

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE PONTOS DE CONTAMINAÇÃO POR *Salmonella* sp. E
COLIFORMES TOTAIS DURANTE O PREPARO DE DIETAS PARA SUÍNOS**

DÉBORA DA CRUZ PAYÃO PELLEGRINI

PORTO ALEGRE

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE PONTOS DE CONTAMINAÇÃO POR *Salmonella* sp. E
COLIFORMES TOTAIS DURANTE O PREPARO DE DIETAS PARA SUÍNOS**

Autora: Débora da Cruz Payão Pellegrini*

**Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, especialidade na área de
Epidemiologia.**

**Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de
Itapema Cardoso**

PORTO ALEGRE

2012

* Médica Veterinária, Msc

CIP - Catalogação na Publicação

Pellegrini, Débora da Cruz Payão
Avaliação de pontos de contaminação por Salmonella
sp. e coliformes totais durante o preparo de dietas
para suínos / Débora da Cruz Payão Pellegrini. --
2012.

145 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.
Coorientadora: Jalusa Deon Kich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2012.

1. Salmonelose. 2. pontos críticos. 3. boas
práticas de fabricação. 4. fábricas de ração. 5.
suínos. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema,
orient. II. Kich, Jalusa Deon, coorient. III. Título.

Débora da Cruz Payão Pellegrini

Avaliação de pontos de contaminação por *Salmonella* sp. e coliformes totais durante o preparo de dietas para suínos

Aprovado em 27 de março de 2012.

APROVADO POR

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADO POR

Dr. Gustavo Júlio Mello Monteiro de Lima

Membro da Comissão

APROVADO POR

Dra. Gertrudes Corção

Membro da Comissão

APROVADO POR

Dra. Mari Lourdes Bernardi

Membro da Comissão

À minha mãe, Jayra (*in memorian*) e avó Jacintha (*in memorian*),
meus maiores exemplos de moralidade e amor.

Ao meu pai José e aos meus amados irmãos, Jaísa e Daniel,
pela amizade, cumplicidade e companheirismo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para meu aperfeiçoamento e evolução.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades e possibilidades de aprendizado que tive e terei ao longo da vida.

A professora Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, pelos ensinamentos, companheirismo, generosidade e acima de tudo amizade. Serei eternamente grata por tudo.

Ao Dr. Gustavo Júlio Mello Monteiro de Lima, pelo compartilhamento de seus conhecimentos e experiências, além da disponibilidade, paciência, amizade e também pelo auxílio na elaboração dos agradecimentos (da primeira à vigésima quinta coleta).

A Dra. Jalusa Deon Kich, pela co-orientação, amizade e auxílio contínuo.

Ao professor Luis Gustavo Corbellini, pela oportunidade de trabalhar com algo que havia esquecido que gostava tanto.

A professora Monica Concha Amin, pelo auxílio nas análises estatísticas, e também pelos conselhos e amizade.

As amigas Andréia Inês Ferronato, Lilian Kolling e Caroline Pissetti pelo auxílio, cumplicidade, parceria e amizade em todos os momentos. Espero que saibam o grande carinho e gratidão que tenho por vocês, minhas irmãs de caminhada.

Ao amigo Daniel Santos Paim, pelo auxílio em todas as etapas do experimento, e especialmente pelas conversas iluminadas e alegria contagiante.

A amiga Thais de Campos, sempre com palavras meigas e incentivadoras.

A amiga e vizinha Vanessa Dias, pelo grande auxílio na execução do PFGE.

Aos colegas e amigos do laboratório Mariana Gomes Nogueira, Juliana Cafruni Calveyra, Luciane Borowsky, Priscila Guerra, Graciela Volz, Gabriela Werlang, Eduardo Costa, Héber Hein, Waldemir Santiago, Jane Both, Ellusa Assunção, Cristiane Moraes, Karla Escopelli, Everton Juffo, Tatiana Vieira, pelos bons momentos de convivência e parceria.

Aos companheiros Arielson, Walter, Miguel, Maurício, Janaína, Luís, Raquel, Beatriz, Wagner, Mariana, Adriana, Fernandão, Ricardo e Luciano, imprescindíveis na execução do projeto.

“Serve e compreende.

Serve e suporta.

Serve e constrói.

Serve e beneficia.

Tuas dificuldades – tuas bênçãos.”

EMMANUEL

Resumo

A presença de *Salmonella* é uma das mais importantes barreiras sanitárias à exportação de alimentos. A ração contaminada representa potencial fonte de introdução de *Salmonella* nos rebanhos suínos, além do risco indireto de infecção ao consumidor. Um estudo transversal conduzido em quatro fábricas de ração teve como objetivos avaliar a frequência de isolamento de *Salmonella* e coliformes totais nestas unidades, verificar a presença desses agentes nas diversas etapas do processo de produção, correlacionar grupos clonais de *Salmonella* sp. obtidos pela análise de macrorestrição associada à eletroforese em campo pulsado (PFGE), além de avaliar a concordância entre o escore obtido na aplicação de roteiro de inspeção da Instrução Normativa (IN) 4 do Ministério da Agricultura e Abastecimento e os níveis de coliformes totais encontrados. De 1.269 amostras analisadas, sessenta e três (4,96%) apresentaram *Salmonella* sp. e 38,53% (n=489) apresentaram presença de enterobactérias. As frequências de contaminação por *Salmonella* nas quatro fábricas avaliadas (A, B, C e D) foram, respectivamente, 3,5% (n=11/317), 1,7% (n=5/289), 7,1% (n=23/308) e 7% (n=25/355). Já para coliformes totais foram, respectivamente, 40,7% (129/317), 30,1% (87/289), 52,6% (162/308) e 31,3% (111/355). Nas fábricas A e D, *Salmonella* foi detectada em amostras de produto final. Estirpes apresentando genótipos semelhantes foram identificadas nos sorovares Orion, Montevideo, Worthington e Agona. Foi possível verificar que o sorovar Montevideo obteve o maior número de grupos clonais, apresentando pulsotipos distribuídos entre ingredientes, poeira, equipamentos e ração. O isolamento de *Salmonella* foi significativamente mais frequente ($p=0,002$) em amostras com a presença (36/489; 7,36%) do que com ausência de coliformes totais (27/780; 3,46%). As contagens logarítmicas médias encontradas de coliformes totais, considerando todas as amostras analisadas por fábrica, foram: A: 0,97 (IC 95%: 0,81-1,13); B: 0,78 (IC 95%: 0,61-0,94); C: 1,32 (IC 95%: 1,16-1,49) e D: 0,91 (IC 95%: 0,75-1,06). Constatou-se elevada variabilidade no número de coliformes totais em todos os pontos amostrados nas quatro fábricas, e não houve diferenças significativas entre os pontos amostrados e entre as fábricas ($p=0,174$). A regressão logística tendo como variável resposta a presença de coliformes totais apontou maiores razão de

chance (OR) de isolamento no transportador (OR=3,67; IC 95%: 2,28-5,89), dosagem (OR=9,51, IC 95%: 4,43-20,41), moagem (OR=7,1; IC 95%: 3,27-15,40), mistura (OR=4,08; IC 95%: 2,04-8,17), poeira (OR=3,50; IC 95%:2,10-5,84), resíduos (OR=6,22; IC 95%: 3,88-9,95) e fábrica C (OR=2,43; IC 95%: 1,68-3,53). Da mesma forma, o transportador (OR= 4,43; IC95%: 2,43-8,09) foi o local com maior probabilidade de isolamento de *Salmonella*, seguidos da poeira coletada nas dependências da fábrica (OR=2,88; IC95%: 1,41-5,88). Comparadas à fábrica B, as unidades C e D apresentaram, respectivamente, 2,74 e 2,83 mais chances de isolamento de *Salmonella*. Ao analisar os 128 itens necessários no Roteiro de Inspeção da IN4, a fábrica B obteve o menor número de não conformidades. Nas demais fábricas, as maiores inconformidades foram encontradas quanto à estrutura da área interna e externa das fábricas. As fábricas A e D foram as que apresentaram o maior número de itens não conformes relacionados à limpeza e higienização de equipamentos. Entre os 29 itens imprescindíveis na Avaliação de Estabelecimento e Procedimentos Operacionais Padrão, oito não foram cumpridos em pelo menos uma das fábricas. A fábrica B apresentou todos os itens em conformidade, ao passo que as fábricas A e D não cumpriram os oito itens. A fábrica C apresentou três itens não conformes, relacionados à limpeza de piso e parede, recepção e armazenamento de matérias-primas. Não houve concordância entre os escores obtidos no roteiro de avaliação e a média de coliformes totais encontrada nas fábricas, demonstrando que apenas a adequação à legislação pode não garantir a inocuidade do alimento produzido. A partir disso, conclui-se que é necessário implantar programas de monitoramento e controle microbiológico ao longo da linha de produção, independente da situação da fábrica em relação à legislação vigente. A elaboração e produção de equipamentos de fácil limpeza e com mínimo acúmulo de poeira e resíduos deve ser incluída nos programas de controle de *Salmonella* concomitante às demais medidas de controle preconizadas.

Palavras chave: Salmonelose, *Enterobacteriaceae*, pontos críticos, boas práticas de fabricação, fábricas de ração, suínos.

Abstract

The presence of *Salmonella* is one of the most important sanitary barriers to food exports. The contaminated feed is a potential source of introduction of *Salmonella* in pig herds, and may also represent a risk to the consumer. A cross-sectional study conducted in four feed mills was carried out to evaluate the frequency of isolation of enterobacteria and *Salmonella* at various stages of feed production, to identify clonal groups of *Salmonella* sp. Obtained by macrorestriction analysis associated with pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and to verify the association between the score obtained by feed mills after the application of the checklist of the Normative 4 (IN4) of the Ministry of Agriculture and Food Supply and the mean of total coliforms found in the unit. Among 1,269 samples analysed, sixty-three (4.96%) showed the presence of *Salmonella*. The four feeds mills evaluated (A, B, C and D) presented, respectively, 3,5% (n=11/317), 1.7% (n=5/289), 7,1% (n=23/308), and 7% (n=25/355) of positive samples. Total coliforms were isolated from 40.7% (129/317), 30.1% (87/289), 52.6% (162/308) e 31.3% (111/355) samples taken at unit A, B, C and D, respectively. In the units A and D, *Salmonella* was detected in samples of feed. Strains showing similar genotypes have been identified as Serovar Orion, Montevideo, Worthington and Agona. Serovar Montevideo presented the highest number of clonal groups, with common pulsotypes distributed among ingredients, dust, equipment and feed. The isolation of *Salmonella* was significantly higher ($p=0,002$) in samples with the presence of total coliforms (36/489; 7.36%) than in the negative ones (27/780; 3.46%). The mean logarithmic counts of total coliforms considering all samples were determined for each plant: A: 0.97 (95% CI: 0.81 to 1.13), B: 0.78 (95% CI: 0.61 to 0.94), C: 1.32 (95% CI: 1.16 to 1.49) and D: 0.91 (95% CI: 0.75 to 1.06). A high variability on the number of total coliforms in all the sampled points was found in all feed mills, and there was no statistical difference between the sampling sites and units ($p=0.174$). The logistic regression, with isolation of total coliforms as the response variable, showed a high odds ratio (OR) of isolation from conveyors (OR = 3.67, 95% CI: 2.28 to 5.89), dosing (OR = 9.51, 95% CI: 4.43 to 20.41), grinding (OR = 7.10, 95% CI = 3.27 to 15.40), mixing (OR = 4.08, 95 % CI: 2.04 to 8.17), dust (OR = 3.50, 95% CI: 2.10 to 5.84), crusts (OR

= 6.22, 95% CI: 3.88 to 9.95) and unit C (OR = 2.43, 95% CI: 1.68 to 3.53). The conveyors (OR = 4.43, 95% CI: 2.43-8.09) were the most likely sites of isolation of *Salmonella*, followed by the dust collected on the premises of the plant (OR = 2.88, 95% CI: 1.41-5.88). Feed mills C and D showed, respectively, 2.74 and 2.83 higher odds for *Salmonella* isolation than feed mill B. The verification of the 128 items addressed on the Guidelines for Inspection of Normative 4 (IN 4) of the Brazilian Ministry of Agriculture and Food Supply pointed out that factory B had the lowest number of nonconformities. The other three feed mills, presented most faults related to the physical structure of the facilities. Feed mills A and D presented the largest number of nonconformities related to cleaning and sanitizing of equipment. Among the 29 mandatory items in IN4, eight were not met in at least one of the factories. Feed mill B presented all items accordingly, while plants A and D did not meet any of the eight items. Feed mill C had three non-compliant items related to the floor and wall cleaning, reception and storage of raw materials. There was no association between the score obtained on the inspection checklist and the level of total coliforms found in the sampled units, demonstrating that only the compliance to the legislation cannot guarantee the safety of feed produced. It was concluded that programs for monitoring and control microbial contamination throughout the production line are needed, regardless of the status of the plant in the relation to the current legislation. The design of equipment that allow easy cleaning and with minimal accumulation of dust and debris should be added to other measures in *Salmonella* control programs.

Keywords: Salmonellosis, Enterobacteriaceae, critical points, good manufacturing practices, feed mills, pigs.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Fluxograma dos processos realizados em uma fábrica de ração _____ 33

CAPÍTULO III – PRIMEIRO ARTIGO

FIGURA 1 – Fluxograma de produção adotado nas fábricas de ração amostradas no estudo. A = fluxo de produção de ração farelada; B = fluxo de produção de ração peletizada _____ 58

CAPÍTULO IV – SEGUNDO ARTIGO

FIGURA 1 – Fluxograma de produção adotado nas fábricas de ração amostradas no estudo. A = fluxo de produção de ração farelada; B = fluxo de produção de ração peletizada _____ 78

FIGURA 2 – Perfil de macrorestrição de isolados de *Salmonella* pertencentes aos sorovares Montevideo, Infantis, Orion e Worthington após clivagem com as enzimas *XbaI* e *BlnI* e eletroforese em campo pulsado (PFGE) _____ 93

FIGURA 3 – Perfil de macrorestrição de isolados de *Salmonella* pertencentes aos sorovares Tennessee, Senftenberg e Agona após clivagem com as enzimas *XbaI* e *BlnI* e eletroforese em campo pulsado (PFGE) _____ 94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III – PRIMEIRO ARTIGO

- TABELA 1 – Número de itens não conformes no grupo de itens classificados como necessários no roteiro de inspeção (IN 4), em quatro fábricas de ração (A, B, C, D) _____ 62
- TABELA 2 – Itens do Roteiro de Inspeção (IN 4) classificados como imprescindíveis e que estavam não conformes nas fábricas de ração (A, B, C, D) _____ 63
- TABELA 3 – Frequência de amostras positivas para coliformes totais em quatro fábricas de ração (A, B, C, D), de acordo com a área de produção amostrada _____ 64
- TABELA 4 – Número médio de coliformes totais (Log ufc.g⁻¹) e desvio padrão encontrados em amostras positivas colhidas em diferentes áreas de processamento de quatro fábricas de ração _____ 64
- TABELA 5 – Razão de Chances (*Odds ratio* –OR), Intervalo de Confiança (95%) e valor de p obtidos no modelo de regressão logística _____ 65

CAPÍTULO IV – SEGUNDO ARTIGO

- TABELA 1 – Frequência de amostras positivas para *Salmonella* sp. em quatro fábricas de ração (A, B, C, D), de acordo com a área de produção _____ 83
- TABELA 2 – Pulsotipos apresentados por isolados pertencentes a sete sorovares de *Salmonella* identificados em quatro fábricas de ração (A, B, C, D) _____ 84
- TABELA 3 – Frequência de amostras positivas para coliformes totais em quatro fábricas de ração, de acordo com as áreas de produção _____ 85
- TABELA 4 – Frequência de *Salmonella* nas áreas e fábricas de ração, incluídas no modelo de regressão logística, e Razão de Chance (OR) de seu isolamento _____ 85

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Caracterização do gênero <i>Salmonella</i>	18
2.2 <i>Salmonella</i> sp. em humanos	19
2.3 <i>Salmonella</i> sp. em suínos	22
2.4 A ração como veículo de transmissão de <i>Salmonella</i>	25
2.5 O processo de produção de ração	31
2.6 A presença de <i>Salmonella</i> sp. em fábricas de ração	37
2.7 Estratégias empregadas no monitoramento e controle da contaminação por <i>Salmonella</i> em fábricas de ração	41
CAPÍTULO III – PRIMEIRO ARTIGO	
Aplicação de roteiro de inspeção de boas práticas de fabricação e avaliação da contaminação por coliformes totais em estabelecimentos fabricantes de alimentos para suínos	51
RESUMO	51
ABSTRACT	53
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 Delineamento do estudo	57
2.2 Caracterização das fábricas de ração	57
2.3 Aplicação do roteiro de inspeção	59
2.4 Coleta de amostras para pesquisa de coliformes totais	60
2.5 Isolamento e enumeração de coliformes totais	60
2.6 Análise de dados	61
3. RESULTADOS	62
4. DISCUSSÃO	65
5. CONCLUSÃO	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

CAPITULO IV – SEGUNDO ARTIGO	
Identificação de grupos clonais de <i>Salmonella</i> e enumeração de coliformes totais em diferentes etapas do processo de produção de quatro fábricas de ração brasileiras _____	73
RESUMO _____	73
ABSTRACT _____	74
1. INTRODUÇÃO _____	76
2. MATERIAL E MÉTODOS _____	77
2.1 Delineamento de estudo _____	77
2.2 Caracterização das fábricas de ração _____	78
2.3 Coleta de amostras para pesquisa microbiológica _____	79
2.4 Pesquisa qualitativa de <i>Salmonella</i> sp. _____	80
2.5 Enumeração de coliformes totais _____	80
2.6 Genotipagem por Eletroforese em campo pulsado (PFGE) _____	81
2.7 Análise Estatística _____	81
3. RESULTADOS _____	82
4. DISCUSSÃO _____	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	89
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO _____	95
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES _____	100
CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	101
ANEXOS _____	111

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

A carne suína é a proteína mais consumida no mundo, com uma produção anual de 115 milhões de toneladas. Atualmente, a China é responsável pela metade da produção mundial, seguida dos países da União Européia (UE) e Estados Unidos da América (EUA). O comércio internacional de carne suína movimenta cerca de 5,4 milhões de toneladas, gerando uma receita anual de 11,9 bilhões de dólares. Este mercado está concentrado em cinco países importadores (Japão, Federação Russa, México, Coréia do Sul e Hong Kong), sendo EUA, UE, Canadá, Brasil e China detentores de 96% das exportações mundiais (ABIPECS, 2010).

A “criação de porcos” do passado obrigou-se a evoluir, tanto na técnica quanto no modelo de coordenação das atividades entre fornecedores de insumos, produtores rurais, agroindústrias, atacado, varejo e consumidores, tornando-se uma cadeia de produção de suínos que explora a atividade de forma econômica e competitiva (GONÇALVES & PALMEIRA, 2006). O Brasil ocupa, hoje, a posição de quarto maior produtor mundial, com 3% da produção e 11% das exportações. A produção de 3,24 milhões de toneladas em 2010 foi responsável pela movimentação de 1,340 bilhão de dólares (ABIPECS, 2011).

Historicamente, a suinocultura apresenta-se como um setor importante para o desenvolvimento econômico do Rio Grande do Sul. No início, a atividade estava ligada à obtenção de banha, mas, a partir de 1960, com o advento das gorduras vegetais e mudanças no hábito alimentar da população, houve uma diferenciação para produção de carne com menor teor de gordura. Paralelamente, o desenvolvimento da avicultura no estado, cuja tecnologia empregada possibilitou a produção de proteína animal de boa qualidade e baixo custo, estimulou o desenvolvimento de sistema integrado na produção de carne suína (TEJADA & COSTA, 2002). Sob este contexto, o estado do Rio Grande do Sul hoje figura como um dos maiores exportadores de carne suína no Brasil, seguido pelos estados de Santa Catarina e Paraná (ABIPECS, 2011).

A abertura de novos mercados implica diretamente em qualidade, inocuidade, rastreabilidade e competitividade. Pelas regras da Organização

Mundial do Comércio (OMC), os países importadores têm o direito de fazer exigências sanitárias mais rígidas do que os padrões estabelecidos internacionalmente ao comprovar plausibilidade lógica e científica. Desde que o acordo “Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias” (SPS – Sanitary and Phytosanitary Measures) entrou em vigor, em 1995, 24 notificações foram relacionadas à *Salmonella* (OMC, 2011). Hoje, a presença de *Salmonella* consiste em uma das mais importantes barreiras sanitárias à exportação, por implicar em rejeição do produto e rescisão do contrato de exportação. Embora as restrições sejam impostas por clientes externos, o risco de transmissão ao consumidor brasileiro também deve ser considerado, uma vez que são destinadas para o mercado interno mais de 2.677 milhões de toneladas de carne por ano (ABIPECS, 2011). Esse cenário tem motivado a busca por novas alternativas tecnológicas para resolução do problema.

Pesquisas realizadas no sul do Brasil evidenciaram a ampla distribuição da infecção por *Salmonella* nos rebanhos suínos. Os dados de prevalência de portadores ao abate na Região Sul variam de 55 a 77% (WEISS et al., 2002; BESSA et al., 2004; KICH et al., 2004; KICH et al., 2005a; SCHWARZ et al., 2009). Especificamente em um frigorífico, 83% de animais positivos resultaram em 94% de contaminação em amostras de massa para embutidos (CASTAGNA et al., 2004). Outro estudo demonstrou a detecção de *Salmonella* em 24% das carcaças prontas para comercialização (KICH et al., 2006). Segundo estimativas do Sindicato das Indústrias de Produtos Suínos RS/SC, a quantidade de produto devolvido pelos importadores varia entre 1 a 5% ao ano. Considerando os dados de 2011 e o custo da tonelada de R\$ 4.892,00, se apenas 1% do volume exportado fosse rejeitado devido à contaminação por *Salmonella*, o setor deixaria de faturar 27 milhões de reais no ano. Existindo condições de retorno para o mercado interno, calcula-se um prejuízo em torno de 25% deste valor acrescido do custo do frete.

A Salmonelose é considerada uma das zoonoses transmitidas por alimentos de maior relevância para a saúde pública. Nos EUA são estimados 1,4 milhão de casos de salmonelose a cada ano, com 15 mil internações e 400 óbitos (SHAKESPEARE, 2009). Os produtos de origem animal (principalmente oriundos de aves e suínos) desempenham um importante papel na transmissão

de *Salmonella* para os humanos (BERENDS et al., 1998). Apesar do grande número de estudos realizados, a interação entre *Salmonella*, hospedeiro e meio ambiente, ainda não foi completamente elucidada. Vários trabalhos relatam que somente a intervenção na propriedade, visando reduzir a prevalência de *Salmonella* nos animais não tem sido eficaz. Um bom nível de higiene e a realização de vazio sanitário (“all-in all-out”) não foram suficientes para reduzir os níveis de transmissão em diversas circunstâncias. Desse modo, a ração torna-se um importante fator a ser também considerado nos programas de controle de *Salmonella* no pré-abate, principalmente pelo elevado tempo de sobrevivência da bactéria em produtos estocados (DAVIES & HILTON, 2000).

Um relatório intitulado “Avaliação de riscos microbiológicos em alimentos destinados a animais de produção” elaborado pela European Food Safety Authority (EFSA), em 2008, identificou *Salmonella* sp. como o maior perigo microbiológico passível de estar presente na ração animal. Outros micro-organismos de grande importância como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Clostridium* sp. foram considerados de menor importância. As farinhas de oleaginosas e de origem animal foram destacadas como os ingredientes com maior risco de introduzir a contaminação por *Salmonella* nas fábricas de ração e no produto final. Foi ressaltada a importância de estudos com o objetivo de avaliar a prevalência de *Salmonella* nos ingredientes, produtos finais e também ao longo do processo de produção, a fim de auxiliar na busca de soluções eficazes no controle da contaminação durante a produção de ração animal. Além do risco reconhecido da veiculação de *Salmonella* via ração para animais e humanos, alguns estudos (JOHNSON et al. 2005; LYNNE et al., 2009; MOLLA et al., 2010) têm relatado a emergência de isolados de *Salmonella* provenientes de produtos finais e ingredientes apresentando perfis de multi-resistência a antimicrobianos, demonstrando a grande relevância na detecção dessas estirpes na ração animal.

Exigências cada vez maiores na área de comércio internacional, quanto à produção de um alimento inócuo à saúde do consumidor, reforçam a necessidade de maior adequação e abrangência nas regras para produção de ração. Sob este contexto, em 2006, o Sindicato Nacional de Indústria de Alimentação Animal (Sindirações) redefiniu a estrutura do seu programa de

certificação visando padronizar as informações relacionadas à segurança dos alimentos. Utilizando os mais recentes tópicos e tendências da produção internacional de alimentos, o novo programa recebe o nome “Feed & Food Safety” – Gestão do Alimento Seguro, e apresenta três opções de certificações: 1) Certificação para Boas Práticas de Fabricação (BPF), 2) Certificação para Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e 3) Certificação com Equivalência Internacional. No ano seguinte, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) revogou a Instrução Normativa 1 (IN1), colocando em vigência a IN 4, que consiste no regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal e um roteiro de inspeção das fábricas.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos:

- analisar a frequência de isolamento de *Salmonella* sp. em quatro plantas produtoras de alimentos para suínos, visando detectar a presença deste micro-organismo em diversas etapas do processo de produção;
- definir possíveis pontos críticos de contaminação e recontaminação na linha de produção;
- identificar e correlacionar grupos clonais de *Salmonella* sp. utilizando a análise de macrorestrição por eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE);
- avaliar a concordância entre o escore obtido na aplicação do roteiro de inspeção instituído pela IN 4 e a quantificação de coliformes totais ao longo do processo de produção, verificando se este indicador é capaz de refletir as reais condições higiênico-sanitárias das fábricas de ração e fornecer um panorama sobre as fábricas quanto às instalações e implantação de programas de qualidade.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram negativos, móveis por flagelos peritríqueos (exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*), anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos. Fermentam glicose, frequentemente com produção de gás, reduzem nitrato em nitrito e são indol, urease e oxidase negativos. Descarboxilam lisina e ornitina e apresentam crescimento em citrato de Simmons. Não fermentam a lactose e produzem gás sulfídrico (H₂S) a partir do tiosulfato (GRIMONT et al., 2000). Os microrganismos deste gênero são mais resistentes a novobiocina, selenito, tergitol e sais biliares do que outros membros da família *Enterobacteriaceae* (GRIMONT et al., 2000). Algumas dessas características fenotípicas são tão específicas que são utilizadas para auxiliar nas etapas de enriquecimento, isolamento seletivo e diferenciação das colônias.

Desenvolvem-se em temperatura de refrigeração (4 a 10°C), com crescimento ótimo entre 25 e 43°C; entretanto, não sobrevivem a temperaturas superiores a 55°C. Suportam uma faixa de pH entre 3,6 a 9,5, apresentando um pH ótimo próximo da normalidade. Podem resistir à desidratação durante um tempo prolongado, sobrevivendo por até nove meses em solo úmido e sombreado, cerca de um ano em instalações avícolas e mais de dois anos em ração (GARCIA & HEREDIA, 2009; QUINN et al., 2011).

O gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (BRENNER et al., 2000). A inclusão de uma terceira espécie, *S. subterranea*, foi proposta (SHELOBOLINA et al., 2004), porém essa modificação não está consolidada (TINDALL et al., 2005). *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (SONGER & POST, 2005).

Ao lado da subdivisão em espécies e subespécies, semelhante à adotada para os demais gêneros bacterianos, o esquema de Kauffman-White, que classifica os membros do gênero *Salmonella* em sorotipos ou sorovares,

tem ampla utilização. Esse esquema baseia-se na diversidade antigênica determinada por três tipos de antígenos: somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (VI). Já foram identificados mais de 2.500 sorovares, os quais não podem ser diferenciados bioquimicamente, sendo a grande maioria pertencentes à subespécie *S. enterica enterica* (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008). Entretanto, apenas um número limitado de sorovares é encontrado na rotina de diagnóstico. O Centro Nacional de Referência de *Salmonella* e *Shigella* da França divulgou que as 19.174 cepas isoladas de humanos, naquele laboratório, estavam distribuídas entre 194 sorovares. Cerca de quinze sorovares representaram 91% das cepas, sendo 69% de todos os isolados de humanos representados pelos sorovares Typhimurium e Enteritidis (GRIMONT et al., 2000).

A classificação da *Salmonella* também pode ser realizada de acordo com a adaptação aos hospedeiros, onde os sorovares são divididos em três grupos. Os sorovares hospedeiro-específicos causam doença sistêmica em um limitado número de espécies relacionadas filogeneticamente. Desse modo, *S.Typhi*, *S.Gallinarum* e *S.Abortusovis* estão associadas a infecções em humanos, aves e ovinos, respectivamente. Os sorovares hospedeiro-restritos estão primariamente associados a uma ou duas espécies de hospedeiros, raramente causando doença em outras espécies. Exemplo destes sorovares são *S.Dublin* e *S.Choleraesuis*, geralmente associadas a infecções generalizadas em ruminantes e suínos, respectivamente. Já os sorovares ubiqüitários, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* podem induzir gastroenterite em um grande número de hospedeiros não relacionados (BARROW et al., 2010).

2.2 *Salmonella* sp. em humanos

Nos EUA, utilizando dados de vigilância passiva e ativa de 2000 a 2007, foi possível estimar que 31 micro-organismos associados a doenças transmitidas por alimentos (DTA) foram responsáveis por 9,4 milhões de casos anuais, gerando 55.961 internações e 1.351 mortes. Quanto à etiologia, 58% dos casos foram causados pelo Norovírus, seguido de *Salmonella* spp. não

tifoide (11%), *Clostridium perfringens* (10%) e *Campylobacter* spp. (9%). Como principal causa de hospitalizações e de mortalidade, *Salmonella* sp. foi responsável por 35% e 28% dos casos, respectivamente (SCALAN, 2011). Os produtos de origem animal são considerados os principais veiculadores de *Salmonella enterica* não tifoides (CRUMP et al., 2002). De acordo com um relatório publicado pelo Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), em 2008 nos EUA, a maioria dos surtos foi atribuída ao consumo de carne de aves (15%), carne bovina (14%) e peixes (14%). Outros alimentos como as frutas, nozes e vegetais também foram associados aos surtos, porém em menor frequência (CDC, 2011).

Entre os anos de 2000 a 2011, o Brasil notificou 8.451 surtos de DTA, ignorando quais alimentos estariam envolvidos em 40,48% dos casos. Dentre os produtos de origem animal, 10,76% (n=909) estariam associados a ovos e derivados; 4,24% (n=358) à carne bovina in natura, processados e miúdos; 2,66% (n=225) à carne de aves in natura, processados e miúdos e 2,24% (n=189) à carne suína in natura, processados e miúdos. Os agentes etiológicos isolados com maior frequência foram *Salmonella* sp. (19,64%), seguida de *Staphylococcus aureus* (9,45%), *Escherichia coli* (4,86%), *Bacillus cereus* (3,55%) e *Clostridium perfringens* (2,25%). Excluindo os surtos sem informação, 44,32% ocorreram em residências e 15,34% em restaurantes e padarias (SVS, 2011).

Ante a compreensão da biologia de certas estirpes relacionadas a surtos em humanos, é imprescindível a verificação de correlação entre a virulência e presença dos genes plasmidiais relacionados à expressão desta, além da análise dos perfis de suscetibilidade a antimicrobianos. Um estudo realizado no sul do Brasil demonstrou que 97% (73/75) das estirpes isoladas em alimentos associados a surtos de toxinfecções alimentares nos anos de 1999 e 2000 pertenciam ao sorovar Enteritidis, sendo que 82,7% (62/75) destes isolados apresentavam o gene regulatório plasmidial *spvR*, relacionado à virulência bacteriana (GEIMBA et al., 2004). Já outro estudo realizado por Paula et al. (2011) avaliou a suscetibilidade aos antimicrobianos de 130 isolados envolvidos em surtos de salmonelose no estado do Rio Grande do Sul (RS) entre 2003 a 2006, encontrando 87,7% (114/130) pertencentes ao sorovar

Enteritidis e elevados índices de resistência aos antimicrobianos ampicilina (100%) e ácido nalidíxico (47,7%). Dos 57 perfis de suscetibilidade, a multi-resistência foi observada em 63,16% das amostras.

Com exceção dos sorovares Typhi e Paratyphi (particularmente A e C), que são hospedeiro-específicos para humanos, todas as demais infecções provocadas pelo gênero *Salmonella* são consideradas zoonoses. A salmonelose provoca uma grave gastroenterite em humanos, caracterizada por um período de incubação de 6 a 72 horas após a ingestão e pela manifestação clínica de febre súbita, mialgia, cefaléia e mal-estar. Os principais sintomas consistem em dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia. Normalmente a doença tem um curso benigno, culminando na recuperação clínica em dois a quatro dias após início da sintomatologia clínica. A infecção pode ocorrer em indivíduos de todas as idades, desde a forma inaparente até quadros de septicemia. Uma pequena proporção de pacientes acometidos por outras enfermidade (AIDS, neoplasias, diabetes) pode sofrer bacteremia, com o comprometimento de diversos tecidos e órgãos, como pulmão, pleura, articulações e, raramente, endocárdio. Crianças com idade inferior a cinco anos e idosos são mais suscetíveis a apresentar complicações decorrentes da infecção (ACHA & SZYFRES, 2000, SHAKESPEARE, 2009).

Dos sorovares hospedeiro-restritos, o Choleraesuis pode provocar doença grave em humanos (SIRICHOTE et al., 2010), podendo desencadear septicemia, esplenomegalia e febre alta, poucos dias e semanas após o início da gastroenterite. Nestes casos, a bacteremia ocorre em mais de 50% dos pacientes e a taxa de letalidade pode chegar a 20%. Outros sorovares como Sendai e Dublin também podem desencadear quadros de septicemia (febre entérica) e abscessos metastáticos. O sorovar mais associado a quadros com elevada mortalidade é o Typhimurium DT104, apresentando taxas de mortalidade de 3%, principalmente em pessoas idosas (SHAKESPEARE, 2009).

2.3 *Salmonella* sp. em suínos

A implantação de programas de controle de *Salmonella* sp. na suinocultura mundial iniciou após um surto na Dinamarca, envolvendo 550 pessoas, no ano de 1993 (WEGENER & BAGGESEN, 1994). Um relatório da DTU Food – National Food Institute (PIRES et al., 2011) com o objetivo de avaliar a contribuição relativa de diversos alimentos e fontes de origem animal na infecção em humanos estimou que a ave poedeira é a principal fonte de *Salmonella* na UE, contribuindo com 43,8% dos casos (IC 95%: 43,2-44,4%), seguida por suínos (26,9%; IC 95%: 26,3-27,6%), perus (4,0%; IC 95%: 3,8-4,3%) e frangos (3,4%; IC 95%: 3,1-3,7%). Apesar dos alimentos de origem avícola estarem, mundialmente, associados a surtos de salmonelose em humanos, neste relatório foi possível verificar que produtos de origem suína também desempenham importante papel como fonte de infecção para humanos.

A Salmonelose suína pode ser considerada sob duas perspectivas. A primeira caracteriza-se pela manifestação clínica de septicemia e enterocolite ou infecções locais como pneumonia e hepatite, associada ao sorovar hospedeiro-restrito Cholerasuis; e a segunda representada por outros sorovares ubiqüitários como Typhimurium, frequentemente relacionados a toxinfecções alimentares. Ocasionalmente, o sorovar Cholerasuis também pode estar associado a episódios de meningite, encefalite e aborto, enquanto o sorovar Typhimurium tem sido associado à doença clínica em suínos, causando principalmente enterocolite e septicemia (GRIFFITH et al., 2006; BERGERON et al., 2010; BARROW et al., 2010).

Suínos carreadores podem eliminar *Salmonella* nas fezes de forma contínua ou intermitente. Cerca de 5 a 30% dos suínos podem excretar *Salmonella* sp. no final da terminação, e este percentual pode dobrar durante o transporte e descanso pré-abate (BERENDS et al, 1996; ROSTAGNO, 2002). Fatores estressantes específicos como jejum hídrico de 12 horas antes do abate, restrição alimentar, transporte e mistura de animais potencializam a eliminação da *Salmonella* pelos portadores e, também, aumentam a

suscetibilidade de animais não infectados (BERENDS et al, 1996; GRIFFITH et al., 2006).

Há uma forte correlação entre número de animais vivos que carregam e eliminam *Salmonella* sp. nas fezes e número de carcaças contaminadas no final do abate. Berends e colaboradores (1997) afirmaram que os suínos carregadores apresentam três a quatro vezes mais chance de terminar o abate como carcaças contaminadas do que animais livres deste micro-organismo. Sorensen e colaboradores (2004) ao verificarem uma forte associação entre sorologia e o isolamento de *Salmonella* em amostras de fezes, faringe e superfície de carcaças, concluíram que a chance de isolamento variou de 1,3 a 1,5 para cada aumento de 10% na prevalência do rebanho ($p < 0,0001$). Estudos recentes abordam a magnitude do ambiente pré-abate na contaminação das carcaças. Resultados apresentados por Lettelier et al. (2009) indicaram a limpeza dos animais antes do abate ($p = 0,008$) e contaminação da água da escaldagem ($p = 0,005$) como significativamente associados à presença de *Salmonella* nas carcaças e no processamento final de abate. As carcaças provenientes de lotes com soroprevalência superior a 20 % apresentaram cinco vezes mais chance de originarem carcaças positivas quando comparados a lotes soronegativos, e três vezes mais chance do que rebanhos com prevalência inferior a 20%. Duggan et al. (2010) mensuraram a contaminação cruzada no ambiente do abatedouro como responsável por 69% da positividade nas carcaças por *Salmonella*, sendo este resultado atribuído aos trabalhadores e equipamentos da planta frigorífica. Enquanto Dorr et al. (2009) e De Busser et al. (2011) caracterizam a baia (ou pocilga) de espera como a principal fonte de contaminação por *Salmonella* no abate, Silva (2011) destacou a grande importância das etapas até a flambagem (principalmente espera e depilação) na disseminação de grupos clonais no abate. Entretanto, o direcionamento de medidas priorizando apenas uma etapa da cadeia de produção (pré-abate, abate ou pós-abate) não é capaz de auxiliar no controle do problema.

As principais fontes de infecção por *Salmonella* discutidas na literatura estão, comprovadamente, presentes em nosso sistema de produção. Em granjas de terminação e de ciclo completo no sul do Brasil (KICH et al., 2005), o destino dos dejetos, acesso de animais à ração, fornecimento de ração

peletizada, trânsito de pessoas e tipo de manejo de limpeza e desinfecção na granja durante o vazio sanitário foram identificados como fatores de risco; de modo que a mensuração da magnitude destes fatores em empresas integradoras de diferentes regiões do Brasil torna-se necessária. Além da ração peletizada (OR=8,2; p=0,001), Wilkins et al. (2009) encontraram também o contato naso-nasal entre lotes como fator de risco associado ao aumento na prevalência por *Salmonella* sp. Programas de controle estabelecidos na granja devem ter como ponto de partida a correção de fatores de risco. Esses, por sua vez, precisam ser corretamente identificados e validados para que haja sucesso no programa proposto. Estudos realizados até o momento demonstram que fatores de risco como tipo e qualidade da ração fornecida aos animais e medidas de biossegurança adotadas na granja são frequentemente considerados de extrema importância (VAN DER WOOLF et al., 2001; LO FO WONG et al., 2004; KICH et al., 2005). Entretanto, em todos os estudos mencionados, observou-se uma grande variabilidade quanto aos fatores de risco definidos em diferentes países, tipos de granja (terminação ou creche) e sistemas de produção, levando a concluir que diferentes empresas integradoras poderão ter diferentes fatores de risco a serem corrigidos, indicando a necessidade de adequação nos protocolos de manejo de acordo com a realidade observada.

A última fase de produção dos suínos é caracterizada pela maior negligência quanto à adoção de medidas de biossegurança, ocorrendo mistura de animais de várias origens e inclusão de ingredientes de origem animal na ração. Por se tratar da fase mais próxima ao abate, a ocorrência destes fatores aumenta o risco de entrada de *Salmonella* no frigorífico. A terminação tem sido identificada como a fase onde a infecção por *Salmonella* é amplificada (BERENDS et al., 1996; FUNK et al., 2001; LO FO WONG et al., 2004), ao mesmo tempo em que a prevalência de animais positivos na fase de creche foi apontada como o principal fator de risco relacionado a essa amplificação (LO FO WONG et al., 2004). No Brasil, os resultados indicam a terminação como sendo uma fase crítica na maioria dos rebanhos (MULLER, 2005; SILVA et al., 2006; SCHWARZ et al., 2009), porém observa-se que, em alguns sistemas

integrados, os animais podem sofrer infecção ainda na fase de creche (KICH et al., 2004; SCHWARZ, 2010).

No Brasil, Kich e colaboradores (2006) acompanharam doze lotes de terminação de uma agroindústria, do alojamento ao abate. Nesse estudo, encontraram *Salmonella* em 26% das amostras ambientais colhidas em granjas de terminação antes do alojamento de animais, 29% de amostras de ração, 90% de amostras provenientes de baias de espera no frigorífico. Ainda, verificaram que 49% dos animais durante o alojamento nas granjas de crescimento e terminação excretavam a bactéria nas fezes. No frigorífico, 67% dos animais eram portadores de *Salmonella* nos linfonodos mesentéricos e a frequência de contaminação das carcaças desses lotes, após 24 horas de refrigeração, foi de 24%. Este fato demonstra que, apesar da adoção de medidas de controle e programas de qualidade implantados pelas agroindústrias, ainda é possível detectar a presença de *Salmonella* no produto final.

Os resultados obtidos até o momento no sul do Brasil comprovaram a alta prevalência de portadores ao abate, entre 55 e 77%, sendo a maioria atribuível à infecção ocorrida na granja (BESSA et al., 2004; SCHWARZ et al., 2009). A prevalência de carcaças contaminadas foi estimada em 23,85% por Kich et al. (2006) e 14,7% por Silva (2011), enquanto que, em linhas de abate com alta prevalência de suínos portadores, em média 90% das amostras de massa para elaboração de embutidos apresentaram presença de *Salmonella* sp. (CASTAGNA et al., 2004). Já a prevalência em amostras de linguiça frescal suína amostradas em supermercados de Porto Alegre (RS) encontrada por Mürmann et al. (2009) foi 24,4%. Contrariamente aos dados observados no sul do Brasil, índices inferiores de morbidade foram observados em suínos abatidos em outros estados, como 2,7% em São Paulo (TEIXEIRA, 2006) e 16,6% no Mato Grosso (SILVA et al., 2009).

2.4 A ração como veículo de transmissão de *Salmonella*

Salmonella sp. pode sobreviver por períodos prolongados, que vão de meses até quatro anos, em rações estocadas a temperatura ambiente

(D'AOUST & SEWELL, 1986; DAVIES & HILTON, 2000). Quando há contaminação, os níveis vão de poucas células a $8E+04 \text{ kg}^{-1}$ de *Salmonella* na ração (SAULI et al., 2005). A taxa de multiplicação de uma única célula deste micro-organismo na ração pode ser alta em determinadas temperaturas (21 a 42°C), chegando a níveis de 10^5 a 10^6 no período de 48 horas em amostras de farelo de soja úmido (ISRAELSEN et al., 1996). O fornecimento de ração contaminada já foi amplamente descrito como fonte de infecção de *Salmonella* sp. para suínos e seu monitoramento constitui um ponto crucial nos programas de controle (ALBAN et al., 2002; MULLER, 2005; SILVA et al., 2006, GRIFFITH et al., 2006). Entretanto, há dificuldade na obtenção de uma amostra representativa de ração, tanto na fábrica quanto na granja, o que resulta no não reconhecimento, em alguns estudos, como um fator de importância na infecção dos animais (FUNK et al., 2001; KICH et al., 2005).

A falta de comparabilidade entre os métodos de detecção e amostragem podem introduzir vieses nos riscos estimados, principalmente quando os resultados de diferentes tipos de estudos são analisados da mesma forma. A contaminação da ração é avaliada qualitativamente, sendo raro o trabalho que quantifica micro-organismos no produto analisado. O tamanho (peso e volume) das alíquotas coletadas normalmente é arbitrário, assim como não há recomendações na literatura quanto à frequência e intensidade (número de alíquotas por ponto) que deveriam ser amostradas para realizar uma avaliação correta (DAVIES et al, 2000; MALORNY et al., 2008).

Tanto os ingredientes quanto a ração animal são caracterizados por serem produtos com baixa atividade de água (0,4 a 0,65), de modo que as células de *Salmonella* permanecem desidratadas. Por esta razão, os métodos de isolamento em ração devem ser capazes de recuperar e multiplicar células lesadas. Apesar da pouca atenção dada aos procedimentos de amostragem, é sabido que o peso da amostra (ou volume) e a homogeneidade têm um profundo impacto nos métodos de detecção de *Salmonella* na matriz, principalmente ao considerar que a sensibilidade nas etapas de enriquecimento seletivo é influenciada pela concentração relativa do agente e pela presença concomitante de outros microrganismos (DAVIES et al., 2000; MALORNY et al., 2008). Maciorowski e colaboradores (2000) estimaram a sensibilidade dos

métodos de detecção na ordem de 50% em amostras de ração contendo aproximadamente 40 organismos por grama, encontrando grande variação entre as matrizes, devido à ampla variabilidade de micro-organismos competidores. Salomonsson e colaboradores (2005) mensuraram que os níveis da microbiota competidora em diferentes ingredientes (incluindo resíduos) estão entre 10^2 a 10^7 /g. Koyuncu e Häggblom (2009), ao comparar três metodologias amplamente utilizadas no isolamento de *Salmonella* (NMKL71, Rappaport Vassiliadis semi-sólido modificado e ISO6579:2002) em diferentes ingredientes empregados no preparo de ração animal (grãos de trigo, farelo de soja, farelo de semente de colza, farinha de semente de palma), ração peletizada para suínos e resíduos presentes nos elevadores da fábrica de ração, não encontraram diferença significativa quanto aos níveis de detecção, com acurácia, sensibilidade e especificidade de 65%, 56% e 97%, respectivamente. Entretanto, os níveis de detecção para os diferentes ingredientes e para a ração variaram consideravelmente devido à presença de uma microbiota competidora intrínseca.

O padrão “negativo para *Salmonella*” na ração implica na adoção de melhorias nos processos de controle e análise do produto final (ausência para *Salmonella*). O uso do termo “negativo para *Salmonella*” ao invés de “livre de *Salmonella*” refere-se à impossibilidade de exclusão completa de células viáveis do microrganismo na ração. Portanto, qualquer padrão negativo deveria ser relativo e não absoluto, com limites de detecção aceitáveis determinados de acordo com o protocolo de amostragem e sensibilidade dos testes empregados (DAVIES et al., 2004).

Poucos trabalhos são capazes de associar casos de toxinfecções em humanos a contaminação presente na ração. As possíveis razões para a não associação são a falta de recursos, dificuldades em relacionar o alimento aos lotes de origem, inexistência de identificação e rastreabilidade, e limitação de análises e registros dos ingredientes e matérias-primas. Os estudos epidemiológicos sobre surtos de toxinfecções em humanos, incluindo a investigação nas fazendas, raramente estendem-se à avaliação microbiológica da qualidade dos insumos e ingredientes. Além disso, a vigilância nas rações realizada para verificar a contaminação bacteriana não é suficientemente

desenvolvida para integrar-se com a vigilância dos produtos de origem animal, a ponto de conseguir discriminar a real proporção de casos humanos atribuível à contaminação das rações (CRUMP et al, 2002). Entretanto, similarmente aos humanos, os animais se infectam oralmente através da ingestão de alimentos contaminados. Se os sorovares isolados nos ingredientes e na ração incluem aqueles que podem causar infecção em humanos, como indicam as estatísticas da EFSA (European Food Safety Authority), a ocorrência destes em ração torna-se um perigo tanto para a sanidade animal quanto para a saúde pública. Dos 15 sorovares mais prevalentes em rações nos Estados Unidos entre 1987 – 1997, apenas três (Enteritidis, Agona e Montevideo) são isolados em humanos. Uma possível hipótese seria a existência de doses infectantes diferentes de sorovares de *S. enterica* entre animais e humanos (CRUMP et al., 2000). Em estudo mais recente realizado por Wierup & Häggblom (2010), quatro (10,5%) dos 38 sorovares isolados em ração estão incluídos no topo da lista de isolados clínicos de casos confirmados de salmonelose em humanos na União Européia. Estes resultados contradizem o argumento frequentemente utilizado contra a necessidade de prevenir a contaminação da ração, afirmando que os sorovares associados à ração não são patogênicos para humanos.

Os sorovares de *Salmonella* variam muito quanto à capacidade de infectar suínos e, também, quanto ao risco de transmissão secundária a outros animais. Assumindo o consumo diário de ração de um suíno na terminação como aproximadamente 3 kg, concentrações superiores à 10^4 de *Salmonella* por grama de ração seriam necessárias, por dia, para estabelecer infecção (DAVIES et al., 2004). Enquanto a exposição oral a 5×10^8 UFC de *S. Typhimurium* ou *S. Livingstone* administradas em 25 gramas de ração levam a uma infecção persistente em suínos desafiados, o mesmo não é observado quando a mesma dose de *S. Gold Coast* ou *S. Panama* são administradas (VAN WINSEN et al., 2001). Esta biodiversidade de sorovares, incluindo a incapacidade de muitos deles em estabelecer infecções persistentes em suínos após a exposição via ração talvez explique essa aparente discrepância entre sorovares isolados de ração e casos clínicos humanos.

Paralelamente, o isolamento de *Salmonella* em amostras de ração colhidas em silos de granjas não é capaz de elucidar a origem dessa

contaminação, podendo ter ocorrido na fabricação ou ser resultado de recontaminação durante o transporte ou no próprio armazenamento na granja. A detecção de *Salmonella* em 29% de amostras de ração, observada em um sistema de produção em Santa Catarina (KICH et al., 2006) justifica uma investigação mais cuidadosa desse problema. A hipótese de uma contaminação ou recontaminação no momento da fabricação da ração explicaria índices tão elevados em lotes distribuídos em granjas de diferentes integrados.

Apesar de a ração ser considerada um importante elemento na cadeia de produção animal, responsável na veiculação de vários patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* diretamente aos animais e indiretamente aos humanos, diversos trabalhos relatam baixos níveis de detecção na ração, e uma prevalência também considerada baixa (inferior a 10%) (ICMFS, 2011). As sementes oleaginosas e os ingredientes de origem animal têm maior risco de introduzir *Salmonella* nas unidades de produção. Diversos estudos encontraram associação entre os processos de mistura na propriedade, peletização e episódios de contaminação e recontaminação nas fábricas de ração (HARRIS et al., 1997; LO FO WONG et al., 2002; VAN WISEN et al., 2002; WILKINS et al., 2010).

Outro tópico de extrema relevância é a emergência de isolados de *Salmonella* provenientes de ração e ingredientes apresentando perfis de multi-resistência a antimicrobianos. Ao realizar um estudo em Alberta (CA), testando a sensibilidade de 209 estirpes de *Salmonella* isoladas de ração e alimentos frente a 17 antimicrobianos, Johnson e colaboradores (2005) encontraram 11,8% de resistência para os seguintes princípios ativos: tetraciclina (35,4%), estreptomicina (32,5%), sulfametoxazol (28,7%), ticarcilina (27,3%) e ampicilina (26,8%). Cento e doze isolados (53,6%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Os sorovares mais comuns com perfis de resistência e multi-resistência foram Typhimurium, Typhimurium var. Copenhagen e Heidelberg. Já Lynne e colaboradores (2009), ao analisar cinquenta e oito isolados de *S. Heidelberg* provenientes de ração, encontraram 72% de resistência a pelo menos um dos princípios ativos testados, enquanto 24% exibiram resistência a oito ou mais antimicrobianos. A resistência foi mais

comum para tetraciclina (71%), estreptomicina (62%) e canamicina (52%). Os isolados provenientes de ração de bovinos e suínos apresentaram maiores taxas de resistência quando comparados aos de frangos. Outro estudo detectou 44% dos isolados em ração comercial e fezes de suínos apresentando perfil de multi-resistência (MOLLA et al., 2010).

Na Dinamarca, o Ministério da Alimentação, Agricultura e Pesca é responsável pela elaboração de leis e normas de controle em alimentos e adequação destas às legislações vigentes na UE, com o objetivo de regular o comércio de matérias-primas e alimentos, evitando a aquisição de insumos e produtos de má qualidade. A lei estabelece que devem ser utilizados somente alimentos que não ofereçam nenhum perigo à saúde dos animais, humanos ou ao meio ambiente. Os requisitos básicos destinados à alimentação e aos fabricantes de ração, inclusive a fiscalização do controle de *Salmonella* na ração, são estabelecidos pela Diretoria Dinamarquesa de Fábricas. A indústria suína dinamarquesa proibiu a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento em janeiro de 2000 e desde 01 de janeiro de 2006 todas as propriedades devem estar formalmente registradas nesta mesma Diretoria. Fabricantes de aditivos ou pré-misturas devem possuir certificação no programa APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), enquanto as que utilizam pré-mistura na alimentação animal ou produzem ração a partir de ingredientes ou suplementos minerais devem realizar os processos seguindo os preceitos de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Todas as recomendações necessárias para controle de *Salmonella* sp. nas fábricas de ração encontram-se presentes no Regulamento nº1177/2007. A maioria das empresas realiza tratamento térmico (aquecimento a 81°C), inclusive em matérias-primas contaminadas. Todos os alimentos adquiridos por produtores de suínos são submetidos ao sistema de controle de *Salmonella* implantados nas fábricas. Procedimentos de limpeza e higienização dos silos e sistemas de alimentação são necessariamente realizadas para evitar a ocorrência de contaminação e recontaminação por *Salmonella*. Os cereais e grãos produzidos na propriedade são considerados com baixo risco de contaminação, entretanto devem ser submetidos a programas de controle de pragas para evitar a infestação de roedores, pássaros e insetos. Matérias-primas com alto

teor de lipídeos, subprodutos como soro de leite, melaço e farinhas de origem animal são considerados ingredientes com alto risco de contaminação, devendo ser armazenados e manipulados corretamente. Os registros de controle e análises são publicados em relatórios mensais, havendo avaliações contínuas com o objetivo de verificar se realmente as fábricas estão realizando os processos e controles corretamente. As fábricas recebem pelo menos duas visitas anuais de fiscalização, sendo o número de amostras analisadas diretamente relacionado à capacidade de fabricação da unidade. A amostragem não é aleatória, mas direcionada para ingredientes e matérias-primas consideradas de maior risco. Os resultados obtidos nas análises são publicados em relatórios trimestrais (LANDBRUG & FODEVARER, 2010).

2.5 O processo de produção de ração

A nutrição adequada dos animais depende diretamente da disponibilidade de aminoácidos, energia, minerais, vitaminas, ácidos graxos e água. Os cuidados com o preparo de rações somam os esforços de formular uma dieta contendo ingredientes com composição e valores nutricionais conhecidos que atendam às exigências nutricionais dos animais. Qualquer erro em uma ou mais etapas do processo de produção de rações pode acarretar prejuízos econômicos expressivos, pois os gastos com a alimentação correspondem à maior parte do custo da produção de suínos (LIMA & NONES, 1997).

Relacionado especificamente à ração, os ingredientes podem representar até 80% do custo final. A alimentação de suínos está baseada em rações balanceadas, formuladas, predominantemente, a partir de produtos de origem vegetal, origem animal, minerais e vitaminas. Dentre os produtos de origem vegetal, destacam-se o milho e o farelo de soja. Uma ampla gama de outros produtos pode ser empregada de acordo com a disponibilidade, tais como cereais de inverno e subprodutos, sorgo, milheto, subprodutos do beneficiamento do arroz, farelos de outras oleaginosas. Dentre os produtos de origem animal frequentemente utilizados estão soro de leite integral, leite em

pó, farinhas de carne, peixe e ossos, sangue e plasma sanguíneo (TISCH, 2005).

É de suma importância a conformidade dos ingredientes componentes da dieta dos suínos com os sistemas de qualidade oficiais para produtos e subprodutos. Quanto aos micronutrientes, o uso responsável e prudente deve ser realizado segundo a legislação vigente, respeitando os prazos de retirada do produto, a identificação laboratorial e determinação da concentração de resíduos em produtos de origem animal. Nesta perspectiva, a qualidade dos procedimentos adotados na fabricação da ração deve ser priorizada, uma vez que têm influência direta tanto na saúde do consumidor quanto no desempenho zootécnico dos plantéis. Para a obtenção de uma dieta adequada, critérios rígidos devem ser adotados no recebimento e armazenagem das matérias-primas, além da implantação de procedimentos de limpeza e controle de pontos críticos na fábrica, possibilitando a produção de uma ração que não ofereça risco à saúde dos animais (TISCH, 2005).

Os principais processos envolvidos na produção de ração são: recebimento de ingredientes, processamento e expedição (Figura 1). Estes setores devem ser bem ordenados nas fábricas, evitando mistura de lotes de matérias-primas, pré-misturas e produtos finais. Ao longo da linha de produção alguns equipamentos podem estar presentes em um ou mais setores da fábrica, como é o caso dos transportadores, balanças e silos de armazenagem (EFSA, 2008).

O recebimento de ingredientes inclui todos os equipamentos necessários para manter ou melhorar a qualidade dos produtos, a granel ou ensacados, empregados na fabricação de ração. O local de armazenagem deve ser projetado para minimizar perdas decorrentes da ação de ventos, chuvas ou contato com animais e controlar a produção de poeira. Normalmente, os ingredientes a granel são despejados em moegas e transportados até as instalações de armazenagem em baixa velocidade para evitar o derramamento de produto e minimizar a dispersão de poeira. Algumas fábricas optam por realizar a pré-limpeza de grãos através de peneiras cilíndricas ou vibratórias acompanhadas de um sistema de ventilação. O objetivo desta etapa é a remoção de impurezas e sujidades oriundas da lavoura, além de melhorar a

eficiência dos sistemas de secagem. Algumas matérias-primas necessitam ser submetidas ao processo de secagem antes do armazenamento para diminuição da umidade. Antes do processamento, recomenda-se a realização de análises físico-químicas e microbiológicas para assegurar que os produtos encaminhados aos silos de armazenagem estejam adequados para integrar a dieta (KOBETZ & KOBETZ, 2005).

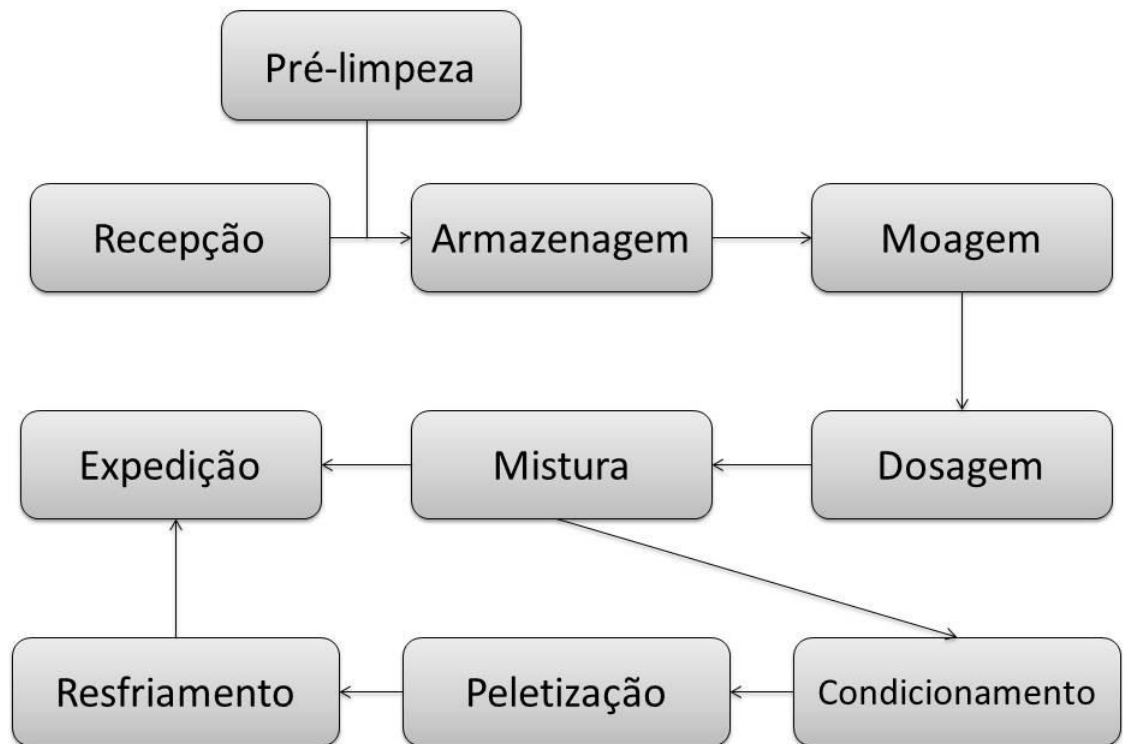


Figura 1 – Fluxograma dos processos realizados para fabricação de ração animal.

A distribuição dos ingredientes nos silos de armazenagem é realizada por distribuidores rotativos ou transportadores de múltiplas saídas. O transporte de ingredientes pode ser horizontal, inclinado ou vertical, em transportadores na forma de roscas, correias, arraste ou pneumáticos. As roscas podem ser utilizadas para controlar o fluxo de materiais e também auxiliar o processo de mistura durante o transporte. Entretanto, devido ao acúmulo de resíduo na parte inferior das roscas, não são recomendadas na fabricação de rações medicadas. As correias são mais econômicas quanto ao custo por tonelada transportado, sendo indicadas para rações peletizadas devido a menor taxa de

quebra dos peletes. Os transportadores em arraste, utilizados na maioria das fábricas, utilizam a movimentação de pás ou barras para empurrar a ração sob uma superfície estacionária e são recomendados para ingredientes secos. Corretamente projetado, o sistema incorpora o arraste e rosca sem fim, o que favorece a limpeza e reduz a probabilidade de contaminações cruzadas. Já os transportadores pneumáticos usam fluxo de ar para o levantamento e carregamento de partículas através de um tubo transportador. O fluxo do ar pode ser por pressão positiva ou negativa, gerando maior robustez quando comparado aos sistemas mecânicos. São utilizados para transporte de minerais, sendo necessária a implantação de sistemas de controle de poeira. Os elevadores de canecos consistem em cinturões ou correntes na direção vertical nos quais as caçambas ou canecos estão fixados. Os elevadores projetados com coletores de poeira proporcionam maior facilidade na limpeza (TISCH, 2005; KOBETZ & KOBETZ, 2005).

A etapa de processamento é formada pela moagem, dosagem e mistura, podendo incluir outros processos como a peletização e extrusão. A moagem tem como finalidade reduzir o tamanho dos ingredientes para favorecer algum tipo de processamento e facilitar a digestibilidade dos nutrientes. A proteção magnética é necessária para prevenir a entrada de objetos metálicos capazes de danificar as telas ou outras estruturas dos equipamentos. O sistema de aspiração presente na moagem é formado por um ventilador e um filtro ou ciclone, onde o ar, aspirado através de aberturas no moinho de martelo e portas, atravessa as telas e é retirado por descargas e forro. Este sistema representa custos adicionais, compensados pela redução na umidade e no calor e proporcionando um aumento de 15% na capacidade de operação do moinho de martelo. No moinho de rolo, empregado na produção de ração de frangos de corte e suínos, o grão alcança o tamanho adequado pela passagem por uma série de rolos, produzindo partículas uniformes. Este método tem ressurgido em fábricas produtoras de ração não peletizada, onde é desejado um produto de maior granulometria. Quando comparado ao de martelo, o moinho de rolo opera a um custo menor por tonelada, não necessita de um sistema assistente de ar, produz menos poeira e ruído. A segunda moagem pode ser empregada com o objetivo de reduzir ainda mais o tamanho médio

das partículas e produzir um produto peletizado de alta qualidade com baixa ou nenhuma segregação de ingredientes, sendo realizada separadamente ao sistema de moagem. Problemas como degradação de vitaminas, perda de micronutrientes pelo sistema de ar e contaminação cruzada têm sido atribuídos à pós-moagem. Após a moagem, pode ser necessária a pré-mistura para incorporar, de forma uniforme, quantidades pequenas de micronutrientes (vitaminas, antimicrobianos e outras substâncias químicas) aos alimentos (TISCH, 2005; KOBETZ & KOBETZ, 2005).

Devido à acessibilidade, muitas fábricas têm optado pelo sistema de dosagem computadorizado. Dependendo do tipo de ração produzida e do número de ingredientes, a fábrica pode ter de uma a seis balanças. Em muitos casos, uma balança é suficiente para todos os micronutrientes, enquanto fábricas com elevados índices de produção requerem o máximo de acurácia na manipulação de ingredientes menores, sendo necessárias duas balanças usadas separadamente para ingredientes maiores e menores. Desse modo, a quantidade de balanças e as capacidades dependerão diretamente do nível de produtividade da fábrica (KOBETZ & KOBETZ, 2005).

Existem vários tipos de misturadores, sendo os mais comuns o vertical e o horizontal. O misturador vertical é constituído por uma célula (depósito) com uma ou duas roscas na linha do eixo central. Eles geralmente são mais lentos quando comparados aos horizontais, com tempo ótimo de mistura de 3 a 19 minutos. A mistura ocorre continuamente através da elevação do conteúdo dos tanques do fundo à parte superior. O tempo de descarga é aproximadamente o mesmo do horizontal, entretanto apresenta dificuldades para limpeza completa. A adição de mais de 3% de líquidos não é recomendada neste tipo de misturador. A grande vantagem do misturador vertical é o baixo custo, sendo largamente utilizado em pequenas fábricas de rações comerciais e em propriedades. Além disso, eles não necessitam de outros equipamentos como silos anexos para armazenagem de ingredientes ou para descarregar a mistura pronta. Os misturadores horizontais são os mais encontrados em fábricas de maior porte. Podem ser providos de fitas ou pás que revolvem a mistura de um lado a outro, repartindo-a e promovendo uma eficiente mistura ao longo de todo o misturador. Possuem portas de descarga que permitem rápido esvaziamento

e facilidade na limpeza. O carregamento do misturador com quantidades acima de sua capacidade dificulta a mistura. As fitas ou pás devem emergir 5 a 7 cm acima do topo da mistura. A maior vantagem destes misturadores frente aos verticais é que eles permitem uma mistura mais homogênea a um tempo de mistura de 3 a 5 minutos. Outra vantagem é possibilitar o uso de maiores quantidades (10%) de líquido na mistura (LIMA & NONES, 1997). São os mais utilizados em fábricas modernas pelo baixo custo, moderado consumo de energia, velocidade, eficiência e fácil limpeza particularmente quando equipados com aberturas inferiores. A capacidade de produção é dependente da velocidade de mistura e da disposição das fitas. Em geral, o tempo de mistura vai de 3 a 5 minutos, entretanto uma nova geração de misturadores com maior potência e com fitas envolvidas foi capaz de misturar oito toneladas em 2 a 3 minutos (KOBETZ & KOBETZ, 2005).

A peletização, realizada pela prensa de peletes ou anel de peletização, envolve temperaturas entre 50° a 100° C. O condicionamento convencional com vapor geralmente é feito em uma câmara horizontal localizada acima da linha do misturador. Muitos condicionadores utilizam o disparo direto do vapor (um sistema de baixa pressão onde os produtos da combustão misturam-se ao vapor) colocados em uma grande vasilha vertical (KOBETZ & KOBETZ, 2005). O teor de umidade da ração após a peletização é de aproximadamente 15%, devendo diminuir após o resfriamento a temperatura ambiente para aproximadamente 12-13%. A diminuição da umidade deve ser rápida para evitar a condensação no equipamento de transporte e recipientes de armazenamento. Algumas rações peletizadas podem ser pulverizadas com gordura ou outros ingredientes líquidos após o resfriamento dos peletes. Depois do processamento, recomenda-se que a dieta permaneça armazenada um curto período de tempo em silos de armazenagem de alimentos na área de expedição aguardando o transporte até a propriedade. Neste local, são imprescindíveis o controle da umidade, o calor excessivo e a presença de animais, principalmente roedores. O projeto e a construção da fábrica de rações irão permitir diferentes graus de separação física das peças e equipamentos limpos e não limpos de produção para permitir medidas de limpeza eficaz. O acúmulo de poeira é um fator inerente à fabricação de ração.

Portanto, sistemas adequados de coletores de poeira na fábrica de rações são importantes para controlar a pó e manter o moinho em bom estado de limpeza (EFSA, 2008).

2.6 A presença de *Salmonella* sp. em fábricas de ração

Em um relatório intitulado “Avaliação de riscos microbiológicos em alimentos destinados a animais de produção” publicado em 2008, a EFSA identificou a presença de *Salmonella* como sendo o maior perigo de contaminação microbiológica na ração. Vários trabalhos relatam a prevalência da contaminação deste micro-organismo em ração e ingredientes, entretanto poucos avaliam quais seriam os principais fatores de risco relacionados à contaminação nas fábricas de ração e que processos seriam mais vulneráveis ao longo da sua produção.

A principal fonte de contaminação por *Salmonella* nas fábricas de ração são os ingredientes que entram na fábrica (COMA, 2003, RICHARDSON, 2008). Nos últimos 50 anos, com a transformação e intensificação na agricultura, houve um aumento na diversidade de ingredientes utilizados na produção de rações (CRUMP et al., 2002, JONES & RICHARDSON, 2004), de forma que *Salmonella* pode ser isolada de qualquer ingrediente, incluindo componentes animais e vegetais, como soja, milho, sorgo, farelo de arroz, farelo de algodão. Desde a proibição, em 1996, do uso de farinha de carne e ossos na Grã-Bretanha como medida de controle para Encefalite Espongiforme Bovina (EEB), a utilização de sementes de oleaginosas teve um significativo acréscimo, o que tem sido associado ao aumento na prevalência de *Salmonella* em humanos no mesmo período (DAVIES & HILTON, 2000).

Todos os ingredientes da ração podem ser considerados como potencialmente sujeitos à contaminação. Entretanto, normalmente esta ocorre numa prevalência baixa (< 10% das amostras testadas por carga contaminada) e em agrupamentos, ou seja, não homoganeamente distribuída nas cargas contaminadas (JONES & RICHARDSON, 2004). Um estudo realizado na Suécia, analisando farelos de soja e semente de colza, constatou que os farelos importados, principalmente de países da América do Sul, têm 2,4 vezes

mais chance de serem contaminados por *Salmonella* quando comparados aos produtos importados de outros países (WIERUP & HÄGGBLÖM, 2010). Como a exclusão completa de ingredientes contaminados não é possível, as medidas de descontaminação nas fábricas de ração são necessárias para assegurar a qualidade microbiológica das rações.

Há escassez de informações sobre o risco de introdução de *Salmonella* no rebanho devido à produção de ração na propriedade. Vários países da Europa e os Estados Unidos realizam o processo de mistura da ração utilizando, em grande parte, ingredientes (milho, soja ou farelo de soja) produzidos na própria propriedade ou em localidades próximas, normalmente não envolvendo algum procedimento de descontaminação. Um estudo realizado por Harris et al. (1997) revelou uma proporção significativamente maior de amostras contaminadas de ração em propriedades que realizavam localmente a mistura, quando comparadas às propriedades que utilizavam ração comercial. Já no estudo de Torres et al. (2011) não foi possível observar diferença estatisticamente significativa quanto à presença de *Salmonella* entre fábricas de ração que produziam menos que 1.000, de 1.000 a 5.000, 5.000 a 10.000 e acima de 10.000 toneladas/mês.

Diversos estudos epidemiológicos realizados na Europa e no Canadá indicam as rações peletizadas (submetidas a tratamentos térmicos e controle regulatório) como positivamente associadas ao risco de isolamento de *Salmonella* (LO FO WONG et al., 2002; VAN WISEN et al., 2002). No estudo realizado por Wilkins e colaboradores (2010) foi verificado que lotes alimentados com ração peletizada apresentaram 8,2 mais chances de serem positivos quando comparados àqueles que receberam ração não peletizada (IC 95%: 3.2-20.6). A ração peletizada diminui a acidez estomacal e aumenta a secreção de mucina, favorecendo a sobrevivência e colonização do suíno por *Salmonella* (MIKKELSEN et al., 2004; HEDEMANN et al., 2005). Contrariamente, em um trabalho espanhol (TORRES et al., 2011) a ração não peletizada teve uma probabilidade 8 vezes maior de estar contaminada do que a ração peletizada (OR=8,2; IC 95%: 2,5 a 26,6).

Poucos estudos relacionam a presença de *Salmonella* sp., na ração e nas fábricas, a mecanismos de sobrevivência que explicariam a perpetuação

do agente. Hofshagen et al. (2007) e Nesse et al. (2005) relataram o isolamento de *Salmonella* em diversos pontos de controle das fábricas de ração e farinha de peixe na Noruega e a persistência, por vários anos, de clones no ambiente. A formação de biofilme tem sido considerada como um fator importante para a persistência deste agente nas fábricas de ração (VESTBY et al., 2009), não somente pelo acúmulo de uma ampla variedade de substratos mas, principalmente, pela proteção da ação de desinfetantes e antimicrobianos (MORETRO et al., 2009). Cepas dos sorovares Agona e Montevideo foram identificadas como boas formadoras de biofilme, persistindo por anos nas linhas de produção das fábricas (VESTBY et al., 2009).

Um estudo transversal, realizado por Torres et al. (2011) para avaliar a prevalência de *Salmonella enterica* em fábricas de ração e identificar potenciais fatores de risco relacionados à contaminação, encontrou 4,8% de amostras positivas (n=185) entre 3844 amostras coletadas em 523 fábricas. Os sorovares mais isolados foram: Mbandaka, Anatum, Senftenberg, Typhimurium e Agona. O ingrediente com maior probabilidade de estar contaminado foi farelo de semente de algodão (OR=3,8; IC 95%: 1,7-8,3), enquanto o local considerado mais crítico foi o recebimento de ingredientes (OR=6,4; IC 95%: 2,7-15,1). A avaliação contemplou três tipos de amostras: ração pronta, ingredientes e poeira coletada nas dependências da fábrica. A positividade foi maior nas amostras de poeira quando comparadas à ração e aos ingredientes. Este achado pode ser devido à maior sensibilidade do método de isolamento na análise de poeira e partículas finas (EFSA, 2008). Caso a análise fosse restrita a amostragem de ração pronta para consumo, o número de unidades positivas não seria 144 e sim 47, o que subestimaria a real contaminação das fábricas por *Salmonella*.

O isolamento por técnicas bacteriológicas convencionais é considerado como referência, porém pode demorar até sete dias antes de apresentar resultados definitivos. Em fábricas que produzem cerca de 40 toneladas de ração por hora, aguardar a emissão do resultado torna-se inviável, tanto quanto à logística, quanto ao impacto financeiro. Resultados rápidos podem ser obtidos por isolamento direto, porém devido à baixa sensibilidade há a possibilidade de obtenção de falso-negativos pela dificuldade de detecção de

células lesadas (MALORNY & LÖFSTROM, 2008). As etapas de enriquecimento seletivo não podem ser encurtadas, sem aumentar concomitantemente o risco de resultados falso-positivos relacionados ao isolamento de micro-organismos com características morfológicas e bioquímicas semelhantes à *Salmonella* como *Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae* (MACIOROWSKI et al., 2006).

Outro aspecto relevante a ser considerado na detecção da *Salmonella* nas fábricas seria a rapidez na emissão dos resultados, principalmente em situações onde o processo de produção, ou mesmo o produto final precisam ser monitorados. Técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem alcançado crescente importância na detecção de *Salmonella*, existindo vários estudos publicados e genes alvo propostos para esse propósito (RAHN et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2002; MALORNY et al., 2003). Apesar de estudos relatarem os altos níveis de sensibilidade e especificidade da técnica, uma das limitações apontadas é a possibilidade de haver substâncias inibitórias que poderiam ocasionar um resultado falso-negativo. Para assegurar a ocorrência de resultados negativos, a inclusão de um Controle Interno de Amplificação (ICA) tem sido proposta (MALORNY et al., 2003). Esse controle seria representado por um oligonucleotídeo curto contendo a sequência alvo dos “primers” que, ao ser adicionado a todas as reações de amplificação conduzidas, seria co-amplificado. Dessa forma, a ausência de amplificação do ICA indicaria a presença de substâncias inibidoras da Taq Polimerase, ao passo que a presença de amplificação do ICA e ausência do fragmento correspondente à porção do gene alvo garantiria um resultado negativo verdadeiro. Um estudo realizado por Castagna e colaboradores (2005) testou um protocolo de amplificação do gene *invA* para a detecção de *Salmonella* em rações fornecidas a suínos. Nos raros casos onde foram observados resultados negativos na PCR e positivos no isolamento bacteriológico, a hipótese de substâncias inibitórias foi levantada e a inclusão do ICA foi proposta como um instrumento capaz de minimizar este problema.

2.7 Estratégias empregadas no monitoramento e controle da contaminação por *Salmonella* em fábricas de ração

A década de 90 trouxe mudanças revolucionárias na indústria de alimentos, principalmente quanto a regulamentos e atitudes dos consumidores frente à segurança dos alimentos. O conceito “farm-to-table” (da fazenda à mesa), onde todos os participantes da cadeia produtiva de alimentos têm responsabilidade na redução do risco de doenças veiculadas por alimentos, hoje é aceito como um dos principais paradigmas da inocuidade dos alimentos. Entretanto, para muitos perigos, uma análise detalhada sobre o emprego deste conceito ainda é falho. Conceitualmente, dentro da contínua oferta de alimentos há uma série linear de setores engajados na produção, colheita, distribuição e consumo. Dentro de cada setor, medidas poderiam ser aplicadas para minimizar os perigos, visando definir um grupo de intervenções capaz de gerar máxima redução de risco a um mínimo custo (DAVIES et al., 2004). O consumidor não se satisfaz mais apenas com a aquisição de um produto de qualidade que respeita os padrões de inocuidade e higiene, exigindo cada vez mais a obtenção de certificações que assegurem a procedência geográfica e descrições detalhadas de todo o ciclo de produção (ARVANITOYANNIS & KASSAVETI, 2009).

É unânime a opinião que intervenções isoladas, privilegiando apenas um elo da cadeia de produção, têm pouca chance de sucesso no controle de *Salmonella*. Devido às múltiplas possibilidades de contaminação, o próximo passo seria avaliar a eficácia das medidas de controle, propondo alternativas para diminuir a amplificação do problema ao longo da cadeia de produção. Estas medidas devem contemplar o conhecimento e correção de fatores de risco nas granjas, elaboração de produtos que diminuam o nível de infecção nos animais e definição de possíveis pontos críticos para a contaminação em fábricas de ração e linha de abate. Na busca por produtos seguros, as indústrias devem adotar programas capazes de detectar possíveis riscos existentes ao longo da produção. O programa Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é um sistema elaborado para identificar perigos específicos e definir ações de controle, visando assegurar a qualidade e a

inocuidade dos alimentos. Essa é uma excelente ferramenta de controle para as indústrias de alimentos e autoridades de saúde pública (SELLERS, 2005; ARVANITTOYANNIS & KASSAVETI, 2009).

Os sete princípios do sistema APPCC foram adotados pelo *Codex Alimentarius* e pelo National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) para caracterizar uma sequência lógica na implantação do programa. O primeiro princípio consiste na análise dos perigos e medidas preventivas, contemplando os seguintes objetivos: identificar os perigos significativos e caracterizar as medidas preventivas correspondentes; modificar o processo ou produto, se necessário, para garantir a segurança; servir de base para a identificação dos pontos críticos de controle (PCCs). É essencial a compreensão de que os perigos referem-se às condições e/ou contaminantes que podem causar dano ao consumidor por meio de uma lesão ou enfermidade, de forma imediata ou tardia, através de uma única ingestão, ou por ingestão reiterada. Todas as atividades que caracterizam um processo, ou fase de obtenção de um produto (matéria-prima ou produto final) devem obedecer às Boas Práticas de Fabricação (BPF). Não é possível estabelecer um sistema de APPCC quando os pré-requisitos não são devidamente cumpridos. Os perigos podem ser classificados como biológicos (bactérias, vírus, parasitos e protozoários), químicos (toxinas naturais ou microbianas, metabólitos tóxicos de origem microbiana, pesticidas, antibióticos, aditivos, tintas, desinfetantes) e físicos (vidros, metais, madeira) (SELLERS, 2005; ARVANITTOYANNIS & KASSAVETI, 2009; BUCKNAVAGE & CUTTER, 2009).

O segundo princípio seria a identificação dos pontos críticos de controle (PCCs), definidos como qualquer ponto, etapa ou procedimento no qual se aplicam medidas preventivas, com o objetivo de manter um perigo identificado sob controle, conseqüentemente eliminando, prevenindo ou minimizando os riscos à saúde do consumidor. As BPF, citadas anteriormente como pré-requisitos para a implantação de um APPCC, são capazes de controlar diversos perigos identificados, considerados pontos de controle (PC); entretanto, aqueles onde não é possível haver controle (total ou parcial), através dos pré-requisitos, devem ser incorporados no sistema APPCC. Desse modo, os PCCs são pontos realmente considerados críticos à segurança, onde

esforços e ações devem ser concentrados. É importante entender que mais de um perigo pode ser controlado por um mesmo PCC, da mesma maneira que mais de um PCC pode ser necessário para controlar um único perigo (SELLERS, 2005; ARVANITTOYANNIS & KASSAVETI, 2009; BUCKNAVAGE & CUTTER, 2009).

O terceiro princípio estabelece os limites críticos (valor máximo e/ou mínimo de parâmetros biológicos, químicos ou físicos) que irão assegurar o controle do perigo. Estes valores podem ser obtidos de diversas fontes, como guias e padrões presentes nas legislações, literatura, experiência prática, levantamento prévio de dados, experimentos, podendo estar associados a medidas como temperaturas, tempo, atividade de água e resíduos. O quarto princípio irá estabelecer os procedimentos de monitoração, ou seja, a sequência ordenada de observações ou mensurações para avaliar se um determinado PCC está realmente controlado, produzindo um registro necessário para verificação futura. A escolha de um responsável pela monitoração de cada PCC é importante, do mesmo modo que as aferições contínuas e rápidas são preferíveis (SELLERS, 2005; ARVANITTOYANNIS & KASSAVETI, 2009; BUCKNAVAGE & CUTTER, 2009).

O quinto princípio consiste no estabelecimento das ações corretivas, devendo ser aplicadas sempre que ocorrerem desvios nos limites críticos definidos. A rápida resposta na identificação de um processo fora de controle é uma das principais vantagens do sistema APPCC. As ações corretivas devem ser empregadas no momento ou imediatamente após a identificação dos desvios. É importante que o plano APPCC especifique o procedimento a ser realizado quando o desvio ocorre e o responsável pela implantação das ações corretivas, devendo haver registros para a verificação da frequência dos controles e necessidade de eventuais modificações nos processos. O sexto princípio refere-se ao estabelecimento dos procedimentos de verificação. Neste caso, a verificação consiste na utilização de procedimentos em adição àqueles utilizados no monitoramento para evidenciar se o sistema APPCC está realmente funcionando. Há três processos adotados na verificação: 1) Processo técnico ou científico, que verifica se os limites críticos nos PCCs são satisfatórios; 2) Processo de validação do plano, que assegura o correto

funcionamento do sistema APPCC; e 3) Processo de revalidação, onde revalidações periódicas são documentadas para assegurar a eficiência e exatidão do sistema APPCC. Finalmente, o sétimo princípio estabelece os procedimentos de registro. Os documentos devem conter um resumo das análises dos perigos, incluindo as medidas aplicadas para o controle dos pontos críticos. Dentro do plano de APPCC, é imprescindível que os relatórios sejam elaborados a partir dos relatos de pessoas envolvidas no programa, além da determinação das responsabilidades individuais (SELLERS, 2005; BUCKNAVAGE & CUTTER, 2009).

A importância do monitoramento contínuo na produção da ração dentro do programa de APPCC e a adoção de ações corretivas na detecção da contaminação são de suma importância para prevenir a introdução de *Salmonella* na produção animal e, subsequentemente, na cadeia de alimentos de origem animal (PRIMM, 1998; WIERUP & HÄGGBLÖM, 2010). A investigação através de amostragens contemplando todo o fluxo de produção, associada ao levantamento dos principais fatores de risco relacionados à produção da ração podem contribuir para o melhor conhecimento de pontos de contaminação e recontaminação do produto final (PETRI, 2002). Na Suíça, desde 1991, com a implantação do APPCC nas fábricas de ração, semanalmente são coletados resíduos (crostas e poeiras) dos pontos considerados como PCCs na linha de processamento e analisados para detecção de *Salmonella*. Matérias-primas importadas são coletadas segundo um plano de amostragem e permanecem em quarentena até a liberação dos resultados. Ingredientes positivos são tratados com ácidos orgânicos e retestados antes de serem usados na fabricação de ração (KOYUNCU & HÄGGBLÖM, 2009).

Procedimentos de controle implantados no sistema APPCC e a realização de tratamento térmico controlam e previnem a disseminação da contaminação de ingredientes para áreas limpas destinadas ao acondicionamento de produto final, embora outras variáveis como o desenho da fábrica e a contaminação por fatores externos possam influenciar neste resultado (WIERUP & HÄGGBLÖM, 2010).

Na Suécia, o sistema APPCC e as BPF foram implantados em 1991 e, a partir de 1993, o país adotou um programa nacional de controle em rações baseado na legislação europeia (EC) N° 2160/2003 de controle de *Salmonella* e outros agentes zoonóticos. Nesta legislação (SJVFS 2006:81), os pontos críticos identificados na linha de processamento de ração para produção animal foram: 1) Ração pronta, 2) Sala de resfriamento, 3) Topo do resfriador, 4) Pó do sistema de aspiração (filtros) e 5) Parte inferior do elevador de matérias-primas. Em unidades produtoras de ração para aves, pelo menos uma amostra de cada um dos pontos descritos é analisada semanalmente para ausência de *Salmonella*. Já nas fábricas destinadas a produção de ração para outras espécies, somente os pontos 1 e 5 são monitorados. No caso da detecção de amostras positivas na fábrica após o tratamento térmico (obrigatório apenas para aves), uma autoridade responsável é notificada e as ações tomadas dependerão da localização da contaminação na fábrica e do tipo de ração produzida. São sempre realizados procedimentos de limpeza e desinfecção da linha de produção, bem como o acompanhamento do lote produzido. O monitoramento de ingredientes da ração é realizado por amostragem, considerando a distribuição heterogênea da contaminação por *Salmonella* e elaborada para detectar a contaminação de 5% do lote com 95% de probabilidade. O peso da amostra é de 25 gramas e, normalmente, oito amostras são analisadas. Cada amostra é formada por 10 sub-amostras de 2,5 gramas. O método utilizado para isolamento e identificação em ração é o protocolo de detecção de *Salmonella* em alimentos elaborado pela Nordisk Metodikkomite for Levnettsmidler denominado NMKL-71 (BOQVIST et al., 2003; KOYUNCU & HÄGGBLOM, 2009; WIERUP & HÄGGBLOM, 2010).

Em 2003, um surto de *S. Cubana* ocorreu, atingindo 77 propriedades criadoras de suínos na Suécia, sendo a fábrica responsável pela produção da ração peletizada considerada como fonte de contaminação. A contaminação ocorreu no resfriador, onde houve a multiplicação de *Salmonella* devido à presença de umidade e temperaturas adequadas (ÖSTERBERG et al., 2006). As análises mostraram que, neste surto, a soja estava associada a um elevado risco de contaminação quando comparada a outros tipos de produtos utilizados na mesma linha de produção. Apesar de vários estudos epidemiológicos

realizados na Europa indicarem as rações peletizadas ou seca como positivamente associadas à contaminação por *Salmonella* comparada à ração líquida ou misturada na propriedade (VAN WINSEN & VAN NES, 2001; LO FO WONG et al, 2002), este estudo não foi capaz de confirmar esta suposição. Importantes desafios de biossegurança estão presentes imediatamente após o tratamento térmico dos peletes nas fábricas de ração. A condensação e a contaminação com poeira durante o resfriamento dos peletes parece ser um fator de risco considerável para a recontaminação e multiplicação de *Salmonella* imediatamente após a peletização (JONES & RICHARDSON, 2004).

Várias estratégias complementares têm sido utilizadas no controle da contaminação da ração, e estas incluem tratamentos físicos e uma ampla variedade de tratamentos químicos. O método de descontaminação mais utilizado é o tratamento térmico, normalmente empregado em conjunto com outros procedimentos de produção como a peletização e a extrusão. A recomendação para a destruição de *Salmonella* em rações é o aquecimento a 80-85°C, por um período de 2 a 12 minutos. Apesar da tolerância ao aquecimento variar entre sorovares, o aquecimento até 80°C (e 0,8 de atividade de água) é capaz de provocar redução decimal (COOKE, 2002). Segundo o estudo de Torres e colaboradores (2011), a peletização é um processo capaz de reduzir a contaminação por *Salmonella* no produto final. De acordo com os níveis de *Salmonella* presentes nos ingredientes da ração, fabricantes consideram que um método de descontaminação deve gerar uma redução de três log na população presente na ração, sendo que o decréscimo de um log implicaria na eliminação de 90 % da população microbiana (COOKE, 2002). Ao estimar, por simulação, o nível de contaminação em lotes de ração produzidos na Suíça, Sauli e colaboradores (2005) encontraram que os lotes não submetidos a processos de descontaminação apresentavam até 34% de probabilidade de terem presença de *Salmonella*, ao passo que os lotes submetidos a tratamentos térmicos associados a químicos (ácidos orgânicos) apresentavam probabilidade nula.

Os principais agentes químicos utilizados atualmente para o controle de *Salmonella* na ração são ácidos orgânicos e seus sais; formaldeído;

desreguladores da parede bacteriana como terpenos e óleos essenciais. (DAVIES & HILTON, 2000; WALES et al., 2010). A maior vantagem da utilização dos tratamentos químicos está no efeito antimicrobiano residual, que pode persistir após o armazenamento, auxiliando na proteção do alimento contra a recontaminação. No entanto, a persistência do produto pode também ser uma desvantagem por interferir no resultado de testes microbiológicos, impedindo a detecção de organismos ainda viáveis. O processo de descontaminação não pode ser considerado garantia de “negativo para *Salmonella*”, pois o nível de contaminação pode estar abaixo do poder de detecção do método aplicado (WALES et al., 2010; WIERUP & HÄGGBLUM, 2010).

Nas fábricas de ração, a presença da *Salmonella* sp. tem sido associada a fatores como contaminação por poeira, presença de vetores e más condições de higiene (EFSA, 2008). A maioria dos equipamentos presentes nas fábricas de ração não foi projetada para evitar o acúmulo de resíduos e facilitar procedimentos de limpeza e higienização, não possuindo sequer acessos para inspeções de rotina. Equipamentos com menor propensão para acumular resíduos, produzir e disseminar umidade e poeira são essenciais para a fabricação de uma ração com menor risco de contaminação. Sistemas de aspiração de poeira são de extrema importância para a produção de ração, principalmente quando os ingredientes são transportados para as dependências da fábrica (WIERUP & HÄGGBLUM, 2010).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pela regulamentação e fiscalização dos produtos destinados à alimentação animal. Todo estabelecimento que produz, fraciona, importa ou comercializa ração, suplementos, premix, núcleos, ingredientes e aditivos para alimentação animal deve ser registrado junto ao MAPA e estar sujeito à fiscalização pelo Serviço da Fiscalização Agropecuária (Sefag), da respectiva Superintendência Federal de Agricultura (SFA). Em 2007, foi revogada a Instrução Normativa número 1 (IN 1), entrando em vigor a IN 4 (BRASIL, 2007) que aborda o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal e um roteiro de

inspeção das fábricas. A fiscalização dos estabelecimentos realizada pelos fiscais agropecuários tem como objetivo principalmente garantir as condições higiênico-sanitárias adequadas aos processos de fabricação, prezando pela segurança, rastreabilidade e inocuidade dos produtos disponíveis no mercado. Os grãos, sementes e fenos in natura (exceto os moídos) destinados à alimentação animal são dispensados da obrigatoriedade de registro. Os demais produtos devem ter registro no MAPA.

O roteiro de inspeção das boas práticas de fabricação de estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal, anexo II da IN4 (BRASIL, 2007), tem como itens principais a Avaliação do estabelecimento, que aborda questões sobre: 1) Instalações, equipamentos e utensílios, 2) Programa de treinamento de funcionários, 3) Controle do processo de produção, armazenamento e expedição; e também a Avaliação de procedimentos operacionais padrões quanto à: 1) Qualificação de fornecedores e controle de matérias-primas, ingredientes e de embalagens, 2) Limpeza/Higienização de instalações, equipamentos e utensílios, 3) Higiene e saúde do pessoal, 4) Potabilidade da água e higienização do reservatório, 5) Prevenção de contaminação cruzada, 6) Manutenção e calibração de equipamentos e instrumentos, 7) Controle integrado de pragas, 8) Controle de resíduos e efluentes e 9) Rastreabilidade e recolhimento de produtos. A pontuação para classificação do estabelecimento é obtida considerando o atendimento dos itens imprescindíveis e necessários, conforme a média ponderada calculada pela seguinte equação:
$$\text{Pontuação} = \frac{\{(\text{soma dos itens imprescindíveis atendidos sobre o total dos itens imprescindíveis do roteiro} \times 100) \times 2 + (\text{soma dos itens necessários atendidos sobre o total dos itens necessários do roteiro} \times 100)\}}{3}$$
. Os estabelecimentos serão classificados em grupos 1, 2, 3 e 4 as fábricas que obtiveram 81 a 100, 61 a 80, 41 a 60 e 0 a 40, respectivamente. Os estabelecimentos exportadores e fabricantes de produtos com medicamentos devem estar classificados no grupo 1. Os estabelecimentos classificados como grupos 2 e 3 recebem prazos para se adequarem, enquanto aqueles classificados no grupo 4 sofrem interdição temporária até adequação. Cabe ao MAPA definir os prazos para que os estabelecimentos apresentem cronograma de adequação das não-

conformidades observadas, sendo que os prazos propostos no cronograma de adequações poderão ser aceitos ou redefinidos (BRASIL, 2009). O roteiro de inspeção instituído pela IN4 encontra-se apresentado no Anexo 1.

Em 2006, o Sindicato Nacional de Indústria de Alimentação Animal - Sindirações (SINDIRAÇÕES, 2006) redefiniu a estrutura do seu programa de certificação com o objetivo de padronizar as informações relacionadas à segurança dos alimentos. Utilizando os mais recentes tópicos e tendências da produção internacional de alimentos, o novo programa contempla a nomenclatura utilizada no “Feed & Food Safety” – Gestão do Alimento Seguro. Em concordância com os padrões e procedimentos para certificação global de Boas Práticas Agrícolas (“Good Agricultural Practices - GAP) elaborado pelo “Euro Retailer Produce Working Group” (Eurep) e adotados no sistema de gestão de qualidade EurepGAP, o programa Gestão do Alimento Seguro tem como objetivo implementar medidas de segurança visando garantir a qualidade da alimentação fornecida aos animais, sendo aplicável aos estabelecimentos processadores de alimentação animal. Com protocolos e requisitos equivalentes ao de diversas entidades que já têm programas de certificação estabelecidos e verificados por organismos internacionais, o programa Gestão do Alimento Seguro garante o reconhecimento de clientes e entidades internacionais que se relacionam com a indústria brasileira. O protocolo apresenta três opções de certificação, compatíveis com os objetivos e necessidades de cada organização, que são: 1) Certificação em Boas Práticas de Fabricação (BPF); 2) Certificação em Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC); 3) Certificação com Equivalência Internacional – CFM (Compound Feed Module). O check-list BPF e o check-list APPCC propostos pelo programa Gestão do Alimento Seguro encontram-se no anexo 2.

A epidemiologia molecular, cada vez mais empregada nos últimos anos devido ao grande número de técnicas moleculares capazes de discriminar agentes similares fenotipicamente, tem auxiliado na elucidação de diversas hipóteses antes incompreendidas. A genotipagem pela técnica de macrorestrição do DNA denominada Eletroforese em campo pulsado (Pulsed field gel electrophoresis – PFGE) é considerada “padrão ouro” na discriminação de linhagens bacterianas pertencentes a um mesmo sorovar, sendo de extrema

importância na rastreabilidade e definição de possíveis fontes de contaminação ao longo da cadeia de produção. O estudo realizado por Molla e colaboradores (2010), com o objetivo de determinar a relação fenotípica e genotípica entre isolados de *Salmonella* provenientes de rações comerciais de suínos e compará-los com isolados recuperados de fezes e ambiente, conseguiu agrupar, por PFGE, 46 isolados em cinco grupos clonais (A, B, C, D e E), sendo quatro destes comuns a ração e fezes. Este achado reforça a importância da ração comercial como potencial veículo na transmissão de *Salmonella*. Kich e colaboradores (2011) visando determinar a distribuição de sorovares e grupos clonais de *Salmonella* em 12 granjas de terminação de suínos e um frigorífico em Santa Catarina (SC) e verificar as possíveis relações epidemiológicas existentes entre isolados provenientes do ambiente de abate, fezes, ração, baia de espera, linfonodos e carcaças pela técnica de PFGE, encontraram maior similaridade entre os isolados de fezes, ambiente e linfonodos subilíaco e pré-escapular (grupo A) e também entre os isolados da baia de espera e carcaça (grupo B). Os isolados de ração foram considerados “outliers” devido à baixa correlação apresentada com os demais isolados. As técnicas de tipificação molecular, apesar de epidemiologicamente valiosas, não são utilizadas na rotina de monitoramento de rações ou na cadeia de produção animal, sendo aplicadas apenas em pesquisa científica, com o intuito de contribuir para elucidação das cadeias de transmissão de patógenos.

CAPÍTULO III – PRIMEIRO ARTIGO

Aplicação de roteiro de inspeção de boas práticas de fabricação e avaliação da contaminação por coliformes totais em estabelecimentos fabricantes de alimentos para suínos

Application of inspection checklist for good manufacturing practices and assessment of contamination by total coliforms in feed mill producing swine feed

RESUMO

O monitoramento e controle da contaminação da dieta fornecida aos animais assumem grande relevância no controle de doenças transmitidas por alimentos, por ser a ração reconhecida como uma das principais formas de sua introdução na cadeia produtiva animal. Um estudo transversal foi conduzido em quatro fábricas de ração para suínos, visando avaliar a concordância entre o escore obtido na aplicação de roteiro de inspeção de boas práticas de fabricação, definido na Instrução Normativa 4 do Ministério da Agricultura Produção e Abastecimento, e os níveis de coliformes totais encontrados em diversas fases do processo de produção. Em cada fábrica, foram realizados seis ciclos de amostragem e uma aplicação do roteiro de inspeção. Um mínimo de 50 pontos foi amostrado por fábrica, contemplando as etapas de recebimento, processamento e expedição. Em cada amostra, a presença e o número de coliformes totais foi determinado em Agar Bile Violeta Vermelho Neutro. Ao analisar os 128 itens considerados necessários no roteiro de inspeção, verificou-se que o maior número de não conformidades estava concentrado em aspectos relacionados com a estrutura da área física das fábricas. As fábricas A e D foram as que apresentaram o maior número de itens não conformes relacionados à limpeza e higienização de equipamentos. Entre os 29 itens considerados imprescindíveis no roteiro de inspeção, oito não foram cumpridos em pelo menos uma das fábricas. A fábrica B apresentou todos os

itens em conformidade, ao passo que as fábricas A e D não cumpriram os oito itens. A fábrica C apresentou três itens não conformes, relacionados à limpeza de piso e parede, recepção e armazenamento de matérias-primas. Os seguintes escores finais no roteiro de inspeção foram obtidos por fábrica: 94,62 (B); 81,51 (C); 67,37 (A) e 67,11 (D), sendo A e B classificadas como plenamente adequadas e C e D em processo de adequação. De 1269 amostras coletadas, 38,53% (n=489) apresentaram presença de coliformes totais. O número de amostras positivas nas fábricas A, B, C e D foram, respectivamente, 40,7% (129/317), 30,1% (87/289), 52,6% (162/308) e 31,3% (111/355). As contagens logarítmicas médias encontradas considerando todas as amostras analisadas por fábrica foram: A: 0,97 (IC 95%: 0,81-1,13); B: 0,78 (IC 95%: 0,61-0,94); C: 1,32 (IC 95%: 1,16-1,49) e D: 0,91 (IC 95%: 0,75-1,06). Não houve diferença significativa ($P=0,174$) na média de coliformes totais presente em amostras positivas entre pontos amostrados ou fábricas. Dessa forma, não houve concordância entre o escore obtido no roteiro de inspeção aplicado e o número médio de coliformes totais encontrado nas fábricas. A análise por regressão logística, considerando como variável dependente a presença de coliformes totais apontou haver maiores razões de chance (OR) de isolamento nas áreas de dosagem (OR=9,51, IC 95%: 4,43-20,41), moagem (OR=7,10; IC 95%: 3,27-15,40) e mistura (OR=4,10; IC 95%: 2,04-8,17), bem como em resíduos (OR=6,21; IC 95%: 3,88-9,95), no transportador (OR=3,67; IC 95%: 2,28-5,89), na poeira (OR=3,50; IC 95%: 2,10-5,84) e na fábrica C (OR= 2,43, IC 95%: 1,68-3,53). A partir disso, conclui-se que, além de buscar adequação à legislação vigente quanto à estrutura e procedimentos operacionais, é necessário implantar programas de monitoramento microbiológico, limpeza e controle de resíduos nas fábricas de ração para garantir a inocuidade dos alimentos produzidos.

Palavras Chave: Ração animal, fábrica de ração, boas práticas de fabricação (BPF), *Enterobacteriaceae*.

ABSTRACT

The monitoring and control of contamination feed are of great importance in the control of foodborne diseases. A cross-sectional study conducted in four feed mills aimed to evaluate the frequency of isolation of total coliforms at various stages of feed production, and to verify the association between the score obtained by feed mills after the application of the checklist of the Normative 4 (IN 4) of the Brazilian Ministry of Agriculture and Food Supply and the mean of total coliforms found in the unit. Among 1,269 samples analyzed, total coliforms were isolated from 40.7% (129/317), 30.1% (87/289), 52.6% (162/308) and 31.3% (111/355) samples taken at unit A, B, C e D, respectively. The mean logarithmic counts of total coliforms considering all samples were determined for each plant: A: 0.97 (95% CI: 0.81 to 1.13), B: 0.78 (95% CI: 0.61 to 0.94), C: 1.32 (95% CI: 1.16 to 1.49) and D: 0.91 (95% CI: 0.75 to 1.06). A high variability on the number of total coliforms in all the sampled points was found in all feed mills, and there was no statistical difference between the sampling sites and units ($p=0.174$). The logistic regression, with isolation of total coliforms as the response variable, showed a high odds ratio (OR) of dosing (OR = 9.51, 95% CI: 4.43 to 20.41), grinding (OR = 7.10, 95% CI = 3.27 to 15.40), mixing (OR = 4.10, 95 % CI: 2.04 to 8.17), dust (OR = 3.50, 95% CI: 2.10 to 5.84), crusts (OR = 6.21, 95% CI: 3.88 to 9.95) and unit C (OR = 2.43, 95% CI: 1.68 to 3.53). The verification of the 128 items addressed on the Guidelines for Inspection of Normative 4 (IN 4) of the Brazilian Ministry of Agriculture and Food Supply pointed out that factory B had the lowest number of nonconformities. The other three feed mills, presented most faults related to the physical structure of the facilities. Feed mills A and D presented the largest number of nonconformities related to cleaning and sanitizing of equipment. Among the 29 mandatory items in IN4, eight were not met in at least one of the factories. Feed mill B presented all items accordingly, while plants A and D did not meet any of the eight items. Feed mill C had three non-compliant items related to the floor and wall cleaning, reception and storage of raw materials. There was no association between the score obtained on the inspection checklist and the level of total coliforms found in the sampled units, demonstrating that only the compliance to the legislation cannot guarantee the safety of feed produced. It was concluded that programs

for monitoring and control microbial contamination throughout the production line are needed, regardless of the status of the plant in the relation to the current legislation.

Keywords: Feed, feed mills, good manufacturing practices (GMP), *Enterobacteriaceae*.

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é a proteína animal de maior consumo mundial, demandando a produção anual de cerca de 115 milhões de toneladas para suprir o mercado. O Brasil ocupa a posição de quarto maior produtor mundial, participando com 3% da produção total e 11% das exportações. Em 2010, a produção do país atingiu o patamar de 3,24 milhões de toneladas, sendo 540 mil toneladas para exportação (ABIPECS, 2011).

Neste contexto, torna-se imprescindível garantir a produção de um alimento inócuo à saúde do consumidor. Entre as bactérias causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni* e *Clostridium perfringens* têm merecido destaque nos levantamentos de ocorrência. Ovos e produtos cárneos, inclusive de origem suína, figuram entre os veiculadores desses micro-organismos (EFSA, 2006; CDC, 2011). Surto envolvendo produtos de origem suína têm sido relatados (PIRES et al., 2011), demonstrando a importância do controle de patógenos causadores de DTA na cadeia produtiva dessa espécie.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1980), o controle de micro-organismos causadores de DTA nos produtos cárneos compreende três linhas de ação: a primeira linha focada na produção animal (pré-abate); a segunda baseada nos procedimentos de higiene durante o abate e processamento do produto; e a terceira concentrada na avaliação da preparação do produto-final e educação do consumidor acerca da aplicação de medidas de higiene efetivas (pós-abate). Entre as medidas a serem priorizadas no pré-abate, o monitoramento e controle da contaminação da dieta fornecida aos animais assumem grande relevância, por ser a ração reconhecida como uma das principais formas de veiculação de agentes patogênicos (EFSA, 2008).

A adoção de programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) durante a elaboração das dietas nas fábricas de ração são estratégias essenciais para minimizar o risco de contaminação, contribuindo para uma menor pressão de infecção nas granjas (PRIMM, 1998). Dessa forma, a investigação, por meio da amostragem

de pontos críticos definidos no fluxograma das plantas de fábricas, associada ao levantamento de fatores de risco ao longo do processamento, podem contribuir para o melhor conhecimento de pontos de contaminação e recontaminação do produto (PETRI, 2002). Apesar de diversos trabalhos citarem os ingredientes como os maiores responsáveis pela introdução de contaminantes na ração, outros fatores como poeira, presença de roedores, umidade e tempo de estoque têm sido considerados capazes de influenciar a inocuidade de um lote de ração (JONES, 2002; COMA, 2003; RICHARDSON, 2008).

No Brasil, a regulamentação e fiscalização de produtos destinados à alimentação animal é responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), existindo também ações exercidas por associações de classe atuantes na área. Nesse sentido, o Sindicato Nacional de Indústria de Alimentação Animal redefiniu seu programa de certificação incluindo itens relacionados à inocuidade dos alimentos (SINDIRAÇÕES, 2006). No ano seguinte, entrou em vigor a Instrução Normativa número 4 (IN 4) (BRASIL, 2007), regulamento que define os procedimentos básicos de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos produzidos e industrializados destinados ao consumo animal e propõe um roteiro de inspeção das fábricas.

A determinação da presença de micro-organismos patogênicos como ferramenta de monitoramento do produto final apresenta limitações relativas à representatividade da amostra colhida, tempo e custo de análise. Por essa razão, a quantificação de micro-organismos indicadores, como as enterobactérias, tem sido usada para verificar a eficácia de processos de descontaminação e avaliar as condições higiênico-sanitárias das linhas de produção das fábricas de ração (VELDMAN et al., 1995, JONES & RICHARDSON, 2004). Porém, a concordância entre a presença de micro-organismos indicadores da condição higiênica das fábricas e a avaliação obtida pela aplicação do roteiro de inspeção proposto na IN4 ainda não foi investigada.

Assim, o estudo teve como objetivos avaliar as fábricas de ração quanto ao escore obtido na aplicação do roteiro de inspeção e a enumeração de coliformes totais em diversas etapas do processo de produção de dietas para

suínos, verificando a concordância entre os dois instrumentos de avaliação adotados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo transversal em quatro fábricas de dietas para suínos pertencentes a diferentes sistemas verticalizados de produção, localizados nas regiões Sul e Sudeste. A inclusão das fábricas no estudo levou em consideração um volume de produção mínimo pré-estabelecido (4.000 toneladas mensais) e a concordância em participar do estudo. O fluxograma de produção de cada unidade foi listado e um mínimo de 50 pontos de amostragem para pesquisa de enterobactérias foi definido por fábrica, contemplando as etapas de recebimento, processamento e expedição. As etapas amostradas do processo foram definidas, visando incluir ingredientes e processos considerados como críticos para a contaminação do produto final. Em cada fábrica, foram realizados seis ciclos de amostragem e uma aplicação do roteiro de inspeção de boas práticas de fabricação de estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal, que consta como anexo da Instrução Normativa 4 do MAPA (BRASIL, 2007).

2.2 Caracterização das fábricas de ração

As fábricas de ração incluídas no estudo apresentavam-se divididas nas seguintes áreas: recebimento dos ingredientes a granel ou ensacados, armazenagem em silos externos ou internos, galpões e tanques, moagem, dosagem, mistura, peletização, resfriamento, ensaque do produto-final e expedição (Figura 1).

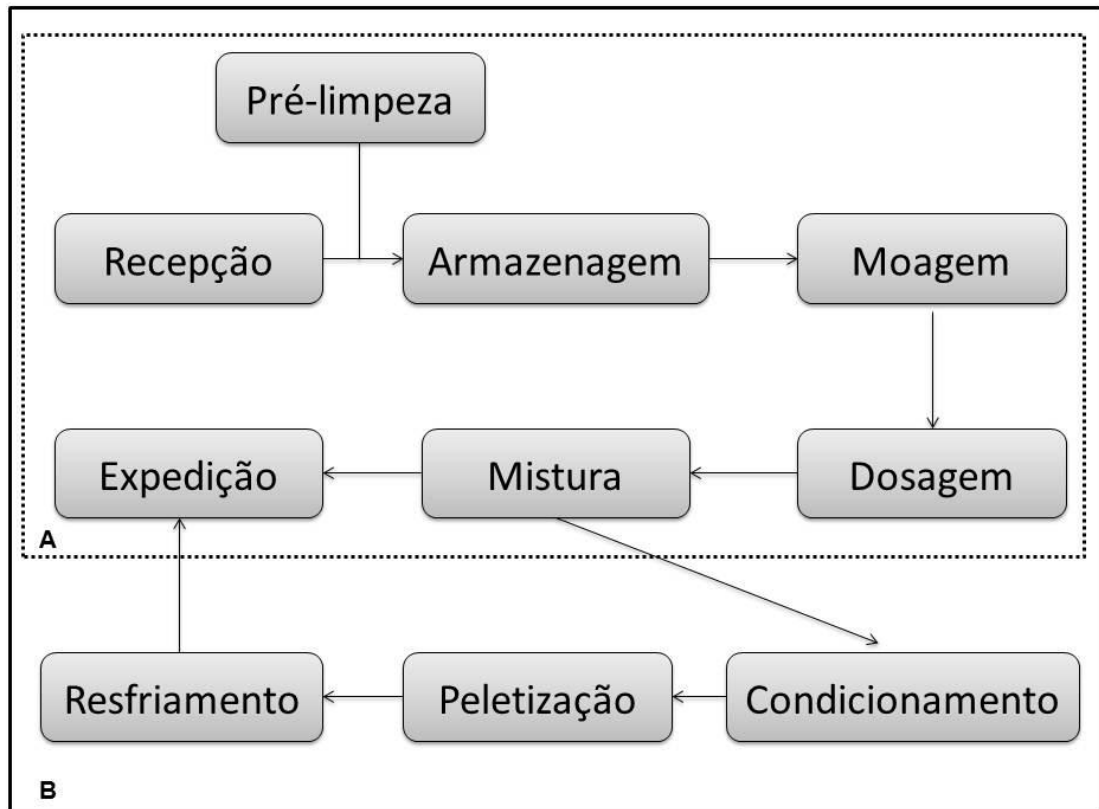


Figura 1 – Fluxograma de produção adotado nas fábricas de ração amostradas no estudo. A= fluxo de produção de ração farelada; B=fluxo de produção de ração peletizada.

A fábrica A produzia somente alimentos destinados a suínos. A principal atividade da unidade B envolvia a produção de concentrados e as fábricas C e D produziam alimentos para diversas espécies de animais domésticos. A produção das unidades A, B, C e D era, respectivamente, 16.000, 4.000, 5.000 e 38.000 tonelada/mês. O recebimento dos ingredientes a granel era realizado em moegas, enquanto os ensacados permaneciam estocados no setor de armazenagem. As fábricas B e C somente utilizavam os ingredientes após serem submetidos a análises físico-químicas realizadas em laboratórios próprios. Enquanto aguardavam os laudos para liberação dos lotes, os produtos permaneciam estocados no setor de armazenagem. Caso houvesse alguma não conformidade do produto, o lote não era utilizado na fabricação. Nas fábricas A e D não eram realizadas análises de rotina nos ingredientes. A distribuição dos ingredientes para os silos internos e externos era realizada por meio de elevadores e transportadores. Somente a fábrica D não possuía setor de pré-limpeza de grãos.

As fábricas B, C e D produziam rações fareladas e peletizadas. A fábrica A produzia somente ração farelada. Apenas a fábrica B possuía uma linha diferenciada com tratamento térmico (peletização), químico (adição de produtos contendo formaldeído e ácidos orgânicos) e encaminhava para terceiros produtos de uma linha específica para tratamento físico (irradiação). Em todas as unidades visitadas, a expedição do produto final era realizada diretamente no interior de caminhões ou após ensaque.

Quanto à adoção de programas de qualidade e certificações, na fábrica B já estavam implantados programas de BPFs avançadas e APPCC, segundo recomendações contidas no programa “Feed and Food Safety” (Gestão do Alimento Seguro), propostos pelo SINDIRAÇÕES (2006). As demais fábricas estavam em fase de adequação e estruturação dos itens propostos na IN 4 (BRASIL, 2007).

2.3 Aplicação do roteiro de inspeção

O roteiro de inspeção foi aplicado pelo mesmo operador, na última visita realizada em cada fábrica incluída no estudo. O roteiro está subdividido em quatro grupos de itens: identificação da empresa; avaliação do estabelecimento; avaliação dos procedimentos operacionais padrões; e classificação do estabelecimento. A avaliação do estabelecimento aborda questões sobre: *i.* instalações, equipamentos e utensílios; *ii.* programa de treinamento de funcionários; *iii.* controle do processo de produção, armazenamento e expedição. Por outro lado, a avaliação de procedimentos operacionais padrões verifica: *i.* qualificação de fornecedores e controle de matérias-primas, ingredientes e de embalagens; *ii.* limpeza/higienização de instalações, equipamentos e utensílios; *iii.* higiene e saúde do pessoal; *iv.* potabilidade da água e higienização do reservatório; *v.* Prevenção de contaminação cruzada; *vi.* manutenção e calibração de equipamentos e instrumentos; *vii.* controle integrado de pragas; *viii.* controle de resíduos e efluentes; *ix.* rastreabilidade e recolhimento de produtos.

O escore para classificação do estabelecimento é obtido considerando o atendimento dos itens classificados como imprescindíveis ou necessários, conforme a média ponderada calculada pela seguinte equação:

Pontuação = $\{(soma\ dos\ itens\ imprescindíveis\ atendidos\ sobre\ o\ total\ dos\ itens\ imprescindíveis\ do\ roteiro\ x\ 100)\ x\ 2 + (soma\ dos\ itens\ necessários\ atendidos\ sobre\ o\ total\ dos\ itens\ necessários\ do\ roteiro\ x\ 100)\}/3$.

De acordo com a pontuação, os estabelecimentos são classificados em grupos: de 81 a 100 (Grupo 1); de 61 a 80 (Grupo 2); de 41 a 60 (Grupo 3); e de 0 a 40 (Grupo 4). Os estabelecimentos exportadores e fabricantes de produtos com medicamentos devem estar classificados no Grupo 1. Os estabelecimentos classificados como Grupo 2 e 3 recebem prazos para adequação, enquanto aqueles classificados no Grupo 4 sofrem interdição temporária (BRASIL, 2009).

2.4 Coleta de amostras para pesquisa de coliformes totais

Em cada ponto amostrado, cerca de 100 g de ingredientes, poeira ou resíduos depositados no chão e na superfície dos equipamentos (silos, transportadores, moinhos, balanças, peletizadoras e resfriadores) foram colhidos, procurando mesclar de 5 a 10 alíquotas individuais para aumentar a representatividade da amostra (RICHARDSON, 2008). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em temperatura ambiente ao Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS.

2.5 Isolamento e enumeração de coliformes totais

Cada amostra foi homogeneizada e foram retirados 25 g, adicionadas, a seguir, a 225 ml de água peptonada tamponada. A partir dessa diluição (10^{-1}) foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-6} . Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram pipetadas, em duplicata, em placas de Petri estéreis. A seguir, cerca de 15 mL de Agar Bile Violeta Vermelho Neutro (VRBA, Oxoid) fundido foi acrescido e homogeneizado com o inóculo. Após a solidificação do meio, uma sobrecamada de 5 mL de meio fundido foi acrescido a cada placa. Após incubação a 37°C por 48 h, colônias características (rosas rodeadas por precipitado de cor púrpura) foram contadas nas placas que apresentavam entre 20 e 200 colônias. Os resultados foram obtidos após a multiplicação do número médio de colônias presentes nas duas placas, onde foi realizada a contagem, multiplicado pelo inverso da diluição semeada nas referidas placas. A

contagem obtida foi expressa em número de unidades formadoras de colônia por grama de ração (UFC.g⁻¹).

2.6 Análise de dados

As quatro fábricas caracterizavam-se pela grande diversidade de equipamentos e processos. Visando tornar possível a comparabilidade entre as unidades, os pontos amostrados foram estratificados nas seguintes áreas: ingredientes ensacados, ingredientes a granel, transportadores, extrusão, moagem, dosagem, mistura, peletização, produto final, poeira e resíduo. Por apresentar uma distribuição assimétrica à direita, a variável numérica referente à quantificação de coliformes totais, expressa em Unidades Formadoras de Colônias/g (UFC. g⁻¹), foi convertida em escala logarítmica. A comparação entre as áreas e fábricas quanto ao grau de contaminação por coliformes totais foi realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

Para verificar quais áreas e fábricas apresentaram maior probabilidade de contaminação por coliformes totais, primeiramente foi realizada uma análise univariada através do teste de qui-quadrado (χ^2). As áreas ingredientes ensacados, ingredientes a granel, transportador, dosagem, moagem, mistura, peletização, produto final, poeira e resíduos e as fábricas foram significativas ($p < 0,25$), sendo incluídas no modelo de regressão logística para estimação das razões de chance (Odds Ratio - OR) para presença de coliformes totais. A estratégia escolhida para elaboração do modelo foi o método "enter", sendo a fábrica B e a área armazenagem selecionadas como referência por apresentarem menores frequências de isolamento. O modelo escolhido foi aquele que utilizando os valores das variáveis preditoras resultaria em um valor de Y mais próximo do valor observado. Para avaliar a aderência do modelo comparando os dados observados e os previstos, foram utilizadas a estatística de verossimilhança-log e avaliação dos resíduos. Todos os parâmetros foram estimados em intervalos com 95% de confiança. As análises foram realizadas no programa SPSS versão 18 (2010).

3. RESULTADOS

Ao analisar os 128 itens classificados como necessários no roteiro de inspeção da IN4 (Tabela 1), verificou-se que a fábrica B apresentou o menor número de não conformidades, com apenas três itens em desacordo com a legislação, correspondentes à área interna, instalações sanitárias/vestiários para funcionários e equipamentos/ utensílios. Nas demais fábricas, os maiores problemas concentraram-se mais no grupo referente à estrutura do estabelecimento do que no de implantação de Procedimentos Operacionais Padrões, onde os itens relativos ao abastecimento de água, controle de pragas, manutenção de equipamentos e programas de rastreabilidade foram cumpridos por todas as unidades avaliadas. As fábricas A e D foram as que apresentaram o maior número de itens não conformes em ambos os grupos, sendo os itens relacionados à limpeza e higienização de equipamentos considerados os mais críticos. Em todas as fábricas, a maior dificuldade em cumprir a legislação foi encontrada em relação à estrutura da área interna e externa das fábricas.

Tabela 1 – Número de itens não conformes no grupo daqueles classificados como necessários no Roteiro de Inspeção (IN4), em quatro fábricas de ração (A, B, C, D).

Grupo/Item	N	Itens não-conformes			
		A	B	C	D
Área externa	5	4	0	4	4
Área interna	20	15	1	10	14
Instalações sanitárias e vestiários para os funcionários	14	4	1	0	2
Lavatórios para a área de produção	3	0	0	0	3
Instalações	3	1	0	0	2
Equipamentos e utensílios	5	4	1	1	2
Programa de treinamento de funcionários	3	0	0	0	0
Controle do Processo de Produção, Armazenamento e Expedição	9	0	0	0	3
Procedimentos Operacionais Padrões					
Qualificação de fornecedores e controle de matérias-primas, ingredientes e embalagens	8	1	0	0	1
Limpeza/higienização de instalações, equipamentos e utensílios	7	3	0	0	3
Higiene e saúde do pessoal	10	2	0	1	1
Potabilidade da água e higienização do reservatório	7	0	0	0	0
Prevenção de contaminação cruzada	5	1	0	0	1
Manutenção e calibração de equipamentos e instrumentos	7	0	0	0	0
Controle integrado de pragas	8	0	0	0	0
Controle de resíduos e efluentes	9	2	0	2	2
Rastreabilidade e recolhimento de produtos	5	0	0	0	0
Total	128	37	3	18	38

Entre os 29 itens classificados como imprescindíveis no Roteiro de Inspeção, oito não foram cumpridos em pelo menos uma das fábricas (Tabela

2). A fábrica B apresentou todos os itens em conformidade, ao passo que as fábricas A e D não cumpriram os oito itens. A fábrica C apresentou três itens não conformes, relacionados à limpeza de piso e parede, recepção e armazenamento de matérias-primas.

Tabela 2 – Itens do Roteiro de Inspeção (IN4) classificados como imprescindíveis e que estavam não conformes nas fábricas de ração (A, B, C, D).

Item	Fábrica			
	A	B	C	D
Pisos e paredes em bom estado de limpeza e conservação	X		X	X
Área isolada para armazenar aditivos e medicamentos	X			X
Recepção da matéria-prima ou ingredientes em local coberto ou em sistema fechado	X		X	X
Matérias-primas e ingredientes armazenados em área específica e em condições apropriadas	X		X	X
Produtos de limpeza ou higienização identificados e guardados em local adequado	X			X
Asseio corporal, mãos limpas, unhas curtas, sem esmalte, sem adornos e manipuladores com barbas, bigodes e cabelos protegidos.	X			X
Controle de sequência da elaboração dos produtos visando evitar contaminação	X			X
Manipulação de aditivos e medicamentos é realizada de forma que evite a contaminação cruzada.	X			X

A partir da avaliação dos itens do roteiro de inspeção proposto na IN4, foram obtidos os seguintes escores por fábrica: 94,62 (B); 81,51 (C); 67,37 (A) e 67,11 (D), classificando as fábricas B e C no Grupo 1 e as fábricas A e D no Grupo 2, de acordo com o previsto na Instrução Normativa 15 do MAPA (BRASIL, 2009).

No total, foram analisadas 1.269 amostras, das quais 489 (38,53%) tiveram presença de coliformes totais. O número de amostras positivas nas fábricas A, B, C e D e nas áreas amostradas está apresentado na Tabela 3. As contagens médias encontradas, expressas em \log_{10} , considerando todas as amostras analisadas por fábrica, foram: A: 0,97 (IC 95%: 0,81-1,13); B: 0,78 (IC 95%: 0,61-0,94); C: 1,32 (IC 95%: 1,16-1,49) e D: 0,91 (IC 95%: 0,75-1,06). Ao analisar conjuntamente os dados de todas as fábricas, as áreas dosagem, moagem e resíduos apresentaram as maiores frequências de presença de coliformes totais, enquanto as áreas ingredientes, produto final e armazenagem apresentaram menor número de amostras positivas (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência de amostras positivas para coliformes totais em quatro fábricas de ração (A, B, C, D), de acordo com a área de produção amostrada.

Áreas	Positivos/Total				Total
	A	B	C	D	
Ingredientes ensacados	0/9(0%)	3/26(11,5%)	5/11(45,4%)	0/14 (0%)	8/60 (13,33%)
Ingredientes a granel	14/96(14,5%)	26/100(26%)	17/82(20,7%)	16/106(15,1%)	73/384 (19,01%)
Transportador	18/48(37,5%)	18/35(51,4%)	45/54(83,3%)	6/27(22,2%)	87/164 (53,05%)
Extrusão			10/24(41,6%)		10/24 (41,67%)
Dosagem	5/6(83,3%)	13/21(61,9%)	10/12(83,3%)	4/5(80%)	32/44 (72,73%)
Moagem	7/12(58,3%)	6/6(100%)	5/6(83,3%)	6/13(46,2%)	24/37 (64,86%)
Mistura	3/6(50%)	0/10(0%)	11/12(91,7%)	10/17(58,8%)	24/45 (53,33%)
Peletização		7/30(23,3%)	8/24(33,3%)	10/43(23,3%)	25/97 (25,77%)
Produto final	6/23(26,1%)	0/24(0%)	5/12(41,7%)	2/21(9,5%)	13/80 (16,25%)
Poeira	6/24(25%)	2/18(11,1%)	14/17(82,3%)	36/65(55,4%)	58/124 (46,77%)
Resíduos	70/93(75,2%)	12/19(63,2%)	32/54(59,3%)	21/44(47,7%)	135/210(64,29%)
Total	129/317 (40,7%)	87/289 (30,1%)	162/308 (52,6%)	111/355 (31,3%)	489/1269 (38,53%)

Ao comparar as áreas de produção entre as fábricas (Tabela 4) foi possível observar a elevada variabilidade na quantificação de coliformes totais em todos os pontos amostrados nas quatro fábricas. Segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, não houve diferenças significativas entre os pontos amostrados e entre as fábricas ($p=0,174$). Em analogia com níveis detectados de coliformes totais em alimentos destinados ao consumo humano, foi possível verificar que 38,45% das amostras apresentaram níveis acima de 2 Log UFC.g⁻¹, 18,20% acima de 3 Log UFC.g⁻¹ e 9,61% acima de 4 Log UFC.g⁻¹. Os maiores níveis de contaminação estavam presentes nas áreas de resíduos e poeira provenientes das fábricas A e D, respectivamente.

Tabela 4 – Número médio de coliformes totais (Log UFC.g⁻¹) e desvio padrão encontrados em amostras positivas colhidas em diferentes áreas de processamento de quatro fábricas de ração.

Áreas	A	B	C	D
Ingredientes ensacados	0,00	1,86 (0,36)	2,45 (0,68)	0,00
Ingredientes a granel	1,86 (0,81)	1,98 (0,51)	2,30(1,16)	2,13 (0,57)
Transportador	2,09 (1,01)	2,42 (0,87)	2,31 (0,77)	2,68 (0,97)
Extrusão	-	-	3,02 (1,72)	-
Dosagem	2,64 (0,69)	3,82 (1,94)	2,66 (0,80)	2,59 (0,84)
Moagem	2,68 (1,40)	2,38 (0,41)	3,21 (1,45)	3,11 (1,23)
Mistura	1,96 (0,64)	0,00	1,99 (0,53)	2,90 (0,93)
Peletização	-	1,99 (0,83)	2,10 (0,98)	2,64 (1,11)
Produto final	1,09 (0,38)	0,00	2,08 (0,32)	1,76 (0,06)
Poeira	1,56 (0,55)	1,55 (0,30)	2,41 (0,79)	3,08 (0,95)
Resíduos	2,70 (1,33)	3,61 (1,24)	3,02 (0,95)	3,45 (1,39)

Como os processos extrusão e peletização não eram realizados em todas as fábricas analisadas, optou-se pela exclusão destas variáveis na análise estatística. Todas as demais áreas testadas foram significativas na análise univariada ($p < 0,25$). No modelo de regressão logística considerando como variável dependente a presença de coliformes totais (Tabela 5) foram significativas as seguintes variáveis: transportador, dosagem, moagem, mistura, varredura, resíduos e fábrica C. As estatísticas residuais indicaram uma boa adequação do modelo, com distância de Cook e DFBeta das variáveis predictoras apresentando valores inferiores a 1 e resíduos padronizados abaixo de $\pm 2,5$.

Tabela 5 – Razão de Chances (*Odds ratio* – OR), Intervalo de Confiança (IC 95%) e valor de P obtidos no modelo de regressão logística de acordo com a presença de enterobactérias nas fábricas de ração analisadas

Áreas	OR	IC 95%	p valor
Ingredientes a granel	0,81	0,53 - 1,26	0,357
Transportador	3,67	2,28 – 5,89	0,000
Dosagem	9,51	4,43 – 20,41	0,000
Moagem	7,10	3,27 – 15,40	0,000
Mistura	4,10	2,04 – 8,17	0,000
Produto final	0,71	0,35 – 1,43	0,341
Poeira	3,50	2,10 – 5,84	0,000
Resíduos	6,21	3,88 – 9,95	0,000
Fábrica C	2,43	1,68 - 3,53	0,000
Fábrica D	0,92	0,63 - 1,35	0,682
Fábrica A	1,14	0,77 - 1,67	0,514

Legenda: A fábrica B e a área Ingredientes ensacados foram consideradas como referência.

4. DISCUSSÃO

O roteiro de inspeção foi capaz de segregar as quatro fábricas em dois grupos, de acordo com o cumprimento dos itens imprescindíveis e necessários que compõem as avaliações dos estabelecimentos e implantação de procedimentos operacionais padrões. De acordo com os escores obtidos, duas fábricas (B e C) foram classificadas, conforme previsto na IN 15 do MAPA (BRASIL, 2009), como aptas à produção para o mercado externo e interno (Grupo 1). As duas fábricas restantes (A e D) estavam em situação de adequação (Grupo 2), necessitando correção de alguns itens estruturais.

A quantificação de coliformes totais não diferenciou as quatro fábricas amostradas e nem as áreas avaliadas, demonstrando que os níveis de contaminação por indicadores higiênico-sanitários eram similares entre grupos. Há algum tempo a quantificação de enterobactérias e coliformes totais têm sido mencionada como indicador da presença de outros micro-organismos, como *Salmonella*, em ração. Van Schothorst & Oosterrom (1984) sugeriram a utilização da contagem para avaliação das BPF nas linhas de produção, enquanto Veldman e colaboradores (1995) descrevem a família *Enterobacteriaceae* como indicadores úteis tanto da contaminação por *Salmonella* quanto para avaliação de processos de descontaminação. Jones & Richardson (2004) verificaram que as amostras de ração (farelada e peletizada) contaminadas com *Salmonella* continham níveis significativamente maiores de enterobactérias do que as amostras sem a presença deste agente, considerando que a enumeração de enterobactérias poderia indicar a probabilidade de contaminação por *Salmonella* em amostras de ração. Programas de monitoramento de *Salmonella* (PDV, 2002; EFSA, 2008) indicam a contagem de enterobactérias como uma boa ferramenta de avaliação.

Comparando os resultados das duas análises conduzidas, não foi possível observar concordância entre o escore obtido pelas fábricas de ração no roteiro de inspeção (IN4) e as médias de coliformes totais encontradas em etapas do processo de produção. As fábricas A e D, que obtiveram os escores mais baixos no roteiro de inspeção, apresentaram médias de coliformes totais semelhantes à fábrica C, que obteve o segundo melhor escore.

Um dos objetivos do roteiro de inspeção da IN4 e da classificação prevista na IN15 é buscar a melhoria nas condições de produção de fabricantes classificados nos grupos 2 e 3 e a interdição temporária daqueles classificados como Grupo 4. É importante observar que nenhuma das fábricas analisadas foi classificada no grupo destinado à interdição, ou seja, o estudo foi conduzido em estabelecimentos que apresentavam uma boa estrutura e controle de processo. As boas condições operacionais das quatro fábricas pesquisadas podem ter refletido na frequência de amostras com isolamento de coliformes totais (38,53%) e nos baixos níveis médios encontrados nas diversas áreas. Ao lado disto, a ampla variabilidade verificada nas contagens obtidas entre visitas

também pode ter influenciado na não concordância entre escore da fábrica e média de coliformes totais. Essa variabilidade resulta da flutuação normal encontrada em populações bacterianas, além da heterogeneidade encontrada em equipamentos e das variações intrínsecas ao dia de coleta e ao processo de amostragem.

Ao analisar as frequências de isolamento (presença/ausência) de coliformes totais, nota-se que as amostras de resíduos, dosagem e moagem apresentaram os maiores índices de positividade, ao passo que a análise univariada demonstrou que houve diferença significativa entre as frequências encontradas nas fábricas A, B, C e D quando comparadas às esperadas ($p=0,000$). A fábrica C apresentou 2,47 mais chances de produzir uma ração com a presença de coliformes totais quando comparada à unidade B (referência), enquanto a dosagem, resíduos, moagem, mistura, poeira e transportador apresentaram maiores probabilidades de estarem associadas ao aumento no número de amostras com a presença destes micro-organismos.

Entre as amostras que apresentaram maiores frequências de isolamento de coliformes totais neste estudo, resíduos (incrustações) e poeira já foram descritas em outros estudos (JONES, 2002; JONES & RICHARDSON, 2004; TORRES et al., 2011). A poeira produzida durante o processo de fabricação de alimentos tende a permanecer em suspensão, absorvendo a umidade e favorecendo a formação de incrustações e, conseqüentemente, a multiplicação e manutenção da contaminação bacteriana. A utilização de filtros em equipamentos com elevada capacidade de produção e acúmulo de poeira pode ser uma alternativa a ser adotada visando à retenção de partículas finas em suspensão, entretanto a troca dos filtros deve ser realizada de acordo com a saturação (STARK & JONES, 2010).

Todas as fábricas analisadas neste estudo realizavam a moagem em moinhos de martelo. A aceleração necessária nos moinhos que possibilite a moagem dos grãos favorece duas situações: a redução da partícula até a granulometria desejada e a produção de calor. A temperatura pode subir 10 a 12°C durante o processo, havendo uma pequena dissipação do calor produzido durante o transporte até os silos de armazenagem. Uma vez nos silos, a umidade tende a se acumular nos locais mais frios, favorecendo o crescimento

microbiano. O acúmulo de umidade dependerá do tempo de armazenagem do produto, de modo que esse deve permanecer estocado o menor período de tempo possível (JONES, 2002).

Os transportadores (conhecidos como elevadores) são os meios de transporte de produtos mais eficientes tanto para os silos de armazenagem quanto para equipamentos da produção. Entretanto, estes equipamentos contribuem para a elevação da temperatura ao longo do processo de produção, principalmente próximo às cabeceiras e seções de inicialização e, também favorecem a dispersão de grandes quantidades de poeira, facilitando a ocorrência de contaminação cruzada. Além disso, o calor gerado implica diretamente no aumento da umidade principalmente nas áreas mais frias, amplificando ainda mais o potencial de contaminação (JONES, 2002).

A fábrica B obteve o maior escore no roteiro de inspeção, com todos os itens imprescindíveis em conformidade e poucos itens necessários pendentes. Esta unidade seguia não somente os procedimentos presentes na IN4, como também possuía certificação do Programa do Alimento Seguro (Feed and Food Safety), proposto pelo Sincirações, que contempla três certificações de BPF, APPCC e também de Equivalência Internacional. Este resultado reforça a importância dos programas de qualidade na produção de alimentos seguros.

É interessante observar que a fábrica C obteve o segundo maior escore no roteiro de inspeção ao mesmo tempo em que permaneceu no modelo de regressão logística como a única fábrica com risco de produzir ração contaminada por coliformes totais. Dentre todas as unidades avaliadas, a fábrica C caracterizava-se pela estrutura física e fluxo de produção complexo, o que provavelmente favorecia a formação e manutenção de poeira na fábrica. Este achado reforça a hipótese de que o roteiro de inspeção é ideal apenas para avaliar BPF, enquanto que a quantificação de coliformes totais reflete o grau de contaminação, inclusive por agentes de origem entérica, estando associado a diversos outros fatores relacionados à sanificação da unidade de produção. A inocuidade da ração produzida, por sua vez, é de suma importância, uma vez que esta apresenta alto poder de veiculação e disseminação de diversos micro-organismos nos plantéis, gerando, além de

perdas econômicas, uma grande ameaça para a sanidade animal e para a saúde pública (MACIOROWSKI et al., 2006).

Os equipamentos das fábricas são caracterizados pela dificuldade de acesso, normalmente sem a existência de janelas de inspeção, o que dificulta muito a realização de procedimentos de limpeza e higienização. A maioria é propícia ao acúmulo de resíduos e sujidades, além de contribuírem para a formação e manutenção da poeira em suspensão nas dependências da fábrica. Por conta disto, a limpeza e higienização frequentemente são negligenciadas nas fábricas. Procedimentos de controle implantados no programa de APPCC e a realização de tratamentos físico e/ou químico auxiliariam na prevenção da disseminação da contaminação microbiana para áreas limpas destinadas ao acondicionamento de produto final e, conseqüentemente, para a ração pronta para consumo, embora outras variáveis como o desenho da fábrica e a contaminação por fatores ambientais externos possam influenciar este resultado (WIERUP & HÄGGBLÖM, 2010).

Os maiores problemas caracterizados no roteiro de inspeção foram relacionados à estrutura interna e externa das fábricas, compreendendo itens referentes à construção, estrutura física e área da unidade de produção (presença de materiais em desuso, conservação de pisos, paredes, janelas, iluminação e ventilação, entre outros), havendo maior adequação quanto à realização dos Procedimentos Operacionais Padrões. Isso pode ser justificado pelo fato de que no processo de adequação à legislação vigente, em que as fábricas se encontravam, as alterações imediatas normalmente referem-se aos programas de qualidade, já que modificações na estrutura física demandam maiores investimentos e planejamentos.

Dentre os 29 itens imprescindíveis, as quatro fábricas avaliadas atenderam pelo menos 21 destes. Os itens não atendidos pelas unidades A, C e D referiam-se à conservação de pisos e paredes, recepção e armazenagem apropriada de matérias-primas e ingredientes. Os demais itens não conformes relacionavam-se à armazenagem de aditivos, medicamentos e produtos de limpeza, higiene pessoal e controle da contaminação cruzada. Esses resultados indicam a vulnerabilidade das fábricas quanto à ocorrência de contaminação cruzada tanto por micro-organismos quanto por aditivos e

medicamentos mal manuseados, além da possibilidade de persistência da contaminação em pisos e paredes propícios a acúmulo de resíduos.

A proposta do MAPA ao instituir a IN4 foi regulamentar as condições higiênico-sanitárias e BPFs preconizadas para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal, e encontrou no roteiro de inspeção uma maneira de avaliar a adoção de programas de qualidade nas unidades de produção. Pelos resultados apresentados, foi possível verificar que o roteiro foi capaz de avaliar se a fábrica havia implantado BPF ao longo do processo de produção, auxiliando na realização do controle da inocuidade do alimento produzido, entretanto constatou-se que há outros fatores que influenciam os níveis microbiológicos na ração e que não podem ser medidos por este instrumento de avaliação.

Sendo assim, verifica-se que mesmo cumprindo a maioria dos itens imprescindíveis e necessários presentes no roteiro de inspeção, há incerteza quanto à ausência de contaminação bacteriana nas etapas do processo de produção. Desse modo, as fábricas devem incluir o monitoramento de indicadores como parte indispensável dos protocolos de controle de qualidade, buscando a adoção de medidas de limpeza e higienização em todas as etapas do processo de produção.

5. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que não houve concordância entre o escore obtido no roteiro de inspeção e os níveis de coliformes totais encontrados nas fábricas amostradas. O roteiro de inspeção, desenvolvido para avaliar a implantação e manutenção das BPFs, não foi capaz de refletir o grau de contaminação por coliformes totais nas linhas de produção.

Os processos dosagem e moagem e as amostras de resíduos foram considerados os mais críticos no processo de produção da ração pela maior frequência de isolamento. Outros processos como mistura e equipamentos como transportadores e amostras de poeira também implicaram no aumento da probabilidade de produzir rações contaminadas.

As fábricas devem buscar adequação segundo a legislação vigente em paralelo à implantação de programas de qualidade, monitoramento e controle microbiológico ao longo da linha de produção visando à inocuidade dos alimentos produzidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS. Relatório de Atividades: Exportações Brasileiras de Carne Suína 2010/2011. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acessado em: 12 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Instrução Normativa n° 4, de 23 de fevereiro de 2007. - Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à Alimentação Animal e o Roteiro de Inspeção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 mar 2007.

BRASIL. Instrução Normativa n° 15, de 26 de maio de 2009. – Regulamenta o registro dos estabelecimentos e dos produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 mai 2009.

CDC. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks -United States, 2008. Atlanta, USA, 09 set 2011 Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035aw>. Acessado em: 19 de novembro de 2011.

COMA, J. *Salmonella* control in pork: effect of animal nutrition and feeding. **Pig News and Information**, v.24, p. 49-62, 2003.

EFSA. Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production. **The EFSA Journal**, n. 341, p. 1-131, 2006.

EFSA. Microbiological risk assessment in feedingstuff for foodproducing animals. **The EFSA Journal**, n.720, p. 1-84, 2008.

JONES, F. T. Feed mills APPCC and pathogens reduction strategies. In: Multi-State Poultry Meeting, 2002, p.1-9.

JONES, F. T.; RICHARDSON, K. E. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. **Poultry Science**, v. 83, p.384-391, 2004.

MACIOROWSKI, K. G.; HERRERA, P.; JONES, F. T.; PILLAI, S. D.; RICKE, S. C. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. in Animal Feeds – A Review. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 127-137, 2006.

PDV. **Programme Monitoring Salmonella in the animal feed sector**. Amsterdam, NL, 2002, 39 p.

PETRI, A. Aspects of quality assurance in European Feed Production. Degussa AG. **Relatório PAT 2002** Embrapa Suínos e Aves, Concórdia: SC, p. 57, 2002.

PIRES, S. M.; KNEGT, L.; HALD, T. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human Salmonella infections in the European Union. **DTU National Food Institute**, 80p, 2011.

PRIMM, N. D. Field experiences with the control of Salmonella e introduction into turkey flocks via contaminated feeds. **Proceedings Western Poultry Conference**, v. 47, p. 27-29, 1998.

RICHARDSON, K. Comprendiendo la contaminación microbiana en el alimento. **World Poultry**, v.26, n.4, p.12-15, 2008.

SINDIRAÇÕES. Manual Feed & Food Safety. Gestão do Alimento Seguro. Versão 3. Outubro/2006. São Paulo: Sindirações. Disponível em: <<http://www.sindiracoes.org.br>>. Acesso em: 05 abr 2010.

STARK, C. R.; JONES, F. T. Quality assurance program in feed manufacturing. **Feedstuffs**, p. 62-67, 15 set 2010.

TORRES, G. J.; PIQUER, F. J.; ALGARRA, L.; DE FRUTOS, C.; SOBRINHO, O. J. The prevalence of Salmonella enterica in Spanish feed mills and potential feed-related risk factors for contamination. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, p. 81-7, 2011.

VAN SCHOTHORST, M.; OOSTERROM, J. Enterobacteriaceae as indicators of good manufacturing practices in rendering plants. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 50, p. 1-6, 1984.

VELDMAN, A.; VAHL, H. A.; BOORGGREVE, G. J; FULLER, D. C. A survey of the incidence of Salmonella species and Enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. **Veterinary Records**, v.136, p.169-172, 1995.

WHO. Report of the WHO/WAVFH Round Table Conference on the Present Status of the Salmonella Problem (Prevention and Control). Bilthoven,; Netherlands, WHO/VPH/81.27, 1980.

WIERUP, M.; HÄGGBLUM, P. (2010) An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of salmonella contamination in pig production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 1-9, 2010.

CAPITULO IV – SEGUNDO ARTIGO

Identificação de grupos clonais de *Salmonella* e enumeração de coliformes totais em diferentes etapas do processo de produção de quatro fábricas de ração brasileiras

Identification of *Salmonella* clonal groups and total coliforms quantification in different risk areas of manufacturing process in four Brazilian feed mills

RESUMO

A presença de *Salmonella* em alimentos é uma das mais importantes barreiras sanitárias à exportação. A ração contaminada representa potencial fonte de introdução de *Salmonella* nos rebanhos suínos, além do risco indireto de infecção ao consumidor. Um estudo transversal conduzido em quatro fábricas de ração teve como objetivos avaliar a frequência de isolamento de *Salmonella*, visando verificar a presença do agente nas diversas etapas do processo de produção, além de identificar e correlacionar grupos clonais de *Salmonella* sp. através da análise de macrorestrição associada à eletroforese em campo pulsado (PFGE). De 1.269 amostras analisadas, sessenta e três (4,96%) apresentaram presença de *Salmonella* sp. As quatro fábricas avaliadas (A, B, C e D) apresentaram respectivamente 3,5% (n=11/317), 1,7% (n=5/289), 7,1% (n=23/308) e 7% (n=25/355) de amostras positivas. Nas fábricas A e D, *Salmonella* foi detectada em amostras de produto final. Estirpes apresentando pulsotipos semelhantes foram identificadas nos sorovares Orion, Montevideo, Worthington e Agona. Foi possível verificar que o sorovar Montevideo obteve o maior número de grupos clonais, apresentando pulsotipos distribuídos entre ingredientes, poeira, equipamentos e ração. O isolamento de *Salmonella* foi significativamente mais frequente (p=0,002) em amostras com a presença (36/489; 7,36%) do que com ausência de coliformes totais (27/780; 3,46%). Os transportadores (OR= 4,43; IC 95%: 2,43-8,09) foram os locais com maior probabilidade de isolamento de *Salmonella*, seguidos da poeira coletada nas

dependências da fábrica (OR=2,88; IC 95%: 1,41-5,88). Comparadas à fábrica B, as unidades C e D apresentaram, respectivamente, 2,74 e 2,83 mais chances de isolamento de *Salmonella*. O desenho de equipamentos de fácil limpeza e higienização e com mínimo acúmulo de poeira e resíduos deve ser incluído nos programas de controle de *Salmonella* em paralelo às demais medidas de controle preconizadas.

Palavras chave: *Salmonella*, Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), pontos críticos, processo de produção de ração, suínos.

ABSTRACT

The presence of *Salmonella* is one of the most important sanitary barriers to food exports. The contaminated feed is a potential source of introduction of *Salmonella* in pig herds, and may also represent a risk for the consumer. A cross-sectional study conducted in four feed mills aimed to evaluate the frequency of isolation of enterobacteria and *Salmonella* at various stages of feed production, and to identify clonal groups of *Salmonella* sp. obtained by macrorestriction analysis associated with pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Of 1,269 samples analyzed, sixty-three (4.96%) showed the presence of *Salmonella*. The four factories evaluated (A, B, C and D) presented, respectively, 3.5% (n = 11/317), 1.7% (n = 5/289), 7.1% (n = 23/308) and 7% (n = 25/355) of positive samples. In the factories A and D, *Salmonella* was detected in samples of final product. Strains showing similar genotypes have been identified in serovar Orion, Montevideo, Worthington and Agona. Serovar Montevideo presented the highest number of clonal groups, with pulsotypes distributed among ingredients, dust, equipment and feed. The isolation of *Salmonella* was significantly higher ($p=0.002$) in samples with the presence of total coliforms (36/489; 7.36%) than in the negative ones (27/780; 3.46%). The conveyors (OR = 4.43, 95% CI: 2.43-8.09) were the most likely sites of isolation of *Salmonella*, followed by the dust collected on the premises of the plant (OR = 2.88, 95% CI: 1.41-5.33). Compared to the factory B, units C and D showed respectively, 2.74 and 2.83 higher odds of isolation of *Salmonella*. The design of equipment allowing easy cleaning and with minimal accumulation of dust and

debris should be included in *Salmonella* control programs in parallel with other recommended control measures.

Keywords: Salmonella, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), critical points, production of feed and swine.

1. INTRODUÇÃO

A presença de *Salmonella* consiste em uma das mais importantes barreiras sanitárias à comercialização de alimentos, por implicar em rejeição do produto e rescisão do contrato de exportação (EFSA, 2008). Os produtos de origem animal (principalmente oriundos de aves e suínos) desempenham um importante papel na transmissão de *Salmonella* para os humanos (BERENDS et al., 1998). Em países com baixa prevalência da infecção em animais, a ração assume um importante papel como fonte de contaminação (EFSA, 2010), entretanto, poucos trabalhos conseguem mensurar a real proporção de toxinfecções em humanos atribuível à contaminação da ração (CRUMP et al., 2002). O frequente isolamento de sorovares em ingredientes e no produto final associados à ocorrência de infecções em humanos reforça a importância da prevenção e controle da presença de *Salmonella* na ração e, também, na busca de novas alternativas para minimizar o risco da contaminação. Em estudo realizado por Wierup & Häggblom (2010), quatro (10,5%) dos 38 sorotipos isolados em ração estão incluídos no topo da lista de isolados clínicos de humanos confirmados de salmonelose na União Européia (UE).

Todos os ingredientes da ração são potencialmente sujeitos à contaminação. Entretanto, a prevalência é baixa (< 10% nas amostras testadas) e ocorre em agrupamentos (JONES & RICKE, 1994). O peso da amostra e a homogeneidade têm um profundo impacto nos métodos de detecção de *Salmonella*, principalmente ao considerar que a sensibilidade nas etapas de enriquecimento seletivo pode ser influenciada pela concentração relativa do agente e presença concomitante de outros micro-organismos (DAVIES et al., 2000; MACIOROWSKI et al., 2000; MALORNY et al., 2008). Devido à baixa atividade de água encontrada nos ingredientes e no produto final, os métodos de isolamento em ração devem ser capazes de recuperar e multiplicar células lesadas (DAVIES et al., 2004; MACIOROWSKI & HERRERA, 2006). Por essa razão, a quantificação de micro-organismos indicadores, como as enterobactérias, tem sido empregada para verificar a eficácia de processos de descontaminação e avaliar as condições higiênico-sanitárias das linhas de produção das fábricas de ração (VELDMAN et al., 1995, JONES &

RICHARDSON, 2004), sendo indicada como uma boa ferramenta de avaliação em programas de monitoramento de *Salmonella* (PDV, 2002; EFSA, 2008).

Nas fábricas de ração, a presença da *Salmonella* tem sido relacionada a vários fatores como contaminação por poeira, presença de vetores e más condições de higiene. (EFSA, 2008). O isolamento em amostras de ração coletadas nos silos de fábricas e granjas não elucida a origem da contaminação ou a etapa do processo onde houve a contaminação ou recontaminação. Desse modo, o monitoramento da ração, ingredientes e processos de produção nas fábricas torna-se imprescindível em programas de controle de *Salmonella* pré-abate, principalmente pela prolongada sobrevivência deste micro-organismo em produtos estocados (DAVIES & HILTON, 2000).

Este trabalho teve como objetivos avaliar a frequência de isolamento de *Salmonella* em quatro fábricas de ração brasileiras, visando verificar a presença do agente nas diversas etapas do processo de produção e a associação com quantificação de coliformes totais, além de identificar e correlacionar grupos clonais de *Salmonella* sp. através da análise de macrorestrição associada à eletroforese em campo pulsado (PFGE).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento de estudo

Foi realizado um estudo transversal em quatro fábricas de dietas para suínos pertencentes a diferentes sistemas verticalizados de produção, localizados nas regiões Sul e Sudeste. A inclusão das fábricas no estudo levou em consideração um volume de produção mínimo pré-estabelecido (4.000 toneladas mensais) e a concordância em participar do estudo. O fluxograma de produção de cada unidade foi listado e um mínimo de 50 pontos de amostragem foi definido por fábrica, contemplando as etapas de recebimento, processamento e expedição. As etapas do processo a serem amostradas foram definidas de acordo com o fluxograma de produção de cada unidade, visando incluir ingredientes e processos considerados como críticos para a contaminação do produto final. Em cada fábrica, foram realizados seis ciclos de

amostragem, onde foram pesquisadas a presença de *Salmonella* e coliformes totais em todas as amostras colhidas.

2.2 Caracterização das fábricas de ração

As fábricas de ração incluídas no estudo apresentavam-se divididas nas seguintes áreas: recebimento dos ingredientes a granel ou ensacados, armazenagem em silos externos ou internos, galpões e tanques, moagem, dosagem, mistura, peletização, resfriamento, ensaque do produto-final e expedição (Figura 1).

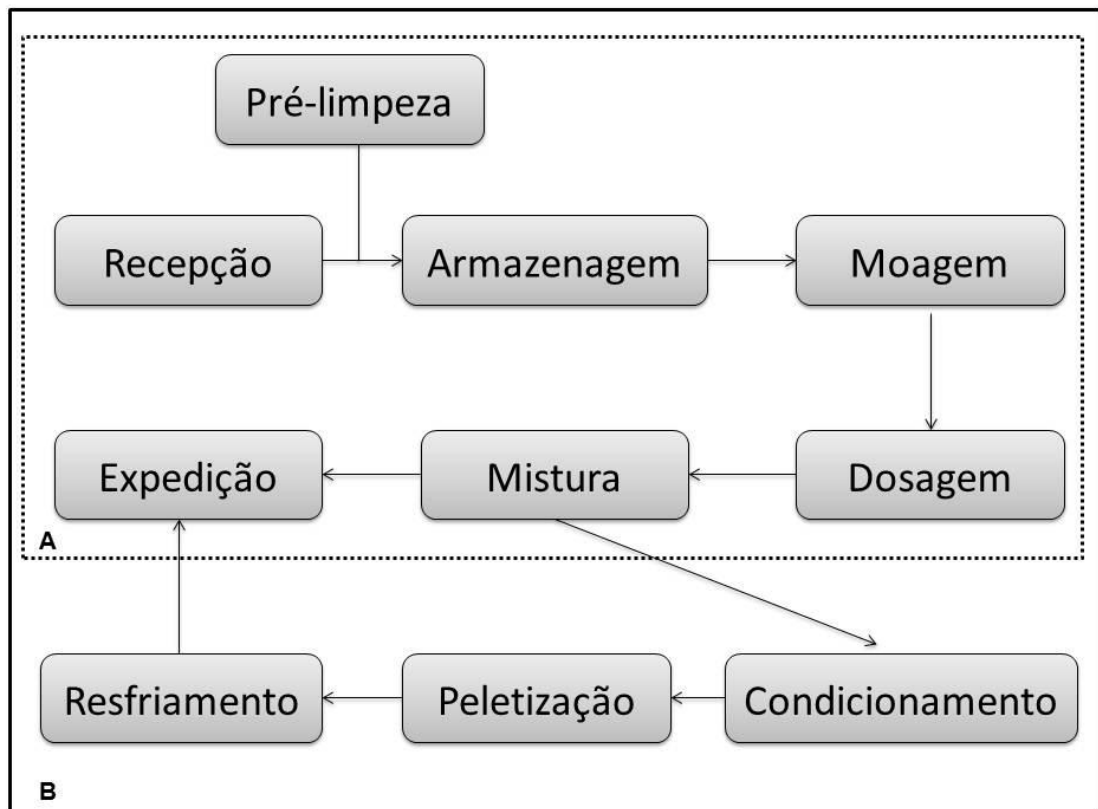


Figura 1 – Fluxograma de produção adotado nas fábricas de ração amostradas no estudo. A= fluxo de produção de ração farelada; B=fluxo de produção de ração peletizada.

A fábrica A produzia somente alimentos destinados a suínos. A principal atividade da unidade B envolvia a produção de concentrados, e as fábricas C e D produziam alimentos para diversas espécies de animais domésticos. A produção das unidades A, B, C e D era, respectivamente, 16.000, 4.000, 5.000 e 38.000 toneladas/mês. O recebimento dos ingredientes a granel era realizado em moegas, enquanto os ensacados permaneciam estocados no setor de

armazenagem. As fábricas B e C somente utilizavam os ingredientes após serem submetidos a análises físico-químicas realizadas em laboratórios próprios. Enquanto aguardavam os laudos para liberação dos lotes, os produtos permaneciam estocados no setor de armazenagem. Caso houvesse alguma não conformidade do produto, o lote não era utilizado na fabricação. Nas fábricas A e D não eram realizadas análises de rotina nos ingredientes. A distribuição dos ingredientes para os silos internos e externos era realizada por meio de elevadores e transportadores. Somente a fábrica D não possuía setor de pré-limpeza de grãos.

As fábricas B, C e D produziam rações fareladas e peletizadas. A fábrica A produzia somente ração farelada. Apenas a fábrica B possuía uma linha diferenciada com tratamento térmico (peletização), químico (adição de produtos contendo formaldeído e ácidos orgânicos) e encaminhava para terceiros produtos de uma linha específica para tratamento físico (irradiação). Em todas as unidades visitadas, a expedição do produto final era realizada diretamente no interior de caminhões ou após ensaque.

Quanto à adoção de programas de qualidade e certificações, na fábrica B já estavam implantados programas de BPFs avançadas e APPCC, segundo recomendações contidas no programa “Feed and Food Safety” (Gestão do Alimento Seguro), propostos pelo Sindirações (2006). As demais fábricas estavam em fase de adequação e estruturação dos itens propostos na IN 4 (BRASIL, 2007).

2.3 Coleta de amostras para pesquisa microbiológica

Cerca de 100 g de cada amostra (ingredientes, poeira e resíduos depositados no chão e na superfície dos equipamentos - silos, transportadores, moinhos, balanças, peletizadoras e resfriadores) foram colhidos, procurando mesclar de 5 a 10 alíquotas colhidas individualmente para aumentar a representatividade da amostra (RICHARDSON, 2008). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em temperatura ambiente até o Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS.

2.4 Pesquisa qualitativa de *Salmonella* sp.

A metodologia para pesquisa de *Salmonella* sp. adotada neste estudo foi previamente padronizada por Michael et al. (2003), compreendendo as seguintes etapas: pré-enriquecimento, onde alíquotas de 25 g de ração ou matéria-prima analisadas foram semeadas em 225 mL de água peptonada tamponada (APT) e incubadas a 37° C durante 18-24h; enriquecimento seletivo no qual alíquotas de 100 µL do pré-enriquecimento foram inoculadas a 9,9 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis incubados a 42°C durante 24h. Paralelamente, alíquotas de 1 mL do pré-enriquecimento foram inoculadas a 9 mL de Caldo Tetracionato igualmente incubado a 42°C durante 24h; isolamento em meio sólido onde 10 µL de cada um dos meios de enriquecimento seletivo foram semeados nos meios Ágar Verde brilhante-lactose-sacarose (BPLS) e Ágar Xilose-Lisina-Tergitol 4 (XLT4). Os meios foram incubados a 37° C durante 24-48h. As bactérias isoladas apresentando características típicas de *Salmonella* sp. foram submetidas a testes bioquímicos (Triple Sugar Iron – TSI; Lisine Iron Agar – LIA e o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo – ONPG) e testes de aglutinação em lâmina com soro polivalente somático (O). Os isolados que apresentaram a reação positiva no teste de aglutinação foram encaminhados à Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para sorotipificação de acordo com o esquema de Kauffmann-White.

2.5 Enumeração de coliformes totais

Cada amostra foi homogeneizada e foram retirados 25 g adicionados, a seguir, a 225 ml de água peptonada tamponada. A partir dessa diluição (10^{-1}) foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-6} . Alíquotas de 1 mL cada diluição foram pipetadas, em duplicata, em placas de Petri estéreis. A seguir, cerca de 15 mL de Agar Bile Violeta Vermelho Neutro (VRBA, Oxoid) fundido foi acrescido e homogeneizado com o inóculo. Após a solidificação do meio, uma sobrecamada de 5 mL de meio fundido foi acrescido a cada placa. Após incubação a 37°C por 48 h, colônias características (rosas rodeadas por precipitado de cor púrpura) foram contadas nas placas que apresentavam entre 20 e 200 colônias. Os resultados foram obtidos após a multiplicação do número

médio de colônias presentes nas duas placas, onde foi realizada a contagem, multiplicado pelo inverso da diluição semeada nas referidas placas. A contagem obtida foi expressa em número de unidades formadoras de colônia por grama de ração (UFC.g^{-1}).

2.6 Genotipagem por Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Os isolados provenientes da mesma fábrica de ração foram submetidos à análise através da técnica de macrorestrição do DNA total, seguida de eletroforese em campo pulsado - Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) para identificação de grupos clonais entre *Salmonella* do mesmo sorovar. A preparação do DNA total para a realização do PFGE foi conduzida de acordo com o protocolo descrito no PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm>) desenvolvido por Ribot et al. (2006). Os isolados foram submetidos à digestão com as enzimas *Xba*I e *Bln*I (Fermentas, St, Leon-Rot, Germany). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% utilizando tampão 0,5X Tris-borato-EDTA em um sistema CHEF DR-II (BioRad Laboratories, Hercules, USA) com 6Volts/cm por 20 horas a 14°C, com tempo inicial de mudança de polaridade de 2 minutos e 16 segundos e tempo final de mudança de polaridade de 63,8 segundos. *Salmonella* Braenderup (ATCC# BAA-664) serviu como referência de tamanho dos fragmentos gerados. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (2 $\mu\text{g/mL}$, Sigma, St. Louis, USA), visualizado em transiluminador e a imagem capturada e digitalizada pelo sistema Kodak 2200 (Rochester, New York, USA). O perfil de macrorestrição e cada posição de banda foram analisados visualmente. Isolados com uma banda de diferença foram considerados como sendo de pulsotipos diferentes.

2.7 Análise Estatística

A prevalência de *Salmonella* sp. foi estimada considerando como fábrica de ração positiva aquela que obteve pelo menos uma amostra positiva dentre todas as amostras analisadas. Devido à grande diversidade de equipamentos e

processos executados nas quatro fábricas pesquisadas e para possibilitar a comparabilidade entre as unidades, os pontos amostrados foram estratificados e agrupados nas seguintes áreas: ingredientes ensacados, ingredientes à granel, transportadores, extrusão seca, moagem, dosagem, mistura, peletização, produto final, expedição, poeira e resíduos. A variável numérica enumeração de coliformes totais, expressa em Unidades formadoras de colônias (UFC.g⁻¹) foi categorizada em presença e ausência de isolamento. A partir desta alteração, a verificação da associação entre coliformes totais e *Salmonella* foi realizada através do teste qui-quadrado (χ^2).

A associação entre as áreas das fábricas de ração e o desfecho “presença de *Salmonella*” foi avaliada inicialmente por uma análise univariada, sendo a significância determinada pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,25$). As variáveis fábricas, transportadores e poeira foram selecionadas para a regressão logística. O modelo de regressão logística estimou as razões de chances (*Odds ratio* – OR) para a ocorrência de *Salmonella* nas diversas áreas amostradas nas fábricas de ração. A estratégia de construção do modelo envolveu o método enter na inclusão das variáveis com valores significativos na análise univariada, sendo a fábrica que apresentou menor frequência de isolamento selecionada como referência. O modelo gerado foi comparado com o melhor ajuste com o teste de razão de verossimilhança. O teste de Hosmer e Lemeshow foi usado para verificar a adequação do ajuste ao modelo final. Todos os parâmetros foram estimados em intervalos com 95% de confiança. As análises foram realizadas no programa SPSS versão 18 (2010).

3. RESULTADOS

Todas as fábricas analisadas foram positivas para *Salmonella* sp. De 1.269 amostras analisadas, sessenta e três (4,96%) apresentaram presença de *Salmonella* sp. Ao estratificar as amostras positivas por grupo de amostra, 4,2% (16/384) foram isoladas nos ingredientes, 2,5% (2/80) foram isoladas no produto final. Todas as amostras colhidas na armazenagem, extrusão seca e peletização apresentaram ausência de *Salmonella*. As maiores frequências de isolamento foram encontradas em amostras colhidas de transportadores

(20/164, 12,20%) e poeira coletada nas dependências das unidades de produção (12/124, 9,68%).

As quatro fábricas avaliadas (A, B, C e D) apresentaram respectivamente 3,47% (n=11/317), 1,73% (n=5/289), 7,14% (n=22/308) e 7,04% (n=25/355) de amostras positivas. Nas fábricas A e D, *Salmonella* foi detectada em amostras de produto final (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência de amostras positivas para *Salmonella* sp. em quatro fábricas de ração (A, B, C, D), de acordos com a área de produção.

Áreas	Positivos/Total				Total
	A	B	C	D	
Ingredientes ensacados	0/9	0/26	0/11	0/14	0/60 (0,00%)
Ingredientes à granel	0/96	1/100	8/82	7/106	16/384 (4,17%)
Transportador	7/48	1/35	6/54	6/27	20/164 (12,20%)
Extrusão			0/24		0/24 (0,00%)
Dosagem	0/6	1/21	0/12	0/5	1/44 (2,27%)
Moagem	0/12	0/6	0/6	1/13	1/37 (2,70%)
Mistura	0/6	0/10	2/12	1/17	3/45 (6,67%)
Peletização		0/30	0/24	0/43	0/97 (0,00%)
Produto final	1/23	0/24	0/12	1/21	2/80 (2,50%)
Poeira	0/24	0/18	4/17	8/65	12/124 (9,68%)
Resíduos	3/93	2/19	2/54	1/44	8/210 (3,81%)
Total	11/317	5/289	22/308	25/355	63/1269 (4,96%)

Dezenove sorovares foram identificados, sendo Montevideo (n=14; 27%), Senftenberg e Anatum (n=8; 12,7%), Mbandaka, Agona e Orion (n=6; 9,5%), Tennessee (n=5; 7,9%) detectados com maior frequência.

Os sorovares Montevideo, Senftenberg, Agona, Worthington, Infantis, Orion e Tennessee estavam presentes em mais de uma das etapas do processo de produção, sendo 35 isolados submetidos à macrorestrição de DNA para averiguação da existência de grupos clonais.

A clivagem com a enzima de restrição *Xba*I originou entre oito e 17 fragmentos, respectivamente, no sorovar Orion e Montevideo. A enzima *Bln*I resultou entre 13 e sete fragmentos, respectivamente nos sorovares Agona e Montevideo (Figuras 2 e 3). Pela combinação dos perfis obtidos com ambas as enzimas, foram obtidos 22 perfis de macrorestrição (pulsotipos), que se encontram discriminados na Tabela 2.

Tabela 2 – Pulsotipos apresentado por isolados pertencentes a sete sorovares de *Salmonella* identificados em quatro fábricas de ração (A, B, C, D).

Fábrica	Sorovar	Pulsotipo	Fonte (Ciclo de amostragem)	
A	Montevideo	Mt7	Transportador (5)	
		Mt8	Transportador (5)	
		Mt9	Transportador (5)	
	Infantis	In1	Resíduo (5)	
		In2	Transportador (5)	
B	Orion	Or1	Balança e farelo de trigo (1)	
C	Montevideo	Mt1	Resíduo (1)	
		Mt2	Poeira (1) e farinha animal (5)	
D	Montevideo	Mt3	Transportador (1)	
		Mt4	Transportador, produto final, farelo de arroz, lácteo, farinha animal (1)	
		Mt5	Sorgo (1), poeira (1 e 2), farinha animal (3)	
		Mt6	Moagem (2)	
		Worthington	Wo1	Poeira e resíduos (1)
		Tennessee	Te1	Moagem (2)
	Te2		Poeira (2)	
	Senftenberg	Se1	Poeira (3)	
		Se2	Poeira (2)	
		Se3	Mistura (2)	
	Agona	Se4	Farelo de soja (1)	
		Ag1	Farelo de trigo (1)	
		Ag2	Poeira (1)	
Ag3		Glúten de milho e poeira (2)		

As áreas que apresentaram maior número de isolados e pulsotipos foram transportadores, ingredientes e poeira, obtendo, cada uma, nove isolados e sete pulsotipos. Estirpes apresentando genótipos semelhantes foram identificadas nos sorovares Orion, Montevideo, Worthington e Agona. Foi possível verificar que o sorovar Montevideo obteve o maior número de grupos clonais, apresentando pulsotipos, como Mt2, Mt4 e Mt5, distribuídos entre ingredientes, poeira, equipamentos e ração.

Quanto à quantificação de coliformes totais, não houve isolamento em 61,46% (n=780/1269) das amostras analisadas (Tabela 3). Das 489 amostras com presença de coliformes totais, as maiores frequências de amostras positivas foram observadas nas áreas de dosagem seguidas de resíduos acumulados nos equipamentos, moagem e mistura, enquanto que o produto final e ingredientes ensacados apresentaram o menor número de amostras positivas. O isolamento de *Salmonella* foi significativamente mais frequente (p=0,002) na presença concomitante de coliformes totais (36/489; 7,36%) do que na ausência (27/780; 3,46%).

Tabela 3 – Frequência de amostras positivas para coliformes totais em quatro fábricas de ração, de acordo com a área de produção.

Áreas	Positivos/Total				Total
	A	B	C	D	
Ingredientes ensacados	0/9	3/26	5/11	0/14	8/60 (13,33%)
Ingredientes à granel	14/96	26/100	17/82	16/106	73/384 (19,01%)
Transportador	18/48	18/35	45/54	6/27	87/164 (53,05%)
Extrusão			10/24		10/24 (41,67%)
Dosagem	5/6	13/21	10/12	4/5	32/44 (72,73%)
Moagem	7/12	6/6	5/6	6/13	24/37 (64,86%)
Mistura	3/6	0/10	11/12	10/17	24/45 (53,33%)
Peletização		7/30	8/24	10/43	25/97 (25,77%)
Produto final	6/23	0/24	5/12	2/21	13/80 (16,25%)
Poeira	6/24	2/18	14/17	36/65	58/124 (46,77%)
Resíduos	70/93	12/19	32/54	21/44	135/210 (64,29%)
Total	129/317	87/289	162/308	111/355	489/1269 (38,53%)

Na análise univariada, as variáveis fábrica, transportadores e poeira mostraram-se associadas à presença de *Salmonella*. Estas variáveis foram significativas e permaneceram no modelo de regressão logística ($p < 0,05$). Os transportadores foram os locais com maior probabilidade de isolamento de *Salmonella*, seguidos da poeira coletada nas dependências da fábrica (Tabela 4). O teste de Hosmer e Lemeshow indicou uma boa adequação do modelo ($p = 0,958$).

Tabela 4 – Frequência de *Salmonella* nas áreas e fábricas de ração, incluídas no modelo de regressão logística, e Razão de Chance (OR) de seu isolamento.

Variáveis	% Positivos (N)	OR	IC 95%	p-valor
Transportadores	12,2 (20/164)	4,43	2,43-8,09	0,000
Poeira	9,68 (12/124)	2,88	1,41-5,88	0,004
Fábrica C	7,14 (22/308)	2,74	1,40-5,33	0,003
Fábrica D	7,04 (25/355)	2,83	1,46-5,50	0,002

Legenda: A fábrica B e a área resíduos foram consideradas como referência.

Ao comparar as unidades de produção, as fábricas C e D apresentaram maiores chances de isolamento de *Salmonella* em relação à unidade B, apresentando, respectivamente, 2,74 e 2,83 mais chances de isolamento de *Salmonella*.

4. DISCUSSÃO

O conceito “from farm to the fork” (da fazenda à mesa), onde todos os participantes da cadeia produtiva de alimentos têm responsabilidades na redução do risco de doenças veiculadas por alimentos, hoje é aceito como um dos paradigmas da segurança de alimentos. Entretanto, uma análise completa sobre o emprego deste conceito na cadeia produtiva ainda é falho. Conceitualmente, dentro da contínua oferta de alimentos há uma série de setores engajados na produção, colheita, distribuição e consumo. Dentro de cada setor, medidas deveriam ser aplicadas para minimizar o risco de perigos de origem alimentar, visando definir um grupo de intervenções capazes de obter a máxima redução de risco a um mínimo custo (DAVIES et al., 2004). A contaminação da ração animal apresenta um caráter amplificador devido à capacidade de disseminação da *Salmonella* pelos plantéis, gerando, além de perdas econômicas, uma grande ameaça para a sanidade animal e saúde pública (MACIOROWSKI et al., 2006).

A quantificação de enterobactérias foi considerada um indicador da presença de *Salmonella* na ração (VELDMAN et al., 1995; JONES & RICHARDSON, 2004). Em consonância com esse resultado, o isolamento de *Salmonella* obtido neste estudo foi significativamente maior nas amostras que apresentavam presença de coliformes totais. Além disso, a maior frequência de coliformes totais nas amostras de poeira e resíduos reforça o risco de contaminação cruzada ou recontaminação por *Salmonella*. A presença de coliformes totais reflete a precariedade na limpeza e higienização das instalações.

Houve isolamento de *Salmonella* em ingredientes, resíduos e poeira coletados na superfície e no interior de diversos equipamentos e chão nas instalações produtoras de alimentos destinados a suínos, bem como em duas amostras do produto final de duas fábricas de rações. Apesar da baixa frequência ($n=2/80$) observada nas amostras de produto final, provavelmente devido à reduzida amostragem em cada unidade avaliada (12 a 24 amostras), os resultados apresentados destacam a importância da contaminação de alimentos durante a fabricação, já que a quantidade de alimentos produzidos

diariamente por uma fábrica de rações pode suprir um elevado número de propriedades criadoras de suínos (LO FO WONG et al., 2002).

Os sorovares Montevideo, Senftenberg, Mbandaka e Agona foram os mais frequentes, também encontrados por Davies & Wray (1997) ao analisar 10 fábricas de ração, por Harris et al. (1997) em rações para suínos e componentes, por Franco (2005) ao avaliar farinhas de origem animal, e por Wierup & Häggblom (2010) amostrando soja e outras fontes de proteína vegetal. Outros sorovares associados à toxinfecções em humanos, como Enteritidis e Typhimurium, não foram isolados durante o estudo.

Alguns pulsotipos desses sorovares foram encontrados em apenas um ciclo de amostragem, indicando a presença nas dependências das fábricas. Esta situação foi observada nos pulsotipos pertencentes aos sorovares Newport e Montevideo isolados nos transportadores na primeira e quinta coletas e Infantis em resíduos na fábrica A, não sendo possível indicar a provável origem da contaminação. Por se tratar de um estudo transversal, as inferências realizadas restringem-se às avaliações nos ciclos de coleta, indicando apenas as prováveis vias de entrada na fábrica e a persistência de pulsotipos nas unidades de produção ao longo do período de condução do estudo. Assim, mesmo na situação observada na fábrica B, onde o pulsotipo do sorovar Orion foi encontrado na balança e no farelo de trigo na primeira coleta, não é possível afirmar que o ingrediente foi responsável pela contaminação. Na fábrica C um pulsotipo do sorovar Montevideo foi isolado em resíduos na primeira coleta em um caminhão pronto para carregamento de ração a granel, caracterizando uma potencial fonte de contaminação para as granjas. Os sorovares Worthington, Tennessee, Senftenberg e Agona da fábrica D, isolados nas áreas de moagem, mistura, ingredientes e poeira também somente foram encontrados em uma coleta.

Outros pulsotipos do sorovar Montevideo foram observados em mais de uma coleta, demonstrando a persistência deste nas fábricas. Na empresa C, o mesmo pulsotipo foi encontrado na poeira na primeira coleta, aparecendo novamente na farinha animal na quinta coleta, indicando a existência de condições propícias para a ocorrência de contaminação e recontaminação de ingredientes e do produto final. Situação semelhante foi observada na fábrica D

ao isolar os mesmos pulsotipos em ingredientes (farelo de arroz, lácteo, farinha animal e sorgo), transportadores, produto final e poeira.

Segundo Vestly et al. (2009), os sorovares Montevideo e Agona podem persistir durante vários anos nas fábricas de ração devido a maior capacidade de formação de biofilme. Neste estudo, um padrão semelhante foi observado, uma vez que o sorovar mais prevalente e com maior número de grupos clonais foi o Montevideo. O pulsotipo Mt4 abrangeu cepas isoladas em equipamentos, ingredientes e ração amostradas no mesmo dia de visita, enquanto os pulsotipos Mt2 e Mt5 foram encontrados em amostras coletadas em dias de visita distintos. Ingredientes de origem animal ou vegetal, tais como farinha de ossos e farelo de soja, podem introduzir *Salmonella* na linha de produção, enquanto o acúmulo de poeira e crostas pode favorecer a formação de biofilmes e persistência de grupos clonais. Desse modo, a contaminação cruzada pode ocorrer durante o processo de produção, através da passagem de ingredientes e produtos pelos equipamentos.

Tanto a análise molecular quanto a análise estatística apontaram como áreas de maior risco o transportador e a poeira depositada na fábrica, apresentando, respectivamente 4,43 e 2,88 mais risco de isolamento de *Salmonella* quando comparados à área referência resíduos. Quanto às fábricas, as unidades C e D apresentaram mais risco de isolamento de *Salmonella*. Os transportadores (elevadores, esteiras, draggers), eficientes meios de transporte de produtos, contribuem para a elevação da temperatura ao longo do processo de produção e favorecem a dispersão de grandes quantidades de poeira, facilitando a ocorrência de contaminação cruzada. Além disso, o calor gerado implica diretamente no aumento da umidade principalmente nas áreas mais frias, amplificando ainda mais o potencial de contaminação (JONES, 2002). Além destas desvantagens, normalmente são de difícil acesso para limpeza e higienização e propícios a acúmulos de resíduos e incrustações. A poeira também foi considerada em diversos trabalhos como um importante fator de risco para isolamento de *Salmonella*. A maior frequência de *Salmonella enterica* encontrada em amostras de poeira, em comparação com matérias primas e produtos finais, foi indicada como um dos principais fatores de risco para a contaminação cruzada dos alimentos

(TORRES et al., 2011). A poeira produzida durante o processo de fabricação de alimentos pode permanecer em suspensão, absorvendo a umidade e favorecendo a formação de incrustações, conseqüentemente contribuindo para a manutenção e contaminação bacteriana.

Os equipamentos das fábricas pesquisadas não foram projetados para realização de procedimentos de limpeza e higienização contínuos. As dificuldades caracterizam-se pela falta de acessos nos equipamentos e presença de superfícies e locais propícios ao acúmulo de resíduos e sujidades ao longo da linha de produção. A necessidade de manter altos índices de produtividade dificulta o controle das condições higiênico-sanitárias e favorece o acúmulo de poeira e conseqüente risco de contaminação cruzada do produto final.

Em conclusão, este estudo demonstrou a presença de *Salmonella* em quatro fábricas de ração e a persistência de grupos clonais ao longo do tempo no processo de produção, sendo que os transportadores e a poeira foram os principais fatores de risco associados à presença de *Salmonella*, bem como os grandes responsáveis pela manutenção de pulsotipos nas dependências das unidades de produção. Dessa forma, o desenho e produção de equipamentos buscando o mínimo acúmulo de poeira e resíduos devem ser priorizados e incluídos no planejamento de programas de controle de *Salmonella* em paralelo às demais medidas de controle preconizadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERENDS, B.R.; VAN KNAPEN, F.; MOSSEL, D.A.; BURT, S.A.; SNIJDERS, J.M. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n.3, p. 219–229, 1998.

BRASIL. Instrução Normativa n° 4, de 23 de fevereiro de 2007. - Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à Alimentação Animal e o Roteiro de Inspeção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 mar 2007.

CRUMP, J.A., GRIFFIN, P.M., ANGULO, F.J. Bacterial Contamination of Animal Feed and Its Relationship to Human Foodborne Illness. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 859–865, 2002.

DAVIES, P.R., TURKSON, P.K., FUNK, J.A., NICHOLS, M.A., LADELY, S.R., FEDORKA-CRAY, P.J. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. **Journal of Applied Microbiology**. v. 89, p.169-177, 2000.

DAVIES, P.R., HURD, H.S., FUNK, J.A., FEDORKA-CRAY, P.J., JONES, F.T. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enteric* in Pork Production. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.1, n.4, 202 – 215, 2004.

DAVIES, R.H.; HILTON, M.H. *Salmonella* in animal feed. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in Domestic Animals**, Oxfordshire:CABI Publishing, 2000.

DAVIES, R.H.; WRAY, C. Distribution of *Salmonella* contamination in ten animal feedmills. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.159-169, 1997.

EFSA. Microbiological risk assessment in feedingstuff for foodproducing animals. **The EFSA Journal**, n.720, p. 1-84, 2008.

EFSA. Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs. **The EFSA Journal**, n.8, p. 1547-1627, 2010.

FRANCO. D.A. A survey of *Salmonella* and most probable numbers in rendered-animal-protein meals: inferences for animal and human health. **Journal of Environmental Health**, v.67, n.6, p.18-22, 2005.

HARRIS, I.T.; FEDORKA-CRAY, P.J.; GRAY, J.T.; THOMAS, L.A.; FERRIS, K. Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 382-385, 1997.

JOHNSON, J.M., RAJIC, A., McMULLEN, L.M. Antimicrobial resistance of selected *Salmonella* isolates from food animals and food in Alberta. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p.141-146, 2005.

JONES, F.T. Feed mills APPCC and pathogens reduction strategies. In: Multi-State Poultry Meeting, 2002, p.1-9.

JONES, F.T., RICHARDSON, K.E. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. **Poultry Science**, v. 83, p.384-391, 2004.

JONES, F.T.; RICKE, S.C. Researchers propose tentative HACCP plan for feed mills. **Feedstuffs**, v. 66, p. 35-42, 1994.

KOYUNCU, S.; HAGGBLOM, P. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. **BMC Veterinary Research**, v.5, n.6., p. 1-10, 2009.

LYNNE, A.M., KALDHONE, P., DAVID, D., WHITE, D.G., FOLEY, S.L. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolated from food animals. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 207-215, 2009.

LO FO WONG, D.M.A.; HALD, T.; van der WOLF, P.J.; SWANENBURG, M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, v.76, p. 215-222, 2002.

MACIOROWSKI, K.G., PILLAI, S.D., RICKE, S.C. Efficacy of a commercial polymerase chain reaction-based assay for detection of *Salmonella* spp. in animal feeds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 710-718, 2000.

MACIOROWSKI, K.G.; HERRERA, P.; JONES, F.T.; PILLAI, S.D. e RICKE, S.C. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. in Animal Feeds – A Review. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 127-137, 2006.

MALORNY, B. ;LÖFSTROM, C.;WAGNER, M.; KRÄMER, N. e HOORFAR, J. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1299-1304, 2008.

PDV. **Programme Monitoring *Salmonella* in the animal feed sector**. Amsterdam, NL, 2002, 39 p.

MICHAEL, G. B.; SIMONETTI, R.; COSTA, M.; CARDOSO, M.R.I. Comparison of different selective enrichment steps to isolated *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 138-142, 2003.

MOLLA, B.; STERMAN, A.; MATHEWS, J.; ARTUSO-PONTE, V.; ABLEY, M.; FARMER, W.; RAJALA-SCHULTZ, P.; MORROW, W.E.M.; GEBREYES, W.A. *Salmonella enteric* in commercial swine feed and subsequent isolation of phenotypically and genotypically related strains from fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 7188-7193, 2010.

RIBOT, E.M.; FAIR, M.A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D.N.; HUNTER, S.B.; SWANINATHAN, B.; BARRETT, T.J. Standardization of Pulsed-field gel eletroforesis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for Pulsenet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.1, p. 59-67, 2006.

RICHARDSON, K. Comprendiendo la contaminación microbiana en el alimento. **World Poultry**, v.26, n.4, p.12-15, 2008.

SINDIRAÇÕES. Manual Feed & Food Safety. Gestão do Alimento Seguro. Versão 3. Outubro/2006. São Paulo: Sindirações. Disponível em: <<http://www.sindiracoes.org.br>>. Acesso em: 05 abr 2010.

TORRES, G.J.; PIQUER, F.J.; ALGARRA, L.; DE FRUTOS, C.; SOBRINHO, O.J. The prevalence of *Salmonella enterica* in Spanish feed mills and potential

feed-related risk factors for contamination. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, p. 81-7, 2011.

VELDMAN, A.; VAHL, H.A.; BOORGGREVE, G. J; FULLER, D. C. A survey of the incidence of *Salmonella* species and Enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. **Veterinary Records**, v.136, p.169–172, 1995.

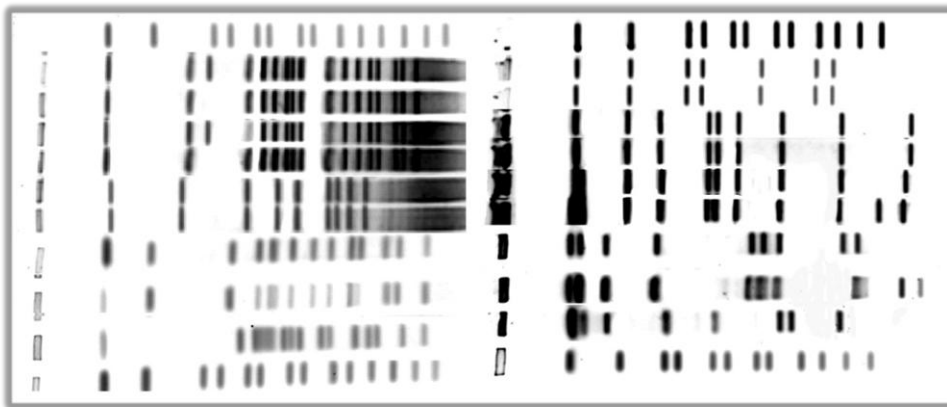
VESTBY, L.K.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E. e NESSE, L.L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal-and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 20, p. 1-6, 2009.

WIERUP, M.; HÄGGBLUM, P. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of salmonella contamination in pig production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 1-9, 2010.

S. Montevideo
PFGE – *Xba*I

PFGE – *Bln*I

*Xba*I+ *Bln*I

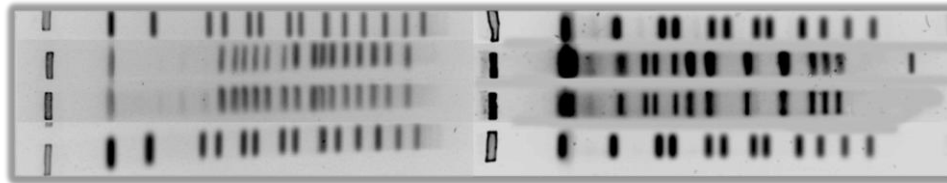


Marcador
Mt1
Mt2
Mt3
Mt4
Mt5
Mt6
Mt7
Mt8
Mt9
Marcador

S. Infantis
PFGE – *Xba*I

PFGE – *Bln*I

*Xba*I+ *Bln*I

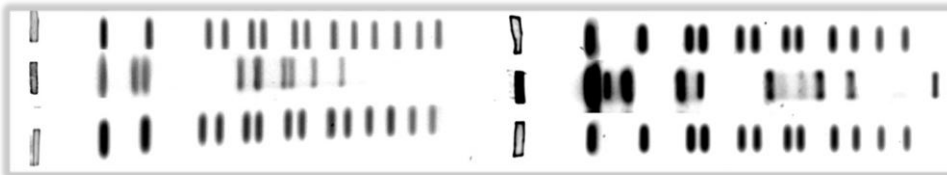


Marcador
In1
In2
Marcador

S. Orion
PFGE – *Xba*I

PFGE – *Bln*I

*Xba*I+ *Bln*I

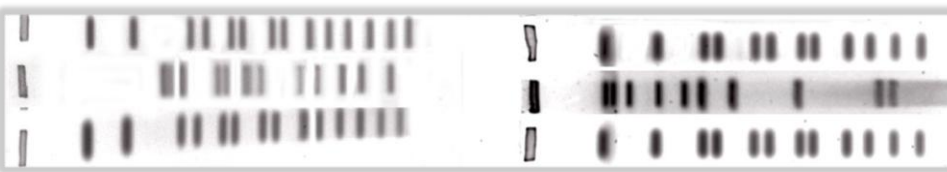


Marcador
Or1
Marcador

S. Worthington
PFGE – *Xba*I

PFGE – *Bln*I

*Xba*I+ *Bln*I



Marcador
Wo1
Marcador

Figura 2 – Perfil de macrorestrição de isolados de *Salmonella* pertencentes aos sorovares Montevideo, Infantis, Orion e Worthington após clivagem com as enzimas *Xba*I e *Bln*I e eletroforese em campo pulsado (PFGE).

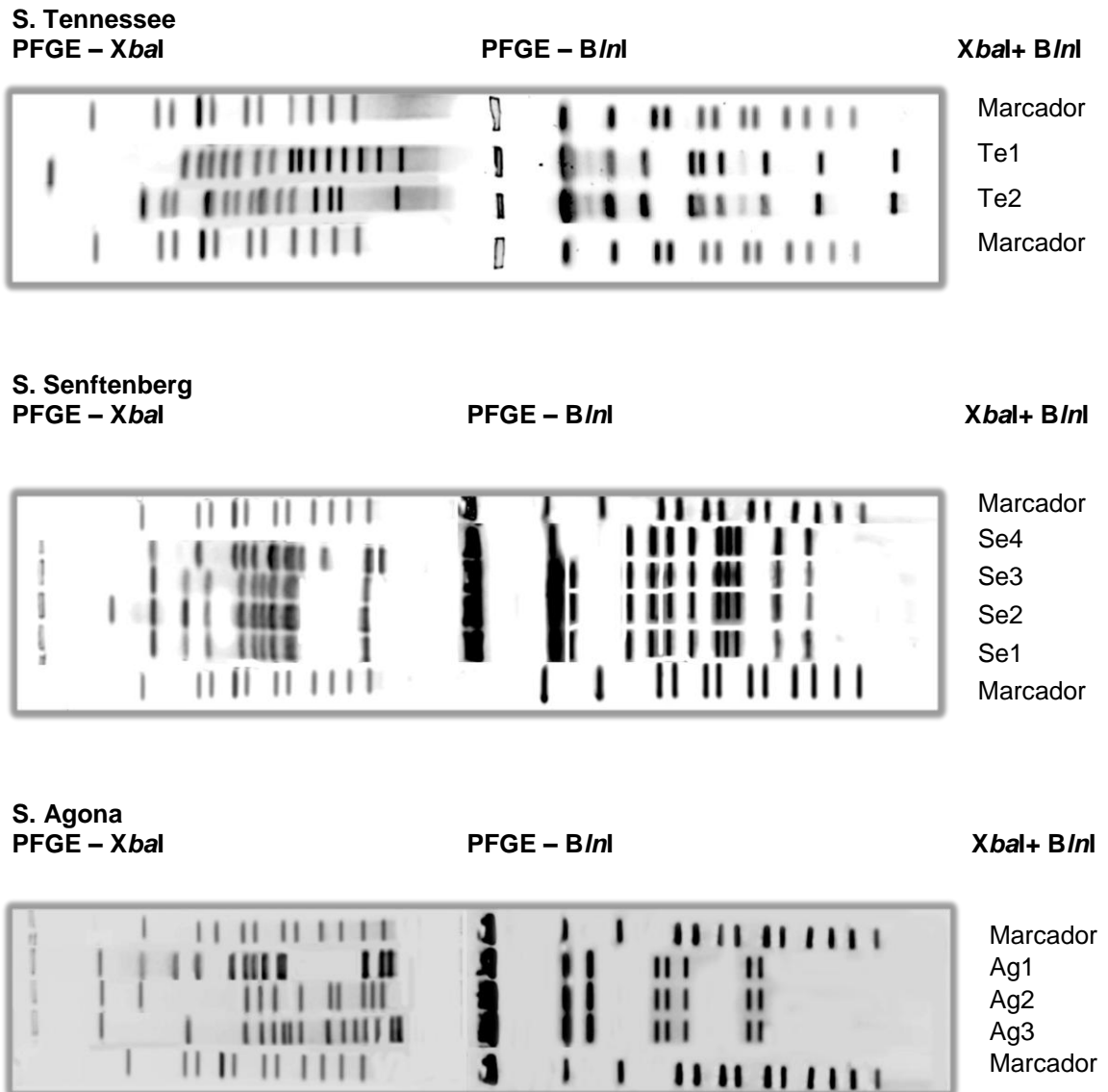


Figura 3 – Perfil de macrorestrição de isolados de *Salmonella* pertencentes aos sorovares Tennessee, Senftenberg e Agona após clivagem com as enzimas *Xba*I e *Bln*I e eletroforese em campo pulsado (PFGE).

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

O fornecimento de ração contaminada já foi amplamente descrito como fonte de infecção por *Salmonella* em suínos (ALBAN et al., 2002; LO FO WONG et al., 2002; FUNK & GEBREYES, 2004). Entretanto, somente em países caracterizados pela baixa prevalência de salmonelose nos rebanhos foi possível demonstrar a real importância da ração contaminada na produção suína, considerado hoje um fator de risco crucial para o sucesso dos programas de controle (EFSA, 2010).

No presente estudo, houve isolamento de *Salmonella* em ingredientes, equipamentos, produto final, resíduos e poeira amostrados em quatro instalações produtoras de alimentos para suínos. Apesar da baixa frequência de isolamento observada, inclusive no produto final, os resultados ilustram a ocorrência da contaminação da ração durante o processo de fabricação. Os sorovares mais frequentes foram Montevideo, Senftenberg, Mbandaka e Agona, enquanto outros sorovares associados à toxinfecções em humanos, como Enteritidis e Typhimurium, não foram isolados neste estudo. Achados semelhantes foram encontrados por diversos autores (Davies & Wray, 1997; Harris et al., 1997; Franco, 2005; Wierup & Häggblom, 2010) ao analisar fábricas de ração e ingredientes de origens vegetal e animal.

Quanto à análise molecular por macrorestrição, pulsotipos pertencentes aos sorovares Montevideo e Infantis na fábrica A, Orion na fábrica B, Montevideo na fábrica C e Worthington, Tennessee, Senftenberg e Agona na fábrica D foram encontrados em apenas um ciclo de amostragem. Este resultado indica a presença destes sorovares nas dependências das fábricas, sendo impossível determinar a provável origem da contaminação. Outros pulsotipos do sorovar Montevideo foram observados em diversas áreas analisadas em mais de um ciclo de coleta nas fábricas C e D, demonstrando a persistência destes na produção e condições propícias para a ocorrência de contaminação e recontaminação de ingredientes, processos e, inclusive, do produto final. Estes achados estão em concordância com Vestly e colaboradores (2009), devido a maior capacidade de produção de biofilmes

observadas nos sorovares Montevideo e Agona, o que facilita a persistência por vários anos nas fábricas de ração. Ingredientes tanto de origem animal quanto vegetal, tais como farinha de ossos e farelo de soja, podem introduzir *Salmonella* na linha de produção, enquanto o acúmulo de poeira e crostas favorece a formação de biofilmes e persistência de grupos clonais. Desse modo, a contaminação cruzada pode ocorrer no processo de produção pelo fluxo de ingredientes e produtos pelos equipamentos.

As análises molecular e estatística definiram como áreas de maior risco os transportadores e a poeira, apresentando, respectivamente 4,43 e 2,88 mais risco de isolamento de *Salmonella* comparado à armazenagem. Quanto às fábricas, as unidades C e D apresentaram maior risco de isolamento de *Salmonella*. Os transportadores contribuem para a elevação da temperatura ao longo do processo de produção e favorecem a dispersão de grandes quantidades de poeira, facilitando a ocorrência de contaminação cruzada. O calor gerado implica diretamente no aumento da umidade principalmente nas áreas mais frias, amplificando o potencial de contaminação (JONES, 2002). Além disso, os transportadores são equipamentos de difícil acesso para limpeza e higienização e propícios a acúmulos de resíduos e incrustações. A poeira também foi considerada em diversos trabalhos como um importante fator de risco para isolamento de *Salmonella*. Torres e colaboradores (2011) encontraram uma frequência maior de isolamento de *Salmonella* em amostras de poeira quando comparada às matérias primas e produtos finais, caracterizando a poeira como um dos principais fatores de risco para a contaminação cruzada da ração. A poeira produzida durante o processo de fabricação de alimentos pode permanecer em suspensão, absorvendo a umidade e favorecendo a formação de incrustações, contribuindo para a manutenção e contaminação bacteriana.

Devido às dificuldades encontradas quanto à detecção de *Salmonella* em ração (MACIOROWSKI et al., 2000; SALOMONSSON et al., 2005; MALORNY et al., 2008; KOYUNCU & HAGGBLOM, 2009), o isolamento de enterobactérias têm sido considerado um indicador da presença de *Salmonella* na ração por alguns autores (VAN SCHOTHORST & OOSTERROM, 1984; VELDMAN et al., 1995; PDV, 2002; JONES & RICHARDSON, 2004). Neste

estudo, a presença de coliformes totais foi significativamente maior nas amostras que também apresentavam *Salmonella*. Além disso, a presença de coliformes totais reflete piores condições higiênico-sanitárias nas linhas de produção, relacionadas à precariedade na limpeza e higienização das instalações.

Não foi possível observar concordância entre o escore obtido no Roteiro de Inspeção (IN4) e os níveis de coliformes totais. As fábricas A e D, classificadas como grupo dois, apresentaram contagens inferiores à fábrica C, com maiores frequência e nível de isolamento de coliformes totais e classificada como grupo um. O Roteiro de Inspeção foi capaz de segregar as quatro fábricas em dois grupos (um e dois), de acordo com o cumprimento dos itens imprescindíveis e necessários; enquanto a quantificação de coliformes totais não diferenciou as quatro fábricas e nem as áreas avaliadas nestas. Uma ampla variabilidade foi demonstrada ao longo das visitas de amostragem, refletindo eventuais flutuações decorrentes do nível de contaminação dos ingredientes e/ou equipamentos existentes na fábrica.

Os maiores problemas caracterizados no roteiro de inspeção restringiram-se à estrutura interna e externa das fábricas, compreendendo itens referentes à construção, estrutura física e área da unidade de produção. Modificações na estrutura física demandam maiores investimentos e planejamentos, o oposto de adequações relacionadas à adoção de programas de qualidade. Quanto aos itens imprescindíveis, as não conformidades nas unidades A, C e D referiam-se à conservação de pisos e paredes, recepção e armazenagem apropriada de matérias-primas e ingredientes. Os demais itens não conformes relacionavam-se à armazenagem de aditivos, medicamentos e produtos de limpeza, higiene pessoal e controle da contaminação cruzada. Esses resultados indicam a vulnerabilidade das fábricas quanto à ocorrência de contaminação cruzada por micro-organismos, aditivos e medicamentos mal manuseados, além da possibilidade de persistência da contaminação em pisos e paredes propícios a acúmulo de resíduos.

As fábricas contempladas neste estudo apresentavam-se em bom estado de organização e em fase de adequação de acordo com quesitos propostos pela IN4, o que foi verificado pela frequência de amostras com

isolamento de coliformes totais (38,53%) e também pelos baixos níveis médios encontrados em diversas áreas. O roteiro proposto na IN4 foi capaz de avaliar a adoção de Boas Práticas de Fabricação ao longo do processo de produção, auxiliando na realização do controle da inocuidade do alimento produzido.

A fábrica C apresentou 2,43 mais chances de produzir uma ração com a presença de coliformes totais do que a unidade B, enquanto a dosagem, resíduos, moagem, mistura, varredura, transportador apresentaram maiores probabilidades quanto ao aumento no número de amostras com a presença deste micro-organismo. Procedimentos de controle implantados no programa de APPCC e a realização de tratamentos físico e/ou químico auxiliariam na prevenção da disseminação da contaminação para áreas limpas destinadas ao acondicionamento de produto final e, conseqüentemente, para a ração pronta para consumo, embora outras variáveis como o desenho da fábrica e a contaminação por fatores ambientais externos possam influenciar este resultado (WIERUP & HÄGGBLÖM, 2010).

Além dos transportadores e da poeira, fatores de risco associados à contaminação por *Salmonella* e coliformes totais descritos no segundo artigo, as áreas moagem, dosagem, mistura e resíduos foram definidos como fatores de risco relacionados à contaminação por coliformes totais. Na moagem, a aceleração necessária para o processamento dos grãos até a granulometria desejada favorece a produção de calor. A umidade gerada tende a se acumular nos locais mais frios, favorecendo o crescimento microbiano. O acúmulo de umidade dependerá do tempo de armazenagem do produto, devendo permanecer em estoque o menor período de tempo possível (JONES, 2002). A dosagem e a mistura são definidas como áreas de menor risco de multiplicação bacteriana (DAVIES & HINTON, 2000), entretanto, qualquer equipamento com acesso limitado tende a ser limpo com menor frequência, sendo suscetíveis a eventuais episódios de contaminação e disseminação a partir do contato com ingredientes ou produtos contaminados.

A utilização de filtros em equipamentos com elevada capacidade de produção e acúmulo de poeira pode ser uma alternativa adotada visando à retenção de partículas finas em suspensão; entretanto, a troca dos filtros deve ser realizada de acordo com a saturação. A realização de controle de pragas

(insetos e roedores) é imprescindível para minimizar os riscos de contaminação cruzada na ração. Um programa de limpeza bem elaborado e executado também auxiliaria no controle de pragas, eliminando possíveis fontes de alimento e água (STARK & JONES, 2010).

Os equipamentos das fábricas são caracterizados pela dificuldade de acesso e ausência de janelas de inspeção, o que dificulta a realização de procedimentos de limpeza e higienização contínuos. São propícios ao acúmulo de resíduos e sujidades, além de contribuírem para a formação e manutenção da poeira em suspensão nas dependências da fábrica. A necessidade de manter altos índices de produtividade dificulta o controle das condições higiênico-sanitárias e favorece o risco de contaminação cruzada do produto final.

Mesmo cumprindo a maioria dos itens imprescindíveis e necessários presentes no roteiro de inspeção e aderindo a programas de qualidade, há incerteza quanto a não ocorrência de contaminação bacteriana durante a produção. Desse modo, as fábricas devem integrar o monitoramento microbiológico como parte indispensável dos protocolos de controle de qualidade, buscando a adoção de medidas de limpeza e higienização de todas as etapas do processo de produção.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo possibilitam concluir:

- Houve isolamento de *Salmonella* nas quatro fábricas de ração avaliadas, sendo significativamente mais frequente em amostras com a presença do que com ausência de coliformes totais;
- Houve diferença na chance de isolamento de *Salmonella* e coliformes totais entre as fábricas avaliadas, com variação de 1,7 a 7,1% e 30,1 a 52,6%, respectivamente. Comparadas à fábrica B, as unidades C e D apresentaram, respectivamente, 2,74 e 2,83 mais chances de isolamento de *Salmonella*;
- Os transportadores foram os locais com maior probabilidade de isolamento de *Salmonella*, seguidos da poeira coletada nas dependências da fábrica;
- O sorovar Montevideo obteve o maior número de grupos clonais, apresentando pulsotipos distribuídos entre ingredientes, poeira, equipamentos e ração e permanecendo na fábrica em mais de um ciclo de amostragem.
- Não houve concordância entre o escore obtido na aplicação do roteiro de inspeção (anexo IN4) e os níveis de coliformes totais encontrados nas quatro fábricas analisadas.
- Os transportadores, as amostras de resíduos e varredura e os processos moagem, dosagem e mistura foram considerados fatores de risco para contaminação por coliformes totais no processo de produção da ração.

CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS. Relatório de Atividades: Carne Suína Brasileira 2009/2010. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 12 de setembro de 2010.

ABIPECS. Relatório de Atividades: Exportações Brasileiras de Carne Suína 2010/2011. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acessado em: 12 de fevereiro de 2011.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Volumen 1: Bacterioses y Micosis.** Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica y Técnica 580. 398 p., 2000.

ALBAN, L.; STEGE, H; DAHL, J. The New Classification System for Slaughter-Pig Herds in the Danish Salmonella Surveillance-and-Control Program. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, n.1-2,133-146, 2002.

ARVANITOYANNIS, I. S.; KASSAVETI, A. HACCP and ISO 22000 – A Comparison of the Two Systems. In: ARVANITOYANNIS, I.S. **HACCP and ISO 22000 – Application to Foods of Animal Origin.** Wiley-Blackwell. p. 3-45, 2009.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infection in animal.** Fourth Edition. Wiley-Blackwell, 2010.

BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A., VAN KNAPEN, F. Identification and Quantification of Risk Factors in Animal Management and Transport Regarding Salmonella spp. in Pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 1-2, p. 37-53, 1996.

BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; SNIJDERS, J. M. A.; MOSSEL, D. A. A. Identification and quantification of risk factors regarding Salmonella spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n. 2-3, p. 199-206, 1997.

BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; MOSSEL, D. A.; BURT, S. A.; SNIJDERS, J. M. Impact on human health of Salmonella spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n.3, p. 219–229, 1998.

BERGERON, N.; CORRIVEAU, LETELLIER, A.; DAIGLE, F.; QUESSEY, S. Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates associated with septicemia in swine. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, 74:11-17, 2010.

BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp em Suínos Abatidos em Frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n. 2, p.80-84, 2004.

BOQVIST, S.; HANSSON, I.; NORD BJERSELIUS, U.; HAMILTON, C.; WAHLSTRÖMI, H.; NOLL, B.; TYSEN, E.; ENGVALL, A. Salmonella isolated from animals and feed production in Sweden between 1993 e 1997. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44,p. 181-197, 2003.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard Identification in Swine Slaughter With Respect to Foodborne Bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 1-2, p. 9-25, 1996

BRASIL. Instrução Normativa n° 4, de 23 de fevereiro de 2007. - Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à Alimentação Animal e o Roteiro de Inspeção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 mar 2007.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. Salmonella Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BUCKNAVAGE, M. W.; CUTTER, C. N. Hazard Analysis of Critical Control Points. In:HEREDIA, N., WESLEY, I., GARCIA, S. **Microbiologically safe foods**. Wiley A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2009.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. R. I. Prevalência de Suínos Portadores de Salmonella sp. ao Abate e Contaminação de Embutidos tipo Frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p.141-147, 2004.

CASTAGNA, S. M. F.; MULLER, M.; MACAGNAN, M.; RODENBUSCH, C. R.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Detection of Salmonella sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 36, n.4, p. 373-377, 2005.

CDC. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks -United States, 2008. Atlanta-USA, 09 set 2011 Disponível em: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmhtml/mm6035a3.htm?s_cid=mm6035aw. Acessado em: 19 de novembro de 2011.

COMA, J. *Salmonella* control in pork: effect of animal nutrition and feeding. **Pig News and Information**, v. 24, n. 2, 49N-62N, 2003.

COOKE, B. C. The industrial production of safe animal feeds in Europe. In: SMUDERS, F.J.M.; COLLINS, J. D. **Food Safety Assurance and Public Health**. Volume 1. Food Safety Assurance in the Preharvest Phase. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, p. 71-86, 2002.

CRUMP, J. A; GRIFFIN, P. M.; ANGULO, F. J. Bacterial Contamination of Animal Feed and Its Relationship to Human Foodborne Ines. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 7, 859–865, 2002.

D'AOUST, J. Y.; SEWELL, A. M. Slow rehydration for detection of *Salmonella* spp. In feeds and feed ingredients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1220-1223, 1986.

DAVIES, P. R.; TURKSON, P. K.; FUNK, J. A.; NICHOLS, M. A.; LADELY, S. R.; FEDORKA-CRAY, P. J. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, n.1, 169-177, 2000.

DAVIES, P. R.; HURD, H. S.; FUNK, J. A.; FEDORKA-CRAY, P. J.; JONES, F. T. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enteric* in Pork Production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.1, n.4, p. 202 – 215, 2004.

DAVIES, R. H.; HILTON, M. H. *Salmonella* in animal feed. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in Domestic Animals**, Oxfordshire:CABI Publishing, 2000.

DE BUSSE, E. V.; MAES, D.; HOUF, K.; DEWULF, J.; IMBERECHTS, H.; BERTRAND, S.; DE ZUTTER, L. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. **International Journal Food of Microbiology**, v.145, n. 1, 279-286, 2011.

DORR, P. M.; TADESSE, D. A.; ZEWDE, B. M.; FRY, P.; THAKUR, S.; GEBREYES, W. A. Longitudinal study of *Salmonella* dispersion and the role of environmental contamination in commercial swine production systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1478-1486, 2009.

DUGGAN, S. J.; MANNION, C.; PRENDERGAST, D. M.; LEONARD, N.; FANNING, S.; GONZALES-BARRON, U.; EGAN, J.; BUTLER, F.; DUFFY, G.. Tracking the *Salmonella* status in pigs and pork from lairage through the slaughter process in the Republic of Ireland. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 2148-2160, 2010.

EFSA. Microbiological risk assessment in feedingstuff for foodproducing animals. **The EFSA Journal**, n.720, p. 1-84, 2008.

FUNK, J. A.; DAVIES, P. R.; NICHOLS, M. A. Longitudinal Study of *Salmonella enterica* in Growing Pigs Reared in Multiple-Site Swine Production Systems. **Veterinary Microbiology**, 83: 45-60, 2001.

GARCIA, S.; HEREDIA, N. Foodborne pathogens and toxins: na overview. In:HEREDIA, N., WESLEY, I., GARCIA, S. **Microbiologically safe foods**. Wiley A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 667 p., 2009.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; OLIVEIRA, F. A.; CANAL, C W.; BRANDELLI, A. A serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1229-1233, 2004.

GONÇALVES, R. G.; PALMEIRA, E. M. Suinocultura Brasileira. Revista Acadêmica de Economia, 71, 2006. Disponível em: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/br>. Acesso em: 16 de outubro de 2009.

GRIFFITH, R. W.; SCHWARTZ, K. J.; MEYERHOLZ, D. K. Salmonella. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 9th ed., Ames: Iowa State University Press p. 739-754, 2006.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in Domestic Animals**, Oxfordshire: CABI Publishing, p. 1-17, 2000.

HARRIS, I. T.; FEDORKA-CRAY, P. J.; GRAY, J. T.; THOMAS, L. A.; FERRIS, K. Prevalence of Salmonella organisms in swine feed. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, p. 382-385, 1997.

HEDEMANN, M. S.; MIKKELSEN, L. L.; NAUGHTON, P. J.; JENSEN, B. B. Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 83, p.1554–1562, 2005.

HOFSHAGEN, M.; NYGARD, K.; HAUGE, K. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs. Norway. **Zoonosis Report**, p. 70, 2007

ICMFS. **Microorganisms in foods 8**: Use of data for assessing process control and product acceptance. New York: Springer, 400 p., 2011.

ISRAELSEN, M.; HANSEN, I. D.; JACOBSEN, E. Don't grow *Salmonella* in the pellet cooler. **Feed International**, v. 17, p. 34-38, 1996.

JONES, F.T., RICHARDSON, K.E. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. **Poult.Science**, v. 83, p. 384-391, 2004.

JOHNSON, J. M.; RAJIC, A.; McMULLEN, L. M. Antimicrobial resistance of selected *Salmonella* isolates from food animals and food in Alberta. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p.141-46.

KICH, J. D.; BORDIN, L. C.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N.; PRATES, A. B. H.; TRIQUES, N.; KLEIN, E. L.; RAMENZONI, M.; VIZZOTTO, R. Estudo Longitudinal da Infecção por *Salmonella* em 12 Granjas de Terminação de Suínos: Variabilidade de Sorovares. In: Congresso de Veterinários Especialistas em Suínos, Fortaleza, Anais, v. 2, p. 54-55, 2005b

KICH, J. D.; BORDIN, L. C.; MORÉS, N.; COLDEBELLA, A.; TRIQUES, N.; KLEIN, E. L.; RAMENZONI, M.; SILVA, L. S. Excreção e soroprevalência de *Salmonella* no alojamento de leitões em granjas de terminação. In: Congresso de Latino Americano de Suinocultura, Foz do Iguaçu, Anais, p.470- 471, 2004.

KICH, J. D.; MORES, N.; PIFFER, I. A.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L.; CARDOSO, M. Fatores de risco Associados com a Prevalência Sorológica de Salmonella em Granjas Comerciais de Suínos no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 35; p. 398-405, 2005a.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MÓRES, N.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J. B.; FEDORKA-CRAY, P. Prevalence and Antibiotic Resistance of Salmonella Isolates Recovered from Finishing Swine Herds and Slaughter Facilities in Southern Brazil. In: IAFP Annual Meeting, p.117-117, 2006.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MÓRES, N.; NOGUEIRA, M. G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J. B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 307-313, 2011.

KOBETZ, R.; KOBETZ, K. Feed plant layout and design. In; SCHOFIELD, E. K. **Feed manufacturing technology**. Arlington: American Feed Industry Association, p.43-86, 2005.

KOYUNCU, S.; HAGGBLOM, P. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. **BMC Veterinary Research**, v.5, n.6., p. 1-10, 2009.

LETELLIER, A.; BEAUCHAMP, G.; GUÉVREMONT, E.; D'ALLAIRE, S.; ILAIRE, D.; HURNIK, D.; QUESSY, S. Risk factors at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2326-2331, 2005.

LIMA, G. J. M. M.; NONES, K. **Os cuidados com a mistura de rações na propriedade**. Concórdia: EMBRAPA, 29 p., 1997

LO FO WONG, D.M.A.; HALD, T.; van der WOLF, P.J.; SWANENBURG, M. Epidemiology and control measures for Salmonella in pigs and pork. **Livestock Production Science**, v.76, p. 215-222, 2002.

LO FO WONG, D. M. A.; DAHL, J.; WINGSTRAND, A.; VAN DER WOLF, P. J.; VON ALTROCK, A.; THORBERG, B. M. A European Longitudinal Study in Salmonella Seronegative and Seropositive-Classified Finishing Pig Herds. **Epidemiology and Infection**, v. 132, p. 903-914, 2004.

LANDBRUG & FODEVARER. **Pig Industry Quality Manual**, 155 p., 2010.

LYNNE, A. M.; KALDHONE, P.; DAVID, D.; WHITE, D. G.; FOLEY, S. L. Characterization of antimicrobial resistance in Salmonella enterica serotype Heidelberg isolated from food animals. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 207-215, 2009.

MACIOROWSKI, K. G.; PILLAI, S. D.; RICKE, S. C. Efficacy of a commercial polymerase chain reaction-based assay for detection of *Salmonella* spp. in animal feeds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 710-718, 2000.

MACIOROWSKI, K. G.; HERRERA, P.; JONES, F.; T.; PILLAI, S. D.; RICKE, S. C. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. in Animal Feeds – A Review. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 127-137, 2006.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 290-296, 2003.

MALORNY, B.; LÖFSTROM, C.; WAGNER, M.; KRÄMER, N.; HOORFAR, J. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1299-1304, 2008.

MIKKELSEN, L. L.; NAUGHTON, P. J.; HEDERMANN, M. S.; JENSEN, B. B. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3485–3492, 2004.

MOLLA, B.; STERMAN, A.; MATHEWS, J.; ARTUSO-PONTE, V.; ABLEY, M.; FARMER, W.; RAJALA-SCHULTZ, P.; MORROW, W. E. M.; GEBREYES, W. A. *Salmonella enteric* in commercial swine feed and subsequent isolation of phenotypically and genotypically related strains from fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 7188-7193, 2010.

MONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.L. *Salmonella* Species. In: MONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.L. **Food Microbiology – An Introduction**. Washington: ASM Press, p. 97-112, 2008.

MORETRO, T.; VESTBY, L.K.; NESSE, L.L.; HANNEVIK, S.; KOTLARZ, K.; LANSRUD, S. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1005-1012, 2009.

MULLER, M. Perfil Sorológico e de Isolamento de *Salmonella* sp. em Suínos no Início da Terminação e ao Abate, 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 191-195, 2009.

NESSE, L. L.; REFSUM, T.; HEIR, E.;NORDBY, K.; VARDUND, T.; HOLSTAD,G. Molecular epidemiology of *Salmonella* spp. isolates from gulls, fish-meal factories, feed factories, animals and humans in Norway based on

pulsed-field gel electrophoresis. **Epidemiology and Infection**, v.133, p. 53-58, 2005.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L. R.; SCHUCH, D. M. T.; SILVA, A. B.; SALLE, C. T. P.; CANAL, C. W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 25-35, 2002.

OMC. Documents and resources. Statistics database. Disponível em: <http://stat.wto.org/Home/WSDBHome.aspx?Language=E>. Acesso em: 04 de novembro de 2011.

OSTERBERG, J.; VAGSHOLM, I.; BOQVIST, S.; LEWERIN, S.S. Feed-borne outbreak of *Salmonella* Cubana in Swedish pig farms: risk factors and factors affecting the restriction period of infected farms. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.47, p.13-21, 2006.

PAULA, C. M. D., RITTER, A. C.; PIETA, L.; AMARAL, P. H.; TONDO, E. C. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* from foods involved in human salmonellosis outbreaks in Southern Brazil from 2003 to 2006. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, n. 9, p. 233-240, 2011.

PIRES, S. M.; KNEGT, L.; HALD, T. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. **DTU National Food Institute**, 80p, 2011.

PRIMM, N.D. Field experiences with the control of *Salmonella* e introduction into turkey flocks via contaminated feeds. **Proceedings Western Poultry Conference**, v. 47, p. 27-29, 1998.

QUINN, T. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 1232 p., 2011

RAHN, K.; GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; McEWE, S. A.; GALAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS, R.; GYLES, C. L. Amplification of *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 271-279, 1992.

RICHARDSON, K. Comprendiendo la contaminación microbiana en el alimento. **World Poultry**, v.26, n.4, p.12-15, 2008.

ROSTAGNO, M. H. *Salmonella* infection in market swine during pre-slaughter holding. In: IPVS CONGRESS. 17, 2002, Iowa. Proceedings. Iowa: IPVS, 2002. p. 319.

SANTOS, R. L.; RAFFATELLU M.; BEVINS C. L.; GARRY ADAMS L.; TÜKEL Ç, TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 498-506, 2009.

SALOMONSSON, A. C.; ASPÁN, A.; JOHANSSON, S.; HEINO, A.; HÄGGBLUM, P. Salmonella detection by polymerase chain reaction after pre-enrichment of feed samples. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**. v.13, 96-110, 2005.

SAULI, I.; DANUSER, J.; GEERAERD, A. H; VAN IMPE, J. F.; RÜFENACHT, J.; BISSIG-CHOISAT, B.; WENK, C.; STÄRK, K. D. C. Estimating the probability and level of contamination with *Salmonella* of feed for finishing pigs produced in Switzerland-the impact of the production pathway. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 289-310, 2005.

SELLERS, R. Hazard analysis and critical control points. In; SCHOFIELD, E. K. **Feed manufacturing technology**. Arlington: American Feed Industry Association, p.399-401, 2005.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. **Emerging Infection Diseases**, 2011

SHAKESPEARE, M. **Zoonosis**. 2. Ed. London: PhP Pharmaceutical Press, 305 p., 2009.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R. et al. Isolation, characterization and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SCHWARZ, P.; CALVEYRA, J.; SELLA, A.; BESSA, M. C.; BARCELLOS, D. E.; CARDOSO, M. R. I. Estudo Longitudinal da Infecção por *Salmonella enterica* em Rebanho Suíno no Sul do Brasil. In: 3. CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, Foz do Iguaçu, Anais,1, p. 457-460, 2006.

SCHWARZ, P.; CALVEYRA, J.; SELLA, A.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. R. I. *Salmonella enterica*: soroprevalência e isolamento em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1028-1034, 2009.

SCHWARZ, P. **Estudo de fatores de risco e avaliação de vacinação para *Salmonella* sp. em diferentes sistemas de produção de suínos brasileiros**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2009.

SILVA, L.E.; GOTARDI, C. P.; VIZZOTTO, R.; KICH, J. D.; CARDOSO, M. R. I. Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um Sistema Integrado de Produção do sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 455-461, 2006.

SILVA, L.E., **Determinação de fontes de contaminação e vias de disseminação de *Salmonella* sp. em linhas de abate de suínos no Sul do**

Brasil. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2011.

SILVA, M. C.; FARIA, G. S.; PAULA, D. A. J.; MARTINS, R. P.; JUNIOR, J. G. C.; KICH, J. D.; COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado do Mato Grosso. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 266-268, 2009.

SINDIRAÇÕES. Manual Feed & Food Safety. Gestão do Alimento Seguro. Versão 3. Outubro/2006. São Paulo: Sindirações. Disponível em: <http://www.sindiracoes.org.br>. Acesso em: 05 abr 2010

SIRICHOTE, P.; HASMAN, H.; PULSRIKARN, C.; SCHONHEYDER, C. H.; SAMULIONIENÉ, J.; PORNRUANGMOMG, S.; BANGTRAKULNONT, A.; AARESTRUP, F. M.; HENDRIKSEN, R. S. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase- producing *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 883-888, 2010.

SONGER, J.G.; POST, K.W. **Veterinary microbiology. Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease.** Elsevier Saunders, 2005.

SORENSEN, L.L.; ALBAN, L.; NIELSEN, B.; DAHL, J. The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 131-141, 2004.

SVS Ministério da Saúde. Análise epidemiológica dos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2009. Available at: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos>. Accessed: 30 November 2010.

TEJADA, C.A.O; COSTA, T.V.M. Competitividade e exportações gaúchas de carnes suínas: 1992 – 2000. **Teoria e evidência econômica**, v.19, p. 93-107, 2002.

TEIXEIRA, S. R. **Detecção de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.

TISCH, D. **Animal Feeds, Feeding and Nutrition and Ration Evaluation.** 491 p., 2005.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY G.M.; EUZÉBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 521-524, 2005.

TORRES, G. J.; PIQUER, F.J.; ALGARRA, L.; DE FRUTOS, C.; SOBRINHO, O. J. The prevalence of *Salmonella enterica* in Spanish feed mills and potential feed-related risk factors for contamination. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, p. 81-7, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 10 ed., Porto Alegre: Artmed, 2011.

VAN DER WOLF, P. J.; ELBERS, A. R.; VAN DER HEIJDEN, H. M.; VAN SCHIE, H. M.; HUNNEMAN, W. A.; TIELEN, M. J. Salmonella Soroprevalence at the Population and Herd Level in Pigs in the Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 80; n. 2; p.171-184, 2001.

VAN WINSEN, R.L.; VAN NES, A.; KEUZENKAMP, D.; URLINGS, H. A.; LIPMAN, L. J.; BIESTERVELD, S.; SNIJDERS, J. M.; VERHEIJDEN, J. H.; VAN KNAPEN, F. Monitoring of transmission of Salmonella enterica serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. **Veterinary Microbiology**, v. 80, n. 3; p. 267-274, 2001.

VAN WINSEN, R.L.; KEUZENKAMP, D.; URLINGS, H. A.; LIPMAN, L. J.; SNIJDERS, J. M.; VERHEIJDEN, J. H.; VAN KNAPEN, F. Effect of fermented feed on shedding of *Enterobacteriaceae* by fattening pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 267-274, 2002.

VESTBY, L.K.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L.L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal-and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 20, p. 1-6, 2009.

WALES, A.D.; ALLEN, V.M.; DAVIES, R.H. Chemical treatment of animal feed and water for the control of Salmonella. **Foorborne Pathogens and Disease**, v.7, p. 3-15, 2010.

WEGENER, H.C.; BAGGESEN, D.L. Investigation of an Outbreak of Human Salmonellosis Caused by Salmonella enterica ssp. Enterica serovar Infantis by Use of Pulsed Field Electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v.32, p.125-131, 1994.

WEISS, L. H.; NONING R. B.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Ocorrência de Salmonella spp. em Suínos de Terminação no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 22, p. 104-108, 2002.

WIERUP, M.; HÄGGBLÖM, P. An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of salmonella contamination in pig production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 1-9, 2010.

WILKINS, W.; RAJIC, A.; WALDNER, C.; MCFALL, M.; CHOW, E.; MUCKLE, A.; ROSENGREN, L. Distribution of Salmonella serovars in breeding, nursery, and grow-to-finish pigs, and risk factors for shedding in ten farrow-to-finish swine farms in Alberta and Saskatchewan. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 81-90, 2010.

ANEXOS

ANEXO 01 – Instrução Normativa nº 4

Instrução Normativa Nº 4, DE 23 DE FEVEREIRO DE 2007

Situação: Vigente

Publicado no Diário Oficial da União de 01/03/2007 , Seção 1 , Página 5

Ementa: Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à Alimentação Animal e o Roteiro de Inspeção.

Histórico:
Revoga a Instrução Normativa nº 1 de 13/02/2003

Os textos legais disponíveis no site são meramente informativos e destinados a consulta / pesquisa, sendo imprópria sua utilização em ações judiciais.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 23 DE FEVEREIRO DE 2007.

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 2º, do Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, tendo em vista o disposto na Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, e no seu Decreto regulamentador nº 76.986, de 6 de janeiro de 1976, e o que consta do Processo nº 21000.012692/2006-11, resolve:

Art. 1º Aprovar o REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE AS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS E DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO PARA ESTABELECIMENTOS FABRICANTES DE PRODUTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO ANIMAL e o ROTEIRO DE INSPEÇÃO, constantes dos anexos.

Art. 2º Estabelecer o prazo de até 365 (trezentos e sessenta e cinco) dias, após a publicação desta Instrução Normativa, para a entrega do Plano de Implementação das Boas Práticas de Fabricação, incluindo o manual, pelos estabelecimentos fabricantes e fracionadores de alimentos para animais.

Art. 3º Estabelecer o prazo de até 545 (quinhentos e quarenta e cinco) dias, após a publicação desta Instrução Normativa, para que os estabelecimentos fabricantes e fracionadores de alimentos para animais atendam às especificações contidas no Regulamento Técnico e Roteiro de Inspeção.

Art. 4º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 5º Fica revogada a Instrução Normativa SARC nº 01, de 13 de fevereiro de 2003.

LUÍS CARLOS GUEDES PINTO

ANEXO I

REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE AS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS E DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO PARA ESTABELECIMENTOS FABRICANTES DE PRODUTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO ANIMAL

1. OBJETIVO

Definir os procedimentos básicos de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos fabricados e industrializados para o consumo dos animais.

2. ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todo estabelecimento fabricante ou fracionador de produtos destinados à alimentação animal. Destina-se ainda aos fiscais federais agropecuários no exercício das ações de inspeção e fiscalização destes estabelecimentos, bem como para servir de guia às empresas do setor na elaboração e implementação do Manual de Boas Práticas de Fabricação com as informações necessárias à segurança e adequação dos alimentos para animais. O cumprimento dos requisitos gerais deste Regulamento não exclui o cumprimento de outros regulamentos específicos em vigor ou que venham a ser publicados.

3. DEFINIÇÕES

Para efeito deste Regulamento, são definidos:

3.1. Boas Práticas de Fabricação - BPF: procedimentos higiênicos, sanitários e operacionais aplicados em todo o fluxo de produção, desde a obtenção dos ingredientes e matérias-primas até a distribuição do produto final, com o objetivo de garantir a qualidade, conformidade e segurança dos produtos destinados à alimentação animal.

3.2. Contaminação: presença de substâncias ou agentes estranhos de origem biológica, química ou física que sejam considerados nocivos para saúde dos animais.

3.3. Contaminação cruzada: contaminação de produto destinado à alimentação animal com outro produto, durante o processo de produção ou contaminação gerada pelo contato indevido de ingrediente, insumo, superfície, ambiente, pessoas ou produtos contaminados, que possam afetar a inocuidade do produto.

3.4. Controle da qualidade: conjunto de procedimentos que envolvem programação, coordenação e execução com o objetivo de verificar e assegurar a conformidade da matéria-prima, do ingrediente, do rótulo e da embalagem, do produto intermediário e do produto acabado com as especificações estabelecidas.

3.5. Desinfecção: é a redução, por meio de agentes químicos ou métodos físicos adequados, do número de microrganismos no ambiente, instalações, maquinários e utensílios, a um nível que não origine contaminação do produto que será elaborado.

3.6. Higienização: limpeza e desinfecção.

3.7. Limpeza: remoção de qualquer tipo de resíduo indesejável.

3.8. Lote: produto obtido em um ciclo de fabricação, sob as mesmas condições e tendo como característica a homogeneidade.

3.9. Matéria-prima: toda substância que, para ser utilizada como ingrediente, necessita ser submetida a tratamento ou transformação de natureza física, química ou biológica.

3.10. Material de embalagem: qualquer material, inclusive material impresso, empregado no processo de embalagem de determinado produto. Os materiais de embalagem podem ser primários ou secundários, de acordo com a existência ou não de contato direto com o produto.

3.11. Pragas: insetos e todos os animais, tais como gatos e pássaros, capazes de contaminar direta ou indiretamente os alimentos.

3.12. Procedimento(s) Operacional(is) Padrão(ões) - POP: é a descrição pormenorizada e objetiva de instruções, técnicas e operações rotineiras a serem utilizadas pelos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal, visando à proteção, à garantia de preservação da qualidade e da inocuidade das matérias-primas e produto final e a segurança dos manipuladores.

3.13. Produtos com medicamento: rações, suplementos, premixes, núcleos ou concentrados que contenham produto de uso veterinário, para emprego em animal de produção.

3.14. Produtos destinados à alimentação animal: substância ou mistura de substâncias, elaborada, semi-elaborada ou bruta que se emprega na alimentação de animais.

4. REQUISITOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DAS INSTALAÇÕES, EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS

4.1. Localização:

4.1.1. Os estabelecimentos devem estar situados em zonas isentas de odores indesejáveis e contaminantes. Fora de área de riscos de inundações e alojamento de pragas. Longe de outras atividades industriais que possam prejudicar a qualidade dos alimentos para animais, a não ser que haja medidas de controle e segurança que evitem os riscos de contaminação.

4.1.2. Na localização dos estabelecimentos, é imprescindível a observação de medidas de controle e segurança que evitem riscos de contaminação dos produtos, das pessoas e do meio ambiente.

4.2. As vias de trânsito interno devem ter superfície compactada e resistente ao trânsito sobre rodas, com escoamento adequado, que permita sua limpeza e evite a formação de poeira.

4.3. Instalações:

4.3.1. Devem ser de construção sólida e sanitariamente adequada. Todos os materiais usados na construção e na manutenção não devem apresentar risco ao produto final. Os edifícios devem ser construídos de maneira que permita o controle eficiente de pragas, de contaminantes ambientais e de outros fatores que possam causar algum dano ao produto.

4.3.2. A empresa deve dispor de espaço adequado para produção, armazenamento de ingredientes, sacaria vazia e produtos acabados obedecendo ao fluxograma de forma a possibilitar a separação entre área de produção e área de armazenamento de produto acabado e evitar as operações suscetíveis de causar contaminação cruzada.

4.3.3. No caso do estabelecimento fabricante de produtos com medicamentos, este deve possuir área específica em local separado, identificado, com acesso restrito e controle de temperatura e umidade, para o armazenamento dos medicamentos.

4.3.4. Devem ser previstos locais específicos, fora da área de produção, para produtos devolvidos ou recolhidos, materiais tóxicos, materiais de laboratório, explosivos ou inflamáveis.

4.3.5. As instalações e equipamentos devem estar dispostos de forma a permitir limpeza adequada.

4.3.6. Devem ser projetados de forma a permitir a separação, por áreas, setores ou outros meios eficazes, de forma a evitar as operações suscetíveis de causar contaminação cruzada.

4.3.7. Devem ser projetados de maneira a possibilitar fluxo unidirecional de operações para que as mesmas possam ser realizadas nas condições higiênicas, desde a chegada das matérias-primas até a expedição do produto final.

4.3.8. Nas áreas de processamento de alimentos, os pisos devem ser de material resistente ao trânsito e ao impacto, de fácil drenagem, limpeza ou higienização e, quando necessário, possuir declive em direção aos drenos. Na área de produção, devem ser evitados os ralos e quando absolutamente imprescindíveis devem ser do tipo sifão ou similar, dotados de fechamento e não permitindo a formação de poças. Da mesma forma, as canaletas, quando absolutamente indispensáveis, devem ser lisas com declive para o sifão ou similar. Nas áreas onde se armazenem ou manipulem produtos úmidos, os pisos devem ser impermeáveis e laváveis.

4.3.9. As paredes e divisórias devem ser lisas, sem frestas ou rachaduras, de fácil limpeza ou higienização. Nas áreas onde se armazenem ou manipulem produtos úmidos, as paredes e divisórias também devem ser impermeáveis e laváveis.

4.3.10. O teto e as instalações aéreas devem ser construídos ou revestidos de modo que impeçam o acúmulo de sujeira e que reduzam ao mínimo a condensação e a formação de mofo. Devem ainda ser de fácil limpeza.

4.3.11. As janelas, portas e outras aberturas devem evitar o acúmulo de sujeira e serem de fácil limpeza. As que se comunicam com o exterior devem ser providas de proteção contra pragas. As proteções devem ser de fácil limpeza e boa conservação.

4.3.12. As escadas, elevadores de serviço, monta-cargas e estruturas auxiliares, como plataformas, escadas de mão e rampas devem estar localizados e construídos de modo a não serem fontes de contaminação.

4.3.13. Nas áreas de elaboração dos produtos, todas as estruturas e acessórios suspensos devem ser instalados de forma que não dificultem as operações de limpeza e de maneira a evitar a contaminação direta ou indireta das matérias-primas, dos produtos e das embalagens.

4.3.14. Os refeitórios devem estar completamente separados dos locais de manipulação dos produtos e não devem ter acesso direto e nem comunicação direta com estes locais.

4.3.15. Os estabelecimentos devem dispor de vestiários e banheiros em número suficiente, separados por sexo, bem iluminados e ventilados, de acordo com a legislação, convenientemente situados, sem comunicação direta com o local onde são processados os produtos destinados à alimentação animal e devem permitir o escoamento sanitário das águas residuais. Os lavabos devem estar providos de elementos adequados, tais como sabão líquido, detergente, desinfetante para lavagem das mãos e de meios higiênicos para sua secagem. Os vestiários e banheiros devem ser mantidos limpos.

4.3.16. As instalações para lavagem das mãos nas áreas de produção, quando a natureza das operações assim o exigir, devem estar

convenientemente localizadas, serem adequadas e providas de tubulações devidamente sifonadas que transportem as águas residuais até o local de deságüe.

4.3.17. Todos os locais destinados à lavagem das mãos devem conter avisos sobre os procedimentos para a correta lavagem ou higienização das mãos.

4.3.18. A instalação para limpeza e desinfecção dos utensílios e equipamentos de trabalho, quando necessária, deve ser específica para a atividade.

4.3.19. O estabelecimento deve dispor de abastecimento, armazenamento e distribuição de água suficientes para as operações propostas.

4.3.20. Os estabelecimentos devem dispor de um sistema eficaz de tratamento e eliminação de águas residuais, aprovado pelo órgão ambiental competente.

4.3.21. Os estabelecimentos devem ter iluminação natural ou artificial, que possibilitem a realização das atividades. As fontes de luz artificial devem estar protegidas, exceto nas áreas onde não haja presença de produtos expostos, abertos ou não protegidos, destinados à alimentação animal. As instalações elétricas devem ser embutidas ou exteriores e, neste caso, estarem perfeitamente revestidas por tubulações isolantes e presas a paredes e tetos, de maneira a dificultar a deposição de resíduos de qualquer natureza.

4.3.22. O estabelecimento deve dispor de ventilação adequada de forma a evitar o calor excessivo, a condensação de vapor e o acúmulo de poeira, com a finalidade de eliminar o ar contaminado. No caso de utilização de ventilação forçada, a direção da corrente de ar deve seguir o fluxo contrário da produção. As aberturas de ventilação devem ser providas de sistemas de proteção para evitar a entrada de pragas e agentes contaminantes.

4.3.23. O local destinado para lixo e resíduos não aproveitáveis deve ser isolado da área de produção, de fácil acesso, devidamente identificado, construído de modo a impedir o ingresso de pragas e evitar a contaminação de matérias-primas e produtos acabados.

4.3.24. Os produtos resultantes de devolução, recolhimento ou apreensão devem ser identificados e colocados em setor separado, pelo período mínimo suficiente para sua destinação final, devendo ser mantidos em condições tais que evitem sua deterioração e sua contaminação.

4.3.25. As vias de acesso e os pátios devem ser mantidos livres de entulhos, lixo, ou qualquer material que propicie o estabelecimento e desenvolvimento de pragas.

4.4. Equipamentos e utensílios:

4.4.1. Todo equipamento e utensílio utilizado nos locais de processamento, que entre em contato direto ou indireto com o alimento, deve ser confeccionado em material atóxico, que não lhe transmita odores e sabores, resistente à corrosão e capaz de suportar repetidas operações de limpeza e desinfecção. As superfícies devem ser lisas, sem frestas e outras imperfeições que possam servir de fonte de contaminação e comprometer a higiene. O uso de madeira só será permitido para paletes e estrados ou para o armazenamento de sal comum, desde que não constitua fonte de contaminação e esteja em bom estado de limpeza e de conservação.

4.4.2. Todos os equipamentos e utensílios devem ser desenhados, construídos e instalados de modo a permitir uma fácil e completa

limpeza, desinfecção e lubrificação; além disso, devem ser utilizados exclusivamente para os fins a que foram projetados.

4.4.3. Os equipamentos e utensílios devem ser mantidos em bom estado de conservação e funcionamento.

4.5. Limpeza, desinfecção e lubrificação:

4.5.1. Todos os produtos de limpeza e desinfecção e lubrificação devem ser registrados pelo órgão competente, identificados e guardados em local específico, fora das áreas de processamento dos alimentos. Os lubrificantes que entram em contato direto ou indireto com os produtos destinados à alimentação animal devem ser grau alimentício.

4.5.2. Com a finalidade de impedir a contaminação dos produtos destinados à alimentação animal, toda área de processamento, equipamentos e utensílios devem ser limpos com a frequência necessária e desinfetados sempre que as circunstâncias assim o exigirem.

4.5.3. Devem ser tomadas medidas para impedir a contaminação dos alimentos quando as áreas, os equipamentos e os utensílios forem lubrificados, limpos e desinfetados com água, detergentes, desinfetantes, lubrificantes ou soluções destes. Os resíduos desses agentes, que permaneçam em superfície suscetível de entrar em contato com o alimento, devem ser eliminados, mediante um enxágüe cuidadoso com água potável antes que os equipamentos ou utensílios voltem a ser utilizados.

4.5.4. O estabelecimento deve assegurar sua limpeza e desinfecção por meio de programa específico. Os funcionários devem ser capacitados para execução dos procedimentos de limpeza e terem pleno conhecimento dos perigos e riscos da contaminação.

4.5.5. O lixo deve ser manipulado e removido de maneira que se evite a contaminação dos produtos destinados à alimentação animal e da água.

4.5.6. A entrada de animais nas áreas internas e externas dentro do perímetro do estabelecimento deve ser impedida.

4.5.7. O programa de controle das pragas deve ser eficaz e aplicado de forma contínua. Os estabelecimentos e as áreas circundantes devem sofrer inspeção periódica com vistas a manter as pragas sob controle.

4.5.8. Os pesticidas solventes e outras substâncias tóxicas devem estar devidamente registrados no órgão competente e rotulados com informações sobre sua toxicidade e emprego. Estes produtos devem ser armazenados em áreas específicas, e só devem ser distribuídos ou manipulados por pessoal autorizado e devidamente capacitado.

4.5.9. As roupas e os objetos pessoais devem ser guardados em áreas específicas.

5. REQUISITOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DO PESSOAL

5.1. A direção do estabelecimento deverá garantir que todos os funcionários recebam treinamento relativo à higiene pessoal e aspectos higiênico-sanitários para processamento dos produtos destinados à alimentação animal mediante um plano de integração de novos funcionários e de treinamento contínuo.

5.2. Toda pessoa que trabalhe na área industrial deve usar uniforme adequado, sendo este de uso exclusivo para o serviço.

5.3. Nas áreas de manipulação de alimentos, deve ser proibido todo ato que possa originar contaminação dos produtos, como comer, fumar, tossir ou outras práticas anti-higiênicas.

5.4. Todos os funcionários que mantêm contato com produtos destinados à alimentação animal devem submeter-se a exames médicos e laboratoriais pertinentes, de modo a avaliar a sua condição de saúde antes do início de sua atividade e repetidos, no mínimo, anualmente enquanto permanecerem na atividade. Havendo constatação ou suspeita de que o funcionário apresente alguma doença ou lesão, que possa resultar em contaminação do produto, ele deverá ser afastado da área de processamento de alimentos.

5.5. O emprego de equipamentos de proteção individual na manipulação de alimentos, como: luvas, máscaras, tampões, aventais e outros, devem obedecer às perfeitas condições de higiene e limpeza destes. No caso de luvas, o seu uso não exime o manipulador da obrigação de lavar as mãos cuidadosamente.

5.6. Os visitantes devem cumprir todas as disposições referentes ao uso de uniformes e higiene pessoal estabelecidas para os funcionários.

6. REQUISITOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DA PRODUÇÃO

6.1. Requisitos aplicáveis aos ingredientes e matérias-primas:

6.1.1. Todos os ingredientes empregados na produção de alimentos para animais devem estar registrados no órgão competente do MAPA, salvo aqueles dispensados de registro em legislação específica.

6.1.2. O estabelecimento não deve aceitar nenhuma matéria-prima ou ingrediente que contenha parasitas, microrganismos, substâncias tóxicas ou estranhas, que não possam ser reduzidas a níveis aceitáveis na industrialização. O produto final deve atender os padrões de identidade e qualidade específicos.

6.1.3. O estabelecimento deve garantir a origem, qualidade e inocuidade da matéria-prima, ingrediente e embalagem.

6.2. Prevenção da contaminação cruzada:

6.2.1. Devem ser tomadas medidas eficazes para evitar a contaminação por contato direto e indireto em todas as etapas do processo e fluxo de produção, considerando instalações, equipamentos, pessoal, utensílios, uniformes e embalagens.

6.2.2. Deve ser estabelecida uma seqüência fixa para o processo de fabricação dos diferentes produtos considerando o emprego de ingredientes de origem animal, aditivos, produtos veterinários e a sensibilidade das diferentes espécies e categorias.

6.2.3. Considerando o seqüenciamento da produção conforme subitem 6.2.2, o estabelecimento deverá empregar procedimentos de limpeza dos equipamentos que garantam a inocuidade do produto. O material utilizado nesta operação deverá ser identificado e armazenado em local próprio. Estes procedimentos deverão ser validados e verificados periodicamente.

6.2.4. Nos casos em que exista risco elevado para a inocuidade dos produtos destinados à alimentação animal, vinculados à contaminação cruzada, e se considere que a utilização dos métodos de limpeza não são eficientes, deve-se utilizar linhas de produção, de transporte, de estocagem e de entrega separadas.

6.2.5. As diferentes matérias-primas e os produtos acabados devem ser identificados e armazenados em separado.

6.3 Uso da água:

6.3.1. É imprescindível um controle da potabilidade da água, quando esta

entra em contato na elaboração dos produtos ou para a produção de vapor e gelo.

6.3.2. A água não potável utilizada para produção de vapor, que não entre em contato com os produtos destinados à alimentação animal, a utilizada para apagar incêndios e outros propósitos, deve ser transportada por tubulações completamente separadas e identificadas, sem que haja conexão com as tubulações que conduzem água potável.

6.4. Produção:

6.4.1. A empresa deve dispor de programa de treinamento dos funcionários contemplando o cronograma dos treinamentos, o conteúdo programático com carga horária, qualificação dos instrutores, plano de avaliação de eficácia do treinamento entre outros.

6.4.2. Os funcionários devem estar treinados e capacitados em boas práticas de fabricação para trabalhar, e supervisionados por pessoal qualificado.

6.4.3. Todas as etapas do processo de fabricação devem ser contínuas, sem acúmulos de materiais, matérias-primas ou produtos e realizadas de forma a garantir a inocuidade e integridade do produto final.

6.5. Embalagem:

6.5.1. Todo material deve ser apropriado para o produto a que se destina e para as condições previstas de armazenamento, devendo também ser seguro e conferir proteção contra a contaminação. A embalagem deve ser armazenada em condições higiênico-sanitárias, em áreas específicas para este fim.

6.5.2. As embalagens devem ser de primeiro uso e íntegras, salvo as autorizadas pelo MAPA em conformidade com a legislação específica. Na área de envase, devem ficar apenas as embalagens necessárias para uso imediato.

6.6. Controle da qualidade:

6.6.1. Os responsáveis pela qualidade devem ter treinamento e conhecimento suficientes sobre as boas práticas de fabricação, para poder identificar os perigos relacionados à inocuidade e qualidade dos produtos destinados à alimentação animal e estabelecer os processos de controle.

6.7. Documentação e registro:

6.7.1. A empresa deve estabelecer procedimentos para elaboração, emissão, circulação e controle da documentação.

6.7.2. Devem ser mantidos registros de todos os controles realizados em todas as etapas do processamento, desde a chegada da matéria-prima até a expedição do produto acabado.

6.8. Armazenamento, conservação e transporte:

6.8.1. As matérias-primas, ingredientes e os produtos acabados devem ser armazenados e transportados devidamente rotulados com todas as informações obrigatórias e em condições que garantam a integridade das embalagens.

6.8.2. As matérias-primas, ingredientes e os produtos acabados devem ser conservados de forma a garantir a sua inocuidade e integridade, sempre respeitando a temperatura e umidade adequadas para conservação e a data de validade.

6.8.3. Os veículos utilizados no transporte devem estar limpos e serem projetados e construídos de forma a manter a integridade das embalagens

e dos produtos destinados à alimentação animal. Os veículos de transporte devem realizar as operações de carga e descarga em locais apropriados, cobertos e fora da área de produção e armazenamento.

7. PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÕES (POP)

7.1. Devem ser implementados POP contemplando no mínimo os seguintes itens:

- a) Qualificação de fornecedores e controle de matérias-primas e de embalagens;
- b) Limpeza/Higienização de instalações, equipamentos e utensílios;
- c) Higiene e saúde do pessoal;
- d) Potabilidade da água e higienização de reservatório;
- e) Prevenção de contaminação cruzada;
- f) Manutenção e calibração de equipamentos e instrumentos;
- g) Controle integrado de pragas;
- h) Controle de resíduos e efluentes;
- i) Programa de rastreabilidade e recolhimento de produtos (Recall);

7.2. Todos os POP devem ser aprovados, datados e assinados pela direção da empresa e pelo responsável pelo controle da qualidade. Os POP devem descrever os materiais e os equipamentos necessários para a realização das operações, a metodologia, a frequência, o monitoramento, a verificação, as ações corretivas e o registro, bem como os responsáveis pelas execuções. As ações corretivas devem contemplar o produto, a restauração das condições sanitárias e as medidas preventivas.

7.3. Os funcionários, os monitores e os verificadores devem estar devidamente treinados para execução dos POP.

7.4. Os POP devem ser apresentados como anexo do manual de procedimentos de Boas Práticas de Fabricação do estabelecimento e acessíveis aos responsáveis pela execução das operações e às autoridades competentes.

7.5. Os POP referentes à qualificação de fornecedores, de matérias-primas e de embalagens devem especificar os critérios utilizados e os procedimentos adotados para a qualificação dos fornecedores e o controle de matérias-primas e de embalagens. Deve-se prever um local para depósito das não aprovadas.

7.6. Os POP referentes às operações de limpeza/higienização de instalações, equipamentos e utensílios devem conter informações sobre a natureza da superfície de operação a ser higienizada, método de higienização, produtos utilizados com a devida concentração, princípio ativo e tempo de ação, temperatura da água, enxágue e outras informações que se fizerem necessárias. O desmonte dos equipamentos deve ser previsto, quando aplicável, e os equipamentos em manutenção devem estar identificados.

7.7. Os POP referentes à higiene e saúde do pessoal devem especificar, no mínimo, os procedimentos em relação ao uso e higiene dos uniformes, hábitos higiênicos, higiene pessoal, higiene antes e durante as operações, exams laboratoriais, atestados médicos, presença de funcionários com lesões visíveis ou sintomas de infecções e treinamento específico.

7.8. Os POP referentes à potabilidade da água e higienização de reservatório devem especificar o padrão de potabilidade microbiológico e físico-químico e abordar as operações relativas ao controle da potabilidade da água, incluindo todas as etapas: captação, tratamento, armazenamento, distribuição, pontos

de colheita de amostras, colheita de amostras, análises, monitoramento, ações corretivas, verificação e registros. Devem estabelecer sempre a frequência da execução das análises, dos monitoramentos, da verificação e da limpeza dos reservatórios.

7.9. Os POP referentes à prevenção de contaminação cruzada deverão identificar os possíveis locais e formas de ocorrência de contaminação cruzada, aplicando os princípios obrigatórios do POP.

7.10. Os POP referentes à manutenção e calibração de equipamentos e instrumentos devem detalhar as operações de manutenção e calibração de cada equipamento e instrumento envolvido no processo produtivo.

7.11. Os POP referentes ao controle integrado de pragas devem contemplar as medidas preventivas e de controle. No caso da adoção de controle químico, os procedimentos operacionais também devem especificar grupos químicos dos produtos utilizados, nome, princípio ativo, concentração, local e forma de aplicação do produto, frequência de sua utilização, assim como o responsável pela execução da tarefa. As empresas terceirizadas contratadas devem ter o registro próprio no Órgão competente.

7.12. Os POP referentes ao controle de resíduos e efluentes devem discriminar o responsável pelo destino dos resíduos além dos itens obrigatórios de um POP.

7.13. Os POP referentes ao programa de rastreabilidade e recolhimento de produtos (Recall) devem estabelecer como será a rastreabilidade, por meio do histórico de cada lote ou partida produzidos, desde a origem das matérias-primas utilizadas até o destino final do produto acabado. Devem ser estabelecidos os procedimentos do Recall a serem seguidos para o rápido e efetivo recolhimento do produto, a forma de segregação dos produtos recolhidos e seu destino final, além dos responsáveis pela atividade.

7.14. Os POP devem ser revisados pelo menos uma vez ao ano e sempre que houver qualquer modificação nos procedimentos operacionais, visando avaliar a sua eficiência e ajustando-os se for necessário.

7.15. Todas as etapas descritas nos POP devem ser registradas e a verificação documentada, para comprovar sua execução. Esses registros devem ser datados e assinados pelo responsável pela execução de cada etapa do POP.

8. DOCUMENTAÇÃO E REGISTROS

8.1. O estabelecimento deve manter os registros das reclamações, sugestões e elogios dos funcionários e consumidores.

8.2. Todos os registros devem ser feitos em formulários próprios, sem rasuras, preenchidos à tinta, datados, assinados, arquivados em ordem cronológica e disponíveis para consulta.

8.3. Manutenção dos registros: todos os registros devem ser mantidos pelo período de no mínimo 2 anos e de 3 anos para produtos com medicamentos.

9. MANUAL DE PROCEDIMENTOS DE BPF

9.1. Cada estabelecimento deverá possuir um manual de procedimentos próprio e específico para o estabelecimento, que tenha base científica e que atenda as exigências do presente Regulamento.

9.2. Todas as operações devem ser realizadas de acordo com o manual de procedimentos de BPF, que deve ser claro e preciso o bastante para que todas as operações sejam executadas conforme o descrito e que o objetivo esperado seja atingido.

9.3. O manual de procedimentos pode ser, a critério do estabelecimento, mais abrangente e mais rigoroso que o presente Regulamento.

10. DISPOSIÇÕES GERAIS

10.1. Os estabelecimentos fabricantes de produtos com medicamentos devem estar classificados no Grupo 1. (NR)

10.2. Os estabelecimentos que forem classificados nos grupos 2 ou 3 terão prazos para se adequarem.

10.3. Os estabelecimentos que forem classificados no grupo 4 sofrerão interdição temporária até adequação.

10.4. O MAPA definirá um prazo para que os estabelecimentos apresentem cronograma de adequação das não-conformidades observadas.

10.5. Os prazos propostos no cronograma de adequações apresentado pelos estabelecimentos serão avaliados pelo MAPA e poderão ser aceitos ou redefinidos.

D - CLASSIFICAÇÃO DO ESTABELECIMENTO

A pontuação para classificação do estabelecimento será obtida considerando o atendimento dos itens imprescindíveis e dos itens necessários, conforme média ponderada descrita abaixo:

Pontuação = $\{(soma\ dos\ itens\ imprescindíveis\ atendidos\ sobre\ o\ total\ dos\ itens\ imprescindíveis\ do\ roteiro\ x\ 100) \times 2 + (soma\ dos\ itens\ necessários\ atendidos\ sobre\ o\ total\ de\ itens\ necessários\ do\ roteiro\ x\ 100)\} / 3$

Obs: Desconsiderar os itens que não se aplicam (N.A.) na soma dos itens atendidos.

- GRUPO 1 - 81 a 100 pontos
- GRUPO 2 - 61 a 80 pontos
- GRUPO 3 - 41 a 60 pontos
- GRUPO 4 - 0 a 40 pontos.

ANEXO 02 – Instrução Normativa nº 15

ANEXO III**INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA Nº 15, DE 26 DE MAIO DE 2009**

O Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto na Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, no Decreto nº 6.296, de 11 de dezembro de 2007, e o que consta do Processo nº 21000.005634/2008-94, resolve:

Art. 1º Regulamentar o registro dos estabelecimentos e dos produtos destinados à alimentação animal, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa.

Art. 2º A alínea "a" do subitem 2.1, do Anexo I, da Instrução Normativa SARC nº 13, de 30 de novembro de 2004, passa a vigorar com a seguinte redação:

"a) Aditivo para produtos destinados à alimentação animal: substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano;" (NR)

Art. 3º A alínea "f", do subitem 2.1, do Anexo I da Instrução Normativa SARC nº 12, de 30 de novembro de 2004, passa a vigorar com a seguinte redação:

"f) suplemento: é a mistura composta por ingredientes ou aditivos, podendo conter veículo ou excipiente, que deve ser fornecida diretamente aos animais ou ser indicada para diluição, para melhorar o balanço nutricional." (NR)

Art. 4º O subitem 10.1, do Anexo I, e a letra "D", do Anexo II, da Instrução Normativa MAPA nº 04, de 23 de fevereiro de 2007, passam a vigorar com a seguinte redação:

"10.1. Os estabelecimentos fabricantes de produtos com medicamentos devem estar classificados no Grupo 1." (NR)

"D) CLASSIFICAÇÃO DO ESTABELECIMENTO

GRUPO 1 - 81 a 100 pontos

GRUPO 2 - 61 a 80 pontos

GRUPO 3 - 41 a 60 pontos

GRUPO 4 - 0 a 40 pontos."(NR)

Art. 5º Os estabelecimentos que já exercem atividades previstas neste regulamento dispõem do prazo de até 18 (dezoito) meses a partir de sua publicação para se adequarem às exigências aqui estabelecidas.

Art. 6º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 7º Ficam revogados o subitem 6.3, do Anexo I, da Instrução Normativa SARC nº 13, de 30 de novembro de 2004, a Portaria SFA nº 4, de 21 de agosto de 1986, a Portaria DNPA nº 39, de 29 de junho de 1976, a Portaria SDA nº 7, de 21 de janeiro de 1993, a Portaria SDR nº 18, de 13 de junho de 1996, a Portaria SDR nº 2, de 31 de maio de 1994, e a Portaria SDA nº 99, de 24 de agosto de 1988.

REINHOLD STEPHANES

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO QUE DISPÕE ACERCA DOS PROCEDIMENTOS
PARA REGISTRO DE ESTABELECIMENTOS E DOS PRODUTOS
DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO ANIMAL

CAPÍTULO I

DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º O presente Regulamento Técnico estabelece os critérios e os procedimentos para o registro e a renovação do registro dos produtos destinados à alimentação animal e dos estabelecimentos que os produzam, fabriquem, manipulem, fracionem, importem e comerciem.

Art. 2º Este Regulamento aplica-se aos estabelecimentos e produtos destinados à alimentação animal.

CAPÍTULO II

DAS DEFINIÇÕES

Art. 3º Para efeito deste Regulamento, considera-se:

I - classificação de produto destinado à alimentação animal: identificação da categoria a que o produto pertence, podendo ser aditivo, alimento, concentrado, ingrediente, núcleo, premix, ração, suplemento e suas variações dentro desta, podendo indicar a espécie e categoria animal a que se destina;

II - veículo ou excipiente: ingrediente ou substância que adicionado a outro facilita a sua dispersão, mistura, diluição e que não possui função nutricional ou função específica dentro do produto ou sobre o animal;

III - alimento: é a mistura composta por ingredientes destinada exclusivamente à alimentação de animais de companhia, que constitua um produto de pronto fornecimento e capaz de atender integralmente ou em parte às suas exigências nutricionais.

CAPÍTULO III

DO REGISTRO DE ESTABELECIMENTOS

Art. 4º Todo estabelecimento que produza, fabrique, manipule, fracione, importe e comercie produto destinado à alimentação animal deve ser registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

§ 1º O registro de que trata o caput terá validade de 5 (cinco) anos, podendo ser renovado pelo mesmo período sucessivamente.

§ 2º O registro e o pedido de renovação do registro do estabelecimento deverão ser requeridos junto à unidade descentralizada do MAPA na Unidade da Federação - UF de jurisdição do estabelecimento.

Art. 5º Os estabelecimentos de que trata o art. 4º serão classificados tendo em vista as seguintes atividades e categorias:

I - atividade: fabricante - aquele que se destina à elaboração de produtos para alimentação animal; categorias: aditivo, alimento, concentrado, ingrediente, núcleo, premix, ração, suplemento e produto com medicamento;

II - atividade: importador - aquele que se destina à importação de produtos para alimentação animal em embalagem original; categorias: aditivo, alimento, concentrado, ingrediente, núcleo, premix, ração e suplemento; e

III - atividade: fracionador - aquele que se destina ao fracionamento de produtos para alimentação animal de fabricação nacional ou importada; categorias: aditivo, alimento, concentrado, ingrediente, núcleo, premix, ração e suplemento.

Parágrafo único. O estabelecimento importador que pretender fracionar seus produtos deverá ser registrado também como Fracionador.

Art. 6º Para o registro do estabelecimento fabricante ou fracionador, o seu proprietário ou representante legal deverá atender às disposições previstas no

Decreto nº 6.296, de 11 de dezembro de 2007, nesta Instrução Normativa e nos demais atos normativos complementares.

Parágrafo único. A solicitação de registro de que trata o caput deverá ser acompanhada da entrega do plano de implementação e do manual de boas práticas de fabricação.

Art. 7º Além das exigências estabelecidas pelo Decreto nº 6.296, de 2007, o importador deve assegurar ao produto importado boas condições de higiene e limpeza no transporte, armazenamento e distribuição.

Art. 8º O certificado de registro do estabelecimento será emitido pela unidade descentralizada do MAPA na UF onde se localiza o estabelecimento, após análise dos documentos e do efetivo cumprimento das exigências legais.

Parágrafo único. O registro será concedido especificamente para cada unidade de estabelecimento, podendo abranger mais de uma atividade e categoria e seu número será sequencial e precedido da sigla da UF onde se localiza o estabelecimento.

Art. 9º Para a alteração de atividade ou de categoria de estabelecimento, o seu proprietário ou representante legal deverá solicitar autorização prévia ao MAPA, mediante a apresentação dos documentos necessários à atualização dos dados previstos pelo Decreto nº 6.296, de 2007, e será emitido um certificado de registro atualizado.

§ 1º Quando se tratar de estabelecimento fabricante ou fracionador, a solicitação de que trata o caput deste artigo deverá estar acompanhada do manual de boas práticas de fabricação atualizado.

§ 2º A alteração de atividade ou categoria que resultar em modificação na unidade fabril, em suas instalações ou em equipamentos poderá implicar a realização de inspeção do estabelecimento pelo MAPA.

Art. 10. Qualquer alteração documental, do endereço, do nome empresarial ou do número de inscrição no CNPJ do estabelecimento deverá ser comunicada ao MAPA, mediante apresentação de requerimento acompanhado da documentação necessária à atualização dos dados cadastrais e posterior atualização do certificado de registro.

Parágrafo único. Quando ocorrer mudança no endereço do estabelecimento ou do número de inscrição no CNPJ, será exigido um novo registro, embora

podendo ser mantido o mesmo número, que deverá ser requerido ao MAPA pelo interessado atendendo às exigências estabelecidas pelo Decreto nº 6.296, de 2007, quando se tratar de estabelecimento fabricante, fracionador ou importador.

Art. 11. Na ocorrência de alteração de propriedade do estabelecimento, o proprietário anterior deverá apresentar ao MAPA os certificados de registros do estabelecimento e dos respectivos produtos, uma declaração do responsável pelo estabelecimento informando os números dos últimos lotes produzidos, fracionados ou importados e suas respectivas datas de fabricação.

Parágrafo único. O novo proprietário deverá apresentar ao MAPA toda a documentação necessária à adequação ou à emissão de novo registro do estabelecimento.

CAPÍTULO IV

DO REGISTRO DE PRODUTOS

Art. 12. Para o registro de produtos para alimentação animal, serão adotadas as seguintes classificações:

I - ingrediente ou matéria-prima: é o componente ou constituinte de qualquer combinação ou mistura utilizado na alimentação animal, que tenha ou não valor nutricional, podendo ser de origem vegetal, animal, mineral, além de outras substâncias orgânicas e inorgânicas;

II - aditivo: substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios, atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano;

III - suplemento: é a mistura composta por ingredientes ou aditivos, podendo conter veículo ou excipiente, que deve ser fornecida diretamente aos animais para melhorar o balanço nutricional; quando se tratar de suplementos minerais destinados à alimentação de ruminantes, estes também poderão ser indicados para diluição.

IV - premix: é a pré-mistura de aditivos e veículo ou excipiente, que facilita a dispersão em grandes misturas, que não pode ser fornecida diretamente aos animais;

V - núcleo: é a pré-mistura composta por aditivos e macrominerais contendo ou não veículo ou excipiente, que facilita a dispersão em grandes misturas, que não pode ser fornecido diretamente aos animais;

VI - concentrado: é a mistura composta por macrominerais, ingredientes ou aditivos que, quando associada a outros ingredientes, em proporções adequadas e devidamente especificadas pelo seu fabricante, constitua uma ração; e

VII - ração: é a mistura composta por ingredientes e aditivos, destinada à alimentação de animais de produção, que constitua um produto de pronto fornecimento e capaz de atender às exigências nutricionais dos animais a que se destine.

Art. 13. Para o registro de ingrediente destinado à alimentação animal, não será permitida a inclusão de mais de um ingrediente em sua composição, sendo permitida apenas a inclusão de aditivos tecnológicos.

Art. 14. Para o registro de aditivos, deverá ser informada a composição quantitativa e qualitativa de todos os constituintes de sua formulação, não sendo permitida a substituição de qualquer componente.

Art. 15. Para o registro de ração, concentrado, núcleo, suplemento, premix e alimento, a relação de todos os ingredientes e aditivos presentes em sua formulação deverá ser informada nominalmente na composição básica.

§ 1º Os aditivos zootécnicos, com exceção dos melhoradores de desempenho antimicrobianos, deverão ser identificados na composição básica do produto pelo grupo funcional ou subgrupo.

§ 2º Será permitida a inclusão simultânea de apenas um aditivo melhorador de desempenho antimicrobiano e um aditivo anticoccidiano na formulação dos produtos.

§ 3º Os coadjuvantes tecnológicos ficam dispensados de declaração na composição básica, uma vez que possuem apenas função intermediária na fabricação do produto e não permanecem em sua composição final.

Art. 16. O ingrediente ou aditivo que eventualmente substituir os declarados na composição básica do produto deverá ser especificado no campo "Eventuais Substitutivos" e deverá guardar correlação nutricional e funcional com o ingrediente ou aditivo substituído.

Parágrafo único. Será permitida a indicação de até dois aditivos melhoradores de desempenho antimicrobianos e até dois aditivos anticoccidianos no campo "Eventuais Substitutivos".

Art. 17. Os níveis de garantia dos produtos para alimentação animal devem guardar correlação com a composição do produto.

§ 1º Os aditivos nutricionais, zootécnicos, anticoccidianos e os macrominerais, constantes na formulação dos produtos, deverão ter suas substâncias ativas ou elementos ativos declarados nos níveis de garantias.

§ 2º Os aditivos sensoriais e tecnológicos constantes na formulação de produtos ficam dispensados de ter seus elementos ativos declarados nos níveis de garantia.

Art. 18. Os ingredientes deverão expressar nos níveis de garantia os parâmetros relativos a cada tipo de produto, definidos em legislação específica.

Art. 19. Na declaração dos níveis de garantia de macrominerais e aminoácidos, deverá ser considerada a quantidade total referente à quantidade adicionada e a presente nos demais componentes do produto.

Parágrafo único. Para a declaração dos níveis de garantia de vitaminas e microminerais, deverão ser consideradas apenas as quantidades adicionadas.

Art. 20. Os níveis de garantia dos produtos destinados à alimentação animal deverão ser expressos em mg/kg (miligramas por quilograma) quando a concentração for inferior a 10.000 mg/kg (miligramas por quilograma) e em g/kg (gramas por quilograma) quando for superior ou igual a 10.000 mg/kg (miligramas por quilograma).

§ 1º As vitaminas A, D e E deverão ser garantidas em UI/kg (Unidades Internacionais por quilograma) e a vitamina B12 em µg/kg (microgramas por quilograma).

§ 2º Outras unidades de expressão das garantias poderão ser empregadas conforme tabelas de valores de referência constantes em atos normativos publicados nacionais ou internacionais, desde que aprovados pelo MAPA.

Art. 21. As rações e concentrados devem apresentar, no mínimo, as seguintes garantias:

- I - umidade (máximo);
- II - proteína bruta (mínimo);
- III - extrato etéreo (mínimo);
- IV - fibra bruta (máximo);
- V - matéria mineral (máximo);
- VI - Cálcio (máximo) e Cálcio (mínimo); e
- VII - Fósforo (mínimo).

§ 1º Os níveis de garantia de microminerais, vitaminas e aminoácidos devem ser expressos em valores mínimos.

§ 2º As rações e concentrados destinados à alimentação de equinos, coelhos e ruminantes devem expressar, nos níveis de garantia, além dos indicados neste artigo, o teor máximo de Fibra em Detergente Ácido - FDA.

§ 3º As rações e concentrados para suínos, aves e equinos devem expressar, além dos indicados neste artigo, os teores mínimos de metionina e lisina.

Art. 22. O registro do produto, o pedido de renovação, de transferência de titularidade ou de sua alteração deverá ser requerido junto à unidade descentralizada do MAPA na UF onde se localiza o estabelecimento, observadas as disposições contidas no Decreto nº 6.296, de 2007, neste Regulamento e em atos normativos complementares.

§ 1º Além da documentação exigida no caput deste artigo, deverão ser especificados no documento de descrição do processo de fabricação os coadjuvantes tecnológicos referidos no § 3º, do art. 15, deste Regulamento.

§ 2º Para o registro de produto importado, também deverá ser apresentado o certificado de Boas Práticas de Fabricação do estabelecimento fabricante, emitido pela autoridade competente do país de origem.

Art. 23. Após análise e aprovação pelo MAPA, o registro do produto será concedido, mediante a emissão de certificado de registro, com validade em todo o território nacional.

Parágrafo único. O número de registro do produto será sequencial por estabelecimento e precedido do número de registro do estabelecimento.

Art. 24. A fabricação de um produto registrado em outra unidade fabril da mesma empresa somente será permitida mediante autorização prévia requerida à unidade descentralizada do MAPA na UF onde se localiza o estabelecimento onde o produto será fabricado.

Parágrafo único. A autorização de que trata este artigo será concedida pelo MAPA, após a avaliação da atividade e categoria de registro da empresa, da capacidade tecnológica e dos possíveis riscos relacionados às boas práticas de fabricação.

Art. 25. O registro de produto importado terá validade nacional e seu procedimento de importação poderá ser realizado por outra unidade da mesma empresa, desde que registrada na mesma atividade e categoria.

Parágrafo único. A alteração do nome original do produto importado somente será permitida mediante prévia autorização do proprietário estabelecido no exterior.

Art. 26. O registro do produto será renovado a cada 5 (cinco) anos desde que pleiteado com antecedência de até 60 (sessenta) dias de seu vencimento.

§ 1º A renovação do registro dar-se-á mediante a emissão de um certificado atualizado, sendo mantido o mesmo número de registro.

§ 2º Expirado o prazo de validade do registro sem que o interessado tenha solicitado sua renovação, este será automaticamente cancelado.

Art. 27. É vedada a adoção de nome idêntico para produto com composição básica diferente, ainda que do mesmo estabelecimento.

Art. 28. Qualquer alteração em produto registrado deverá ser requerida ao MAPA para aprovação prévia.

Parágrafo único. O pedido de alteração de que trata o caput deste artigo deverá ser encaminhado à unidade descentralizada do MAPA na UF onde se localiza o estabelecimento, acompanhado de relatório técnico que justifique a alteração proposta.

Art. 29. A transferência da titularidade de registro dos produtos destinados à alimentação animal deverá atender ao disposto no Decreto nº 6.296, de 2007.

CAPÍTULO V

DA TERCEIRIZAÇÃO DE FABRICAÇÃO, FRACIONAMENTO E DISTRIBUIÇÃO EXCLUSIVA

Art. 30. A autorização para terceirização de fabricação de produtos entre empresas registradas no MAPA será requerida pelo contratante na unidade descentralizada do MAPA na UF de sua localidade, e deverá atender às normas dispostas no art. 28, do Anexo ao Decreto nº 6.296, de 2007.

§ 1º O estabelecimento contratante somente poderá terceirizar a fabricação de produtos em estabelecimentos registrados na mesma atividade e categoria.

§ 2º O MAPA poderá autorizar a contratação de terceiros por estabelecimentos com a atividade temporariamente suspensa por necessidade de adequação à legislação vigente.

§ 3º O estabelecimento contratado poderá sofrer inspeção prévia pelo MAPA para autorização de fabricação dos produtos.

§ 4º Para a terceirização da fabricação de produtos destinados à exportação, a empresa contratante e a contratada deverão estar previamente habilitadas para este fim, conforme exigência estabelecida pelo art. 116, do Anexo ao Decreto nº 6.296, de 2007.

Art. 31. A autorização de fracionamento de produtos nacionais ou importados deverá ser solicitada à unidade descentralizada do MAPA na UF onde se localiza o estabelecimento, e atender às normas dispostas no art. 28, do Anexo ao Decreto nº 6.296, de 2007.

§ 1º O estabelecimento fracionador deverá estar registrado na mesma categoria do estabelecimento fabricante ou importador.

§ 2º O estabelecimento fracionador deverá assegurar a qualidade e a inocuidade dos produtos fracionados.

Art. 32. A emissão do registro do estabelecimento fracionador será efetuada após análise e aprovação dos documentos apresentados e a inspeção prévia do estabelecimento pelo MAPA.

Parágrafo único. Não será concedido um novo número de registro ao produto fracionado, mantendo-se o número de registro do produto fabricado ou importado.

Art. 33. O estabelecimento que fabricar produtos para distribuição exclusiva deverá informar ao MAPA o nome empresarial, o número de inscrição no CNPJ e o endereço do estabelecimento distribuidor exclusivo no pedido de registro de produto acompanhado do contrato firmado entre as partes.

CAPÍTULO VI

DO ENCERRAMENTO DA ATIVIDADE, DA SUSPENSÃO TEMPORÁRIA E DO ARRENDAMENTO DO ESTABELECIMENTO

Art. 34. O estabelecimento que encerrar ou suspender temporariamente qualquer atividade ou categoria deverá comunicar o referido fato à unidade descentralizada do MAPA de sua localidade, de acordo com o disposto no art. 11, do Anexo ao Decreto nº 6.296, de 2007.

§ 1º A suspensão temporária de qualquer atividade ou categoria deve vir acompanhada do número do último lote produzido de cada produto e suas respectivas datas de fabricação e de validade.

§ 2º O estabelecimento com atividade ou categoria suspensa fica proibido de exercer a respectiva atividade durante o prazo de vigência da suspensão temporária, exceto para os casos previstos no § 2º, do art. 30, deste Regulamento.

§ 3º Não havendo manifestação do interessado, dentro do prazo estabelecido, para a reativação das atividades ou para a prorrogação da suspensão temporária, o registro de estabelecimento e dos produtos serão cancelados.

Art. 35. O arrendamento do estabelecimento deverá ser comunicado pelo estabelecimento detentor do registro à unidade descentralizada do MAPA de sua localidade, de acordo com o disposto no Decreto nº 6.296, de 2007, acompanhado do documento comprobatório do arrendamento.

Parágrafo único. O arrendatário deverá solicitar o registro do estabelecimento à unidade descentralizada do MAPA de sua localidade, acompanhado da documentação exigida pelo Decreto nº 6.296, 2007, acompanhado do plano de implementação e do manual de boas práticas de fabricação, conforme determina a legislação específica vigente.

ANEXO 03

Tabela 01: Sorovares isolados nas fábricas analisadas (A, B, C e D)

Locais amostrados	Área	Coleta	Fábrica	Sorotipos
Farinha animal	Transportador	1	A	S.enterica sub enterica (O:6,8), Newport
Farinha animal	Transportador	1	A	Newport
Ração	Produto final	1	A	Senftenberg
Pré-limpeza milho	Residuo	2	A	Tennessee
Elevador	Transportador	5	A	Montevideo
Farinha animal	Transportador	5	A	S.enterica sub enterica (O:6,7), (O:3,10:eh-), Anatum
Farinha animal	Transportador	5	A	Montevideo
Residuo	Residuo	5	A	Infantis
Silo ração	Residuo	5	A	S.enterica sub enterica (O:3,10:eh-)
Residuo	Transportador	6	A	Infantis
Farinha animal	Transportador	6	A	Montevideo
Balança	Dosagem	1	B	Orion
Farelo de Soja	Residuo	1	B	S.enterica sub enterica (O:3,10)
Farelo de Trigo	Ingrediente	1	B	S.enterica sub enterica (O:3,10), Anatum, Orion
Pre limpeza milho	Residuo	5	B	Senftenberg
Farelo de Soja	Transportador	6	B	Morehead, S.enterica sub enterica (O:16:c:-)
Caminhão	Residuo	1	C	Montevideo
Pre limpeza milho	Residuo	1	C	Orion, Heindenberg
Varredura	Varredura	1	C	Montevideo
Farinha animal	Ingrediente	2	C	Anatum
Residuo	Transportador	2	C	Mbandaka
Elevador	Transportador	2	C	Mbandaka, Anatum
Misturador	Misturador	2	C	Mbandaka
Varredura	Varredura	2	C	Mbandaka
Varredura	Varredura	2	C	Rissen
Farinha animal	Ingrediente	4	C	Anatum
Farelo de algodão	Ingrediente	4	C	Tennessee
Farelo de milho	Ingrediente	4	C	Anatum
Ovo pasteurizado	Ingrediente	4	C	Cerro
Farinha animal	Ingrediente	4	C	Senftenberg
Farinha animal	Ingrediente	4	C	Tennessee, Orion
Elevador	Transportador	4	C	S.enterica sub enterica (O:3,10:eh-), Anatum, Worthigton
Elevador	Transportador	4	C	Orion, S.enterica sub enterica (O:3,10:eh-)
Misturador	Misturador	4	C	Orion
Varredura	Varredura	4	C	Anatum
Farinha animal	Ingrediente	5	C	Scharzengrund, Montevideo
Residuo	Transportador	5	C	Mbandaka, S.enterica sub enterica (O:3,10)
Residuo	Transportador	6	C	Agona
Farelo de arroz	Ingrediente	1	D	Montevideo
Farelo de Soja	Ingrediente	1	D	Senftenberg
Farelo de Trigo	Ingrediente	1	D	Agona
Lácteo	Ingrediente	1	D	Montevideo

Locais amostrados	Área	Coleta	Fábrica	Sorotipos
Sorgo	Ingrediente	1	D	Montevideo
Elevador	Transportador	1	D	Montevideo
Elevador	Transportador	1	D	Montevideo
Farinha animal	Transportador	1	D	Montevideo
Ração Expedição	Produto final	1	D	Montevideo
Varredura	Residuo	1	D	Worthington
Varredura	Varredura	1	D	Agona
Varredura	Varredura	1	D	Worthington, Montevideo
Varredura	Varredura	1	D	Agona
Gluten de Milho	Ingrediente	2	D	Agona
Moinho	Moagem	2	D	Tennessee, Montevideo
Misturador	Misturador	2	D	Senftenberg
Varredura	Varredura	2	D	Senftenberg
Varredura	Varredura	2	D	Agona
Varredura	Varredura	2	D	Mbandaka, Senftenberg
Varredura	Varredura	2	D	Montevideo, Tennessee
Varredura	Varredura	2	D	Senftenberg
Elevador	Transportador	3	D	Lexington
Farinha animal	Ingrediente	3	D	Montevideo
Elevador	Transportador	4	D	Havana
Elevador	Transportador	5	D	Idikan, <i>S. enterica</i> sub <i>enterica</i> (O:13,23)