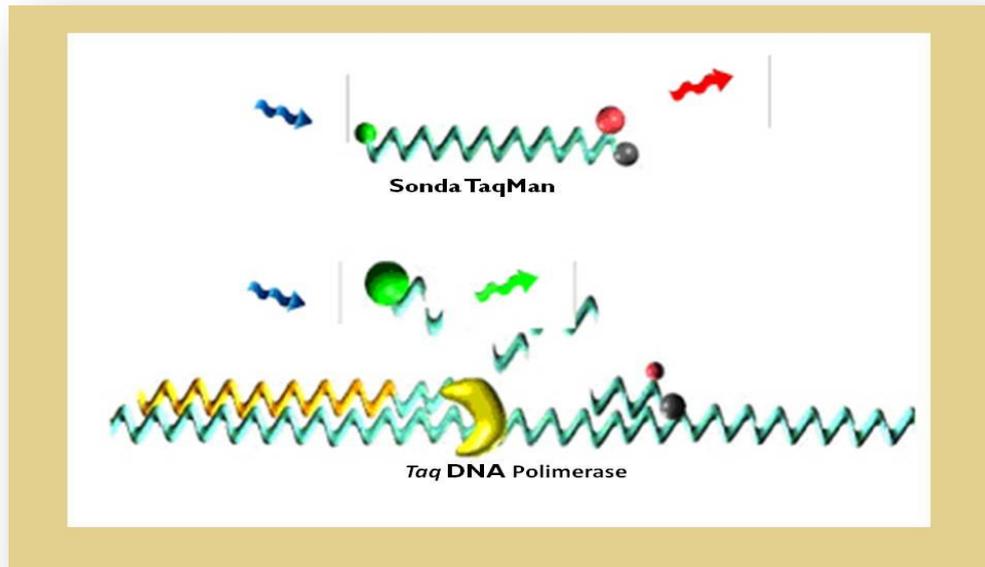


Figura 11- À medida que a reação da amplificação ocorre, a enzima Taq DNA polimerase quebra a ligação da sonda com a sequência, permitindo a emissão de luz (Fonte: <http://www.fleury.com.br/medicos/medicina-e-saude/manuais/manual-hematologia/Pages/pcr.aspx>)

5.2 Outros métodos de controlo laboratoriais

Outros métodos, tais como a técnica de cromatografia líquida (LC), olfatométrie, ELISA e NIRM, podem também ser utilizados na deteção de PAT (van Raamsdonk et al., 2007).

A LC baseia-se na deteção e proporção de diferentes polipéptidos (e.g. a carnosina, encontra-se predominantemente nos mamíferos e a anserina em aves), enquanto a olfatométrie se baseia na deteção de agentes voláteis não específicos (van Raamsdonk, et al. 2007).

5.2.1 NIRM

O método de microscopia de infravermelho próximo (NIRM) foi desenvolvido em 1998 pelo Centro de Pesquisa Agrícola Walloon (CRA-W). Este método segue o mesmo princípio da microscopia clássica, mas a avaliação visual das características das partículas, conforme exigida pela microscopia clássica, é substituída pela deteção e quantificação de picos de espetros de NIR interpretados como compatíveis com os de partículas de origem animal em alimentos compostos para animais (Boix, et al. 2012). Vários estudos testemunharam a

capacidade da espectroscopia NIR na identificação e / ou quantificação de ingredientes de origem animal em mistura de alimentos para animais, tais como farinha de carne e osso de mamíferos e peixes (Fumiere, et al. 2009; von Holst, et al. 2008).

No ano 2000 foi desenvolvida a NIRM com sistema de imagem (Figura 12) e, como a anterior, permite a análise da fração bruto e de sedimentos mas também a análise de aproximadamente 300-500 partículas simultaneamente, reduzindo radicalmente o tempo de análise. O nível de detecção é inferior a 1 g / kg, uma vez que se baseia na técnica de microscopia, em combinação com a possibilidade de identificação das partículas individuais (van Raamsdonk, et al., 2007).

Estes métodos não foram validados em estudos inter laboratoriais devido aos poucos instrumentos disponíveis.

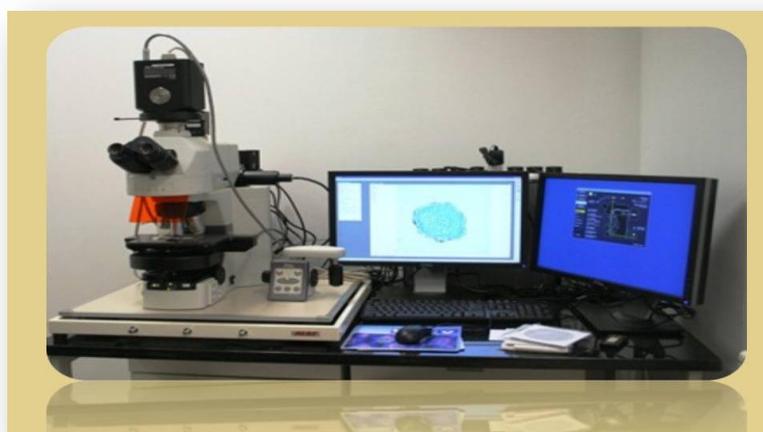


Figura 12 - Microscopia infravermelho próximo com sistema de imagem (Fonte: <http://www6.cityu.edu.hk/bhdbapp/deptweb/equipment/21-30.html>)

Desde 2006, esses dois métodos estão a ser usados no CRA-W para análise de rotina no âmbito das atividades do Laboratório Comunitário de Referência para as proteínas de origem animal nos alimentos para animais (CRL-AP)

5.2.2 ELISA

O método ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) é um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo, tratando-se do método imunológico atualmente mais utilizado em investigação e aplicações clínicas. Este método que permite detetar, e quantificar com base na conversão de substrato, antígenos (Ag) ou anticorpos (Ac), usando uma enzima como marcador, foi desenvolvido nos anos 70 por dois grupos, um em França (Avrameas e Guilbert, 1971) e outro na Suécia (Engvall e Perlman, 1971).

Neste ensaio o antígeno apresenta dois locais de ligação a anticorpos (epítomos) espacialmente afastados de forma que permita ligar independentemente dois anticorpos. O anticorpo ou o antígeno é adsorvido na fase sólida, o que permite separar a fração livre da que se encontra ligada, por uma simples lavagem, dispensando métodos de separação demorados e com elevados custos. Desde a sua publicação o método ELISA teve sucessivos desenvolvimentos relativamente aos acessórios e protocolos utilizados (Luttmann, et al., 2006).

Existem vários tipos de ELISA: ELISA direta, ELISA indireta, ELISA *Sandwich*, ELISA competitiva e ELISA multiplex. Em análise de alimentos, o teste ELISA é fundamental e aplicado em duas tipologias: ELISA competitivo e ELISA *Sandwich* - a ELISA competitivo é dirigido à deteção de substâncias de baixo peso molecular, a ELISA *sandwich* é adequada para analitos (antígenos) de dimensões maiores (Belitz ,Grosch e Schieberle, 2009).

A proteína por si só permite identificar tipos de tecidos, aspeto importante para diferenciar proteínas que são autorizadas na alimentação animal das proibidas (van Raamsdonk 2007). Foi desenvolvido um ensaio de ELISA *sandwich* (ver Figura 13) com anticorpos monoclonais para a troponina I, destinado a detetar tecidos musculares de ruminantes presentes em extratos feitos a partir de carne cozida e em produtos como FCO (Fumiere 2009).

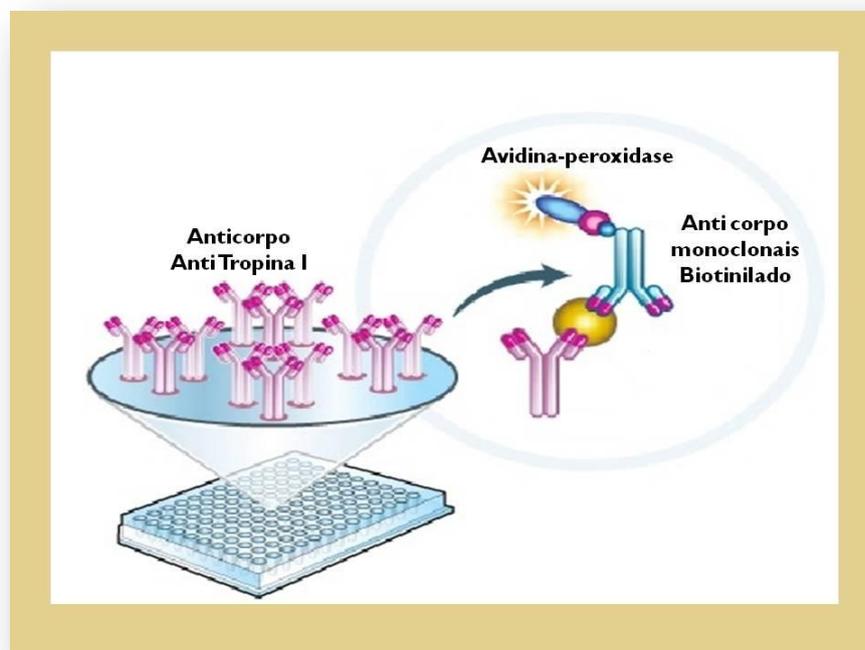


Figura 13-Esquema de ELISA *Sandwich* (Fonte: www.mitosciences.com/sandwich_elisa_assay_overview.html)

O *MELISA-TEK Ruminant*TM, comercialmente disponível em combinação com o *kit de extração* de amostra respetivo foi validado e considerado adequado à avaliação da presença de PATs não ruminantes na alimentação dos animais de aquacultura. Várias amostras não ruminantes com PATs de ruminantes (processados a 133°C, 137°C, 141°C e 145°C) adicionados a diferentes concentrações foram analisadas. Os resultados mostraram uma especificidade global de 99%, o que indica que não há reação cruzada com proteína não ruminante. A sensibilidade do teste revelou-se ainda fortemente dependente da temperatura de processamento e da proporção de fibras musculares das PAT de ruminantes. A sensibilidade do ensaio à presença de 1% e de 2% de PAT ruminantes em PAT não ruminantes (processados à temperatura de 133°C e 137°C) foi de 100% para todos os tecidos musculares e de 85% e 100% respetivamente, para tecidos das carcaças. Em conclusão, *MELISA-TEK Ruminant*TM mostrou resultados bastante promissores, tornando-o um método candidato ao método oficial de controlo de PAT de ruminantes em alimentos para animais (Raamsdonk, et al. 2012).

Parte II

Trabalho Experimental

6 Material e Métodos

7 Resultados e Discussão

6 Material e métodos

6.1 Material biológico

Farinhas de origem animal processadas segundo as condições exigidas pelo regulamento europeu (pelo menos 133°C e 3 bar durante 20 min, sendo o tamanho das partículas da matéria-prima previamente reduzidas a, pelo menos, 50 µm): farinha de peixe, farinha de aves e farinha de mamífero

Rações cedidas pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) (amostras provenientes de várias origens, em diferentes anos para o controlo de PATs) e recolhidas em fábrica (ver Tabela 3)

Tabela 3- Origem e natureza das amostras cedidas pelo INIAV e recolhidas em fábrica utilizadas no estudo

Proveniência	Referência	Natureza	Origem
INIAV	HP-13-00002	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-13-00003	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-12-00920	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-12-00921	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-04854	Alimento composto para Bovino	Exploração pecuária
INIAV	HP-11-05215	Alimento composto para Bovino	Exploração pecuária
INIAV	HP-11-05218	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-05220	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-05221	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-05407	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-04587	Alimento composto para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-04825	Alimento composto para Bovino	Exploração pecuária
INIAV	HP-11-06380	Alimento composto para Ovino	Industrial
INIAV	HP-11-07124	Alimento composto para Ovino	Exploração pecuária
INIAV	HP-11-07349	Alimento composto para Ovino	Industrial
INIAV	HP-11-06717	Alimento composto para Ovino	Exploração pecuária
INIAV	HP-11-06718	Alimento composto para Ovino	Industrial
INIAV	HP-12-00330	Alimento composto para Caprino	*

Proveniência	Referências	Natureza	Origem
INIAV	HP-12-00759	Alimento composto para Peixe	Industrial
INIAV	HP-11-06733	Alimento composto para Peixe	*
INIAV	HP-11-06734	Alimento composto para Peixe	Industrial
INIAV	HP-11-07346	Alimento composto para Peixe	Industrial
INIAV	HP-11-07347	Alimento composto para Peixe	Industrial
INIAV	HP-11-05245	Alimento composto para Coelho	Industrial
INIAV	HP-11-05253	Alimento composto para Coelho	Industrial
INIAV	HP-11-07345	Alimento composto para Coelho	Industrial
INIAV	HP-11-06669	Alimento composto para Equino	Industrial
INIAV	HP-11-07683	Alimento composto para Equino	Industrial
INIAV	HP-11-05036	Silagem	Industrial
INIAV	HP-11-05056	Silagem	Industrial
INIAV	HP-11-07195	Silagem	Industrial
INIAV	HP-11-07196	Silagem	Exploração pecuária
INIAV	HP-11-07206	Silagem	Industrial
INIAV	HP-11-0478	Pré-Mistura para Ovino	Industrial
INIAV	HP-11-05208	Pré-Mistura para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-05210	Pré-Mistura para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-07456	Pré-Mistura para Bovino	Industrial
INIAV	HP-11-06749	Pré-Mistura para Bovino	Exploração pecuária
INIAV	HP-12-00918	Pré-Mistura para Coelho	Industrial
INIAV	HP-11-07571	Pré-Mistura para Coelho	Industrial
INIAV	HP-12-00436	Pré-Mistura para Suíno	*
INIAV	HP-11-06753	Pré-Mistura para Suíno	Industrial
INIAV	HP-11-06747	Pré-Mistura para Aves	Industrial
INIAV	HP-11-06750	Pré-Mistura para Aves	Industrial
INIAV	HP-11-05209	Pré-Mistura para Equino	Exploração pecuária
INIAV	HP-12-00925	Farinha de Peixe	Industrial
INIAV	HP-12-00926	Farinha de Peixe	Industrial
INIAV	HP-12-00928	Farinha de Peixe	Industrial
INIAV	HP-12-00948	Matéria-prima	Industrial

Proveniência	Referências	Natureza	Origem
INIAV	HP-11-04812	Matéria-prima	Industrial
INIAV	HP-11-04813	Matéria-prima	Industrial
Fabrica A	6	Alimento composto para Bovino	Industrial
Fabrica A	7	Alimento composto para Aves	Industrial
Fabrica A	8	Alimento composto para Suínos	Industrial
Fabrica A	9	Soja	Industrial
Fabrica B	10	Alimento composto para Bovino	Industrial
Fabrica B	11	Alimento composto para Aves	Industrial
Fabrica B	12	Alimento composto para Suínos	Industrial
Fabrica B	13	Alimento composto para Ovino	Industrial

* Informação não encontrada na base de dados do LINIV

Rações e DNA extraído de rações cedidas pelo Laboratório de Referência da União Europeia para as proteínas animais nos alimentos para animais (EURL-AP), onde as suas composições inicialmente se desconhecia, por isso denominadas de “amostra cega”.

Em cada uma das rações foram incorporados diferentes % de PAT de diferentes espécies de e em algumas essas incorporações não foram efetuadas, conforme se pode observar na tabela 4.

Tabela 4- Amostras cega cedidas pelo EURL-AP utilizadas no estudo

Proveniência	Referencias	Natureza
Amostra de Ração com incorporação de:		
EURL-AP	1	0,1% PATs de Bovino
EURL-AP	2	0,1% PATs de Bovino
EURL-AP	3	0% PATs
EURL-AP	4	0% PATs
EURL-AP	5	0,1% PATs de Ovelha
EURL-AP	57	0,1% PATs de Ovelha
EURL-AP	58	1% PATs de Suíno
EURL-AP	59	0,1% PATs de Bovino
EURL-AP	60	0,1% PATs de Bovino

Proveniência	Referencias	Natureza
ADN extraído de Ração com incorporação de:		
EURL-AP	271	0,1% PATs de Bovino
EURL-AP	272	1% PATs de Suíno
EURL-AP	273	0,1% PATs de Ovelha
EURL-AP	274	0% PATs (100% Vegetal)
EURL-AP	275	0,1% PATs de Bovino
EURL-AP	348	0,2% PATs de Bovino

6.2 Métodos

6.2.1 Microscopia

6.2.1.1 Equipamentos: Balança analítica (*Mettler Toledo AG245, Greifensee, Suíça.*) com uma precisão 0,001g; Moinho (*Rescht ZM200, Haan, Alemanha*); Peneira para tamização (*Rescht, , Haan, Alemanha*) munido de malha quadrada com 0,25 mm de diâmetro; Ampola de decantação cônica de vidro de 250 ml com torneira, o diâmetro de abertura da torneira é \leq 4 mm; Papel de filtro; Microscópio ótico composto (*Olympus BX50, Tokyo, japão*); Lâminas e lamelas de microscópio lisa; Pinças e espátulas finas (metálica); Material de vidro de uso corrente.

6.2.1.2 Reagentes: Agente de Concentração: Tetracloroetileno (densidade 1,62) (*Scharlau, Barcelona, Espanha*); Reagente de coloração: Vermelho de alizarina 0,2% (p/v) (*Sigma-Adrich, EUA*) em ácido clorídrico, 250mM (*Merck, Darmstadt, Alemanha*); Meio de Montagem: Glicerol (não diluído, viscosidade: 1490 cP); Meio de Montagem com propriedades de coloração: Reagente de Fehling: 3,45% de sulfato de cobre (II) penta hidratado (*Merck, Darmstadt, Alemanha*), 17,3% tartarato de potássio e sódio tetra-hidratado (*Merck, Darmstadt, Alemanha*), e 6% de NaOH (*Merck, Darmstadt, Alemanha*); Agentes de Lavagem: álcool a 96%, acetona, água 18 mQ; Reagente descolorante: Solução de hipoclorídrico de sódio (9-14% de cloro ativo).

6.2.1.3 Preparação das amostras

Extração e preparação do sedimento: No processo de receção das amostras recolhe-se 50 g para moagem. Transfere-se uma porção de 10 g, com uma aproximação de 0,1 g, (ou 3 g no caso da farinha de peixe ou outros produtos de origem animal puros, ingredientes

minerais ou pré-misturas que gerem mais de 10 % de sedimento) da subamostra moída para a ampola de decantação e adiciona-se 50 ml de tetracloroetileno. Agita-se vigorosamente a mistura um mínimo de 30 segundos e lava-se a superfície interior da ampola com tetracloroetileno para remover eventuais partículas aderentes. Formam-se 3 fases (ver Figura 14): o sedimento, fração mais densa, donde se recuperarão fragmentos de osso e de escamas de peixe; o tetracloroetileno no meio; e o sobrenadante, fração de menor peso específico, que flutua sobre o tetracloroetileno, donde se recuperam porções musculares, cabelos e penas. Deixa-se repousar a mistura resultante 5 minutos antes de separar o sedimento, abrindo a torneira e deixa-se secar no filtro.



Figura 14- Extração e preparação do sedimento

Coloração do sedimento: transfere-se o sedimento seco para um tubo de ensaio de vidro e lava-se duas vezes com 5 ml de etanol, sob agitação forte por 30 segundos seguida de incubação por 1,5 minutos. Repete-se o procedimento de lavagem outras duas vezes com 10 ml de água. Acrescentam-se 2 a 10 gotas de solução vermelho de alizarina e agita-se a mistura em vórtex. Após 30 segundos de incubação lava-se o sedimento corado duas vezes com 5 ml de etanol e uma vez com acetona conforme anteriormente descrito. Seca-se o sedimento corado.

Extração e preparação do sobrenadante: Após a recuperação do sedimento pelo método anteriormente descrito, duas fases restam na ampola de decantação: uma líquida composta por tetracloroetileno e uma sólida superficial, o sobrenadante. Recolhe-se o sobrenadante invertendo o conteúdo da ampola de decantação sobre um filtro de pregas (Figura 15). Deixa-se secar e tamiza-se em rede de 0,25 mm, analisando a fração de granulometria inferior ao microscópio.



Figura 15 - Preparação do sobrenadante.

6.2.1.4 Observação ao microscópio

Observação do sedimento: Colocar o preparado de sedimento sobre uma lâmina e sob uma lamela, utilizando glicerol como meio de montagem. Observar ao microscópio composto a diversas ampliações (10X, 40X e 100X; Figura 16).

Observação do sobrenadante: Cora-se o preparado de menor granulometria do sobrenadante com Licor de Fehling e observa-se inteiramente cada lâmina em várias ampliações.

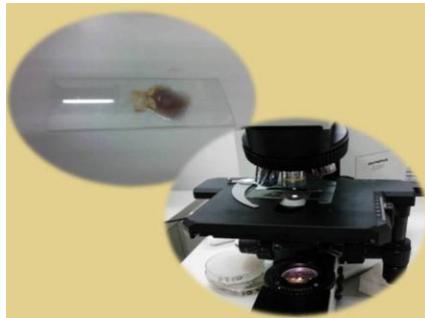


Figura 16 - Observação do sobrenadante e do sedimento ao microscópio ótico.

6.2.2 Reação de PCR em tempo real

6.2.2.1 Equipamento: Balança analítica (com precisão 0,001g) (*Mettler Toledo AG245, Greifensee, Suíça*); Tubos 2 ml (*Eppendorf, Hamburg, Alemanha*); Micropipetas de 10 a 100 μ l (*Eppendorf, Hamburg, Alemanha*) e respectivas pontas com filtro (*Molecular Bioproducts, San Diego, Califórnia, EUA*); Placas de 96 poços (*Multiplate[®] PCR Plates[™] –BIO-RAD, Berkeley, Califórnia, EUA*) e respectivas fitas de selar poços (*Microseal[®] PCR PCR Sealrs[™] – BIO-RAD, Berkeley, California in EUA*); Vórtex (*Heidolph Reox 2000, Schwabach, Alemanha*); Centrífuga (*Centrifuga Eppendorf 5415D, Hamburg, Alemanha*); Suporte de separação magnético;

Câmara para PCR com fluxo laminar (*Astec, Andover, Inglaterra*); Câmara para PCR (*Herolab, Wiesloch, Alemanha*); Termociclador de PCR em tempo real (*Bio Rad CFX96™ Real Time System* e *C1000™ Thermal cycler, Berkeley, California, EUA*).

6.2.2.2 Reagentes: Isopropanol (*Merck, Darmstadt, Alemanha*); Etanol a 70%; Nuclease-free H₂O (*BIO-RAD, Berkeley, California, USA*); solução de remoção de DNA contaminantes (*DNA-Erase™ MP Biomedicals, Santa Ana, California, EUA*).

Kit de extração e purificação: (*Wizard® Magnetic DNA Purification System for food – Promega, Fitchburg, Massachusetts, EUA*): Tampão de extração A, Tampão de extração B, RNase A, Solução de precipitação de ácidos nucleicos, Esferas magnéticas.

Amplificação do DNA: Primer Fw: 5'-CCA GCA TCA GAG TCT TTT CCA AAT-3' (concentração de 10 µM) (*Eurofins MWG operon, Ebersberg, Alemanha*); Primer Rev: 5'-GAA GGA ATG ATG CTA AAG CTG AAA C-3' (concentração de 10 µM) (*Eurofins MWG operon, Ebersberg, Alemanha*); Sonda Taqman: 5'-CAA CTC TTC GCA TGA GGT GGC CAA A-3' (concentração de 5 µM) (*Eurofins MWG operon, Ebersberg, Alemanha*); Master Mix (concentração de 2X) (*GMO-UN-A600 Diagenode, Liège, Bélgica*).

Controlo: Calibrantes produzidos e fornecidos pelo EURL-AP, a partir de fragmento de DNA nuclear constituído por uma sequência de 85 bp, determinado a partir da subunidade α precursor do recetor da acetilcolina, conforme se pode observar na tabela 5.

Tabela 5 - Calibrantes produzidos a partir de uma sequência alvo de 85 pb determinado a partir da subunidade α precursor do recetor da acetilcolina bovina, fornecidos pelo EURL-AP.

Calibrante	Origem
47 Cópias de DNA ruminante	EURL-AP
168 Cópias de DNA ruminante	EURL-AP
680 Cópias de DNA ruminante	EURL-AP

6.2.2.3 Preparação da amostra

Extração de DNA: Pesa-se 100 mg (99-105mg) da amostra que se moeu previamente (para a análise por microscopia) para um tubo de 2 ml. Adiciona-se 500 µl de tampão de extração A e 5 µl de RNase A (mg/ml) e mistura-se 10 a 15 segundos no vórtex. Adiciona-se 250 µl tampão de extração B e mistura-se 10 a 15 segundos no vórtex. Após 10 minutos de

incubação à temperatura ambiente adicionam-se 750µl da solução de precipitação e mistura-se no vórtex durante 10 a 15 segundos antes de centrifugar por 10 min, a 13000 rpm (Tabela 6).

Tabela 6 - Reagentes utilizados na extração do DNA.

Reagentes	Volume (µl)	Vórtex (Heidolph Reox 2000) (tempo)
Solução tampão A	500	
RNAse A (mg/ml)	5	10 a 15 segundos
Solução tampão B	250	10 a 15 segundos
Solução de precipitação	750	10 a 15 segundos

Purificação do DNA: Transferem-se 50 µl de esferas magnéticas e 1000 µl do sobrenadante para um eppendorf de 2 ml. Adicionam-se 800 µl de isopropanol e homogeneiza-se por inversão 5-6 vezes. Incuba-se à temperatura ambiente durante 5 min e mistura-se vigorosamente durante 90 segundos; Após inserir o eppendorf no suporte de separação magnética (Figura 17) despreza-se o sobrenadante.



Figura 17- Suporte de separação magnética.

Adicionam-se 250 µl de Tampão de extração B e mistura-se com a pipeta durante 30 segundos, tornando a inserir-se os tubos no suporte de separação magnética por 60 seg. Despreza-se o sobrenadante, lava-se por duas vezes com 1000 µl de etanol a 70% separando magneticamente por 60 seg e desprezando o sobrenadante. Deixa-se o tubo aberto por 5 min para evaporar o etanol e dilui-se em 300 µl de água mQ, separando das esferas magneticamente, para recuperar o sobrenadante. Armazena-se a -20°C. Na tabela 7 apresentam-se os reagentes utilizados na purificação do DNA, bem como os tempos os correspondentes tempos de contacto.

Tabela 7 - Reagentes utilizados na purificação do DNA.

Passos operacionais	Volume (µl)	Misturar (tempo)
Esferas magnéticas	50	
Isopropanol	800	90 Segundos
Solução tampão B	250	30 Segundos
Etanol a 70%.	100	30 Segundos
Água mQ	300	60 Segundos

6.2.2.4 Amplificação genética

Os estudos da sequência alvo, dos *primers* e sonda a serem utilizados tais como as suas concentrações e volumes a serem adicionados foram realizados e disponibilizados pelo laboratório de referência da União Europeia para as proteínas animais na Bélgica. A *master mix* é adquirida pronta e os *primers* liofilizados são ressuspensos num volume de água *nuclease e nucleic acid free* para que fiquem a uma concentração de 10 µM.

Preparação da *mix*: na câmara de fluxo laminar da sala limpa, depois de deixar as superfícies estéreis utilizando UV durante pelo menos 25 min, adicionam-se num único tubo, todos os componentes da mistura reacional pela ordem e concentração indicados na Tabela 8, homogeneizando entre cada adição. Transferem-se 20 µl da *mix* para cada poço.

Tabela 8 - Reagentes utilizados na preparação da *mix*.

Componentes da mistura de PCR	Concentração	Volume/amostra (µl)
<i>Master Mix</i>	2X	12,07
<i>Primer A</i>	10µM	1,1
<i>Primer B</i>	10µM	1,1
Sonda	5 µM	0,73
Água destilada (mQ)		5
Total		20

Adição da amostra: Na sala de adição de amostra, após preparação da câmara à semelhança da anterior, adicionam-se 5 µl do DNA anteriormente extraído das amostras nos poços respetivos, consoante o registo de ensaio, perfazendo 25 µl de volume de reação. Em todos os ensaios correm-se paralelamente controlos negativos e positivos por forma a garantir a qualidade da reação no que diz respeito às soluções e instrumentação e a ausência de contaminação ambiental. Nos poços referentes aos controlos, na vez da amostra, adicionam-se os mesmos 5 µl de água mQ, como controlo negativo, e de calibrante de 168 cópias como controlo positivo. Selam-se os poços e corre-se o programa adequado no termociclador (ver Tabela 9).

Tabela 9 - Condições reacionais estabelecidas para a realização do método de PCR.

Função	Número de ciclo	Temperatura	Duração
Pré-desnaturação	1	94°C	10 Minutos
Desnaturação		95°C	15 Segundos
Anneling e Extensão	50	60°C	60 Segundos

Depois de aproximadamente 2h observam-se os gráficos da reação fornecidos pelo *software*, analisando os resultados.

6.2.3 Visualização dos produtos de amplificação de PCR em tempo real

Os produtos de amplificação das reações de PCR em tempo real (ver Tabela 6) foram visualizados em gel de agarose.

6.2.3.1 Equipamentos: Moldagem do gel: tanque de corrida, tabuleiro com marcações na base, pente com 10 dentes de 1,5mm; Micropipetas (100 a 1000µl); Transiluminado (*Bio-Rad Sistema de Fotodocumentação Gel Doc XR+, Berkeley, Califórnia, EUA*).

6.2.3.2 Reagentes: Tampão de arrastamento TBE 1× (10,8 de Tris Base (*Sigma, St Louis, EUA*), 5,5g de ácido bórico (*Sigma, St Louis, EUA*) e 1,861gde EDTA (*Sigma, St Louis, EUA*), pH8, para um volume total de 1 litro em água bidestilada); Agarose a 2% em TBE 1×; Brometo de etídeo (Uma vez que o brometo de etídeo é cancerígeno, o uso de luvas de

nitrito é obrigatório); Marcador de peso molecular (100 bp *Ladder* (Jena Bioscience, Jena, Alemanha)).

6.2.3.3 Preparação de géis de Agarose

Num erlenmeyer, dissolve-se à temperatura de ebulição, a agarose em tampão TBE 1x. Para análise dos fragmentos de PCR é necessário agarose a 2 %, onde se adiciona uma gota de uma solução contendo 1% de brometo de etídeo. Agita-se o frasco e deixa-se baixar a temperatura até aproximadamente 60°C.

Verte-se a solução obtida em tabuleiro próprio para géis equipado com pentes. Após a formação do gel, removem-se os pentes com cuidado.

Coloca-se o gel sólido no aparelho de eletroforese e adiciona-se tampão TBE 1x até obter uma espessura de 2-3 mm sobre o gel.

6.2.3.4 Deposição das soluções de DNA

Num tubo de microcentrifuga, coloca-se 1-2 µl de tampão de arrastamento e 1-2 µl de marcador de peso molecular. Agita-se cuidadosamente e depositam-se cuidadosamente no primeiro poço do gel com auxílio de uma micropipeta.

Deposita-se cuidadosamente, nos restantes poços, 5 µl das soluções de DNA obtidas.

Deixa-se separar por eletroforese em gel de agarose à temperatura ambiente durante 1 hora, sob um campo elétrico de 90V.

Observa-se num transiluminador de luz ultravioleta, uma vez que os ácidos nucleicos modificados pelo brometo de etídeo ficam visíveis e armazena-se em suporte fotográfico o resultado da separação observável do gel.

6.2.4 ELISA

6.2.4.1 Equipamento: Micropipetas (20-1000 µl); Frasco de 250 ml; Moinho (*Rescht ZM200, Haan, Alemanha*); Frasco de vidro; Recipientes de 1000ml; Banho-maria; Papel de filtro; Tubo para centrifuga com filtro (*Centrifugal Filter Units – Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA*); Espectrofotómetro para leitura de placas ELISA, equipado com filtro de 450 nm (*Dynatech MRX, Denkendorf, Alemanha*).

6.2.4.2 Reagentes e Solução

Kit ELISA (*MELISA-TEK[®] MEAT SPECIATION KIT: Ruminant, Gainesville, USA*): Tampão de extração; Solução de lavagem; Placa ELISA (3 tiras com 8 poços cada) revestida com anticorpo anti-troponina I; Anticorpo monoclonais biotinizado; Solução de avidina-peroxidase; TMB; Solução stop; Três controles de teste (10% de músculo de bovino, 10% de músculo de ovelha e 10% de músculo de porco).

6.2.4.3 Preparação dos componentes do Kit

Tampão de extração: Dissolveu-se uma embalagem de sais de tampão de extração em 1000ml de água purificada. Misturar até que o conteúdo se dissolva completamente.

Solução de lavagem: Preparou-se a solução de lavagem, misturando uma garrafa de concentrado de solução de lavagem (100 ml) em 900 ml de água purificada. Misturar por inversão suavemente várias vezes.

Controles de teste: Preparou-se os controles de teste, usando controlo (10%) das espécies que coincide com as espécies que se quer detetar na amostra, da seguinte forma: a) preparou-se dois controlos altamente positivo (1%) utilizando 100 µl de cada controlo (10% de músculo de bovino e 10% de músculo de ovelha separadamente) em 900ml da solução de extração. Misturou-se suavemente com auxílio de uma micropipeta; b) O controlo (10% de músculo de porco) fornecido utilizado como controlo negativo não precisou ser diluído; c) preparou-se um controlo menos positivo (0,05%), adicionou-se 50 µl do controlo altamente positivo (1%) em 950 µl d do controlo negativo (10%). Misture suavemente com auxílio de uma micropipeta.

6.2.4.4 Preparação da amostra

Pesou-se 5,0 g da amostra moída inicialmente e transferiu-se para um balão de 250 ml. Adicionou-se 50 ml de solução de extração que incubou 30 min à temperatura. Cobriu-se o balão com papel de alumínio e levou-se a banho-maria (95-100°C) durante 15 min. Após arrefecer (não mais de 30 minutos), filtrou-se o líquido e centrifugou-se a 10.000 g durante 10 minutos, usando-se o extrato diretamente no ensaio, independentemente de poder ser claro ou turvo.

6.2.4.5 Aplicação na placa ELISA

Pipeta-se 100µl da solução de extração (branco), das amostras e dos controles, de acordo com um plano de trabalho previamente elaborado, na placa. Deixa-se incubar por 20 min e depois lava-se 3 vezes.

A seguir aplicaram-se os reagentes na placa de ELISA pela ordem indicada pelo na Tabela 10, respeitando os tempos de incubação e os números de lavagens indicados.

Tabela 10 - Aplicação dos reagentes na placa ELISA.

Reagentes	Volume (ul)	Tempo de incubação (min)	Número de lavagem
Anticorpo monoclonais biotinizado	50	20	3x
Solução de avidina-peroxidase	50	20	6x
TMB	50	20	Não lavar
Solução stop	50	10	

Leu-se a placa com um filtro de 450 nm.

7 Resultados e Discussão

7.1 Caracterização das PAT por Microscopia

Os constituintes de origem animal suscetíveis de estar presentes em matérias-primas para a alimentação animal e alimentos compostos para animais são atualmente identificados com base em características típicas e detetáveis por exame microscópico (por exemplo, fibras musculares e outras partículas de carne, cartilagens, ossos, chifres, pelos, cerdas, sangue, penas, cascas de ovos, espinhas e escamas).

A detecção de eventuais elementos provenientes de fontes contaminantes às rações e matérias-primas implica o seu reconhecimento, pelo que se iniciou este estudo pela identificação dos elementos nas fontes contaminantes propriamente ditas.

Seguidamente analisaram-se os alimentos simples e compostos procurando as mesmas estruturas.

7.1.1 Caracterização da morfologia das PATs em farinha de origem animal

A observação microscópica permitiu encontrar os diversos elementos previstos para cada tipo de farinha em análise, possibilitando, posteriormente, uma análise rigorosa das amostras utilizadas no estudo. Abaixo descrevem-se exemplos dos constituintes encontrados, com as características identificadoras referenciadas.

Em Farinha de peixe foi possível observar fragmentos de cartilagens, de brânquias, de escamas e de ossos. Fragmentos de cartilagens caracterizam-se por apresentarem partículas irregulares, com superfície amarelada, apresentando numerosas lacunas mas sem *canaliculis* (espaço muito fino que se forma entre as células dos ossos), os de brânquias caracterizam-se por apresentarem partículas retangulares com lacunas dispostas longitudinalmente nos extremos e lacunas dispostas perpendicularmente a essas ao longo de toda a superfície da partícula; já os fragmentos de escamas são identificados por apresentarem partículas planas translúcidas, com bandas concêntricas alternadamente claras e escuras e sem lacunas, enquanto os fragmentos de ossos se caracterizam por apresentarem partículas opacas ou semitransparentes, ocasionalmente de cor prateada ou amarelada e por apresentarem lacunas filiformes ou fusiformes ramificadas e muito evidentes, diferentes das dos mamíferos e das aves (ver Figura 18).

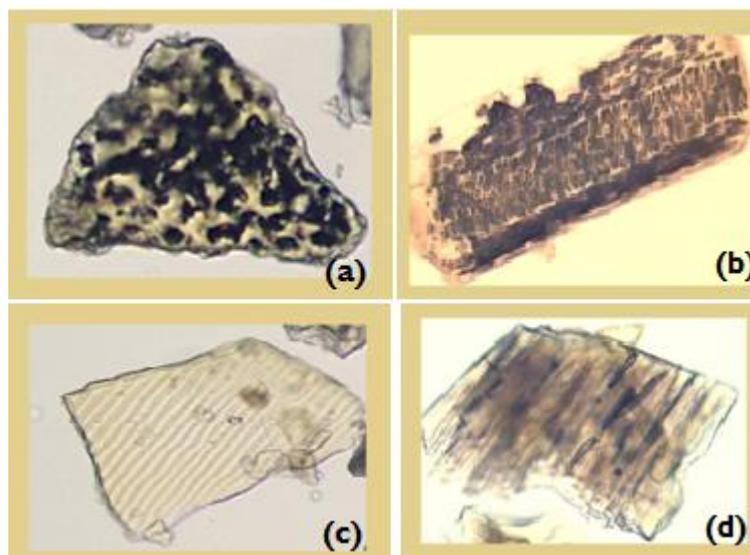


Figura 18 - Fotografia obtida por microscopia ótica composta à ampliação total de 100X, representativa dos fragmentos encontrados na farinha de peixe: (a) Fragmentos de cartilagens de peixes, (b) Fragmentos de Brânquias de peixes, (c) Fragmentos de escamas de peixes e (d) Fragmentos de ossos de peixes.

Em farinha de aves foi possível encontrar fragmentos de penas (bárbulas) e fragmentos de ossos. As bábulas caracterizam-se por apresentarem uma estrutura com segmentos transparentes, inseridos uns nos outros em nós e os fragmentos de ossos por apresentarem lacunas redondas e elíticas em maior densidade, relativamente diferentes no tamanho e na forma das dos ossos de mamíferos e por serem distinguíveis dos ossos de mamíferos, pela forma mais alongada e pontas cortadas (Figura 19).

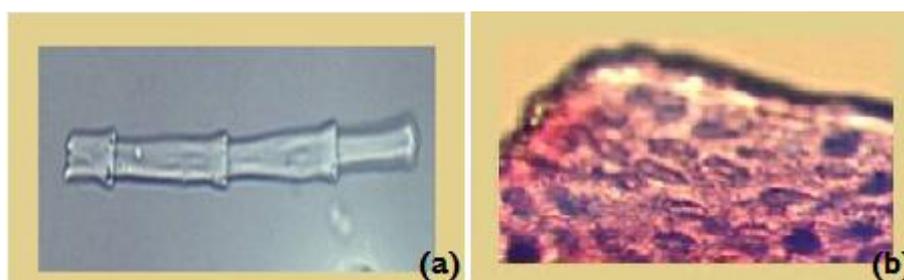


Figura 19 - Fotografia obtida por microscopia ótica composta à ampliação total de 100X, representativa dos fragmentos encontrados na farinha de aves: (a) Fragmentos de fragmentos de penas (bárbulas) e (b) Fragmentos de ossos de aves.

Em farinha de mamífero foi possível identificar porções de fibras musculares e fragmento de ossos. As porções de fibras musculares distinguem-se por apresentarem uma estrutura semelhante às das aves, isto é, linhas transversais alternadamente escuras e claras (referentes

a músculo estriado), mas que nem sempre são visíveis e por apresentarem uma cor semitransparente e terem comumente tamanho inferior às dos peixes e os fragmentos de ossos por exibirem lacunas que parecem buracos arredondados com um fundo cinzento (Figura 20).

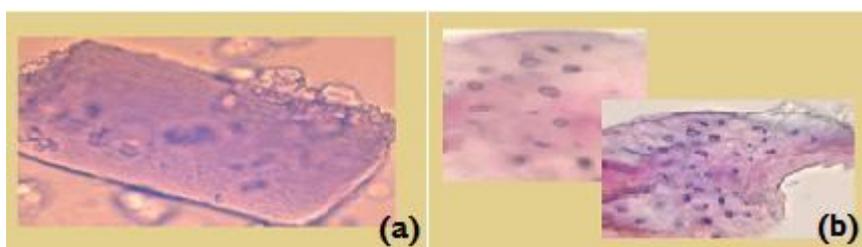


Figura 20 - Fotografia obtida por microscopia ótica composta à ampliação total de 100X, representativa dos fragmentos encontrados na farinha de mamíferos: (a) porções de fibras musculares e (b) fragmentos de ossos de mamíferos.

7.1.2 Caracterização das amostras analisadas

Todas as amostras de rações e matérias-primas fornecidas pelo INIAV ou colhidas em fábricas foram analisadas, por microscopia clássica. Os resultados positivos indicam a presença de pelo menos uma estrutura de PAT e negativo indica a ausência da detecção da mesma. Confirma-se que não foi encontrado qualquer dos elementos identificadores de PATs nas rações do INIAV ou colhidas em fábricas, obtendo-se assim todos os resultados negativos quanto a presença de fontes de proteínas proibidas (ver Tabela II)

Tabela II - Resumo dos resultados de análise da presença de PAT por microscopia clássica.

Proveniência	Referência	Resultado	Proveniência	Referência	Resultado
INIAV	HP-13-00002	Negativo	INIAV	HP-11-06669	Negativo
INIAV	HP-13-00003	Negativo	INIAV	HP-11-07683	Negativo
INIAV	HP-12-00920	Negativo	INIAV	HP-11-05036	Negativo
INIAV	HP-12-00921	Negativo	INIAV	HP-11-05056	Negativo
INIAV	HP-11-04854	Negativo	INIAV	HP-11-07195	Negativo
INIAV	HP-11-05215	Negativo	INIAV	HP-11-07196	Negativo
INIAV	HP-11-05218	Negativo	INIAV	HP-11-07206	Negativo
INIAV	HP-11-05220	Negativo	INIAV	HP-11-0478	Negativo
INIAV	HP-11-05221	Negativo	INIAV	HP-11-05208	Negativo

Proveniência	Referência	Resultado	Proveniência	Referência	Resultado
INIAV	HP-11-05407	Negativo	INIAV	HP-11-05210	Negativo
INIAV	HP-11-04587	Negativo	INIAV	HP-11-07456	Negativo
INIAV	HP-11-04825	Negativo	INIAV	HP-11-06749	Negativo
INIAV	HP-11-06380	Negativo	INIAV	HP-12-00918	Negativo
INIAV	HP-11-07124	Negativo	INIAV	HP-11-07571	Negativo
INIAV	HP-11-07349	Negativo	INIAV	HP-12-00436	Negativo
INIAV	HP-11-06717	Negativo	INIAV	HP-11-06753	Negativo
INIAV	HP-11-06718	Negativo	INIAV	HP-11-06747	Negativo
INIAV	HP-12-00330	Negativo	INIAV	HP-11-06750	Negativo
INIAV	HP-12-00759	Negativo	INIAV	HP-11-05209	Negativo
INIAV	HP-11-06733	Negativo	INIAV	HP-12-00925	Negativo
INIAV	HP-11-06734	Negativo	INIAV	HP-12-00926	Negativo
INIAV	HP-11-07346	Negativo	INIAV	HP-12-00928	Negativo
INIAV	HP-11-07347	Negativo	INIAV	HP-12-00948	Negativo
INIAV	HP-11-05245	Negativo	INIAV	HP-11-04812	Negativo
INIAV	HP-11-05253	Negativo	INIAV	HP-11-04813	Negativo
INIAV	HP-11-07345	Negativo	Fabrica B	10	Negativo
Fabrica A	6	Negativo	Fabrica B	11	Negativo
Fabrica A	7	Negativo	Fabrica B	12	Negativo
Fabrica A	8	Negativo	Fabrica B	13	Negativo
Fabrica A	9	Negativo	-	-	-

7.1.3 Caracterização das amostras com uma incorporação de 0,1% de FCO de mamíferos

Tendo em conta as amostras que deram resultados negativos, subconjunto de uma amostra inicial, procedeu-se à incorporação intencional de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos, concentração correspondente ao limite de deteção determinada para técnica de microscopia clássica, com o objetivo de estudar a sensibilidade do método ao contaminante.

Em 3 das 25 incorporações a 0,1% obteve-se resultados falsos negativos, todas as restantes análises foram positivas (ver Tabela 12).

Tabela 12 - Resumo dos resultados obtidos das amostras pela microscopia clássica, após uma incorporação intencional de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos.

Proveniência	Referência	Resultado
INIAV	HP-13-00002	Positivo
INIAV	HP-11-04587	Positivo
INIAV	HP-11-04825	Negativo
INIAV	HP-11-06717	Positivo
INIAV	HP-11-06718	Positivo
INIAV	HP-11-07345	Positivo
INIAV	HP-11-06669	Positivo
INIAV	HP-11-07683	Positivo
INIAV	HP-11-05056	Positivo
INIAV	HP-11-07196	Positivo
INIAV	HP-11-07206	Negativo
INIAV	HP-11-07456	Positivo
INIAV	HP-11-06749	Positivo
INIAV	HP-12-00918	Positivo
INIAV	HP-11-07571	Positivo
INIAV	HP-12-00436	Positivo
INIAV	HP-11-06747	Positivo
INIAV	HP-11-06750	Negativo
INIAV	HP-11-05209	Positivo
INIAV	HP-12-00925	Positivo
INIAV	HP-12-00926	Positivo
Fabrica A	6	Positivo
Fabrica A	7	Positivo
Fabrica A	9	Positivo
Fabrica B	12	Positivo

Pode-se verificar que apenas 12% dos resultados obtidos foram falsos negativos, confirmando assim que o método revela a sensibilidade e a especificidade necessária à detecção de coconstituintes de origem animal em matérias-primas para alimentos compostos para animais.

Por se tratar de amostras sólidas, não sendo possível 100% da sua homogeneização, pode-se atribuir os resultados falsos negativos a erros que podem ocorrer na recolha da pequena porção analisada (porção recolhida de uma parte da amostra total que não chegou a ser contaminada pela proteína de origem animal).

7.1.4 Caracterização das amostras, com uma incorporação de 0,025% de FCO de mamíferos

Tendo em conta as amostras que deram resultados positivos, subconjunto de uma amostra inicial, procedeu-se à redução da concentração de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos para 0,025%, concentração muito inferior ao limite de deteção do método, sendo aceitável o facto de 70,83% dos resultados obtidos serem falsos negativos (Tabela 13).

Tabela 13 - Resumo dos resultados obtidos das amostras pela microscopia clássica, com uma concentração de 0,025% (p/p) de FCO de mamíferos.

Proveniência	Referência	Resultado
INIAV	HP-13-00002	Positivo
INIAV	HP-11-04587	Negativo
INIAV	HP-11-04825	Negativo
INIAV	HP-11-06717	Negativo
INIAV	HP-11-06718	Negativo
INIAV	HP-11-07345	Negativo
INIAV	HP-11-06669	Negativo
INIAV	HP-11-07683	Negativo
INIAV	HP-11-05056	Negativo
INIAV	HP-11-07196	Negativo
INIAV	HP-11-07206	Negativo
INIAV	HP-11-07456	Negativo
INIAV	HP-11-06749	Negativo
INIAV	HP-12-00918	Negativo
INIAV	HP-11-07571	Negativo
INIAV	HP-12-00436	Negativo
INIAV	HP-11-06747	Negativo
INIAV	HP-11-05209	Negativo
INIAV	HP-12-00925	Positivo
INIAV	HP-12-00926	Positivo
Fabrica A	6	Positivo
Fabrica A	7	Positivo
Fabrica A	9	Positivo
Fabrica B	12	Positivo

7.2 Implementação do PCR em tempo real

Sequências alvo de DNA, exclusivas para dada espécie ou referentes a determinada origem animal genérica suscetível de estar presente enquanto contaminante na alimentação animal são detetáveis segundo a técnica de amplificação genética de PCR em tempo real.

Este método implica, primeiro, a extração de DNA das amostras, que é depois submetido a uma reação específica de amplificação exponencial, a fim de determinar a sua origem. Nesta versão de PCR o termociclador tem um sistema de deteção de fluorescência calibrado para o comprimento de onda do fluoróforo utilizado, por forma a permitir identificar o progresso da amplificação, quantificando o alvo na mistura original. Encontrando-se ligado a um computador, permite aceder aos resultados em tempo real, isto é, apresenta a curva de amplificação à medida que se dá a amplificação do DNA das amostras, sendo um método simples e expedito e extremamente eficiente porquanto um só ensaio permite avaliar em triplicado 30 amostras independentes além dos controlos exigidos.

7.2.1 Determinação do *Cut-off*

Para determinar o *cut-off* foram realizados quatro ensaios independentes, com três calibrantes (12x de cada calibrante por ensaio) de DNA em diferentes números de cópias (46, 177 e 680, respetivamente), por PCR em tempo real (Figura 21).

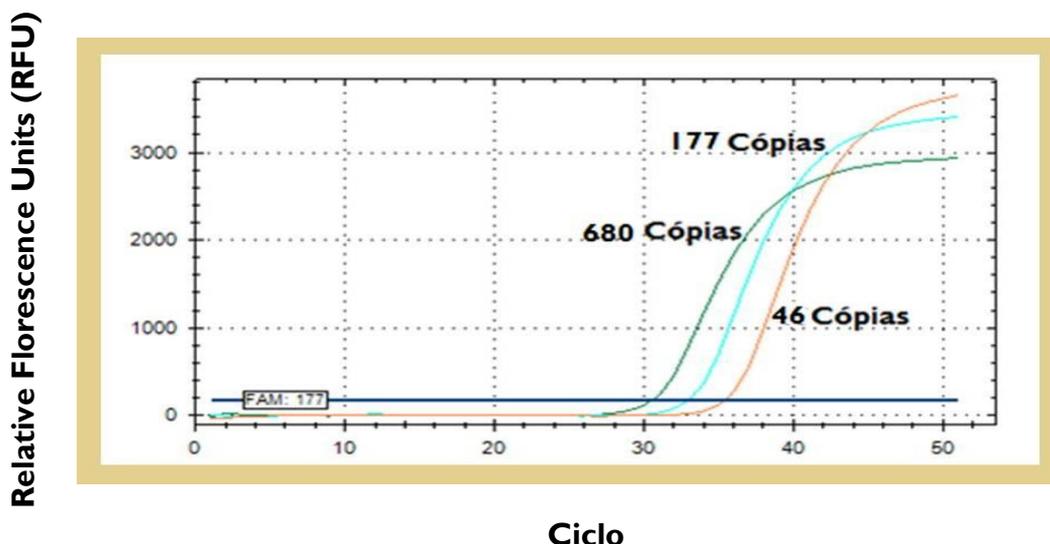


Figura 21- Curva de amplificação obtida para os calibrantes de 46, 177 e 680 cópias da subunidade α do precursor do recetor da acetilcolina bovina, seguindo o protocolo definido pelo laboratório de referência da EU na Bélgica, no termociclador (*Bio Rad CFX96™ Real Time System* e *C1000™ Thermal cycler*) do laboratório de bacteriologia do INIAV.

Tabela 14 - Representação dos valores resultante dos quatro ensaios realizados com os diferentes calibrantes (46, 177 e 680 cópias) da subunidade α precursora do recetor da acetilcolina bovina.

1º Ensaio			2º Ensaio			3º Ensaio			4º Ensaio		
Calibrantes											
680	177	46	680	177	46	680	177	46	680	177	46
Cts correspondentes aos respetivos calibrantes											
30,64	32,95	35,06	31,14	32,75	34,76	30,58	33,35	35,1	30,79	32,66	34,29
30,67	33,61	34,23	30,86	32,28	35,36	30,58	32,57	34,28	30,69	32,69	34,32
30,64	33,31	35,01	31,09	33,15	34,82	30,84	32,71	35,48	30,79	32,99	34,33
31,57	32,58	34,48	32,4	32,61	35,01	30,75	32,4	35,13	31,14	32,7	34,95
30,7	32,7	35,41	30,97	32,83	35,41	30,45	33,17	34,76	30,7	32,23	34,46
30,67	32,78		31,01	32,47	34,36	31,09	32,52	34,74	30,75	32,73	35,07
30,61	32,96	35,18	31,07	33,77	34,64	30,74	33,5	35,13	30,6	32,8	34,6
30,75	32,51	34,27	30,66	33,21	34,34	31,21	32,59	34,89	30,97	33,06	34,5
30,4	32,92	34,67	30,76	32,48	34,39	31,12	32,64	35,05	30,76	33,01	34,33
30,86	32,62	34,28	30,96	33,2	34,97	31,63	33,1	34,78	30,86	32,66	34,84
31,64	32,57	35,39	31,25		34,7	30,71	33,25	35,23	30,77	32,51	34,81
30,56	32,76	34,96	30,78	32,26	34,69	30,69	33,15	34,78	30,92	33,16	34,08

Após a remoção das curvas aberrantes, calculou-se a média do Ct para os diferentes ensaios com cada calibrador. Com os valores maiores e menor de média de Ct obtidos para cada calibrante nos diferentes ensaios (ver Tabela 14), determinaram-se respetivamente o limite superior e inferior de Ct correspondentes, bem como os respectivos valores médios (Tabela 15).

Tabela 15 - Média dos Cts dos diferentes calibrantes para cada ensaio.

Média dos Ct			
	680 Cópias	177 Cópias	46 Cópias
1º Ensaio	30,80917	32,85583	34,81273
2º Ensaio	31,07917	32,81909	34,7875
3º Ensaio	30,86583	32,9125	34,94583
4º Ensaio	30,81167	32,76667	34,54833

Com as respectivas retas de calibração relativo ao logaritmo do número de cópias de alvo ($y = \log(N)$) em função dos C_t s obtemos a equação da recta ($y = \log(N) = m \times x + b$) que nos vai permitir a determinação do *cut-off* (x) (Figura 22)(Fumiére, et al. 2012a).

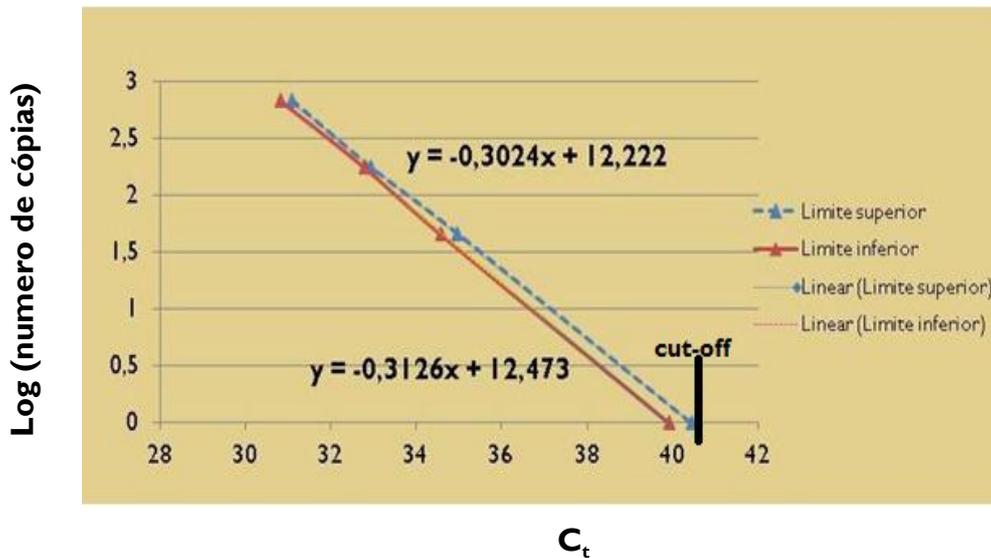


Figura 22 - Determinação do *cut-off* (x) baseado nos dados valores maiores das médias dos C_t s dos diferentes ensaios.

Uma vez que de acordo com a proposta do laboratório de referência para a UE apenas se considera que uma ração está contaminada quando apresenta uma deteção do alvo - subunidade α precursor do recetor da acetilcolina bovina correspondente a um número de cópias superior a 15, encontra-se valor para o *cut-off* em x quando y é igual ao $\log(15)$ (Fumiére, Marien e Berben, 2012b).

Para $y = \log(15) = 1,176091$

$$y = -0,3024x + 12,222$$

$$\Leftrightarrow 1,176091 = -0,3024x + 12,222$$

$$\Leftrightarrow x = 36,52748$$

Cut-off (15 cópias) = 36,52748

7.2.2 Validação do método

O método de detecção de PAT ruminantes através de PCR em tempo real foi validado no âmbito do trabalho do INIAV como laboratório de referência nacional entre parceiros europeus através da análise de quinze amostras cegas (Tabela 16) e posterior avaliação quanto à sua precisão, sensibilidade e especificidade.

A precisão avalia o grau de acerto global; a sensibilidade avalia capacidade de classificar uma amostra positiva como positivo; enquanto a especificidade avalia a capacidade para classificar uma amostra negativa como negativo (Fumiére, Marien e Berben, 2013).

A precisão (PC) foi avaliada segundo a equação:

$$PC = \frac{PE+NE}{PE+FN+FP+NE}$$

A sensibilidade (SS) segundo a equação:

$$SS = \frac{PE}{PE+FN}$$

A especificidade (EP) segundo a equação:

$$EP = \frac{NE}{FP+NE}$$

Onde PE corresponde aos resultados positivos esperados, NE aos negativos esperados, FP aos falsos-positivos e FN aos falsos-negativos. Os resultados são expressos em percentagem, donde uma classificação de 100% significa que todas as amostras que eram positivas deram resultado positivo e que todas as amostras negativas deram resultado negativo.

Tabela 16 - Resultado da amplificação das amostras cega.

Proveniência	Referência	Média dos Cts	Resultado
EURL-AP	1	30	Positivo
EURL-AP	2	31	Negativo
EURL-AP	3	39	Negativo
EURL-AP	4	41	Negativo
EURL-AP	5	27	Negativo
EURL-AP	57	28	Negativo
EURL-AP	58	39	Negativo

Proveniência	Referência	Média dos Cts	Resultado
EURL-AP	59	31	Negativo
EURL-AP	60	31	Negativo
EURL-AP	271	32	Negativo
EURL-AP	272	39	Negativo
EURL-AP	273	32	Negativo
EURL-AP	274	38	Negativo
EURL-AP	275	32	Negativo
EURL-AP	348	31	Negativo

As amostras avaliadas permitiram a validação do PCR em tempo real, de acordo com as especificações propostas, para a detecção de PAT ruminantes com uma precisão, sensibilidade e especificidade de 100%, segundo as equações respectivas:

$$PC = \frac{PE+NE}{PE+FN+FP+NE} = \frac{1+1}{1+0+0+1} = 1$$

$$SS = \frac{PE}{PE+FN} = \frac{1}{1+0} = 1$$

$$EP = \frac{NE}{FP+NE} = \frac{1+1}{1+0+0+1} = 1$$

7.2.3 Caracterização das amostras por PCR em tempo real

Todas as amostras de rações e matérias-primas fornecidas pelo INIAV ou colhidas em fábricas foram analisadas, por PCR em tempo real. Os resultados positivos indicam a presença de DNA de ruminantes superiores a 15 cópias, os negativos indicam ausência de DNA de ruminantes superiores a 15 cópias e nos inconclusivos os valores estão muito próximo do *cut-off* determinados para 15 cópias (Tabela 17).

Tabela 17 - Resumo dos resultados de análise da presença de PAT por PCR em tempo real.

Proveniência	Referência	Média dos Cts	Resultado
INIAV	HP-13-00002	44,1	Negativo
INIAV	HP-13-00003	36,92	Inconclusivo
INIAV	HP-12-00920	30,99	Positivo
INIAV	HP-12-00921	30,78	Positivo
INIAV	HP-11-04854	34,02	Positivo
INIAV	HP-11-05215	27,19	Positivo
INIAV	HP-11-05218	35,92	Positivo
INIAV	HP-11-05220	26,36	Positivo
INIAV	HP-11-05221	33,05	Positivo
INIAV	HP-11-05407	35,68	Positivo
INIAV	HP-11-04587	44,77	Negativo
INIAV	HP-11-04825	38,85	Negativo
INIAV	HP-11-06380	25,29	Positivo
INIAV	HP-11-07124	36,14	Inconclusivo
INIAV	HP-11-07349	29,46	Positivo
INIAV	HP-11-06717	38,95	Negativo
INIAV	HP-11-06718	38,02	Negativo
INIAV	HP-12-00330	29,74	Positivo
INIAV	HP-12-00759	36,44	Inconclusivo
INIAV	HP-11-06733	32,13	Positivo
INIAV	HP-11-06734	32,32	Positivo
INIAV	HP-11-07346	31,99	Positivo
INIAV	HP-11-07347	34,48	Positivo
INIAV	HP-11-05245	32,09	Positivo
INIAV	HP-11-05253	31,94	Positivo
INIAV	HP-11-07345	38,22	Negativo
INIAV	HP-11-06669	39,8	Negativo
INIAV	HP-11-07683	38,94	Negativo
INIAV	HP-11-05036	36,07	Inconclusivo
INIAV	HP-11-05056	48,06	Negativo

Proveniência	Referência	Média dos Cts	Resultado
INIAV	HP-11-07195	36,05	Inconclusivo
INIAV	HP-11-07196	N/A	Negativo
INIAV	HP-11-07206	N/A	Negativo
INIAV	HP-11-0478	35,02	Presente
INIAV	HP-11-05208	33,19	Positivo
INIAV	HP-11-05210	36,39	Inconclusivo
INIAV	HP-11-07456	37,79	Negativo
INIAV	HP-11-06749	N/A	Negativo
INIAV	HP-12-00918	38,33	Negativo
INIAV	HP-11-07571	37,18	Negativo
INIAV	HP-12-00436	42,96	Negativo
INIAV	HP-11-06753	33,65	Positivo
INIAV	HP-11-06747	38,57	Negativo
INIAV	HP-11-06750	38,56	Negativo
INIAV	HP-11-05209	39,7	Negativo
INIAV	HP-12-00925	38,45	Negativo
INIAV	HP-12-00926	41,62	Negativo
INIAV	HP-12-00928	34,64	Positivo
INIAV	HP-12-00948	35,24	Positivo
INIAV	HP-11-04812	21,84	Positivo
INIAV	HP-11-04813	19,11	Positivo
Fabrica A	6	37,2	Negativo
Fabrica A	7	37,54	Negativo
Fabrica A	8	31,2	Positivo
Fabrica A	9	38,37	Negativo
Fabrica B	10	33,93	Positivo
Fabrica B	11	31,03	Positivo
Fabrica B	12	39,17	Negativo
Fabrica B	13	34,99	Positivo

Em 26 das 59 amostras analisadas foram encontradas presença de DNA de ruminantes superiores a 15 cópias. Verifica-se, portanto, que 44,07% das amostras, em que os resultados foram negativos por microscopia clássica, apresentaram valores positivos com a aplicação de PCR em tempo real. Uma vez que a microscopia se baseia na identificação de estruturas provenientes de PATs e o PCR em fragmentos de DNA, neste caso ruminantes, independentemente da sua origem, podendo se tratar de matérias permitidos, como por exemplo o leite, podemos estar perante uma percentagem de resultados falsos positivos para PATs de ruminantes.

7.2.4 Caracterização das amostras, por PCR em tempo real, com uma incorporação de 0,1% de FCO de mamíferos

Apenas as amostras cujo resultado por PRC em tempo real foi considerado negativo, foram selecionadas para efeitos de controlo após a incorporação de 0,1% de FCO de mamíferos (Tabela 18) tanto pela microscopia clássica como por PCR em tempo real.

Tabela 18 - Resumo dos resultados obtidos das amostras, analisados por PCR em tempo real, após uma incorporação intencional de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos.

Proveniência	Referência	Média dos Cts	Resultado
INIAV	HP-13-00002	26,27	Positivo
INIAV	HP-11-04587	26,73	Positivo
INIAV	HP-11-04825	27,23	Positivo
INIAV	HP-11-06717	28,19	Positivo
INIAV	HP-11-06718	27,42	Positivo
INIAV	HP-11-07345	30,67	Positivo
INIAV	HP-11-06669	33,57	Positivo
INIAV	HP-11-07683	28,48	Positivo
INIAV	HP-11-05056	33,13	Positivo
INIAV	HP-11-07196	27,34	Positivo
INIAV	HP-11-07206	28,76	Positivo
INIAV	HP-11-07456	30,58	Positivo
INIAV	HP-11-06749	33,65	Positivo
INIAV	HP-12-00918	28,92	Positivo
INIAV	HP-11-07571	27,36	Positivo

Proveniência	Referência	Resultado	Proveniência
INIAV	HP-12-00436	28,51	Positivo
INIAV	HP-11-06747	26,84	Positivo
INIAV	HP-11-06750	40,15	Negativo
INIAV	HP-11-05209	26,70	Positivo
INIAV	HP-12-00925	27,99	Positivo
INIAV	HP-12-00926	33,54	Positivo
Fabrica A	6	27,68	Positivo
Fabrica A	7	26,64	Positivo
Fabrica A	9	29,05	Positivo
Fabrica B	12	27,79	Positivo

O método mostrou ser robusto, apresentando uma precisão muito elevada (96,15%) para a concentração limite de detecção (0,1% (p/p)).

Ao comparar os resultados do método PRC em tempo real com os da microscopia, segundo este trabalho, pode-se claramente afirmar que a técnica PCR é mais sensível.

7.2.5 Caracterização das amostras, por PCR em tempo real, com uma incorporação de 0,025% de FCO de mamíferos

Tendo em conta as amostras que deram resultados positivos, subconjunto de uma amostra inicial, procedeu-se a redução da sua concentração de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos para de 0,025% (p/p).

Com base nos resultados obtidos (ver Tabela 19), pode-se constatar que o método não permite uma avaliação segura para concentrações de FCO de mamíferos na concentração de 0,025% (p/p) como se pode constatar relativamente à detecção de concentração de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos.

Tabela 19 - Resumo dos resultados obtidos das amostras por PCR em tempo real, com uma concentração de 0,025% (p/p) de FCO de mamíferos.

Proveniência	Referência	Média dos Cts	Resultado
INIAV	HP-13-00002	28,90	Positivo
INIAV	HP-11-04587	33,63	Positivo
INIAV	HP-11-04825	27,23	Positivo
INIAV	HP-11-06717	28,19	Positivo
INIAV	HP-11-06718	37,52	Negativo
INIAV	HP-11-07345	41,34	Negativo
INIAV	HP-11-06669	33,57	Positivo
INIAV	HP-11-07683	N/A	Negativo
INIAV	HP-11-05056	39,76	Negativo
INIAV	HP-11-07196	37,02	Negativo
INIAV	HP-11-07206	37,91	Negativo
INIAV	HP-11-07456	37,31	Negativo
INIAV	HP-11-06749	38,15	Negativo
INIAV	HP-12-00918	N/A	Negativo
INIAV	HP-11-07571	N/A	Negativo
INIAV	HP-12-00436	33,98	Positivo
INIAV	HP-11-06747	37,33	Negativo
INIAV	HP-11-05209	33,92	Positivo
INIAV	HP-12-00925	37,31	Negativo
INIAV	HP-12-00926	39,76	Negativo
Fabrica A	6	30,19	Positivo
Fabrica A	7	29,14	Positivo
Fabrica A	9	N/A	Negativo
Fabrica B	12	40,25	Negativo

7.3 Estudo da sequência alvo

7.3.1 Visualização dos produtos de amplificação de PCR em tempo real

O método PCR em tempo real acumula níveis de controlo de especificidade ao exigir à amplificação a complementaridade dos *primers* em relação ao molde e à deteção da complementaridade da sonda. Ainda assim propôs-se correr alguns produtos desta reação no gel de agarose a 2% em TBE Ix para confirmar a dimensão esperada de 85bp (ver figura 23).

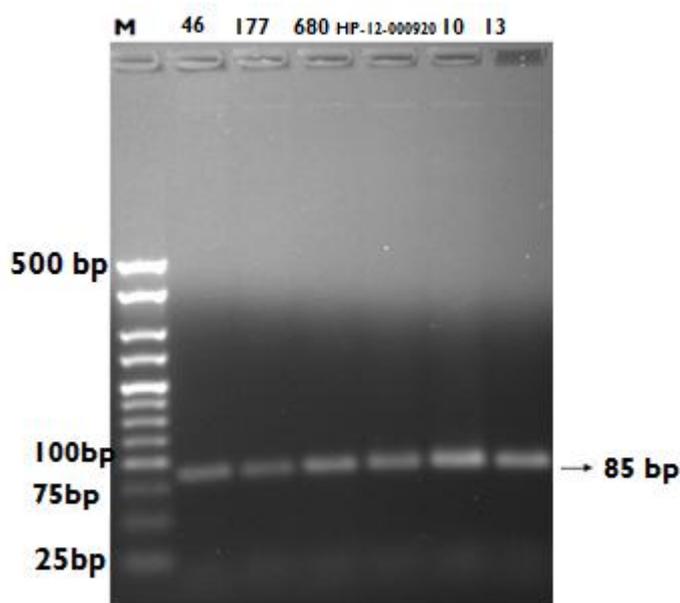


Figura 23 - Eletroforese me gel de agarose a 2% em TBE Ix dos produtos amplificados por PCR em tempo real. O primeiro poço corresponde a 5 μ l de marcador hyperladder V (BIOLINE) (com bandas distintas em 25 bp dos 25bp aos 500bp), nos restantes correu-se 5 μ l de produtos amplificados por PCR em tempo real para a subunidade α do precursor do recetor da acetilcolina, respetivas dos calibrantes 46 cópias, 177 cópias, 680 cópias e das amostras HP-12-00920, 10 e 13.

7.3.1 Identificação de sequência alvo no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

A partir das sequências dos *primers* e a sonda, e identidade da sequência alvo, subunidade α do precursor do recetor da acetilcolina, foi possível reconstituir o amplião recorrendo à base de dados de biologia molecular, Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

NCBI (NCBI, 2013). Inseriu-se a sequência exata do *primer* direto (*Primer A* 5'-CCA GCA TCA GAG TCT TTT CCA AAT-3') e o complementar do *primer* reverso (*primer B* 5'GAA GGA ATG ATG CTA AAG CTG AAA C3' , cujo complementar é 5' GTT TCA GCT TTA GCA TCA TTC CTT C3').

Com os dados completos chegou-se a identificação dos pares de base da sequência alvo de 85 bp da subunidade α precursor do recetor da acetilcolina utilizada na identificação de PATs ruminantes em alimentos para animais (5' CCA GCA TCA GAG TCT TTT CCA ATG AGT CAA CTC TTC GCA TGA GGT GGC CAA AGT ACT GGA GTT TCA GCT TTA GCA TCA TTC CTT C3').

7.4 Estudo complementar pela técnica ELISA

ELISA *sandwich* permite detetar tecido muscular em extratos feitos a partir de carne ou farinha de carne e osso. Este método baseia-se no reconhecimento da troponina I, uma proteína termoestável específica do músculo de ruminantes, por anticorpos monoclonais específicos imobilizados nos poços de teste. O antigene (troponina I) da amostra ou controlo liga-se especificamente ao anticorpo. A este liga-se um segundo anticorpo monoclonal troponina-I específico biotinilado com o qual uma peroxidase de rábano-estreptavidina (SA-HRP) interage por sua vez. Esta, perante a adição de substrato TMB muda de cor em intensidade proporcional ao nível de troponina I originalmente ligado ao poço (ver Figura 24), que se espera seja representativo da amostra original, sendo quantificada usando um leitor de placas ELISA.



Figura 24 - Placa de ELISA após a mudança de cor em proporção do nível de troponina I específica do músculo de ruminante.

De acordo com novos critérios de decisão, baseados em estudos feitos pelo EURL-AP em 2009, uma amostra é considerada positiva se o seu valor de absorvência subtraído pelo valor do controlo branco for maior que 0,017 (Fumière, Baeten e Berben 2009).

De acordo com os critérios citados, só foi possível identificar com este kit rações com incorporação de 0,1% de FCO de mamíferos (Ver tabela 20).

Uma vez que as placas Elisa disponíveis eram limitados, só foi possível analisar 4 mostras. Apesar de não se ter observado nenhum resultado falso negativo, no que diz respeito a identificação de troponina I específica do músculo de ruminante, nas amostras com

incorporação de 0,1% (p/p) de FCO de mamíferos, não foi possível afirmar a robustez do método devido ao número limitado de amostras analisadas. O ensaio permitiu apenas mostras que o Kit em questão funciona para incorporados de 0,1% (p/p), mas não para 0,025% (p/p).

Tabela 20 - Resumo dos resultados da leitura da placa ELISA no espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

Amostra	ABS	ABS de amostra – ABS do Branco	Resultado
Branco	0,060		
Baixo Positivo (0,05% PATs de Ovinos)	1,267	1,207	Presente
Alto Positivo (1% PATs de Ovinos)	OVER		Presente
Negativo (PATs de Porco)	0,061	0,001	Ausente
Branco	0,060		
Baixo Positivo (0,05% PATs de Bovino)	1,258	1,198	Presente
Alto Positivo (1% PATs de Bovino)	OVER		Presente
Negativo (PATs de Porco)	0,059	-0,001	Ausente
HP-13-00002 (0,025% PATs de Mamífero)	0,071	0,011	Ausente
HP-11-00436 (0,025% PATs de Mamífero)	0,069	0,009	Ausente
HP-11-04825 (0,025% PATs de Mamífero)	0,077	0,017	Ausente
HP-11-05209 (0,025% PATs de Mamífero)	0,060	0	Ausente
HP-13-00002 (0,1% PATs de Mamífero)	0,270	0,210	Presente
HP-11-00436 (0,1% PATs de Mamífero)	0,259	0,199	Presente
HP-11-04825 (0,1% PATs de Mamífero)	0,327	0,267	Presente
HP-11-05209 (0,1% PATs de Mamífero)	0,272	0,212	Presente
HP-13-00002 (0,0% PATs de Mamífero)	0,059	-0,001	Ausente
HP-11-00436 (0,0% PATs de Mamífero)	0,055	-0,005	Ausente
HP-11-04825 (0,0% PATs de Mamífero)	0,059	0,001	Ausente
HP-11-05209 (0,0% PATs de Mamífero)	0,056	-0,004	Ausente

Parte III
Conclusão

8 Conclusão

8 Conclusão

A BSE, condição neurológica progressiva semelhante à *scrapie* em ovinos e caprinos, é uma TSE que atinge os bovinos. A necessidade de controlar a doença foi reforçada com reconhecimento da sua ligação à vCJD.

A sua origem é ainda desconhecida, mas pesquisas científicas realizadas até à data apontam para a ingestão de alimentos enriquecidos com FCO contaminada com agente infeccioso, prião, proveniente de reciclagem de subprodutos de origem animal como possível fonte. Dentro da UE, o controlo dessas PAT começou a ser feito após a publicação de vários regulamentos onde se proíbe explicitamente a alimentação de animais de criação com PAT de mamíferos (CE, 2001) e a alimentação de animais com proteínas da mesma espécie (CE, 2002b).

Para uma avaliação da proibição total de PAT exigem-se métodos de rotina que permitam detetar PAT nos alimentos para animais, bem como a sua origem a nível de espécie. Vários progressos vêm sendo atingidos ao longo dessas investigações. Métodos como a microscopia clássica, que permite distinguir PAT de peixes das PAT de animais terrestres, justificaram o fim da proibição do uso da farinha de peixe na alimentação dos animais de criação (CE, 2003). Recentemente uma nova proibição foi revogada, a incorporação de PAT de não ruminantes na alimentação de peixes de aquacultura (EU, 2013a), aplicando o PCR em tempo real como método de controlo (EU, 2013b).

Neste trabalho foi avaliado, através de um estudo comparativo, as metodologias disponíveis para deteção de FCO incorporados nos alimentos para animais, como a microscopia clássica, PCR em tempo real e ELISA, tendo-se chegado à conclusão que os três métodos são eficazes quando o objetivo é detetar PAT a 0,1 % em alimentos para animais, o que não se observou a uma concentração de 0,025% (p/p). Mas como foi salientado anteriormente, cada método acuta de forma diferente. A microscopia clássica baseando na observação das características morfológicas dos fragmentos de FCO incorporados nas rações, já a técnica ELISA e o PCR em tempo real são mais específicos, visto que um se baseia na deteção de troponina I específica do músculo de ruminante e o outro na deteção de DNA de ruminantes proveniente da subunidade α do precursor do recetor da acetilcolina, respetivamente, tornando-os métodos capazes de vir a proporcionar o regresso das PAT não ruminante na alimentação dos animais de criação.

Este trabalho comprova ainda a aplicabilidade do método de RT-PCR, recentemente desenvolvido pelo laboratório de Referência da União Europeia, em Portugal em alimentos compostos para animais, ingredientes e aditivos, testando diversas matrizes com vários níveis de incorporação. Poderá assim ser aplicado, com segurança, como método de rotina em controlo oficial.

Parte IV
Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Aristoy, M. C. e Toldra F. (2004) - Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. "Meat Science." 67 (2004) 211-217.
- Arsac, J. N. [et al.] (2007) - Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle. "Acta Neuropathologica." 114(2007) 509-516.
- Baeten, V. [et al.] (2005) - Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. "Analytical and Bioanalytical Chemistry " 382(2005) 149-157.
- Baskakov, I. V. [et al.] (2000) - Self-assembly of recombinant prion protein of 106 residues. "Biochemistry." 39(2000) 2792-2804.
- Belitz, H. D., Grosch, W. e Schieberle P. (2009) - Food Chemistry."Springer". (2009) 137-141.
- Benedetto, A. [et al.] (2011) - Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuffs. "Food Chemistry." 126(2011) 1436-1442.
- Boix, A. [et al.] (2012) - Validation of a near infrared microscopy method for the detection of animal products in feedingstuffs: results of a collaborative study. " Food additives & contaminants" . 29 (2012) 1872-1880.
- Bozzetta, E. [et al.] (2004) - Evaluation of rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats. "Acta Neuropathologica." 107(2004) 559-562.
- Brown, P. (2001) - Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease. "British Medical Journal." 322(2001) 841-844.
- Caughey, B. [et al.] (1995) - Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. " Chemistry & Biology " 2(1995) 807-817.
- CE (2001) - Regulamento(CE) n° 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Maio de 2001 que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis. [Acedido a 1 de Setembro de 2012]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2001R0999:20090224:PT:PDF>

- CE (2002a) - Regulamento(CE) n° 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios [Acedido a 12 de Dezembro de 2012]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:031:0001:0024:PT:PDF>
- CE (2002b) - Regulamento(CE) n° 1774/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 3 de Outubro de 2002 que estabelece regras sanitárias relativas aos subprodutos animais não destinados ao consumo humano. [Acedido a 5 de Dezembro de 2012]. Disponível na Internet: http://pauta.dgaiec.min-financas.pt/NR/rdonlyres/28C7635C-1675-430E-A27E-4C1FD6E39A10/0/PI7_R1774_02.PDF
- CE (2003) - Regulamento(CE) n° 1234/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de Julho de 2003 que altera os anexos I, IV e XI do Regulamento (CE) n.o 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho e o Regulamento (CE) n.o 1326/2001 no que respeita às encefalopatias espongiformes transmissíveis e à alimentação dos animais [Acedido a 13 de Dezembro de 2012]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:173:0006:0013:PT:PDF>
- CE (2004) - Regulamento(CE) n° 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais [Acedido a 12 de Dezembro de 2012]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:165:0001:0141:PT:PDF>
- CE (2008) - Regulamento(CE) n° 956/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Setembro de 2008 que altera o anexo IV do Regulamento (CE) n.o 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis. [Acedido a 8 de Dezembro de 2012]. Disponível na Internet: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:260:0008:0011:PT:PDF>

- CE (2009) - Regulamento(CE) n° 52/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 2009 que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais
[Acedido a 7 de Dezembro de 2012]. Disponível na <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2009R0152:20120418:PT:PDF>
- Cohen, F. E. [et al.] (1994) - Structural clues to prion replication. "Science." 264(51994): 530-531.
- Collinge, J. [et al.] (1996) - Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. "Nature" 383 (1996) 685-690.
- COM (1999) - Livro Branco Sobre Segurança dos Alimentos. "Comissão das Comunidades Europeias". 719 Final Bruxelas (2000). [Acedido a 2 de Setembro de 2012].
Disponível na Internet:
http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/com/1999/com1999_0719pt01.pdf
- COM (2005) - The TSE Roadmap. "European comission". 322 Final Brussels (2005).
[Acedido a 3 de Setembro de 2012] .
Disponível na Internet: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/roadmap_en.pdf
- COM (2010) - The TSE Roadmap 2. "European comission". 384 Final Brussels (2010).
[Acedido a 3 de Setembro de 2012].
Disponível na Internet:
http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/docs/roadmap_2_en.pdf
- Correia, J. e A. Correia (2005) - Etiopatogenia das Prionoses Animais e suas Bases. Ordem dos médicos veterinários, [Acedido a 13 de Outubro de 2012]. Disponível na Internet:<http://www.omv.pt/biblioteca-online/publicacoes-omv/etiopatogenia-prionoses-animais-e-suas-bases>
- Doherr, M. G. (2003) - Bovine spongiform encephalopathy (BSE) infectious, contagious, zoonotic or production disease? "Acta Veterinaria Scandinavica." 98 (2003) 33-42.
- Doherr, M. G. (2007) - Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). "Vaccine" 25(2007) 5619-5624.
- Ducrot, C. [et al.] (2010) - Modelling BSE trend over time in Europe, a risk assessment perspective. "European Journal of Epidemiology." 25(2010) 411-419.

- FEFAC (2012) - Feed & Food. Statistical Yearbook 2012. Federation Europeenne des Fabricants D'Aliments Composes pour Animaux, 2012 . [Acedido a 12 de Abril de 2013] . Disponível na Internet: <http://www.fefac.eu/files/51501.pdf>
- Fumière, O. [et al.] (2009) - Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. "Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement." 12(2009) 59-70.
- Fumière, O., Baeten, V. e Berben, G. (2009) - Evaluation of the « MELISA-TEK™ RUMINANT KIT» (ELISA TECHNOLOGIES, INC., GAINESVILLE, FL, USA) for the detection of ruminant proteins in processed animal proteins. "Community Reference Laboratory for Animal Proteins in Feedingstuffs, CRL-AP Gembloux, Belgium" (2009) [Acedido a 10 de Junho de 2013]. Disponível na Internet: http://www.eurl.craw.eu/img/page/pcr/MELISA_TEK_final_report_1.pdf
- Fumière, O. [et al.] (2012a) - Implementation of the Real-Time PCR as official method of detection of PAPs in the EURL-AP network. 4 th International FEED SAFETY Conference – Methods and Challenges- Beijing, PR China (2012) [Acedido a 23 de Dezembro de 2012]. Disponível na Internet: http://feedsafety.org/fs2012/doc/lectures/L4-04_EURLAP_-_O._Fumi%C3%A8re.pdf
- Fumière, O., Marein A. e Berben G. (2012b) - Validation of a real-time PCR method developed by TNO Triskelion bv for the detection of ruminant DNA in feedingstuffs. Department Valorisation of Agricultural Products (CRA-W) (2012). [Acedido a 4 de Janeiro de 2013]. Disponível na Internet: <http://eurl.craw.eu/img/article/20120309617d721b.pdf>
- Fumière, O., Marein A. e Berben G. (2013) - EURL-AP PCR Proficiency Test (2013). [Acedido a 28 de Maio de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL-AP%20PCR%20ILS%202013%20final%20version.pdf>
- Hausermann, C. [et al.] (2010) - Surveillance and simulation of bovine spongiform encephalopathy and scrapie in small ruminants in Switzerland. "BMC Veterinary Research. " 6 (2010) 20.
- Heid C. A. [et al.] (1996) - Real time quantitative PCR." Genome Research." 6 (1996) 986-94.
- Hope, J. [et al.] (1986) - The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). "EMBO Journal." 5(1986): 2591-2597.

- Hörnlimann, B. [et al.] (2007) - Prions in humans and animals. Berlin ; New York, Walter de Gruyter, 2007. ISBN: 9783110182750.
- Imran, M. Mahmood, S. (2011) - An overview of animal prion diseases. "Virology Journal" 8 (2011) 493.
- Johnson, R. T. (2005) - Prion diseases. "Lancet Neurology." 4 (2005) 635-642.
- Konold, T. [et al.] (2012) - Experimental H-type and L-type bovine spongiform encephalopathy in cattle: observation of two clinical syndromes and diagnostic challenges. " BMC Veterinary Research." 8 (2012) 22.
- Luttmann, W. [et al.] (2006) - Immunology. "Spektrum Akademischer Verlag" (2006). ISBN: 9783827414502
- NCBI (2013) - National Center for Biotechnology Information. [Acedido a 16 de Setembro de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338070>.
- Orge, L. [et al.] (2004) - Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. "Journal of General Virology ." 85 (2004) 3487-3491.
- Oesch, B. [et al.] (1985) - A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. "Cell." 40 (1985): 735-746.
- OMS (2013) - Transmissible spongiform encephalopathies (TSE). [Acedido a 15 de Janeiro de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/bloodproducts/tse/en/>.
- Orge, L. [et al.] (2004) - Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. "Journal of General Virology ." 85 (2004) 3487-3491.
- Pegels, N., González, I. [et al.] (2013) - Detection of Fish-Derived Ingredients in Animal Feeds by a TaqMan Real-Time PCR Assay. " Food Analytical Methods" 6(2013) 1040-1048.
- Pestana, E. [et al.] (2005) - Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR applications. "Springer". Dordrech (2010). ISBN: 978-90-481-3132-7
- Pina M. F., Arun K. B. [et al.] (2005) - Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. "Caister Academic Press". West Lafayette, EUA. ISBN: 978-1-904455-00-4
- Prusiner, S. B. [et al.] (1982) - Further purification and characterization of scrapie prions. "Biochemistry" 21(1982): 6942-6950.
- Rao, Q. e Hsieh Y. H. (2007) - Evaluation of a commercial lateral flow feed test for rapid detection of beef and sheep content in raw and cooked meats. "Meat Science." 76(3) 489-494.

- Sala, C. e Ru, G. (2009) - Time trends in exposure of cattle to bovine spongiform encephalopathy and cohort effect in France and Italy: value of the classical Age-Period-Cohort approach. "BMC Veterinary Research" 5 (2009) 34.
- Salman, M. (2012) - Geographical BSE risk assessment and its impact on disease detection and dissemination. "Preventive Veterinary Medicine." 105 (2012) 255-264.
- Saunders, S. E. [et al.] (2012) - Soil-mediated prion transmission: Is local soil-type a key determinant of prion disease incidence? "Chemosphere." 87(2012): 661-667.
- Sigurdsson B. (1954) - Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. "British Veterinary Journal". 110 (1954) 341-354.
- Tschampa, H. [et al.] (2007) - Radiological assessment of Creutzfeldt-Jakob disease. "European Radiology." 17(5) 1200-1211.
- Turgeon, M. L. (2005) - Clinical Hematology: Theory and Procedures. Lippincott Williams & Wilkins. St. Louis, ISBN: 0-7817-5007-5
- UE (2013a) - Regulamento(UE) n° 56/2013 do Conselho de 16 de janeiro de 2013 que altera os anexos I e IV do Regulamento (CE) n° 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis . [Acedido a 13 de Fevereiro de 2013]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:021:0003:0016:PT:PDF>.
- UE (2013b) - Regulamento(UE) n° 51/2013 do Conselho de 16 de janeiro de 2013 que altera o Regulamento (CE) n° 152/2009 no que respeita aos métodos de análise para a determinação dos constituintes de origem animal no quadro do controlo oficial dos alimentos para animais. [Acedido a 13 de Fevereiro de 2013]. Disponível na Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:020:0033:0043:PT:PDF>.
- van Raamsdonk, L. W. D. [et al.] (2007) - New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. "Animal Feed Science and Technology". 133(2007) 63-83.
- Vana, K. [et al.] (2007) - Novel aspects of prions, their receptor molecules, and innovative approaches for TSE therapy. "Cellular and Molecular Neurobiology " 27(2007) 107-128.
- Weissmann, C. [et al.] (2002) - Transmission of prions. "Journal of Infectious Diseases" 186 (2002) 57-165.

- Wells, G. A. [et al.] (1987) - A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. "Veterinary Record." 121(1987) 419-420.
- Will, R. G. [et al.] (1996) - A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. "Lancet." 347(1996) 921-925.
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. e Atkinson, M. J. (1991) - Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. "Veterinary Record." 128(1991) 199-203.
- Yamamoto, T. [et al.] (2006) - A quantitative assessment of the risk of exposure to bovine spongiform encephalopathy via meat-and-bone meal in Japan. "Preventive Veterinary Medicine". 75 (2006) 221-238.
- Yang, Z. [et al.] (2008) - Detecting and quantifying meat meal or meat and bone meal contamination in fishmeal by visible and near infrared reflectance spectra. "Animal Feed Science and Technology." 147 (2008) 357-367.