

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



Tese de doutorado

**Perigos microbiológicos e químicos associados ao trânsito ilegal de produtos de origem animal na fronteira oeste do sul do Brasil com Argentina e Uruguai**

**Juliano Gonçalves Pereira**

**Pelotas, 2017**

**Juliano Gonçalves Pereira**

**Perigos microbiológicos e químicos associados ao trânsito ilegal de produtos de origem animal na fronteira oeste do sul do Brasil com Argentina e Uruguai**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva  
Co-orientadora: Prof. Dr. Eduarda Hallal Duval

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

P436p Pereira, Juliano Gonçalves

Perigos microbiológicos e químicos associados ao trânsito ilegal de produtos de origem animal na fronteira Oeste do Sul do Brasil com Argentina e Uruguai / Juliano Gonçalves Pereira ; Wladimir Padilha da Silva, orientador ; Eduarda Hallal Duval, coorientadora. — Pelotas, 2017.

146 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Alimentos. 2. Patógenos. 3. Resíduos de antimicrobianos. 4. Resíduos de antiparasitários. I. Silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Duval, Eduarda Hallal, coorient. III. Título.

CDD : 664

**Juliano Gonçalves Pereira**

**Perigos microbiológicos e químicos associados ao trânsito ilegal de produtos de origem animal na fronteira oeste do sul do Brasil com Argentina e Uruguai**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

**Data da defesa: 14/07/2017**

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)  
Doutor em Ciência dos Alimentos pela USP

Prof. Dr. Fabio Pereira Leivas Leite  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade do Wisconsin - Madison

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini  
Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela UFSC

Profa. Dra. Daniela Isabel Brayer Pereira  
Doutora em Ciência Veterinária pela UFRGS

Dra. Graciela Volz Lopes  
Doutora em Ciência Veterinária pela UFRGS

***Dedico este trabalho  
à minha esposa Vanessa e  
ao meu filho Lucas...***

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por guiar meus passos e me proteger nessa longa jornada de viagens para o cumprimento deste estudo.

Ao meu filho Lucas e minha esposa Vanessa, pelo conforto do carinho, compreensão nas angústias e fortaleza nos momentos em que precisamos nos distanciar. Vocês são as razões da minha vida, amo vocês.

Aos meus pais João e Joana pelo incentivo e esforço despendido desde o início dos estudos de graduação, pelo exemplo de vida, pelas preocupações compartilhadas e pela presença constante em nossas vidas mesmo a milhares de quilômetros de distância. Igualmente, agradeço aos meus sogros Carlos e Vera pelos pensamentos positivos e atenção nos poucos momentos em que passamos juntos durante todos esses anos.

Ao querido orientador professor Wladimir, primeiramente por ter apostado suas fichas na minha orientação, pois não nos conhecíamos pessoalmente. Pela confiança depositada, acolhimento de ideias, liberdade concedida durante todo o experimento e cordialidade na relação de orientação. Sua paciência, generosidade e solicitude são características que tentarei aplicar na minha vida pessoal e profissional.

Agradeço a minha co-orientadora professora Eduarda Hallal Duval, por ter aberto às portas da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) para o doutorado. Da mesma forma, agradeço a confiança e liberdade no desenvolvimento deste estudo.

Aos acadêmicos de pós-doutorado e graduação do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) Vanessa, Manu, Leonardo Tadielo, Leonardo Marques, Rita, Fernanda, Bruna, Phellipe, Fernando, Matheus e Éverton no auxílio durante as viagens, entrevistas, coletas e análises microbiológicas.

Ao querido amigo professor Luciano Bersot por sua dedicação desde os primeiros passos na área de Inspeção. Mesmo estando fisicamente distante o que não permitiu sua participação efetiva desde projeto, suas ideias, cobranças e

entusiasmo foram a base para a construção de minha formação acadêmica, o que me permitiu alçar voos sozinho e desenvolver projetos, orientar acadêmicos, buscar parceiros e implantar e coordenar o Laboratório de Inspeção de Produtos de Animal da UNIPAMPA.

Ao Jorge Vargas, Auditor Fiscal Federal Agropecuário da Vigilância Agropecuária Internacional (VIGIAGRO), por ter acolhido o projeto e o levado à Superintendência da Agricultura do RS permitindo assim a coleta de amostras e autorização para aquisição e ingresso de alimentos no Brasil. Aos funcionários da VIGIAGRO, unidade de Uruguaiana-RS que se esforçaram para a coleta e envio das amostras para análise laboratorial.

Ao Fabiano Barreto, Auditor Fiscal Agropecuário do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Porto Alegre-RS e toda a sua equipe, pela cooperação firmada que permitiu a pesquisa de resíduos químicos no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários. Esta parceria engrandeceu fortemente a ideia inicial do projeto.

Aos professores Fernando Spilki e Andreia Henzel e a mestrandia Fernanda Gil de Sousa da Universidade Feevale de Novo Hamburgo que abriram as portas do Laboratório de Microbiologia Molecular e auxiliaram na pesquisa dos vírus.

Agradeço a todos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFPEL pela recepção durante as análises finais do projeto, em especial à pós-doutoranda Graciela Volz Lopes pelo auxílio e supervisão na realização das análises moleculares.

Aos colegas e amigos da UNIPAMPA, professora Débora Pellegrini no auxílio às dúvidas estatísticas e ao professor Mário Brum pela consultoria na área de virologia.

Agradeço a UNIPAMPA por me conceder o afastamento para a conclusão do doutorado e pela concessão de bolsa de iniciação científica aos acadêmicos vinculados ao projeto bem como no auxílio financeiro ao Grupo de Pesquisa envolvido no projeto.

Agradeço a UFPEL e todos os seus servidores, em especial ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de cursar o doutorado.

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

## Resumo

PEREIRA, Juliano Gonçalves. **Perigos microbiológicos e químicos associados ao trânsito ilegal de produtos de origem animal na fronteira Oeste do Sul do Brasil com Argentina e Uruguai.** 2017. 146f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O controle do trânsito de alimentos em regiões de fronteira é fundamental para reduzir os riscos de propagação de perigos microbiológicos e químicos. Desta forma, os objetivos deste estudo foram: 1) Avaliar o perfil de brasileiros residentes em cidades da fronteira Oeste do RS com Argentina ou Uruguai, quanto à prática de importação de produtos de origem animal e determinar associações entre as características da população e a aquisição destes produtos; 2) Avaliar a qualidade higiênico-sanitária, por meio da contagem de micro-organismos indicadores e pesquisa e identificação molecular de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) em produtos de origem animal *in natura* e processados comercializados em região de fronteira internacional do RS, Brasil; e 3) Pesquisar resíduos de fármacos veterinários (antimicrobianos e antiparasitários) em produtos de origem animal comercializados em região de fronteira do RS. Para o estudo do perfil dos importadores, foi elaborado um questionário o qual foi aplicado em seis cidades do RS (três que fazem fronteira com Argentina e três com Uruguai). Para a avaliação higiênico-sanitária foram analisadas 270 amostras de produtos de origem animal *in natura* (carne bovina, suína, de frango e de caça) e processados (laticínios e carnes processadas), sendo 150 adquiridos na Argentina e 120 no Uruguai; a pesquisa de vírus foi realizada em 159 amostras (86 da Argentina e 73 do Uruguai). A pesquisa de resíduos de fármacos veterinários foi realizada em 189 amostras (90 da Argentina e 99 do Uruguai). Pelo questionário aplicado, obtiveram-se 744 respostas verificando-se que parte da população avaliada importa ilegalmente produtos de origem animal, tanto na fronteira Brasil-Argentina (65,17%) quanto Brasil-Uruguai (76,28%). Nestas fronteiras, derivados do leite foram os principais produtos importados, seguido de carnes *in natura* e processadas. Quanto aos patógenos, observou-se a presença de *Salmonella* spp. (4% dos produtos da Argentina), *L. monocytogenes* (3% da Argentina; 16,66% do Uruguai), HAV (23,25% da Argentina; 12,32% do Uruguai) e RV (36,04% da Argentina; 9,58% do Uruguai) em produtos *in natura* e processados. Não foram detectadas amostras contaminadas com *E. coli* O157:H7 e HEV. As altas médias das contagens de mesófilos e enterobactérias evidenciaram condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a cadeia de produção e comercialização dos produtos. Resíduos de fármacos veterinários foram detectados em 50 amostras (26,45%), com 28 apresentando resíduos de



antimicrobianos (14,81%) e 22 de antiparasitários (11,64%). Das 50 amostras positivas, 20 (15 da Argentina e cinco do Uruguai) apresentaram Limite Máximo de Resíduo (LMR) acima dos parâmetros legais, correspondendo a 10,58% do total das amostras analisadas. Os resultados demonstraram que a prática de importação ilegal de produtos de origem animal é comum nas cidades de fronteira do RS e que os produtos podem conter perigos biológicos (bactérias e vírus) e químicos (resíduos de fármacos veterinários). Desta forma, há necessidade de uma maior ação dos órgãos de vigilância de fronteira internacional, de modo a controlar a entrada de alimentos que possam veicular perigos microbiológicos e químicos bem como de conscientização da população fronteiriça de modo a esclarecer os riscos que a introdução de alimentos no Brasil sem a devida fiscalização sanitária pode trazer para a saúde pública e animal.

**Palavras-chave:** alimentos, patógenos, resíduos de antimicrobianos, resíduos de antiparasitários.

## Abstract

PEREIRA, Juliano Gonçalves. **Microbiological and chemical hazards associated with the illegal transit of animal products at the border west of the southern Brazil with Argentina and Uruguay.** 2017. 146f. Thesis (Doctorate degree in Food Science and Technology) – Graduate Program in Agroindustrial Science and Technology, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Control of food transit in border regions is important to reducing the risk of dissemination microbiological and chemical hazards. The objectives of this study were: 1) To evaluate the profile of Brazilians residing in cities on the western border of RS with Argentina or Uruguay, regarding the practice of importing products of animal origin and determining associations between the characteristics of the population and the acquisition products; 2) Evaluate hygienic-sanitary quality, by counting the micro-organisms and the detection and molecular identification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7, hepatitis A virus (HAV), hepatitis E (HEV), and rotavirus (RV) in in natura and processed animal products marketed in an international border region of RS, Brazil; and 3) Detection of veterinary drug residues (antimicrobials and antiparasitics) in products of animal origin marketed in RS border region. In order to study the profile of the importers, a questionnaire was developed which was applied in six cities of RS (three bordering Argentina and three with Uruguay). For the hygienic-sanitary evaluation, 270 samples of products of animal origin in natura (beef, pork, chicken and game meat) and processed products (dairy and processed meats) were analyzed, of which 150 were purchased in Argentina and 120 in Uruguay. The virus detection was performed in 159 samples (86 from Argentina and 73 from Uruguay). The survey of veterinary drug residues was performed in 189 samples (90 from Argentina and 99 from Uruguay). From the questionnaire applied, 744 responses were obtained, verifying that part of the population evaluated illegally imports products of animal origin, both at the Brazilian-Argentine border (65.17%) and Brazil-Uruguay border (76.28%). At these borders, dairy products were the main imported, followed by fresh and processed meats. As for the pathogens, the presence of *Salmonella* spp. (4% of Argentina's products), *L. monocytogenes* (3% from Argentina, 16.66% from Uruguay), HAV (23.25% of Argentina, 12.32% of Uruguay) and RV (36.04% of Argentina, 9.58% of Uruguay). No samples contaminated with *E. coli* O157: H7 and HEV were detected. The high mean counts of indicators showed inadequate hygienic-sanitary conditions during the chain of production and commercialization of the products. Residues of veterinary drugs were detected in 50 samples (26.45%), with 28 showing antimicrobial residues (14.81%) and 22 antiparasitic residues (11.64%). Of the 50 positive samples, 20 (15 from Argentina and five from Uruguay) had a maximum residue limit (MRL) above the legal parameters, corresponding to

10.58% of the total samples analyzed. The results showed that the practice of illegal importation of animal products is common in RS border cities and that the products may contain biological (bacteria and virus) and chemical (veterinary drug residues) hazards. In this way, there is a need for greater action by international border surveillance agencies in order to control the entry of food that may lead to microbiological and chemical hazards as well as awareness of the border population in order to clarify the risks that the introduction of food in Brazil without proper sanitary inspection can bring to public and animal health.

**Keywords:** antibiotic residues; antiparasitic residues; foods; pathogens.

## Lista de Figuras

### Capítulo 1

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Profile of the survey respondents and frequency of illegal importation of products of animal origin. .... | 53 |
| Figure 2 | Purchasing profile of products of animal origin imported illegally .....                                  | 54 |
| Figure 3 | Profile of the interviewees related to the knowledge on illegal import of products of animal origin. .... | 55 |

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1

- Tabela 1 Questionnaire applied for the determination of the profile of the illegal import of products of animal origin to Brazilian cities at the border with Argentina and Uruguay..... 51
- Tabela 2 Association between respondent characteristics and illegal food import ..52

### Capítulo 2

- Tabela 1 Produtos de origem animal obtidos na Argentina e Uruguai ..... 77
- Tabela 2 Enumeração de mesófilos aeróbios e enterobactérias (log UFC.g<sup>-1</sup> ou UFC.mL<sup>-1</sup>) em produtos de origem animal *in natura* e processados obtidos na Argentina e Uruguai..... 78
- Tabela 3 Frequência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em produtos de origem animal *in natura* e processados obtidos na Argentina e Uruguai..79
- Tabela 4 Presença de genes de virulência de isolados *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 ..... 80

### Capítulo 3

- Tabela 1 Alimentos avaliados na fronteira Brasil-Argentina-Uruguai quanto a presença de vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV)... ..... 99
- Tabela 2 *Primers* utilizados para a detecção de vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) ..... 100
- Tabela 3 Frequência e razão de chance (OR) para a presença de vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) em produtos de origem animal obtidos da Argentina e Uruguai ..... 101

## Capítulo 4

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| Table 1 | Animal products evaluated at the Brazil-Argentina-Uruguay border for the presence of antimicrobials and antiparasitics residues.....                                    | 116 |
| Table 2 | Veterinary drugs evaluated by LC-MS/MS in animal products on the Brazil-Argentina-Uruguay border .....  | 117 |
| Table 3 | Number and frequency of samples of animal products evaluated for the presence of antimicrobials and antiparasitic residues in the Brazil-Argentina-Uruguay border ..... | 118 |
| Table 4 | Samples (n = 20) with values higher than the Maximum Residue Limit (MRL) for the evaluated analytes.....  | 119 |

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| <b>1 Introdução</b> .....   | 16 |
| <b>1.1 Objetivos</b> .....  | 17 |
| <br>  |    |
| <b>2 Revisão bibliográfica</b> .....  | 18 |
| 2.1 Contextualização do problema .....  | 18 |
| 2.2 Regulamentação para o comércio internacional e o sistema de vigilância de fronteiras no Brasil .....  | 21 |
| 2.3 Perigos microbiológicos associados à importação ilegal de alimentos .....   | 24 |
| 2.3.1 Perigos à saúde pública .....   | 25 |
| 2.3.1.1 <i>Salmonella</i> spp. ....   | 25 |
| 2.3.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....   | 26 |
| 2.3.1.3 <i>Escherichia coli</i> produtoras de shiga toxina .....  | 28 |
| 2.3.1.4 Vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) .....  | 30 |
| 2.3.1.5 Presença de patógenos em alimentos importados ilegalmente .....   | 31 |
| 2.3.2 Perigos à saúde animal.....   | 33 |
| 2.4 Perigos químicos associados à importação ilegal de alimentos.....   | 35 |
| <br>  |    |
| <b>3 Capítulo 1 - Profile of the illegal import of products of animal origin to Brazilian cities at the border with Argentina and Uruguay</b> ..... | 37 |
| Abstract .....  | 39 |
| 3.1 Introduction.....   | 40 |
| 3.2 Material and methods .....  | 41 |
| 3.2.1 Preparation of the questionnaire .....  | 41 |
| 3.2.2 Target cities, population sample, and questionnaire administration .....  | 41 |
| 3.2.3 Data Analysis .....   | 42 |
| 3.3 Results .....   | 43 |
| 3.4 Discussion .....  | 45 |

|                        |    |
|------------------------|----|
| Acknowledgements ..... | 48 |
| References .....       | 49 |

**4 Capítulo 2 – Alimentos de origem animal introduzidos no Brasil pela fronteira com Argentina e Uruguai: pesquisa de patógenos e avaliação da qualidade higiênico-sanitária.....**

|  |    |
|--|----|
| Resumo .....   | 56 |
| 4.1 Introdução .....   | 58 |
| 4.2 Material e métodos.....  | 59 |
| 4.2.1 Coleta das amostras .....  | 60 |
| 4.2.2 Análises microbiológicas e moleculares.....  | 60 |
| 4.2.2.1 Enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios, enterobactérias e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva..... | 61 |
| 4.2.2.2 Detecção de <i>Salmonella</i> spp.....   | 61 |
| 4.2.2.3 Detecção de <i>L. monocytogenes</i> .....  | 62 |
| 4.2.2.4 Detecção de <i>E. coli</i> O157:H7 .....   | 63 |
| 4.2.3 Análise dos dados .....  | 63 |
| 4.3 Resultados .....   | 64 |
| 4.4 Discussão.....   | 64 |
| Agradecimentos .....   | 67 |
| Referências .....  | 72 |

**5 Capítulo 3 – Vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) em produtos de origem animal comercializados em região de fronteira entre Brasil, Argentina e Uruguai .....**

|   |    |
|---|----|
| Resumo .....  | 81 |
| 3.1 Introdução .....  | 83 |
| 3.2 Material e métodos.....   | 84 |
| 3.2.1 Coleta das amostras .....                                       | 86 |
| 3.2.2 Detecção de HAV, HEV e RV.....                                  | 86 |
| 3.2.2.1 Preparo das amostras, extração de RNA e síntese do cDNA ..... | 87 |
| 3.2.2.2 RT-qPCR para detecção de HAV .....                            | 87 |
| 3.2.2.3 RT-Nested PCR para detecção HEV.....                          | 88 |
| 3.2.2.4 RT-PCR para detecção de RV .....                              | 88 |



|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 3.2.3 Análise dos dados ..... | 89 |
| 3.3 Resultados .....          | 89 |
| 3.4 Discussão.....            | 91 |
| Agradecimentos .....          | 95 |
| Referências .....             | 95 |

**6 Capítulo 4 – Residues of veterinary drugs in animal products commercialised in the border region between Brazil, Argentina and Uruguay .....** 102

|   |     |
|---|-----|
| Abstract .....                                    | 104 |
| 6.1 Introduction.....                             | 105 |
| 6.2 Materials and methods .....                   | 106 |
| 6.2.1 Sample collection .....                     | 106 |
| 6.2.2 Detection of veterinary drug residues ..... | 107 |
| 6.3 Results and discussion.....                   | 108 |
| 6.4 Conclusions.....                              | 111 |
| 6.5 References .....                              | 112 |

**7 Conclusões .....** 120

**Referências .....** 121

**Apêndices .....** 137

## 1 Introdução

A globalização do comércio de alimentos e o trânsito de passageiros entre países constituem importantes rotas de disseminação de perigos biológicos e químicos de importância em saúde pública. O controle de fronteiras internacionais é vital para a mitigação de riscos associados ao intenso fluxo de comércio legal e ilegal de produtos de origem animal.

A importação ilegal de alimentos é o ato de aquisição de alimentos em um determinado país e sua introdução em um segundo, sem que este passe pela fiscalização sanitária de fronteira realizada pelos serviços oficiais de vigilância agropecuária. No Brasil, a responsabilidade da operação de vigilância é da VIGIAGRO (Vigilância Agropecuária Internacional) que atua em portos, aeroportos e postos de fronteira visando barrar a entrada de produtos que possam carrear perigos. Uma falha na execução desta fiscalização pode permitir a introdução de alimentos contendo patógenos com capacidade de afetar a saúde da população exposta, bem como pode alterar o *status* sanitário do rebanho animal brasileiro.

O Rio Grande do Sul (RS), situado na região sul do Brasil, possui uma região de fronteira internacional muito extensa. O estado faz fronteira com a Argentina e o Uruguai. Entre o RS e a Argentina são, aproximadamente, 720 km de fronteira, toda margeada pelo rio Uruguai, com destaque para as cidades gaúchas de Uruguiana, São Borja, Itaqui e Porto Xavier. Já na fronteira com o Uruguai são, aproximadamente, 1.000 km, com destaque para as cidades de Quaraí, Barra do Quaraí, Santana do Livramento, Aceguá, Rio Branco e Chuí.

Atualmente, o ingresso de produtos processados importados está liberado no Brasil, desde que sejam respeitados parâmetros com relação ao alimento, quantidade e embalagem. Tais características devem ser verificadas no momento do ingresso no Brasil, sejam em postos de fronteira ou aeroportos. A entrada de produtos de origem animal, sem qualquer fiscalização, é preocupante sob o ponto de vista de saúde pública, pois não há garantia alguma de que os alimentos estejam em condições de consumo, podendo assim veicular perigos físicos, químicos e

biológicos, já que não se sabe a sua procedência, o local e forma de abate dos animais e o tipo de industrialização. Além disso, não atendem os requisitos sanitários internacionais e não foram submetidos à fiscalização sanitária oficial, a qual garante a segurança dos alimentos.

Uma vez que a vigilância não é realizada de maneira sistemática, seja por dificuldades operacionais ou pela clandestinidade de ações relacionadas ao comércio internacional, os riscos à saúde animal e pública são imensuráveis. Ao adquirir um produto de fora do país, que se desconhece sua origem, bem como se atendeu ou não as normas mínimas de processamento higiênico-sanitário e tecnológico, estes tornam-se um risco à população, pela probabilidade de veicular patógenos ou contaminantes químicos que afetam a saúde do consumidor brasileiro.

## 1.1 Objetivos

- Avaliar o perfil de brasileiros residentes em cidades da fronteira oeste do RS com Argentina ou Uruguai, quanto à prática de importação de produtos de origem animal e determinar associações entre as características da população e a importação destes produtos.

- Avaliar a qualidade higiênico-sanitária por meio da contagem de micro-organismos indicadores e pesquisa e identificação molecular de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV), de produtos de origem animal *in natura* e processados comercializados em região da fronteira oeste do RS com Argentina e Uruguai.

- Pesquisar resíduos de fármacos de uso veterinário (antimicrobianos e antiparasitários) em produtos de origem animal comercializados na região da fronteira oeste do RS com a Argentina e Uruguai.

## **2 Revisão bibliográfica**

### **2.1 Contextualização do problema**

O Brasil é o maior país da América do Sul em população e território. Faz fronteira com 10 países, numa área de 16.886 km, a qual requer vigilância constante para garantir a soberania nacional e salvaguardar a saúde da população e do rebanho de animais.

Pelas fronteiras brasileiras podem ingressar produtos alimentícios, desde que sua entrada atenda à regulamentação sanitária (BRASIL, 2006a, 2016a). No momento da entrada, devem ser submetidos à fiscalização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), porém, a entrada de produtos de origem animal de maneira ilegal é prática comum em fronteiras brasileiras. Isso afeta diretamente os cofres públicos, pois não são efetuados os pagamentos de impostos de importação e expõe o país aos riscos da introdução de agente patogênicos que podem afetar seu *status* sanitário.

Animais e produtos de origem animal são expressamente proibidos de trafegar entre países sem a anuência da fiscalização e o atendimento de normas sanitárias rígidas nacionais e internacionais, pois podem carrear patógenos ou contaminantes químicos, afetando assim a saúde dos consumidores (OIE, 2016).

O RS, estado situado na região sul do Brasil, possui uma região de fronteira internacional muito extensa, fazendo fronteira com a Argentina e o Uruguai. Em algumas cidades fronteiriças, devido às características geográficas e culturais, a fiscalização sanitária internacional não ocorre, o que permite a entrada ilegal dos mais variados produtos de origem animal.

Entre o RS e a Argentina são, aproximadamente, 724 km de fronteira, toda margeada pelo rio Uruguai, com destaque para as cidades gaúchas de Uruguiana, Itaqui, São Borja e Porto Xavier, que fazem fronteira com as cidades argentinas de Paso de Los Libres, Alvear, Santo Tomé e San Javier, respectivamente. A existência

da divisa geográfica, delimitada pelo rio, facilita a operacionalização das ações de vigilância, já que deixa clara a região limítrofe internacional e permite a instalação de pontos de fiscalização sanitária agropecuária em determinados pontos da fronteira, obrigando todos os ingressantes no Brasil a passarem por pontos onde é possível realizar a averiguação de bagagens e mercadorias.

Já a fronteira com o Uruguai é de, aproximadamente, 1.000 km, com destaque para as cidades brasileiras de Quaraí, Barra do Quaraí, Santana do Livramento, Jaguarão, Chuí e Aceguá as quais fazem f com as cidades uruguayas de Artigas, Bella Unión, Rivera, Rio Branco, Chuy e Aceguá, respectivamente.

Nestas regiões de fronteira, além da entrada de eletroeletrônicos, produtos de perfumaria, bebidas e roupas, como ocorre em outras fronteiras, adentram também produtos de origem animal. Isto se deve pela percepção e apreciação que a população que reside nestas regiões tem pela qualidade dos alimentos, com destaque para a carne *in natura* e produtos cárneos, como salames, e derivados lácteos, como queijos e doce de leite. A carne argentina é reconhecida regional e mundialmente pelas suas características sensoriais, como maciez e sabor, atribuídas ao tipo de rebanho criado, quase que exclusivamente formado por animais de raças europeias que, as quais produzem carne com maior gordura em marmoreio e mais macia (ALVES et al., 2005). Os derivados lácteos uruguayos, como queijo e o doce de leite, são produtos muito apreciados devido à excelente qualidade sensorial quando comparados com os produtos brasileiros.

Sem dúvida, as características sensoriais são as que chamam mais atenção na escolha desses produtos. Entretanto, se forem computados, ainda, o preço atrativo e a facilidade de ingresso no Brasil com estes alimentos, devido às deficiências na fiscalização, a importação ilegal é prática cada vez mais comum e inevitável nas cidades de fronteira do estado.

Um fator que dificulta a fiscalização no momento do ingresso no Brasil é a quantidade transportada. Na maioria das vezes, o volume trazido é pequeno e os produtos são escondidos entre as bagagens para ocultá-los durante a averiguação dos carros e mercadorias, passando despercebidos durante a fiscalização sanitária, quando esta ocorre.

Dados<sup>1</sup> da Vigilância Agropecuária Internacional (VIGIAGRO) do MAPA no RS referentes aos últimos três anos (2014, 2015 e 2016) demonstraram que, das 10 unidades de fiscalização de fronteira no Estado (Chuí, Jaguarão, Aceguá, Santana do Livramento, Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja, Porto Xavier e Porto Mauá), ocorreram apreensões apenas em Itaqui e Uruguaiana. Em Itaqui, foram realizadas 13 apreensões de produtos de origem animal em 2015, totalizando 25 kg e, em 2016, foram 12 apreensões, somando 12 kg. Em Uruguaiana, de 2014 a 2016, foram apreendidas 3.095 kg de carne bovina *in natura*, 729 kg de pescados, 493 kg de carnes de caça (principalmente carne de capivara), 436 kg de mel, 45 kg de queijo, 15 kg de carne suína, 13 kg de salame e 10 kg carne ovina.

Deve-se considerar a possibilidade de os dados acima estarem subestimados, uma vez que a averiguação de carros e bagagens no retorno ao Brasil é realizada por método de amostragem. Além disso, dados apontam que 59% das pessoas que residem em cidades de fronteira do RS, ingressam com certa frequência com produtos de origem animal adquiridos na Argentina ou Uruguai e que, apenas 5% já tiveram seus produtos apreendidos pela VIGIAGRO no retorno ao Brasil (PEREIRA et al., 2015). Desta forma, é evidente que o volume de apreensões demonstrado pelos dados da VIGIAGRO não representa o volume real que ingressa ilegalmente no país.

No caso do RS, a principal forma de ingresso destes alimentos é via fronteira terrestre, porém, esta problemática atinge o Brasil de uma maneira geral, uma vez que alimentos podem ser introduzidos a partir de outras rotas, como os aeroportos.

Em 2014, a VIGIAGRO apreendeu mais de 65 toneladas de produtos de origem animal ou vegetal, em bagagens de passageiros em três dos maiores aeroportos brasileiros (Confins, em Belo Horizonte, Guarulhos, em São Paulo e Salgado Filho, em Porto Alegre). Os produtos mais apreendidos são de origem animal, como lácteos, embutidos, pescados, mel e carnes. Sementes, mudas e frutas lideram a lista dos produtos de origem vegetal (BRASIL, 2015b).

Em estudo realizado por Melo et al. (2014a) em parceria com a VIGIAGRO, foram apreendidos pela fiscalização sanitária, 657,4 kg de produtos de origem animal ilegalmente importados, que ingressariam no Brasil via aeroportos de Guarulhos-SP e Galeão-RJ. Este mesmo estudo apontou que entre 2006 e 2009,

---

<sup>1</sup>Dados não publicados obtidos por meio de solicitação junto ao e-SIC (Sistema Eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão). Protocolo 21900.001631/2016-48.

foram apreendidas cerca de 40 toneladas de alimentos de origem animal no aeroporto de Guarulhos e, entre 2008 e 2009, 19 toneladas no aeroporto do Galeão.

A entrada de produtos de origem animal, sem qualquer fiscalização, é preocupante sob o ponto de vista de saúde pública, pois não há garantia alguma de que os alimentos estejam em condições de consumo, podendo assim veicular perigos físicos, químicos e biológicos, já que não se sabe a sua procedência, o local e forma de abate dos animais e o tipo de industrialização. Além disso, não atendem os requisitos sanitários internacionais e não foram submetidos à fiscalização sanitária oficial, a qual garante a segurança dos alimentos.

## **2.2 Regulamentação para o comércio internacional e o sistema de vigilância de fronteiras no Brasil**

No Brasil, a regulamentação para a produção e industrialização de produtos de origem animal é baseada no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) e em legislações complementares (BRASIL, 2017a). Estas legislações estabelecem normas relativas às condições das instalações, equipamentos, fluxograma operacional, processos tecnológicos, aplicação de boas práticas de fabricação, Programas de Autocontrole e programas de prevenção da contaminação. Do mesmo modo que as indústrias nacionais devem obedecer estas exigências, toda e qualquer indústria de fora do país que tenha ambição de exportar para o Brasil, deve seguir rigorosas recomendações sanitárias.

Na manifestação de interesse de um país em comercializar seus produtos com o Brasil, este recebe o credenciamento para realizar o comércio internacional, desde que sejam atendidos diversos requisitos legais e sanitários recomendados pelo Brasil. Mesmo após ter recebido o credenciamento, o MAPA poderá determinar visitas de auditorias periódicas aos países reconhecidos e em seus estabelecimentos credenciados, visando assegurar a manutenção das condições previamente aprovadas, podendo manter ou suspender, a qualquer tempo, o credenciamento, caso haja comprometimento do sistema de inspeção ou por queda de padrão higiênico-sanitário dos mesmos (BRASIL, 1998).

Além de parâmetros relacionados à planta de abate e processamento e aos procedimentos de controle de qualidade, os países devem possuir programas sanitários que garantam a saúde do rebanho bem como dos produtos que são gerados após o abate. Carnes e derivados de bovinos devem ser originados de animais que nasceram e permaneceram de forma ininterrupta até o abate em países classificados pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) como de risco insignificante para Encefalopatia Espongiforme Bovina e em país ou em zona livre de febre aftosa. As operações de inspeção *ante-mortem* e *post-mortem* devem ser realizadas sob supervisão de Médico Veterinário Oficial e o abate não deve ocorrer como consequência de programas de erradicação de enfermidades infectocontagiosas (BRASIL, 2009a).

Os produtos de origem animal procedentes de países e estabelecimentos devidamente credenciados, após os procedimentos de controle realizados em postos aduaneiros (portos, aeroportos, postos de fronteira) e sua liberação para o ingresso no Brasil, são destinados para estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF), dotados de instalações, equipamentos e fluxograma operacional que permita os procedimentos de reinspeção e, quando necessário, coleta de amostras para exames laboratoriais. Somente poderão circular livremente no Brasil após terem sido considerados aptos pelos procedimentos de reinspeção e serem acompanhados de certificado sanitário. Os produtos de origem animal que apresentarem inconformidades no exame documental e/ou no exame laboratorial, não poderão adentrar no território brasileiro, podendo retornar ao país de origem ou ainda serem inutilizados conforme julgamento do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do MAPA (BRASIL, 1998, 2006a, 2017).

Estes procedimentos de fiscalização e vigilância internacional são de responsabilidade da VIGIAGRO, órgão vinculado ao MAPA. As atividades deste órgão têm como objetivos impedir a entrada e a disseminação de agentes patogênicos que constituam ameaças à agropecuária nacional. Outra função desta vigilância é a garantia da saúde pública, uma vez que as ações também têm como objetivo o impedimento da entrada de alimentos de origem animal que possam constituir um risco pela veiculação de patógenos alimentares (BRASIL, 2006a).

A VIGIAGRO opera em mais de 100 unidades localizadas em portos, aeroportos e postos de fronteira e é responsável pela fiscalização sanitária e zoofitossanitária das cargas agropecuárias que passam por esses diferentes pontos



de entrada de pessoas e de mercadorias no país. Compete à VIGIAGRO fiscalizar o cumprimento das exigências estabelecidas para o trânsito internacional, realizando exames de animais vivos, inspeção de produtos de origem animal e derivados, averiguação de bagagens de passageiros com vistas a detectar produtos de origem animal e derivados. Cabe à VIGIAGRO, também, expedir certificados para trânsito interestadual ou internacional de animais e produtos de origem animal, com base nos certificados sanitários de origem (BRASIL, 2006a).

O Manual de Procedimentos Operacionais da VIGIAGRO, aprovado pela Instrução Normativa 26 de 2006, dispõe sobre os procedimentos a serem utilizados na fiscalização e inspeção do trânsito internacional de produtos agropecuários nos aeroportos internacionais, portos, postos de fronteira e aduanas. Esse documento foi desenvolvido a partir da interpretação e compilação da legislação básica que dá suporte à vigilância zoofitossanitária, objetivando aperfeiçoar os mecanismos operacionais do sistema, esclarecer, orientar e disciplinar os princípios determinados pela legislação vigente, padronizando as ações desenvolvidas (BRASIL, 2006a).

Com relação ao trânsito de produtos de origem animal, a partir da publicação da Instrução Normativa 11 de 2016, o MAPA autorizou o ingresso no território nacional, de produtos de origem animal destinados ao uso e consumo humano ou animal, classificados como “*não presumíveis veiculadores de doenças contagiosas*”. Nesta classificação, estão atualmente autorizados a adentrar no Brasil, produtos cárneos industrializados (limitados a 10 kg por pessoa), produtos lácteos industrializados (5 kg ou L por indivíduo), produtos derivados de ovos (5 kg por indivíduo), pescado salgado, defumado ou enlatado (5 kg por indivíduo), produtos de confeitaria e produtos de origem animal destinados ao consumo de animais (5 kg por indivíduo). Para fins de ingresso no território nacional, os produtos devem estar acondicionados em sua embalagem original de fabricação, com rotulagem que possibilite a sua identificação, devidamente lacrados, sem evidência de vazamento ou violação. Todas estas exigências devem ser verificadas quanto ao seu atendimento no momento em que os viajantes regressam ao Brasil, porém, muitas vezes a fiscalização não ocorre ou, quando ocorre, não consegue detectar irregularidades, permitindo o ingresso de alimentos contendo riscos, como carnes *in natura* ou produtos que não atendam as especificações da IN 11 (BRASIL, 2016a).

Na Europa, o livre trânsito de alguns alimentos entre os países que compõe o bloco da União Europeia tem levantado dúvidas com relação à segurança pública,

uma vez que a disseminação de patógenos entre os países tem sido relatada em alguns estudos (BEUTLICH et al., 2015; SCHODER et al., 2015). Autores que defendem a restrição de trânsito citam que as deficiências na fiscalização sanitária nos pontos de ingresso de viajantes é comum e pode comprometer o *status* sanitário do país que permite o ingresso de alimentos (NOORDHUIZEN et al., 2013).

No Brasil, apesar da obrigatoriedade da averiguação dos carros no momento do ingresso no Brasil (BRASIL, 2006a), em muitos locais as ações são prejudicadas por diversos fatores, tais como a insuficiência de recursos humanos (Auditores Fiscais Federais Agropecuários e técnicos), a liberação irregular e o contingenciamento de recursos, a insuficiência de recursos para investimento, além de problemas de ordem administrativa em algumas Superintendências Federais do MAPA nos estados brasileiros, como apontado por auditorias na VIGIAGRO realizada por membros do Tribunal de Contas da União (BRASIL, 2006b).

Uma vez que esta vigilância sistemática não é realizada, seja por dificuldades operacionais ou pela clandestinidade de ações relacionadas ao comércio internacional, os riscos à saúde animal e à saúde pública são imensuráveis, pois uma vez que se adquire um produto de fora do país, que se desconhece sua origem, bem como se atendeu ou não as normas mínimas de processamentos higiênico-sanitário, estes tornam-se um risco à população, pela probabilidade de veicular patógenos ou contaminantes químicos que afetam a saúde dos consumidores que residem em regiões de fronteira.

### **2.3 Perigos microbiológicos associados à importação ilegal de alimentos**

A entrada de alimentos veiculando perigos biológicos no território brasileiro pode ter duas consequências:

- 1) risco de contaminação da população por meio da ingestão de produtos de origem animal contaminados com patógenos alimentares, levando à ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

- 2) risco de contaminação dos rebanhos, afetando diretamente o *status* sanitário e trazendo sérias consequências à economia do país;

### 2.3.1 Perigos à saúde pública

Os perigos biológicos de interesse para a saúde pública são representados pela presença de micro-organismos patogênicos nos alimentos, tais como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* produtora de shiga toxina, bem como de vírus patogênicos. Segundo dados do Ministério da Saúde, entre 2007 e 2016 foram notificados, no Brasil, 6.632 surtos de DTA, com 469.482 indivíduos expostos, 118.104 doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos. Os principais alimentos envolvidos foram produtos de origem animal como ovos, carnes bovina, suína e de frango, pescados e leite. Agentes bacterianos foram responsáveis por 90,5% dos surtos, sendo os principais *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Shigella* spp. DTA de origem viral corresponderam à 7,1% dos surtos e os patógenos envolvidos foram HAV, RV e norovírus (NV) (BRASIL, 2017b).

#### 2.3.1.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, anaeróbios facultativos. O organismo apresenta taxa de multiplicação ótima à 37 °C e produz gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*), sendo capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria das cepas é móvel, apresentando na sua estrutura flagelos peritríquios, exceção feita aos sorotipos *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que são imóveis (FRAZIER & WESTHOFF, 1988; JAY, 2005).

A DTA mais frequente no mundo é a salmonelose (BOLLAERTS et al., 2008), decorrente em 95% dos casos da ingestão de alimentos contaminados com células viáveis de diversos sorotipos de *Salmonella* spp. (FRAZIER & WESTHOFF, 1988; JAY, 2005). Os sintomas caracterizam-se por dor abdominal, calafrios, febre, vômito, desidratação e dores de cabeça e o período de incubação pode variar de 5 a 72 h, frequentemente ocorrendo entre 12 a 36 h. A recuperação normalmente ocorre entre 1 e 4 dias após o aparecimento dos sintomas, sendo que a maioria dos casos é autolimitante (CLIVER, 1990).

*Salmonella* spp. foi o principal agente causador das DTA ocorridas no Brasil entre 2007 e 2016 (BRASIL, 2017b). Nos Estados Unidos da América (EUA), foram notificados 2.437 surtos de salmonelose entre 1998 e 2015, com 65.724 pessoas envolvidas, 7.521 hospitalizações e 86 mortes (CDC, 2017). Segundo relatório apresentado pelas autoridades de segurança alimentar da União Europeia, em 2008, foram confirmados 131.468 casos de salmonelose; deste modo, a taxa de notificação média na União Europeia foi de 26,4 casos/100.000 habitantes, com uma ampla variação entre os países membros da comunidade. A menor incidência ocorreu na Romênia com 2,9 e a maior na população da Eslováquia com 126,8/100.000 habitantes (EFSA, 2010).

A importância de *Salmonella* spp. como agente causador de toxinfecções alimentares reside no fato de estar amplamente distribuída na natureza, e do trato intestinal de humanos e animais ser o seu principal reservatório natural (CLIVER, 1990). Desta forma, o micro-organismo ingressa nas plantas de processamento e, devido às características de abate e processamento, pode permanecer nos ambientes industriais sendo fonte constante de contaminação (FREITAS et al., 2010).

Em algumas regiões da Argentina, a prevalência média de *Salmonella* spp. em frangos é de  $\pm 25\%$ , contudo, em algumas propriedades este valor se aproxima de 70% (XAVIER et al., 2011). Em suínos, a prevalência na Argentina pode variar de 24,1% a 45% (IBAR et al., 2009). Apesar de não de ser detectada em produtos obtidos do Uruguai, *Salmonella* spp. é reconhecida como um importante patógeno naquele país (BETANCOR, 2010).

### **2.3.1.2 *Listeria monocytogenes***

Dentre as espécies que compõe o gênero *Listeria*, *L. monocytogenes* é a única considerada patogênica aos humanos, a qual é um importante patógeno veiculado por alimentos e responsável por causar surtos de listeriose em humanos e animais (FORSYTHE, 2005; JAY, 2005). O gênero *Listeria* é, atualmente, composto por 17 espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*,

*Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* e *Listeria booriae* (WELLER et al., 2015; ORSI & WIEDMANN 2016). Estas espécies podem ser diferenciadas pela realização de testes fenotípicos como a fermentação de açúcares e atividade hemolítica (DOYLE et al., 1997; JAY, 2005).

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Listeria* são bacilos curtos (0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 a 2 µm de comprimento), Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e cápsulas. São móveis a temperatura de 25 °C devido a presença de flagelos peritríquios. *Listeria monocytogenes* pode multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (1 a 25°C) e pH (4,6 - 9,6), além de tolerar concentrações salinas elevadas (≥10%), tendo assim uma capacidade de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis (DOYLE et al., 1997; JAY et al., 2005).

*Listeria monocytogenes* é frequentemente isolada de alimentos, sendo esta sua principal via de transmissão. Estudos relatam o seu isolamento em carne *in natura* e produtos cárneos, leite *in natura* e subpasteurizado, queijos, sorvetes, alimentos prontos para o consumo, saladas e alimentos de origem marinha, inclusive alimentos refrigerados (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004; BERSOT et al., 2008; SANT'ANA et al., 2012; CARTWRIGHT et al., 2013).

Nos EUA, foram notificados 61 surtos de listeriose entre 1998 e 2015, com 818 pessoas envolvidas, 578 hospitalizações e 121 mortes (CDC, 2017). Contudo, o valor real é, provavelmente, maior devido à subnotificação. Assim, estudos apontam que *L. monocytogenes* causa a doença em aproximadamente 2.500 pessoas por ano, com cerca de 500 mortes, nos EUA (MEAD et al., 1999). Na União Europeia, em 2011, foram confirmados 1.476 casos de listeriose humana de origem alimentar (EFSA, 2013). Apesar da baixa morbidade, *L. monocytogenes* apresenta a maior taxa de letalidade dentre os patógenos de origem alimentar.

No Brasil, há uma grande deficiência no diagnóstico clínico e na notificação de casos e surtos de listeriose alimentar, o que reflete na inexistência de relatos oficiais por parte das autoridades sanitárias conflitando com os vários relatos de listeriose humana no Brasil. Vale ressaltar que nenhum destes relatos relaciona a doença com a ingestão de alimentos contaminados (HOFER et al., 1999), embora este fato possa estar relacionado à falta de conhecimento por parte da comunidade médica em relação à importância dos alimentos na disseminação de *L.*

*monocytogenes* aos seres humanos, o que dificulta a identificação da fonte da doença (DESTRO, 2013).

*Listeria monocytogenes* também é um patógeno que tem sido isolado em produtos da Argentina (PELLICER et al., 2002; CALLEJO et al., 2008). No Uruguai, o patógeno já foi isolado em embutidos e queijos e causou a morte de quatro pessoas em 2016, o que levou as autoridades sanitárias a lançar alertas para a população, de modo a evitar o consumo de alimentos crus ou mal cozidos, produtos sem tratamento térmico (sucos e leites) e produtos sem origem conhecida (EL PAÍS, 2016).

### **2.3.1.3 *Escherichia coli* produtoras de shiga toxina**

De maneira geral, *E. coli* é considerado um dos mais versáteis patógenos bacterianos pois, enquanto algumas estirpes pertencem a microbiota natural e desempenham um importante papel na fisiologia intestinal de animais e humanos, outras são capazes de causar infecção no trato intestinal, bem como trato urinário e sistema nervoso (MENG et al., 2007). Inúmeros surtos de DTA foram relacionados à presença de cepas patogênicas de *E. coli*, evidenciando que sua relevância vai além de ser um micro-organismo indicador de contaminação de origem fecal nos alimentos (MENG et al., 2007, CDC, 2017).

As estirpes patogênicas de *E. coli* podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de patogenicidade em: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) e de agregação difusa (DAEC) (HUANG, 2004). As EHEC são um subgrupo composto pelas *E. coli* produtoras de shiga toxina (STEC).

*Escherichia coli* produtoras de shiga toxina são responsáveis por sintomas que variam de simples diarreia até diarreia sanguinolenta, podendo evoluir para Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU) e púrpura trombótica trombocitopênica, podendo levar à falência renal e óbito. O sorotipo O157:H7 é considerado o principal produtor de shiga toxina envolvido com surtos de DTA, porém, alguns casos podem ocorrer por outros sorotipos como O103, O104, O111 e O26 (NATARO & KAPER, 1988; CDC, 2013b).

Os bovinos são o reservatório mais importante de STEC e a maioria dos surtos de infecções humanas causadas por estas bactérias deve-se ao consumo de carne bovina mal cozida, leite de vaca não pasteurizado e águas de abastecimento e recreação contaminados pelo conteúdo intestinal de animais, sobretudo, dos bovinos, ou mesmo outros alimentos que, por ventura, contaminaram-se por esta fonte (GRIFFIN & TAUXE, 1991; BEUTIN et al., 1993; PATON & PATON, 1998; KARMALI, 2010).

No Brasil, poucos estudos têm relatado o isolamento de STEC (CERQUEIRA et al., 1999; LEOMIL et al., 2003). O primeiro relato de isolamento de *E. coli* O157:H7 em gado bovino ocorreu em 1999, por Cerqueira et al. (1999), que, ao analisarem amostras de fezes de 197 bovinos de corte e leiteiro no Rio de Janeiro, detectaram STEC em 71% (139/197) dos animais, sendo 82% (99/121) em gado leiteiro e 53% (40/76) em gado de corte. No entanto, apenas 1,5% dos animais apresentaram o sorotipo O157:H7.

Diversos estudos conduzidos na Argentina demonstraram a presença do sorotipo O157:H7 em produtos de origem animal. Na Argentina, Jure et al. (2015) isolaram *E. coli* O157:H7 em 3,1% das amostras de carne moída bovina e embutidos coletadas em diversas cidades daquele país. Na cidade de Berisso, Argentina, Brusa et al. (2013) detectaram o patógeno em 25,5% e 4,4% das amostras de carne moída bovina e ambiente de processamento de carne (facas, mesas e moedores), respectivamente. Fato relevante é que a incidência de SHU neste país chega a ser 10 vezes maior que em outros países industrializados (13,9 casos / 100.000 crianças menores que 5 anos), diferente da dinâmica epidemiológica observada em outros países (LEOTTA et al., 2008). Atribui-se esta elevada incidência provavelmente ao consumo significativo de carne. Uruguai e Chile também são países da América do Sul onde a incidência dessa síndrome é ligeiramente maior do que nos EUA e Canadá (MOREIRA et al., 2003).

No Brasil, dados oficiais não relacionam nenhum caso de DTA com a ingestão de produtos de origem animal contaminados com STEC, apesar de diversos estudos demonstrarem a presença desse patógeno tanto nos animais quanto nos seus produtos. Dois estudos realizados em São Paulo em diferentes períodos, detectaram 1,2% das carcaças bovinas contaminadas com STEC (RIGOBELLO et al., 2006, RIGOBELLO & ÁVILA, 2012). Vicente et al. (2005), em um trabalho realizado em propriedades leiteiras de Jaboticabal - SP, detectaram 3,3% de STEC em amostras

de leite. Contudo, Beraldo et al. (2014), não detectaram amostras positivas para STEC em leites provenientes de três propriedades produtora de leite de búfala do estado de São Paulo.

#### **2.3.1.4 Vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV)**

O HAV e o RV são, juntamente com o NV, os principais vírus causadores de DTA no Brasil (BRASIL, 2017b). Apesar de não aparecer nas estatísticas oficiais do Ministério da Saúde brasileiro, o HEV também tem sido relacionado à surtos de DTA no mundo. Nos EUA, 101 surtos relacionados à presença de HAV, HEV e RV foram notificados ao serviço de vigilância, entre de 1998 e 2015. Estes surtos envolveram 2.822 pessoas, 249 hospitalizações e 12 óbitos (CDC, 2017).

O HAV é um vírus RNA, não envelopado e pertencente à família *Picornaviridae* (WHITE et al., 2016) e é o causador mais comum de hepatite infecciosa em todo o mundo. A infecção é frequentemente assintomática em crianças mais jovens, enquanto em crianças mais velhas e em adultos, há uma gama de manifestações clínicas, desde infecção leve a insuficiência hepática grave. O HAV é endêmico na América do Sul, onde inquéritos epidemiológicos indicam que mais de 90% da população de baixa renda apresenta evidências sorológicas de infecção. Além disso, é responsável por mais de 50% de todos os casos relatados de hepatite aguda em humanos (GARCÍA-AGUIRRE & CRISTINA, 2008).

O HEV é um vírus RNA pertencente à família *Hepeviridae* (WHITE et al., 2016). A infecção por HEV está associada a saneamento deficiente e água não potável. Todos os anos, cerca de 20 milhões de indivíduos são infectados por esse vírus, resultando em aproximadamente 56.000 mortes. A doença é geralmente autolimitante, mas pode causar insuficiência hepática aguda, com baixa mortalidade, em indivíduos saudáveis, e taxas de mortalidade significativamente maiores em mulheres grávidas. Os sintomas podem incluir febre, náuseas, vômitos, dor abdominal e icterícia (SA-NGUANMOO et al., 2015). O suíno, assim como sua carne e derivados, são os principais veículos de HEV (VASCONCELOS et al., 2015; WILHELM et al., 2014), o qual tem sido detectado em amostras de fezes e carcaças obtidas em abatedouros e no comércio varejista (INTHARASONGKROH et al.,



2016), bem como em amostras de produtos cárneos. Heldt et al. (2016) detectaram a presença do genoma do HEV em 36% de amostras de patês suínos comercializados na cidade de Novo Hamburgo, Brasil.

O RV é um vírus RNA e pertence à família *Reoviridae* (WHITE et al., 2016), sendo considerado a causa mais importante de gastroenterite aguda em lactentes e crianças em países desenvolvidos e em desenvolvimento em todo o mundo. É responsável por 30 a 50% dessas doenças, gerando grande número de hospitalizações. O RV é excretado nas fezes de pessoas infectadas durante o período de diarreia aguda, em concentrações que podem atingir até  $10^{11}$  partículas virais/g (VICTORIA et al., 2014)

Apesar das diferenças observadas quanto à manifestação clínica das doenças causadas por estes vírus, todos possuem a transmissão fecal-oral, quer por contato pessoa-pessoa ou por meio do ambiente ou alimentos contaminados. Desta forma, procedimentos higiênicos durante a obtenção e manipulação de alimentos constituem uma importante barreira para evitar a contaminação viral dos alimentos (WHITE et al., 2016).

### **2.3.1.5 Presença de patógenos em alimentos importados ilegalmente**

Nos EUA, diversos surtos de DTA foram relacionados com a ingestão de produtos de origem animal importados ilegalmente, principalmente na região de fronteira com o México. Entre 1997 e 2007, quatro grandes surtos de salmonelose ocorreram devido à ingestão de queijo fresco tipo mexicano, que ingressou ilegalmente via fronteira (JOSEPH et al., 2013). Dados do Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet 2004-2009), apontam que surtos de listeriose envolvendo mulheres grávidas são muito mais frequentes naquelas de origem hispânica, devido ao fato destas relatarem o consumo frequente de queijo fresco de origem mexicana (SILK et al., 2012). Entre 2000 e 2001 ocorreu um surto de listeriose causado pela ingestão desse tipo de queijo, que resultou na morte de 5 pessoas na Carolina do Norte, EUA (CDC, 2001).

Surtos de tuberculose e brucelose envolvendo a ingestão de produtos ilegalmente importados para os EUA também já foram relatados (JOSEPH et al.,

2013). Análises microbiológicas de alimentos apreendidos na fronteira entre Tijuana (México) e San Diego (EUA), verificaram a presença de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *Mycobacterium bovis* em queijos frescos (KINDE et al., 2007).

No Brasil e no mundo, diversos estudos avaliaram apreensões em fronteiras secas ou aeroportos e, sem exceção, todos os autores apontam o grande risco que a falta de controle sanitário dos alimentos que ingressam ilegalmente nas fronteiras pode trazer, tanto para saúde pública quanto animal.

No Brasil, Melo et al. (2015) avaliaram apreensões da VIGIAGRO nos aeroportos de Guarulhos e Galeão, dois dos maiores aeroportos brasileiros. A maioria das apreensões analisadas apresentou contaminação por coliformes a 35 °C e 45 °C. *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* também foram detectados em produtos lácteos e carnes bovina, suína e ovina. *Salmonella* spp. foi isolada de uma amostra de linguiça suína.

Oniciuc et al. (2015) avaliaram produtos apreendidos em região de fronteira terrestre entre a Romênia e a Moldávia. Os autores encontraram *S. aureus* em 8% das amostras, sendo na sua maioria, produtos lácteos. Dentre os isolados, apenas uma amostra estava contaminada com *S. aureus* metilicina-resistente.

Beutlich et al. (2015) avaliaram apreensões em dois grandes aeroportos da Alemanha. Os autores relataram que o maior número de apreensões foi de produtos lácteos, seguido de carne *in natura* e produtos cárneos processados. De todos os alimentos apreendidos, 5% apresentavam micro-organismos patogênicos (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Yersinia* spp., *E. coli*, *Brucella* spp.), sendo que os produtos com maior contaminação eram as carnes *in natura*, seguidas dos produtos cárneos e laticínios.

Rodríguez-Lázaro et al. (2015a) avaliaram produtos interceptados de voos de fora da União Europeia, no aeroporto de Bilbao na Espanha, e detectaram diversos produtos contaminados com *S. aureus* e *S. aureus* metilicina-resistente. O produto mais relacionado com esta contaminação foi o queijo. Em outro estudo, esses mesmos autores avaliaram 200 amostras de alimentos, também no aeroporto de Bilbao, e detectaram *L. monocytogenes* (10%) e *Salmonella* spp. (5,5%) em produtos oriundos de diversos países, na sua maioria da América do Sul (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2015b). Ainda neste mesmo aeroporto, Rodríguez-Lázaro et al. (2015c) avaliaram a presença de vírus patogênicos em alimentos. Das 122 amostras de carne apreendidas, 67 foram positivas para, pelo menos, um vírus

entérico, sendo 65 positivas para o HEV (53,3%), 3 para NV I (2,5%) e uma para o NV II (0,8%). Nenhuma das amostras analisadas apresentou o HAV. Todos os tipos de carne apresentaram contaminação, contudo, houve uma detecção maior em produtos de carne suína (64,2%).

Schoder et al. (2015) avaliaram 600 amostras de produtos de origem animal apreendidos pelo serviço veterinário no Aeroporto de Viena, na Áustria. Os produtos apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e STEC, sendo os derivados da carne, os que apresentaram maior número de amostras contaminadas.

### **2.3.2 Perigos à saúde animal**

O MAPA, por meio da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), com o objetivo de garantir a sanidade do rebanho brasileiro, estabeleceu o Programa Nacional de Saúde Animal, que contempla diversos Programas de Sanidade, Controle e/ou Erradicação de diversas doenças que acometem os animais domésticos, dentre eles: Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e outras Encefalopatias (PNCRH), Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA), Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) e o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, dos Caprinos e Ovinos, Avícola, Apícola e Suídea (BRASIL, 2009b).

Nestes programas, estão contidos os requisitos de vacinação, trânsito e quarentena animal, com objetivo de evitar a entrada e/ou permanência no Brasil, de perigos biológicos que possam trazer riscos à pecuária nacional. Desta forma, se estes requisitos não forem atendidos, o ingresso ilegal de animais ou seus produtos pode introduzir patógenos com significativo potencial de afetar o *status* sanitário do rebanho brasileiro.

Além de causar prejuízos econômicos associados ao controle e erradicação, a ocorrência de doenças infecciosas nos animais também provoca impactos nas transações comerciais entre os países. A alteração do *status* sanitário de um país devido à suspeita ou presença de uma doença de notificação obrigatória, pode comprometer as vendas externas para outros países, causando o enfraquecimento

do comércio interno, aumento de desemprego e, conseqüentemente, escassez de renda (HORST et al., 1998, STEINFELD, 2004).

Doenças como influenza aviária, Newcastle e micoplasmose aviária podem ser disseminadas pelo trânsito irregular de aves e produtos avícolas, bem como suínos e seus produtos podem disseminar febre aftosa, peste suína africana e clássica, doença vesicular suína ou síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS). Ruminantes e seus produtos podem disseminar enfermidades como brucelose, listeriose e febre aftosa (HARTNETT et al., 2007; VAN DEN BERG, 2009; BROOKES et al., 2014; EIDT et al., 2015). Deste modo, o controle sanitário de fronteira é fundamental para evitar prejuízos econômicos quando da ocorrência de uma emergência sanitária em saúde animal (SWALLOW, 2012).

O vírus da febre aftosa, doença que afeta principalmente bovinos, suínos, ovinos e caprinos, foi diagnosticada no Brasil, pela última vez, nos Estados do Paraná e Mato Grosso Sul, no ano de 2006, em regiões próximas à fronteira com o Paraguai. Os focos de febre aftosa detectados na Europa na década de 90, tiveram como origens o contrabando de animais vivos procedentes de países infectados, a importação de animais com atestados falsificados e a importação ilegal de animais e carnes (EIDT et al., 2015).

Neste sentido, Hartnett et al. (2007) analisaram o risco de ingresso do vírus da febre aftosa no Reino Unido a partir da importação ilegal de carne bovina. Os autores identificaram que, anualmente, cerca de 7.431 t de carne ingressam através de bagagens de viajantes, fretes marítimos, transporte aéreo de cargas e correspondências. Desse total, estima-se que 55% tem o objetivo comercial. A quantidade de carne contaminadas com o vírus da febre aftosa que entra ilegalmente no Reino Unido a cada ano, é estimada como sendo, em média, 95 kg, com 90% de certeza que a quantidade se situa entre 30 kg e 244 kg. Isto corresponde a, em média, 0,001% do fluxo total de carne ilegalmente importada.

Brookes et al. (2014) determinaram o risco da veiculação do vírus da PRRS a partir de importação ilegal de carne suína na Austrália. Os autores verificaram que existe a possibilidade de ingresso do vírus a partir de carne importada ilegalmente e destacam a importância de estratégias de mitigação, tais como eliminação de alimentos de resíduos de tráfego internacional.

## 2.4 Perigos químicos associados à importação ilegal de alimentos

Resíduo de fármaco de uso veterinário pode ser definido como uma fração da droga, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados (BRASIL, 1999). Sua administração resulta na presença de resíduos químicos nos tecidos animais, contudo, se a administração for realizada de maneira adequada (dose, concentração, via de administração) e o período de carência for atendido, tais resíduos ficarão em concentrações abaixo do LMR (Limite Máximo de Resíduo) (REIG & TOLDRA, 2008).

Limite Máximo de Resíduo é o limite legalmente aceito para a presença do resíduo em questão no alimento, sendo este parâmetro determinado de acordo com o limite máximo aceitável de ingestão diária (FAO, 2015). A ingestão de alimentos com concentrações acima do LMR pode resultar em reações tóxicas e/ou alérgicas ou, até mesmo, induzir efeitos carcinogênicos, mutagênicos ou teratogênicos (DOYLE 2006; BEYENE et al., 2016), dependendo da droga veterinária ingerida.

Neste sentido, o MAPA criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), um programa federal de inspeção e fiscalização das cadeias produtivas de alimentos, que visa monitorar a efetividade dos controles implementados pelos sistemas de produção e a respectiva qualidade e segurança dos produtos de origem animal e vegetal disponibilizados ao comércio e ao consumo. Este monitoramento oficial é realizado por meio da verificação da presença e dos níveis de resíduos de substâncias químicas nocivas à saúde do consumidor, como produtos de uso veterinário, agrotóxicos ou afins, e de contaminantes químicos (BRASIL, 1999).

O PNCRC baseia-se em análises laboratoriais de amostras de tecidos animais e de produtos de origem animal, seguindo normativas específicas que estabelecem, para cada espécie animal, os tecidos e as respectivas quantidades a serem amostradas, além das substâncias a serem monitoradas e respectivos limites de tolerância a serem considerados. Ressalta-se que todo este monitoramento é realizado apenas nos estabelecimentos registrados pelo MAPA (BRASIL, 1999). Assim, o consumo de produtos de origem animal adquiridos de maneira informal torna-se um risco à saúde pública, pois não existe a garantia de sua inocuidade,

ficando os consumidores expostos à presença de resíduos químicos, principalmente pelos efeitos em longo prazo destes resíduos.

Os fármacos veterinários autorizados mais comumente utilizados são os antibióticos ( $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, fluoroquinolonas, sulfonamidas e macrolídeos) (OIE, 2017) e os antiparasitários (ivermectinas e benzimidazol). Para estes, as autoridades sanitárias estabelecem os LMR permitidos para cada matriz (rins, fígado, músculo, gordura, leite ou ovos) (CHOPRA & ROBERTS 2001; NAVRÁTILOVÁ et al., 2009, EUROPEAN COMMISSION, 2010; PRADO et al., 2015; BRASIL, 2017c). Algumas drogas são banidas, devido à sua insegurança na administração e aos efeitos altamente tóxicos para os seres humanos, a exemplo do cloranfenicol, proibido em diversos países devido à relação com a ocorrência de anemia aplásica e câncer, ainda que presente em baixos níveis de concentração nos alimentos (CROUBELS & DAESELEIRE, 2012; REJTHAROVÁ et al., 2017).

Cabe ressaltar que a Argentina, Uruguai e Brasil, por serem países membros do Mercado Comum do Sul (Mercosul), compartilham valores de LMR para diversos resíduos químicos (MERCOSUL, 1995), ficando a cargo de cada país instituir os programas de monitoramento, bem como a amostragem, de modo a garantir a segurança dos alimentos produzidos e comercializados no bloco.

O PNCR brasileiro analisou 25.320 amostras de produtos de origem animal no Brasil, entre 2014 e 2015, tendo encontrado 143 amostras com LMR acima do preconizado, o que representa 0,56% (BRASIL, 2015a, 2016b). Dados do controle realizado pelo *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria* (SENASA) da Argentina, em 2015, apontam que das 24.024 amostras de carne bovina, suína e aves avaliadas, 228 foram consideradas não conformes, representando 0,94% do total avaliado (ARGENTINA, 2017). No Uruguai, o Programa Nacional de Resíduos Biológicos da *Dirección General de Servicios Ganaderos* do *Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca* (MGAP) analisou 5.977 amostras de carne bovina, detectando cinco (0,08%) com LMR acima do recomendado, sendo quatro com resíduos de cádmio e uma com ivermectina (URUGUAI, 2016).

### **3 Capítulo 1 - Profile of the illegal import of products of animal origin to Brazilian cities at the border with Argentina and Uruguay**

Manuscrito aceito para publicação no periódico *Journal of Protection* (ISSN 1944-9097) - doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-123

**Título:** Profile of the illegal import of products of animal origin to Brazilian cities at the border with Argentina and Uruguay

**Autores:** Pereira, J.G.<sup>1,2,\*</sup>, Soares, V.M.<sup>2</sup>, Santos, E.A.R.<sup>2</sup>, Tadielo, L.E.<sup>2</sup>, Pellegrini, D.C.P.<sup>2</sup>, Duval, E.H.<sup>1</sup>, Silva, W.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão. Avenida Eliseu Maciel, s/n, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 96010900.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. BR 472, Km 585, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97501970.

\*Autores para correspondência:

Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul – RS, Brazil, CEP 96010-900, Phone: +55 53 32757378

Email: [julianopereira@unipampa.edu.br](mailto:julianopereira@unipampa.edu.br) (J.G. Pereira),  
[wladimir.padilha2011@gmail.com](mailto:wladimir.padilha2011@gmail.com), (W.P. Silva)



## **Abstract**

International food transit is a risk to public and animal health when not subject to legal importation sanitation procedures. Due to the extensive border area, illegal food import in Brazil is a common practice, especially in Rio Grande do Sul (RS), a State that borders with Argentina and Uruguay. The objective of this study was to evaluate the profile of Brazilians living in cities of RS that border with Argentina (BR-AR) or Uruguay (BR-UR) regarding the practice of illegal import of products of animal origin, and determine associations between the population characteristics and illegal import. A questionnaire with information related to the personal profile, habits of acquisition of imported food, and knowledge of health risks deriving from the consumption of the imported products was elaborated. The questionnaire was administered in six cities of RS (three bordering Argentina and three bordering Uruguay) and responses were obtained from 744 individuals. The variables city, gender, level of education, and knowledge were subjected to the chi-square test to verify the association between these variables and food import. Part of the interviewees admitted to illegally import products of animal origin at both BR-AR (65.17%) and BR-UR (76.28%) borders. Dairy products were the main imported goods, followed by raw and processed meat. The study revealed that illegal import is common at the frontier region of RS, especially that of products of animal origin, dairy, and raw and processed meat. Although illegal importation occurs at all the cities under study, it was higher at the BR-UR border. Also, knowledge of the health risks influences the decision to import food or not.

**Keywords:** Argentina; border; Brazil; food; illegal import; Uruguay.

### 3.1 Introduction

International food trade is essential for economy. Currently, Brazil is one of the largest producers and exporters of beef in the world (1), a position gained by rigid health controls applied from production to industrialization. The main goods imported by Brazil are fish and dairy products. The transit of food between different countries should follow strict sanitary rules to prevent the transmission of pathogens that affect public health and health status of animal herds, and introduction of new pests of the agricultural crops of the importing country (6, 7, 13).

Brazil has continental dimensions and borders (totaling 15,735 km) with 10 countries in South America. Rio Grande do Sul (RS), a Brazilian State located in the southern region, has an extensive international border with Argentina and Uruguay. In particular, RS borders with Argentina and Uruguay for approximately 724 km and 1,000 km, respectively. In these border regions, in addition to the entry of consumer electronics, perfumery products, beverages, and clothing, as it normally occurs at other borders, products of animal origin also cross, which often do not pass through any sanitary inspection.

The control of the entry of products of animal origin in Brazil is the responsibility of the Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA) through the International Agricultural Surveillance (VIGIAGRO) service, which is located in ports, airports, and border crossings and inspects baggage and vehicles with the aim of preventing the entry of irregular products (3). In 2014, the surveillance of VIGIAGRO resulted in the confiscation of more than 65 tons of animal and plant products found in personal baggage at the airports of Minas Gerais, São Paulo, and RS (4).

One factor hindering surveillance at the time of entry into Brazil is the amount of food transported, which is often small and hidden within the baggage to escape sanitary inspections. Moreover, the lack of knowledge of the population on the risks to public and animal health associated with the entry of illegal food calls for the deployment of health education programs to prevent the introduction of pathogenic agents in the Country.

Thus, the objective of this study was to evaluate the profile of Brazilians living in cities of RS that border with Argentina (BR-AR) or Uruguay (BR-UR) regarding the practice of importing food of animal origin with the goal of determining associations between population characteristics and illegal food import.

## **3.2 Material and methods**

### **3.2.1 Preparation of the questionnaire**

The questionnaire contained questions related to the social profile, illegal food import habits, and knowledge of the subject under study (Table 1, Apêndice 1). The issues addressed in the questionnaire were related to (i) (i.e., city, gender, age, occupation, level of education, and import of animal products); (ii) profile of illegal food import (i.e., food type, frequency of import, places of acquisition, reason of acquisition, hygiene of the selling establishment, and confiscation by VIGIAGRO), and (iii) knowledge (i.e., knowledge of the health risks related to illegal import, of the responsibility for surveillance, and whether respondents received information through pamphlets, newspapers, radio, or other routes). After the preparation of the questionnaire, 10 interviewers were selected and trained by the researchers responsible to ensure the correct administration of the questionnaire. A script was provided for each question to ensure standardization.

### **3.2.2 Target cities, population sample, and questionnaire administration**

Six municipalities in RS were selected, three cities at the BR-AR border Argentina (i.e., Uruguaiana, Itaqui, and São Borja) and three cities at the BR-UR border (i.e., Barra do Quaraí, Quaraí, and Santana do Livramento). The size of the sample population interviewed was based on the total population of the six cities (342,577 inhabitants) according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics

(8). Therefore, to ensure a significance level of 99% and a margin of error of 5% (StatCalc - Epi Info™ 7.1.5), 662 interviews were conducted and divided among the six cities based on their population. Thus, the minimum number of interviews to be conducted in Uruguaiana was 250, in Itaqui 75, in São Borja 122, in Barra do Quaraí 9, in Quaraí 46, and in Santana do Livramento 160. In some cities, more interviews than the minimum calculated were conducted.

The questionnaire was administered between May and September 2016. At the time of the interviews, the interviewers were positioned at points with large movement of people, such as parks, shopping centers, and bus terminals. A convenience sampling (nonprobability) was used to approach people at the points of application of the questionnaire. After the initial acceptance of the individual, the interviewer briefly summarized the objectives of the research, and the interviewee agreeing to participate signed a declaration of consent (Apêndice 2). Only Brazilians residents in the cities targeted by the study, older than 18, and consuming products of animal origin were selected.

This study was submitted to ethical assessment on the Brazil Platform of the Brazilian Ministry of Health (<http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil>), and was registered under the number CAAE 42695215.7.0000.5323 with favorable ethical opinion nº 1216314 (Apêndices 3 e 4).

### **3.2.3 Data Analysis**

The information obtained was tabulated and the results expressed in frequencies. The variables border (BR-AR or BR-UR), gender, educational level, knowledge of risks, and whether the interviewee received prior information were subjected to the chi-square test to verify the association of these variables with illegal import. The analysis was performed using the statistical program IBM® SPSS® Statistics Version 20.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3.3 Results

The results of the study, which consisted of 744 responses spread over the six cities evaluated. With regard to gender, at the BR-AR border the number of male (50.31%) and female (49.69%) respondents was comparable, whereas at the BR-UR border the number of male respondents (54.94%) was higher than that of the female respondents (45.06%). The average age was 41.30 and 39.27 at the BR-AR and BR-UR borders, respectively. In all cities, most individuals reported having jobs. Accordingly, at the BR-AR border, 25.25% reported being unemployed, 9.57% were students, and 7.94% were both students and workers. At the BR-UR border, 14.23% of the individuals were both students and workers, 13.83% reported being unemployed, and 3.95% were students. With regard to the education level, 71.92% and 84.18% of the respondents in BR-AR and in BR-UR, respectively, reported having complete or incomplete primary or secondary education. With regard to higher education, only 27.09% and 15.81% in BR-AR and in BR-UR, respectively, claimed to have a professional degree or to be enrolled in undergraduate courses (Figure 1).

A high rate of illegal food import was reported at both borders. In BR-AR, 65.17% of the respondents reported having bought or buying products in Argentina and returned the goods to Brazil illegally. At the BR-UR border, this frequency was higher (76.28%) than that at the BR-AR border.

The goods with the highest rate of acquisition were dairy products (i.e., cheese, milk jam, and cream). In particular, 84.69% (BR-AR border) and 87.05% (BR-UR border) of the people who returned with illegal products brought them in their baggage. Raw meat was the second place preference of import at both borders (65.31% at BR-AR and 51.30% at BR-UR). Processed meats, fluid milk, honey, and eggs were mentioned less frequently than dairy and raw meat products. At the BR-AR border, two individuals (0.63%) reported having entered into Brazil with capybara meat (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Figure 2).

Concerning the frequency of illegal import, at the BR-AR border, the majority of individuals (65%) stated that this practice occurs at intervals higher than 30 days, whereas the remaining imports occur monthly (23.13%) or weekly (10.94%), with 0.94% of the interviewee buying illegal products on a daily basis. On the BR-UR

border, these frequencies were different: 34.20% of the illegal import occurs monthly, 31.09% on a weekly basis, 26.42% at intervals higher than 30 days, and 8.29% daily.

When asked in what type of facilitates the illegal products were purchased, the majority of the respondents reported purchasing items in markets or grocery stores at both BR-AR (61.25%) and in BR-UR (60.62%) borders. Purchases at butcher shops were 8.44% and 9.33% at the BR-AR and BR-UR borders, respectively, whereas those who purchased products directly at the producer were 0.63% and 0.52% at the BR-AR and BR-UR borders, respectively. The remaining 29.69% and 29.53% of respondents at the BR-AR and BR-UR borders, respectively, declared to purchase products at more than one location (e.g., markets and butchers, grocers and butchers).

When questioned about the reasons for illegal import, the most frequent answers were low price and the sensorial qualities (e.g., taste, tenderness). At the BR-AR border, 41.56% of the interviewees reported that they acquired items for their lower prices, 21.56% for their sensory qualities, 34.69% for both attributes (i.e., price and quality), and 2.19% for other reasons, such as great variety of cheese, a large number of available brands, and possibility of buying wholesale. At the BR-UR border, the main reasons for buying illegal goods were quality (59.07%), followed by price and quality (23.83%), price (16.58%), and other reasons (0.52%).

When the interviewees were asked to compare the sites of acquisition in Brazil with those cited in Argentina (BR-AR), 59.06% reported that foreign facilities offer worse sanitary conditions than Brazilian establishments, 11.56% said that the Argentinian sites are cleaner, 23.75% that both feature the same sanitary level, and 5.63% could not tell. Different results were obtained at the BR-UR border, with 37.82% of the respondents having the perception that establishments in Uruguay were cleaner than those in Brazil, followed by the perception that the sites are comparable (34.20%), 22.80% reporting that Brazilian establishments are cleaner, and 5.18% could not tell.

Regarding the confiscation of products by VIGIAGRO upon returning to Brazil, 10% of the respondents traveling from Argentina had their products confiscated, while only 4.14% of the interviewees returning from Uruguay had this experience.

Figure 3 presents the questionnaire results on the level of knowledge of the respondents. At the BR-AR border, 50.31% of the interviewees reported that they know that illegal food import could pose risks to public or animal health, mentioning

“foodborne diseases”, “bacteria”, “diarrhea”, “foot-and-mouth disease”, “zoonosis”, and “brucellosis”. Also, 51.88% said they knew which federal agency should inspect the baggage, and 25.63% had already received some information on international food transit. At the BR-UR Border, 37.31% of the respondents said they knew the risks, 28.50% knew who should perform surveillance, and 26.42% received information on the topic.

Table 2 shows the results on the association between the considered variables (i.e., border, gender, education, knowledge) and illegal food import. At the BR-UR border, illegal import was significantly higher than that at the BR-AR border ( $P = 0.002$ ), i.e., at the border with Uruguay, the entry of products of animal origin is more intense than that at the border with Argentina. The variable gender was not associated with importation, both in general (BR-AR + BR-UR) and evaluating each border individually ( $P > 0.05$ ).

With regard to education, there was association between the level of education of the interviewees and illegal import. At both BR-AR and BR-UR borders, and in general, the illegal import was more frequent among individuals who have higher education degrees than in those who only primary or secondary education ( $P < 0.05$ ). Interestingly, the majority of people who declared to import food did not know whether illegal food import could carry health risks, whereas most individuals who did not import food were aware of the risks. This association was statistically significant at the BR-AR border and in the sum of the results of the two borders (general) ( $P < 0.05$ ), whereas it was not significant at the BR-UR border ( $P > 0.05$ ). There was no significant association between having received prior information on the topic and illegal food import ( $P > 0.05$ ).

### **3.4 Discussion**

The results of this study highlight the considerable sanitary problem related to the transit of products of animal origin at the borders of the State of RS. The absence of appropriate health surveillance, reflected by the high rate of illegal food import and low number of confiscations in the cities monitored, may cause risks to the population owing to the introduction of pathogens and diseases.

Several studies have analyzed confiscations at border posts or airports and pointed to the considerable risks to public and animal health related to the lack of sanitary controls on illegally imported food due to the presence of pathogens (2, 12, 14, 15).

In the United States of America (USA), several outbreaks of foodborne diseases have been related to the intake of illegally imported animal products, mainly at the border with Mexico. Between 1997 and 2007, four major outbreaks of salmonellosis were associated with the illegal intake of fresh Mexican cheese (9). During 2000 and 2001, an outbreak of listeriosis caused by the import of Mexican cheese resulted in the death of five people in North Carolina, USA (5). Outbreaks of tuberculosis and brucellosis caused by the ingestion of illegally imported products into the USA have also been reported (9). Microbiological analysis of food sequestered at the border between Tijuana (Mexico) and San Diego (USA) revealed the presence of *Salmonella* spp. spp., *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* in fresh cheese (10).

Melo et al. (12) studied confiscations carried out by health authorities in Guarulhos and Galeão (Brazil), two of the largest airports located in the States of São Paulo and Rio de Janeiro, respectively. Most of the confiscations analyzed revealed contamination with coliforms at 35°C and 45°C. The authors also detected *L. monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in dairy products and meat. *Salmonella* spp. spp. were isolated from a sample of pork sausage.

In this study, the highest frequency of illegal food import was associated with dairy products, at both BR-AR and BR-UR borders. Although the processing of milk for the production of derivatives may prevent the presence of pathogenic microorganisms, Melo et al. (11) detected the presence of *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis*, and *M. avium* in milk jams, cheese, and powdered milk sequestered at Brazilian airports. Despite the presence of these pathogens in processed products, the risk for disease outbreaks is even higher with the entry of raw products, which this study demonstrated to occur at high frequency at both BR-AR and BR-UR borders.

Residents in cities near the border with Uruguay buy illegal food much more frequently than those who live next to Argentina (76.28% BR-UR; 65.17% BR-AR). This difference can be explained by analyzing the characteristics of the two borders. Part of the BR-AR border is traced by the Uruguay River, which requires crossing



long bridges or even crossing the river with ferries. Interestingly, some of the interviewees claimed that the crossing of the river was the main obstacle toward purchasing foreign products. On the contrary, most of the border with Uruguay is represented by land, which facilitates crossing. This observation justifies the high frequency of food acquisition at the BR-UR border, with 34.20% of the respondents reporting to purchase products on a monthly basis and 31.90% on a weekly basis. Instead, at the BR-AR border, the highest frequency of illegal import was at intervals higher than 30 days (65%).

Another aspect that may justify the high import frequency at the BR-UR border compared to the BR-AR border is how health inspections are conducted, which is reflected in the number of confiscations. Only 4.14% of the interviewees have had products sequestered by the agricultural surveillance officers. At the BR-AR border this occurred at higher frequency than at the BR-UR border (10%). The geographical characteristics of the borders must be taken into account again because the presence of the river at the BR-AR border imposes a single legal route of return to Brazil, facilitating the operationalization of baggage inspections. The absence of a river at the BR-UR border allows several points of entry and exit from Brazil, which complicates the inspections by the authorities.

Illegal import frequency also reflects the unawareness of the population with respect to baggage inspection responsibilities. At the BR-AR border, over 50% of the respondents said they knew who is responsible for inspections, whereas, at the BR-UR border, this percentage was lower (28.5%). However, it is worth noting that most of the interviewees, who claimed to know the inspection agency, responded only affirmatively to this question, whereas very few (3.89%) clearly affirmed that the responsibility of baggage inspection is of VIGIAGRO/MAPA.

Interestingly, the study revealed that the level of education was associated with the illegal import practice. Contrarily to expectations, individuals with high-level education did not demonstrate being more aware of the health risks related to illegal food import than less educated individuals. In fact, the highest frequency of importation corresponds to professionals with a degree or individuals enrolled in undergraduate studies (completed or incomplete). This may be related to the purchasing power of these individuals being higher than that of less educated ones.

However, individuals who know the risks of illegal importation do not hesitate to practice the illegality, but less frequently than those who are ignorant of the risks.

Moreover, considering that only 159 individuals at the BR-AR and BR-UR borders had already received some information (e.g., pamphlets, lectures, advertisements on the radio or television) on the health risks related to illegal food import, it can be concluded that programs of awareness targeting border population could revert the current illegal food import status.

Since the data reported in this study indicate that sensorial quality and price of the imported food were the main reasons for illegal importation despite the inadequate sanitary conditions of the foreign establishments where food is sold, the need for a health education policy is urgent. In fact, it is striking that, although many interviewees at the BR-AR border recognized the hygienic deficiencies of Argentinian establishments, this did not discourage people from purchasing products of animal origin.

This study revealed that illegal importation of food, especially products of animal origin such as dairy products, and raw and processed meat, is frequent at the frontier region of RS. Although illegal importation was verified at all cities, it was higher at the BR-UR border than it was at the BR-AR border. Interestingly, knowledge of the health risks related to illegal food import influenced the decision to import food or not, thus justifying the need for improved practices of the inspection authorities, as well as the need for awareness of the border population about the risks posed to both public and animal health by the introduction of food in Brazil without due sanitary inspections.

## **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge the Universidade Federal do Pampa for the scholarship to Emanoelli dos Santos (Programa de Desenvolvimento à Pesquisa – PDA 2016) and financial support (Programa de Apoio aos Grupos de Pesquisa).

## References

1. ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. *Relatório Anual 2016*. 2016. Available at: [http://abpa-br.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)/ Accessed 20 March 2017.
2. Beutlich, J., J. A. Hammer, B. Appel, K. Nöckler, R. Helmuth, K. Jöst, M. L. Ludwig, C. Hanke, D. Bechtold, and A. Mayer-Scholl. 2015. Characterization of illegal food items and identification of foodborne pathogens brought into the European Union via two major German airports. *Int J Food Microbiol.* 209:13-19.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 36, de 10 de novembro de 2006. 2006. Manual de procedimentos operacionais da vigilância agropecuária internacional. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF.
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Apreensões de produtos em aeroportos ultrapassaram 65 t em 2014. 2015. Available at: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/02/apreensoes-de-produtos-em-aeroportos-ultrapassaram-65-toneladas-em-2014/> Accessed 20 March 2017.
5. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese - North Carolina, October 2000–January 2001. 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 50: 560–562.
6. Eidt, M. J., M. E. P. Sá, C. M. Mcmanus, and C.B. Melo. 2015. Interception of animal-origin products at land borders in Brazil. *Ciênc. anim. bras.* 16:388-398.
7. Hartnett, E., A. Adkin, M. Seaman, J. Cooper, E. Watson, H. Coburn, T. England, C. Marooney, A. Cox, and M. Wooldridge. 2007. A quantitative assessment of the risks from illegally imported meat contaminated with foot and mouth disease virus to Great Britain. *Risk Anal.* 27:187–202.
8. Joseph, R., A. Thornton, and S. H. Waterman. 2013. Crossing Borders - Unpasteurized Cheese a Public Health Challenge for Hispanic and US–Mexico Binational Communities. *Clin Infect Dis.* 57: 5-6.
9. Kinde, H., A. Mikolon, A. Rodriguez-Lainz, C. Adams, R. L. Walker, S. Cernek-Hoskins, S. Treviso, M. Ginsberg, R. Rast, B. Harris, J. B. Payeur, S. Waterman, and A. Ardans. 2007. Recovery of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* from cheese entering the United States through a noncommercial land port of entry. *J Food Prot.* 70:47-52.
10. Melo, C.B., M.E. Sá, V. M. Sabino, A. R. Souza, A. M. Oliveira, P. M. P. C. Mota, P. R. Campani, J. O. Luna, S. C. Pinto, F. F. Schwingel, C. Mcmanus,

and L. Seixas. 2014. Bacteria in dairy products in baggage of incoming travelers, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 20:1933-1934.

11. Melo, C. B., M. E. Sá, V. M. Sabino, M. F. B. Fernandes, M. T. Santiago, F. F. Schwingel, C. Freitas, C. A. Magioli, S. C. Pinto, C. Mcmanus, and L. Seixas. 2015. Microbiological detection of bacteria in animal products seized in baggage of international air passengers to Brazil. *Prev Vet Med.* 118:22–27.
12. OIE – World Organisation for Animal Health. 2016. *Terrestrial Animal Health Code.* 25th ed. World Organisation for Animal Health, Paris.
13. Oniciuc, E.A., J. Ariza-Miguel, A. S. Bolocan, M. Diez-Valcarce, J. Rovira, M. Hernández, I. Fernández-Natal, A. I. Nicolau, and D. Rodríguez-Lázaro. 2015. Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int J Food Microbiol.* 209:37–38.
14. Rodríguez-Lázaro, D., M. Diez-Valcarce, R. Montes-Briones, D. Gallego, M. Hernández, and J. Rovira. 2015. Presence of pathogenic enteric viruses in illegally imported meat and meat products to EU by international air travelers. *Int J Food Microbiol.* 209:39–43.

Table 1 - Questionnaire applied for the determination of the profile of the illegal import of products of animal origin to Brazilian cities at the border with Argentina and Uruguay

| <b>Profiles</b>                       | <b>Questions or alternatives</b>                        | <b>Possible answers</b>  |
|---------------------------------------|---|--|
| <b>Social profile</b>                 | City  | Urugaiana, Itaqui, São Borja, Barra do Quaraí, Quaraí, Santana do Livramento                   |
|                                       | Gender  | Male, Female   |
|                                       | Age (in years)  | Years  |
|                                       | Occupation  | Student, Worker, Student and worker, Unemployed  |
|                                       | Education   | Complete or incomplete primary and secondary, Complete or incomplete higher education          |
|                                       | Imports illegally                                       | Yes, No  |
| <b>Profile of illegal food import</b> | Products purchased                                      | Raw meat, Processed meat; Fluid Milk, Dairy products, Honey, Eggs, Other foods                 |
|                                       | Frequency of illegal import                             | Daily, Weekly, Monthly, > 30 days  |
|                                       | Places of acquisition                                   | Markets or grocery stores, Butcher shop, Producer  |
|                                       | Reason of purchase                                      | Price, Quality, Other reasons  |
|                                       | The sites are cleaner than those in Brazil              | Yes, No, Same  |
|                                       | Products seized by VIGIAGRO                             | Yes, No  |
| <b>Knowledge</b>                      | Know the risks associated with illegal food import?     | Yes, No, or reports of Foodborne diseases, Animal diseases, Clinical signs or symptoms, others |
|                                       | Know the Brazilian inspection agency? Name of agency ?  | Yes, No, Name of agency  |
|                                       | Received information on the topic? Type of information? | Yes, No, Type of information (TV, internet, radio, others)                                     |

Table 2 - Association between respondent characteristics and illegal food import

| Variables   | Answers            | Imports illegally |              | P value      |        |
|---|--------------------|-------------------|--------------|--------------|--------|
|   |                    | Yes (n = 513)     | No (n = 231) |              |        |
| Border  | BR-AR <sup>a</sup> | 320 (65.17%)      | 171 (34.83%) | 0.002        |        |
|   | BR-UR <sup>b</sup> | 193 (76.28%)      | 60 (23.72%)  |              |        |
| Gender  | General*           | Male              | 269 (69.69%) | 117 (30.31%) | 0.567  |
|   |                    | Female            | 244 (68.16%) | 114 (31.84%) |        |
|   | BR-AR              | Male              | 164 (66.40%) | 83 (33.60%)  | 0.758  |
|   |                    | Female            | 156 (63.93%) | 88 (36.07)   |        |
|   | BR-UR              | Male              | 105 (75.53%) | 34 (24.47%)  | 0.652  |
|   |                    | Female            | 88 (77.19%)  | 26 (22.81%)  |        |
| Education   | General            | Primary/secondary | 379 (66.37%) | 192 (33.63%) | 0.006  |
|   |                    | Higher            | 134 (77.45%) | 39 (22.55%)  |        |
|   | BR-AR              | Primary/secondary | 222 (62.01%) | 136 (37.99%) | 0.016  |
|   |                    | Higher            | 98 (73.69%)  | 35 (26.31%)  |        |
|   | BR-UR              | Primary/secondary | 157 (73.70%) | 56 (26.30%)  | 0.026  |
|   |                    | Higher            | 36 (90.0%)   | 4 (10.0%)    |        |
| Know the risks associated with illegal food import? | General            | Yes               | 238 (62.46%) | 143 (37.54%) | <0.001 |
|   |                    | No                | 275 (75.75%) | 88 (24.25%)  |        |
|   | BR-AR              | Yes               | 166 (59.28%) | 114 (40.72%) | 0.002  |
|   |                    | No                | 154 (72.98%) | 57 (27.02%)  |        |
|   | BR-UR              | Yes               | 72 (71.28%)  | 29 (28.72%)  | 0.128  |
|   |                    | No                | 121 (79.60%) | 31 (20.40%)  |        |
| Received information on the topic?                  | General            | Yes               | 114 (71.69%) | 45 (28.31%)  | 0.399  |
|   |                    | No                | 399 (68.20%) | 186 (31.80%) |        |
|   | BR-AR              | Yes               | 83 (71.55%)  | 33 (28.50%)  | 0.099  |
|   |                    | No                | 237 (63.20%) | 138 (36.80%) |        |
|   | BR-UR              | Yes               | 31 (72.10%)  | 12 (27.90%)  | 0.478  |
|   |                    | No                | 162 (77.14%) | 48 (22.86%)  |        |

<sup>a</sup> Border between Brazil and Argentina

<sup>b</sup> Border between Brazil and Uruguay

\*Refers to the sum of the data collected at the BR-AR and BR-UR borders

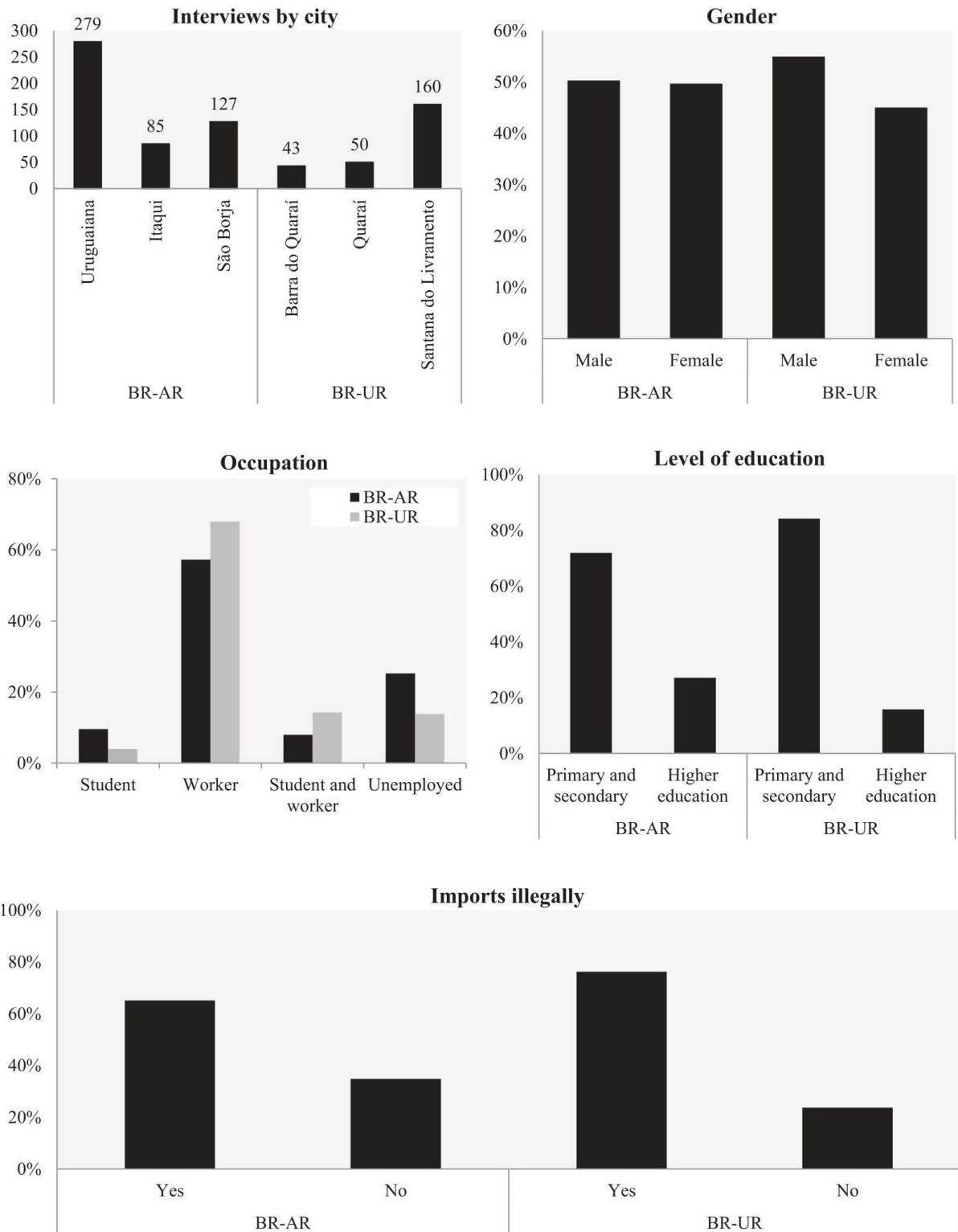


Figure 1 - Profile of the survey respondents and frequency of illegal importation of products of animal origin

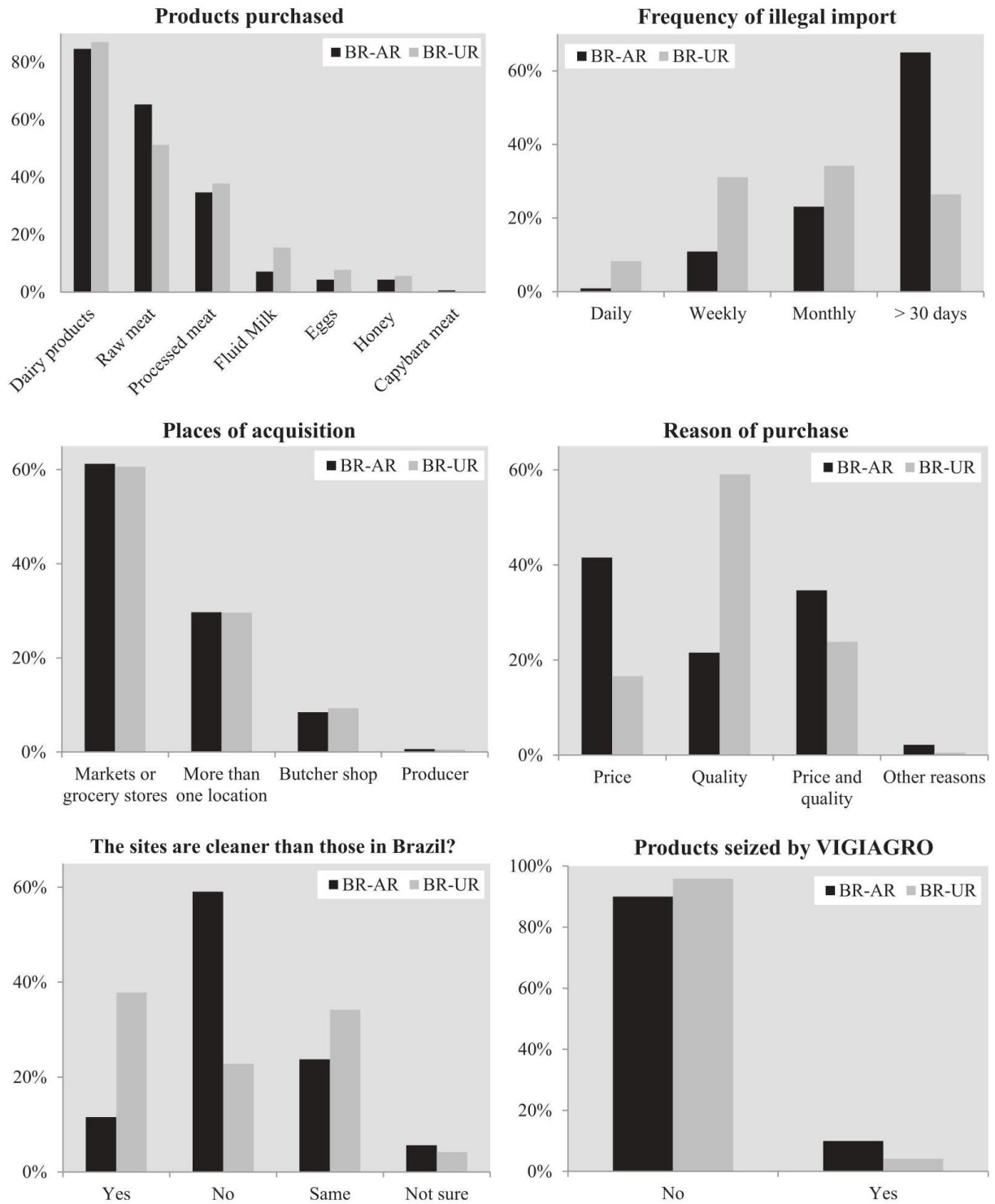


Figure 2 - Purchasing profile of products of animal origin imported illegally



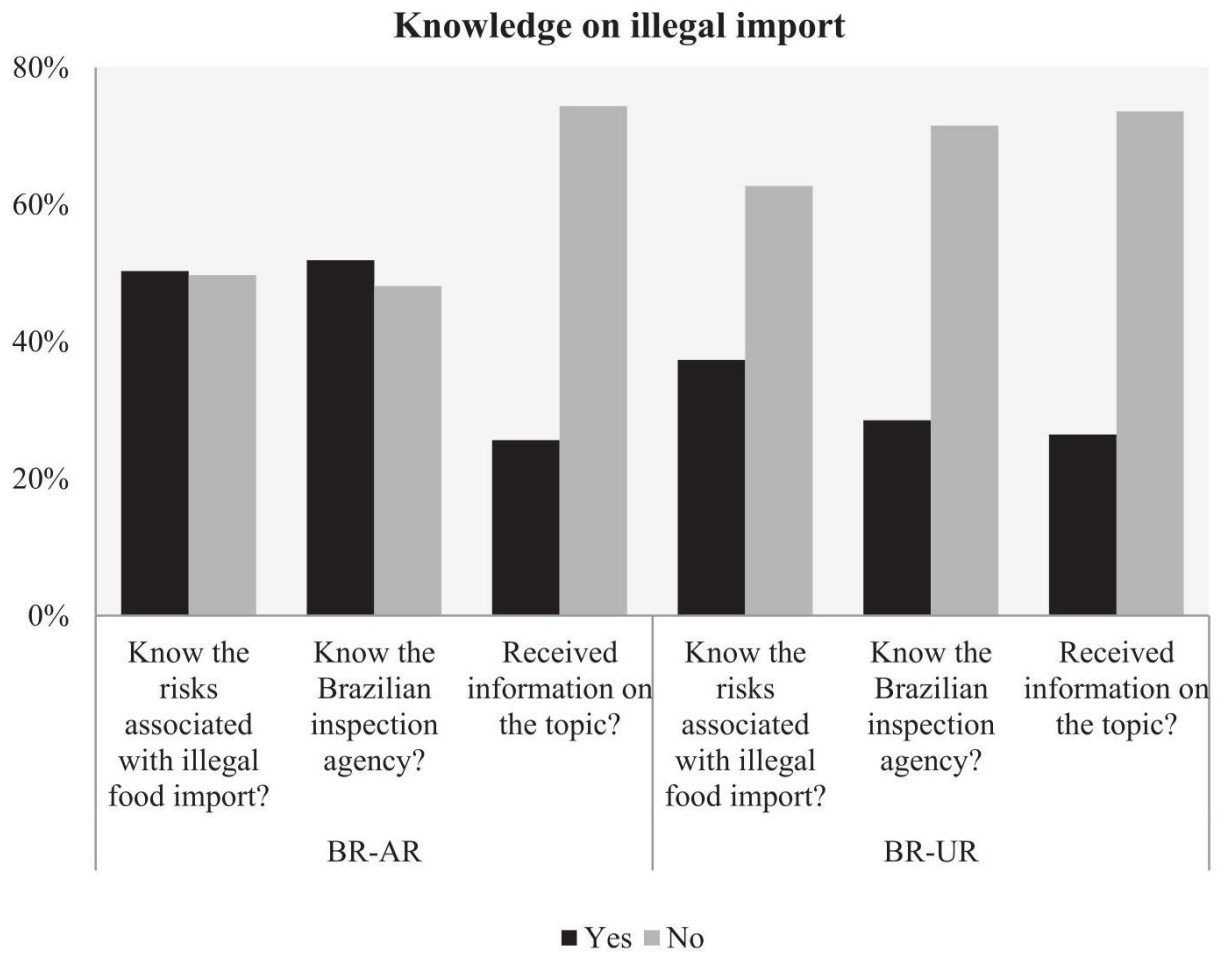


Figure 3 - Profile of the interviewees related to the knowledge on illegal import of products of animal origin

**4 Capítulo 2 – Alimentos de origem animal introduzidos no Brasil pela fronteira com Argentina e Uruguai: pesquisa de patógenos e avaliação da qualidade higiênico-sanitária**

Manuscrito a ser enviado para publicação no periódico *International Journal of Food Microbiology* (ISSN 0168-1605)

**Título:** Alimentos de origem animal introduzidos no Brasil pela fronteira com Argentina e Uruguai: pesquisa de patógenos e avaliação da qualidade higiênico-sanitária

Juliano Gonçalves Pereira<sup>a,b\*</sup>, Vanessa Mendonça Soares<sup>b</sup>, Leonardo Ereno Tadielo<sup>b</sup>, Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos<sup>b</sup>, Graciela Volz Lopes<sup>a</sup>, Débora da Cruz Payão Pellegrini<sup>b</sup>, Eduarda Hallal Duval<sup>a</sup>, Wladimir Padilha da Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão. Avenida Eliseu Maciel, s/n, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 96010900.

<sup>b</sup>Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. BR 472, Km 585, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 97501970.

\*Autores para correspondência:

Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul – RS, Brazil, CEP 96010-900, Phone: +55 53 32757378

Email: [julianopereira@unipampa.edu.br](mailto:julianopereira@unipampa.edu.br) (J.G. Pereira),  
[wladimir.padilha2011@gmail.com](mailto:wladimir.padilha2011@gmail.com), (W.P. Silva)

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade higiênico-sanitária de produtos de origem animal comercializados em região de fronteira internacional do estado Rio Grande do Sul (RS), Brasil. As amostras (n=270) foram obtidas junto ao serviço de Vigilância Agropecuária Internacional do Brasil e em estabelecimentos comerciais das cidades de Paso de Los Libres (Argentina) e Rivera (Uruguai), municípios que fazem fronteira com o Brasil no estado do RS. Dentre essas, 150 foram obtidas da Argentina (75 amostras de carne *in natura* e 75 amostras de laticínios e carnes processadas) e 120 do Uruguai (60 de carnes *in natura* e 60 de laticínios e de carnes processadas). As amostras foram submetidas à enumeração de mesófilos aeróbios, enterobactérias e *Staphylococcus* coagulase positiva e à pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, nos quais também se investigou a presença de importantes genes de virulência de *Salmonella* spp. (*hilA*, *invA*, *spvC*, *pefA* e *sefA*), *L. monocytogenes* (*prs*, *inlA*, *inlC* e *inlJ*) e *E. coli* (*uspA*, *eae*, *rfb*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, *stx1*, *stx2* e *hlyA*). Com relação aos micro-organismos indicadores, os produtos *in natura* apresentaram maiores contagens quando comparados aos produtos processados, proveniente da Argentina, quanto do Uruguai (P < 0,05). Não houve diferença significativa nas contagens médias de enterobactérias e mesófilos aeróbios entre os produtos *in natura* e processados da Argentina quando comparados aos do Uruguai (P > 0,05). *Escherichia coli* O157:H7 não foi detectada nos produtos avaliados. Já *Salmonella* spp. foi detectada em seis (8%) produtos *in natura* (carne de frango n=5; e carne suína n=1) da Argentina, não sendo isolada em produtos processados. Nenhuma amostra proveniente do Uruguai apresentou contaminação por esse micro-organismo. *Listeria monocytogenes* foi isolada em cinco (6,66%) produtos *in natura* provenientes da Argentina (carne suína n=4; carne bovina n=1) e 20 (16,66%) produtos *in natura* do Uruguai (carne bovina n=8; carne suína n=6; carne de frango n=6), não sendo encontrada em produtos processados de amostras oriundas de ambos os países. Houve associação entre a presença dos patógenos e carnes *in natura* (P < 0,05) bem como entre a presença de *Salmonella* spp. nestes produtos procedentes da Argentina e de *L. monocytogenes* em produtos do Uruguai (P < 0,05). Todos os 52 isolados com características típicas de *E. coli* portavam o gene *uspA* e apenas um dos isolados carregava o gene *eae*. Os genes *rfb*<sub>O157</sub>, *fliC*<sub>H7</sub>, *stx1*, *stx2* e *hlyA* não foram detectados. Todos os isolados de *Salmonella* spp. portavam os genes *hilA* e *invA*, porém, nenhum apresentou os genes *spvC*, *pefA* e *sefA*. Os isolados de *L. monocytogenes*, carregavam o gene *prs*, entretanto, os genes *inlA*, *inlC* e *inlJ* foram encontrados em 20% dos isolados provenientes da Argentina e 95% do Uruguai. Este estudo descreve os primeiros dados microbiológicos obtidos em região de fronteira seca no Brasil. Apesar de não ter sido detectada *E. coli* O157:H7, os produtos analisados podem veicular *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, indicando um grave problema para a saúde pública na região denotando a necessidade de uma maior vigilância, de modo a reduzir os riscos da introdução de patógenos de origem alimentar no Brasil.

**Palavras-chave:** alimentos; contaminação; fronteira, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7

## 4.1 Introdução

A globalização do comércio de produtos de origem animal e o aumento do número de viagens internacionais, embora apresentem muitos benefícios e oportunidades, oferecem riscos à saúde pública e animal (Käferstein et al., 1997). Alimentos transportados por passageiros em viagens internacionais, ou comercializados de maneira ilegal em região de fronteira, podem servir como fontes de contaminação por patógenos, elevando os riscos de doenças transmitidas por alimentos, ou como veículos de introdução de agentes em países considerados livres desses micro-organismos (Huestonet al., 2011; Swallow, 2012). Desta forma, medidas sanitárias são importantes para controlar o trânsito de alimentos entre países, evitando prejuízos para a saúde pública e animal.

Devido à sua extensa área fronteira (15.735 km), o Brasil possui um grande aparato de fiscalização sanitária internacional. O controle do trânsito de alimentos e animais nestas regiões é realizado pela VIGIAGRO (Vigilância Agropecuária Internacional), órgão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que opera em mais de 100 unidades localizadas em portos, aeroportos e postos de fronteira, realizando exames de animais vivos, inspeção de produtos de origem animal e averiguação de bagagens de passageiros (Brasil, 2006a).

O Rio Grande do Sul (RS), estado brasileiro situado na região sul do país, possui uma ampla faixa territorial em região de fronteira, sendo 720 km com a Argentina e 1.000 Km com o Uruguai. A entrada de produtos de origem animal industrializados está liberada nas fronteiras brasileiras desde que sejam respeitadas algumas condições, como o tipo de produto (somente processados), quantidade por passageiro e inviolabilidade da embalagem primária (Brasil, 2016). Porém, em alguns países, muito tem se discutido sobre o risco da veiculação de patógenos associados ao trânsito de alimentos nas fronteiras, mesmo quando a liberação é referente à circulação de produtos considerados “não presumíveis veiculadores de doenças contagiosas” (Hueston et al., 2011; Noordhuizen et al., 2013).

Independente da liberação ou não, a fiscalização sanitária nas fronteiras deve ser rigorosa, garantindo que alimentos potencialmente veiculadores de patógenos

não sejam introduzidos no país. Contudo, mesmo com a atuação dos órgãos de fiscalização sanitária, a importação ilegal de produtos de origem animal é uma prática comum em muitas regiões do Brasil, seja em fronteiras terrestres (Pereira et al., 2017) ou aeroportos (Melo et al., 2014, 2015). Especificamente na região de fronteira do RS, estima-se que mais de 60% dos passageiros que viajam para Argentina ou Uruguai retornam ao Brasil portando algum produto de origem animal (*in natura* ou processado) e que menos de 10% destes viajantes já passaram, em algum momento, pela fiscalização de bagagem no retorno ao Brasil (Pereira et al., 2017).

Esta entrada de produtos de origem animal sem qualquer fiscalização é preocupante sob o ponto de vista de saúde pública, pois não há garantia de que os alimentos estejam em condições de consumo. Dessa forma, podem veicular patógenos, já que não há certeza sobre a sua procedência, local e forma de abate, tipo de industrialização e atendimento aos requisitos sanitários internacionais, visto que não passaram por algum tipo de fiscalização sanitária oficial, a qual garante a segurança dos produtos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade higiênico-sanitária por meio da contagem de micro-organismos indicadores de contaminação e da presença e identificação molecular de patógenos (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7) em produtos de origem animal *in natura* e processados comercializados em região de fronteira internacional do estado do RS, Brasil.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Coleta das amostras**

A obtenção das amostras foi realizada entre setembro de 2015 e novembro de 2016, avaliando-se 270 produtos de origem animal (produtos *in natura*, carnes processadas e produtos lácteos), sendo 150 oriundas da Argentina e 120 do Uruguai (Tabela 1).

Em parceria com a VIGIAGRO, Unidade de Uruguaiana (RS), foram coletadas amostras de produtos de origem animal apreendidas durante a fiscalização de bagagens na Ponte Internacional Getúlio Vargas - Agustín Pedro Justo (29°45'18"S, 57°05'16"O), que liga as cidades de Uruguaiana (Brasil) e Paso de Los Libres (Argentina). Destas amostras, nove foram de carne bovina e uma de carne de caça (*Hydrochoerus hydrochaeris* - capivara), transportadas por viajantes que entrariam no Brasil.

Além de amostras apreendidas, foram realizadas amostragens em estabelecimentos situados em duas cidades que fazem fronteira com o Brasil, Paso de Los Libres (Argentina, 29°43'00"S, 57°05'00"O) e Rivera (Uruguai, 30°54'09"S, 55°33'02"O), mediante autorização prévia da VIGIAGRO. Os produtos foram adquiridos em 16 estabelecimentos comerciais (supermercados, mercearias e açougues), sendo oito em cada cidade e em três momentos distintos com intervalo médio de um mês entre cada momento.

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos identificados, transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e, na chegada ao laboratório, foram mantidas a 4 °C até o momento das análises microbiológicas.

#### **4.2.2 Análises microbiológicas e moleculares**

##### **4.2.2.1 Enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios, enterobactérias e *Staphylococcus coagulase positiva***

O preparo, pesagem e diluição das amostras seguiu o preconizado pela legislação brasileira (Brasil, 2003). Após as diluições decimais seriadas em solução salina 0,9%, alíquotas de 1 mL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Padrão para Contagem (PCA) para as contagens de mesófilos aeróbios, e ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBGA), para contagens de enterobactérias. As contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* foram realizadas após semeadura de 0,1 mL em placas com ágar Baird Parker (BP). As leituras foram realizadas após a incubação a 36°C/24 h (VRBGA) e 48 h (PCA e BP). A confirmação das colônias

de *S. aureus* coagulase positiva foi realizada pelo teste da coagulase. Os resultados foram expressos em log UFC.g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2.2 Detecção de *Salmonella* spp.

A detecção de *Salmonella* spp. seguiu o protocolo preconizado por Andrews et al. (2016) com modificações. Após a pesagem de 25 g ou mL de cada amostra em saco plástico esterilizado, foram adicionados 225 mL de água peptonada tamponada a 1% (APT) e incubou-se a 35 °C/24 h. Da mistura pré-enriquecida, foram transferidos, 0,1 mL e 1 mL para tubos contendo 10 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e 10 mL do caldo Tetrathionato (TT), respectivamente. Os caldos RV e TT foram incubados 42 °C/24 h e, após esse período, foram semeados em placas contendo ágar Bismuto Sulfito (BS) e Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), incubando-se a 35 °C/24 h. As colônias que apresentaram característica típica foram submetidas a testes bioquímicos (lisina, H<sub>2</sub>S, urease, indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato) e sorológicos (soro polivalente anti-*Salmonella* spp.) para a confirmação.

Isolados confirmados fenotipicamente como *Salmonella* spp., foram submetidos à PCR para a pesquisa do gene comum à espécie (*hilA*) e genes relacionados à invasão (*invA*), infecção sistêmica (*spvC*), adesão (*pefA*) e produção de fímbrias (*sefA*). A extração do DNA bacteriano foi realizada pelo método de pérolas de vidro (Green e Sambrook, 2012) e os *primers* e condições da PCR, de acordo com Fernandes et al. (2017) (Apêndice 6). Para as reações, foram utilizados 12,5 µL de 2x GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix, 1 µL de cada *primer* (*reverse* e *forward* - 10 pmol/µL), 2 µL de DNA (5 ng/µL) e 8,5 µL de água ultrapura. A reação foi realizada em termociclador (Life Express) e os produtos da PCR submetidos à eletroforese a 80V por 70 min em gel de agarose 1,5%. Os produtos amplificados foram corados com GelRed<sup>™</sup> e visualizados sob luz UV em transiluminador Loccus L-PIX Touch (Apêndice 7).



#### 4.2.2.3 Detecção de *L. monocytogenes*

A identificação de *L. monocytogenes* foi realizada segundo Pagotto et al. (2001). Após a pesagem de 25 g ou mL da amostra, foram adicionados 225 mL de caldo Base de Enriquecimento para *Listeria* (LEB), incubando-se a 30 °C/48 h. Decorrido este período, uma alíquota de 0,1 mL do LEB foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser, o qual foi incubado a 35 °C/48 h. A seguir, foi realizada a semeadura em placas contendo os ágares Palcam e Oxford, incubando-se a 35 °C/24-48 horas. Entre três e cinco colônias características, de ambos os meios de cultura, foram semeadas em ágar Soja Trypticase com 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 30 °C/24-48 h, para verificação de pureza. Os isolados purificados foram submetidos às provas de catalase, fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, ramnose e manitol) e produção de  $\beta$ -hemólise.

Isolados identificados fenotipicamente como *L. monocytogenes* foram submetidos à pesquisa dos genes comum ao gênero (*prs*) e genes que codificam internalinas responsáveis pela invasão e internalização (*inIA*, *inIC* e *inIJ*). A extração do DNA, volumes de reagentes, condições de corrida de eletroforese e visualização do produto da PCR foram idênticas as descritas anteriormente. Os *primers* e condições da PCR foram baseados nos protocolos descritos por Doumith et al. (2004) e Liu et al. (2007) (Apêndices 6 e 8).

#### 4.2.2.4 Detecção de *E. coli* O157:H7

A pesquisa de *E. coli* O157:H7 seguiu o preconizado por Feng et al. (2016), com modificações. Foram adicionados 25 g ou mL da amostra em sacos plásticos contendo 225 mL de caldo Trypticase de Soja modificado (mTSB,) contendo novobiocina (20 mg.L<sup>-1</sup>) e incubados a 41,5 °C/24 h. Após a incubação e diluição do caldo mTSB em *Butterfield's Phosphate Buffer*, alíquotas de 0,05 mL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey Sorbitol contendo telurito (2,5 mg.L<sup>-1</sup>) e cefixima mg/L (0,05 mg.L<sup>-1</sup>) (TC-SMAC) e CHROMagar™ O157,

também com telurito e cefixima. As placas foram incubadas a 37 °C/24 h. Colônias típicas e atípicas de *E. coli* O157:H7 foram selecionadas para a confirmação molecular.

A confirmação molecular da espécie *E. coli* foi realizada pela pesquisa do gene *uspA*, sendo que os *primers* e condições de PCR foram descritos por Chen e Griffiths (1998) (Apêndice 6). A confirmação do sorotipo O157:H7 foi realizada pela pesquisa dos genes *rfb*<sub>O157</sub> e *fliC*<sub>H7</sub> (Morin et al., 2004) e dos genes de virulência *stx1*, *stx2*, *eae* e *hlyA*, de acordo com Paton e Paton (1998). A extração do DNA, volumes de reagentes, condições de corrida de eletroforese e visualização do produto da PCR foram semelhantes ao descrito anteriormente (Apêndice 9).

#### 4.2.3 Análise dos dados

As contagens bacterianas foram convertidas em log UFC.g<sup>-1</sup> ou UFC.mL<sup>-1</sup> e submetidas ao teste de Mann-Whitney para verificar a existência de diferença estatística entre os produtos analisados e suas procedências (Argentina ou Uruguai). Os resultados da identificação de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foram expressos em frequências e submetidos ao teste do Qui-quadrado para verificação de associações entre a presença do patógeno com os produtos analisados. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico IBM® SPSS® Statistics Version 20, usando nível de significância de 0,05.

#### 4.3 Resultados

As contagens de mesófilos aeróbios e de enterobactérias foram significativamente superiores nos produtos *in natura* quando comparados com os processados, tanto nas amostras obtidas da Argentina quanto naquelas do Uruguai (P < 0,05) (Tabela 2). Não houve diferença estatística significativa nas contagens de mesófilos e de enterobactérias para produtos *in natura* coletados na Argentina quando comparados aos coletados no Uruguai, assim como para os processados (P

> 0,05). Nenhum dos produtos avaliados apresentou contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Entre os produtos oriundos da Argentina, o que apresentou maior contagem de mesófilos aeróbios foi a carne de caça (7,98 log UFC.g<sup>-1</sup>), contudo, devido a ser uma única amostra, não foi realizada a comparação estatística. Das carnes *in natura* analisadas, a suína foi a que apresentou maiores contagens médias de microorganismos mesófilos (7,07 log UFC.g<sup>-1</sup>) e enterobactérias (5,77 log UFC.g<sup>-1</sup>), contudo, a média foi estatisticamente significativa apenas quando comparada com a carne de frango (P < 0,05) que, por sua vez, apresentou a menor contagem média de mesófilos (6,13 log UFC.g<sup>-1</sup>) e enterobactérias (4,86 log UFC.g<sup>-1</sup>). Não houve diferença significativa nas médias das contagens entre a carne bovina e a carne suína e de frango (P > 0,05). Todos os tipos de carne apresentaram contagem de mesófilos e enterobactérias significativamente superiores as contagens dos laticínios e embutidos (P < 0,05). As contagens de mesófilos e de enterobactérias nas amostras de laticínios e carnes processadas não apresentaram diferença estatística entre si (P > 0,05).

As contagens de mesófilos e de enterobactérias das carnes *in natura* oriundas do Uruguai não apresentaram diferença estatística significativa entre si (P > 0,05), contudo, quando comparadas com os laticínios e carnes processadas, as contagens foram significativamente superiores (P < 0,05). Não houve diferença entre as contagens dos laticínios e embutidos (P > 0,05). Avaliando o mesmo tipo de produto de acordo com a procedência (Argentina vs. Uruguai), não houve diferença nas médias de contagens, tanto de mesófilos quanto de enterobactérias (P > 0,05).

*Salmonella* spp. foi detectada em seis amostras de produtos coletados na Argentina, porém, nenhuma amostra coletada no Uruguai apresentou o patógeno. *Listeria monocytogenes* foi detectada em 25 produtos, sendo cinco da Argentina e 20 do Uruguai (Tabela 3). *Escherichia coli* O157:H7 não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Nos produtos apreendidos pela VIGIAGRO não foram detectados os patógenos pesquisados.

Houve associação significativa entre a presença de *Salmonella* spp. nos produtos *in natura* provenientes da Argentina, quando comparados com os processados (P < 0,05). Além disso, a presença do patógeno apresentou associação com produtos *in natura* oriundos da Argentina quando comparados com aqueles do Uruguai (P < 0,05). A carne de frango foi a que apresentou maior frequência de

amostras positivas para *Salmonella* spp. dentre os produtos provenientes da Argentina (26,31%)( $P < 0,05$ ), seguido por carne suína (6,66%). Houve associação entre a presença deste patógeno na carne de frango oriunda da Argentina quando comparada com as do Uruguai ( $P < 0,05$ ). Para a carne suína, a associação não foi significativa ( $P > 0,05$ ).

Foi observada associação significativa entre produtos *in natura* e a presença de *L. monocytogenes*, tanto nos produtos provenientes da Argentina, quanto do Uruguai ( $P < 0,05$ ). Quando comparadas as frequências obtidas nos produtos *in natura* de cada país, observou-se associação significativa naqueles oriundos do Uruguai ( $P < 0,05$ ). Entre os produtos provenientes da Argentina, o que apresentou maior frequência do patógeno foi a carne suína (26,66%)( $P < 0,05$ ). Nas amostras do Uruguai, a maior frequência ocorreu na carne de frango (50%), seguida por carne suína (30%) e bovina (28,57%)( $P < 0,05$ ).

Comparando-se o mesmo produto de acordo com a origem, houve associação entre a presença de *L. monocytogenes* na carne de frango e bovina oriundas do Uruguai, quando comparadas com aquelas obtidas da Argentina ( $P < 0,05$ ). Não houve associação entre a presença de *L. monocytogenes* na carne suína e a procedência ( $P > 0,05$ ).

Seis isolados de *Salmonella* spp. foram obtidos de amostras provenientes da Argentina, e todos portavam os genes *hilA* e *invA*. Os demais genes pesquisados (*spvC*, *pefA* e *sefA*) não foram detectados (Tabela 4). Com relação aos isolados de *L. monocytogenes*, todos apresentavam o gene *prs*. Nos cinco isolados identificados em produtos provenientes da Argentina, um carregava os genes *inIA*, *inIC* e *inIJ* simultaneamente, três portavam os genes *inIA* e *inIJ* e, um, carregava os genes *inIA* e *inIC*. Já nas amostras provenientes do Uruguai, entre os 20 isolados de *L. monocytogenes* identificados, 19 portavam os genes *inIA*, *inIC* e *inIJ* e um, os genes *inIA* e *inIJ*.

Foram obtidos 52 isolados de *E. coli*, sendo 37 identificados em produtos da Argentina e 15 em produtos do Uruguai. Todos os isolados foram confirmados através da identificação do gene *uspA*. Os demais genes utilizados para a confirmação do sorotipo O157:H7 (*rfb<sub>O157</sub>* e *fliC<sub>H7</sub>*), bem como os genes de virulência *stx1*, *stx2* e *hlyA*, não foram detectados. Apenas um dos isolados carregava o gene *eae*.

#### 4.4 Discussão

As contagens elevadas de micro-organismos mesófilos aeróbios e de enterobactérias, tanto nos produtos *in natura* quanto nos processados, indicam deficiências durante os processos de obtenção, manipulação ou comercialização dos produtos. Estas deficiências higiênicas também foram apontadas por consumidores que adquirem produtos de origem animal nas regiões de fronteira do Brasil com Argentina e Uruguai e os transportam de maneira ilegal para o Brasil, em estudo realizado na região da fronteira do RS com a Argentina e com o Uruguai (Pereira et al., 2017).

As contagens de micro-organismos indicadores foram menores nos produtos processados do que nos produtos *in natura*, além disso, é de se destacar que estes produtos não apresentaram patógenos. No ano de 2016, o MAPA autorizou a entrada de produtos processados importados no Brasil, desde que em quantidade que caracterize consumo próprio (Brasil, 2016).

Na Europa, o livre trânsito de alguns alimentos entre os países que compõe o bloco da União Europeia tem levantado dúvidas com relação à segurança pública, uma vez que a disseminação de patógenos entre os países é comumente relatada por alguns estudos (Beutlich et al., 2015; Schoder et al., 2015). Autores que defendem a restrição de trânsito citam que as deficiências na fiscalização sanitária nos pontos de ingresso de viajantes são comuns e podem comprometer o *status* sanitário do país que permite o ingresso de alimentos (Noordhuizen et al., 2013). No Brasil, órgãos de auditoria governamental já apontaram deficiências no sistema de vigilância de fronteiras (Brasil, 2006b), fato que dificulta a averiguação de 100% das bagagens e carros de viajantes.

A não detecção de *E. coli* O157:H7 deve ser avaliada com muito cuidado, uma vez que a Argentina é um país onde a incidência de Síndrome Hemolítica-Urêmica (SUH) chega a ser 10 vezes maior que do em outros países industrializados (13,9 casos / 100.000 crianças menores que 5 anos), diferindo da dinâmica epidemiológica observada em outros países (Leotta et al., 2008). Jure et al. (2015) isolaram *E. coli* O157:H7 em 3,1% das amostras de carne moída bovina e embutidos coletadas em diversas cidades da Argentina. Na cidade de Berisso, Argentina, Brusa et al. (2013) detectaram o patógeno em 25,5% e 4,4% de amostras de carne bovina

moída e ambiente de processamento de carne (facas, mesas e moedores), respectivamente. Um dos isolados de *E. coli* obtidos neste estudo portava o gene *eae*, codificador da intimina, um fator de virulência que auxilia na adesão intestinal das *E. coli* enteropatogênicas (Ayaz et al., 2014).

*Salmonella* spp. foi mais frequente nos produtos *in natura* oriundos da Argentina, enquanto *L. monocytogenes* foi mais relacionada aos produtos uruguaios ( $P < 0,05$ ). A presença destes patógenos nestes alimentos demonstra a necessidade de uma maior vigilância na região, uma vez que os produtos *in natura* podem carrear patógenos e afetar a saúde da população residente nas cidades brasileiras de fronteira. O fato de não ter sido isolado patógenos em produtos industrializados demonstra que estes apresentam segurança microbiológica quando comparado com os produtos *in natura*. Contudo, alguns autores já detectaram patógenos de importância em saúde pública (*Brucella* e *Mycobacterium*) em queijos e doce de leite importados ilegalmente para o Brasil (Melo et al., 2014).

Os genes virulência *spvC*, *pefA* e *sefA* não foram detectados nos isolados de *Salmonella* spp. testados. Os genes *hilA* e *invA* são responsáveis pela expressão de componente iniciais de invasão às células do hospedeiro e, portanto, determinantes na virulência das estirpes. Os demais genes aumentam a taxa de multiplicação do patógeno, aumentando a severidade da doença (gene *spvC*) ou aumentando a taxa de adesão (*pefA* e *sefA*), não sendo descritos como imprescindíveis para infecção. Desta forma, mesmo com a ausência destes genes, os isolados podem causar salmonelose em humanos (Castilla et al., 2006).

Todos os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram os genes *prs* e *inIA*, os quais são utilizados como marcadores espécie-específicos. Entre os cinco isolados provenientes de produtos argentinos, apenas em um houve a presença simultânea dos três genes que codificam as internalinas (*inIA*, *inIC* e *inIJ*). Já entre os 20 isolados provenientes de produtos uruguaios, 19 apresentaram essa característica genética. A presença simultânea destes genes é importante para determinar a virulência ou não das estirpes de *L. monocytogenes*, sendo que aquelas que não possuem esta combinação podem não ser capazes de iniciar um processo infeccioso (Liu et al., 2007; Sant' Ana et al., 2012). Desta forma, mesmo havendo a presença do patógeno nos produtos argentinos, pode-se concluir que 80% (4/5) são consideradas avirulentos, enquanto que entre os isolados provenientes de produtos do Uruguai apenas um (1/20; 5%) não teria a capacidade de causar listeriose.

A presença de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em alimentos provenientes de diversos estabelecimentos e em dias de amostragem diferentes demonstram níveis de contaminação preocupantes, tanto em estabelecimentos na Argentina quanto no Uruguai. Além disso, alguns estabelecimentos apresentaram muitas amostras positivas num mesmo dia de coleta, demonstrando falhas no processo de higienização do ambiente, utensílios e equipamentos de processamento e manipulação de carnes, permitindo a persistência de patógenos nestes locais e promovendo a contaminação cruzada entre os produtos de diferentes origens. *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* são, reconhecidamente, bactérias formadoras de biofilme, podendo permanecer viáveis por longos períodos em superfícies de contato com alimentos, quando os procedimentos de higienização são deficitários (Wanget al., 2013; da Silva Fernandes et al., 2015).

Os patógenos encontrados nas amostras avaliadas neste estudo são comumente detectados em estudos realizados em ambos os países. *Salmonella* spp. é reconhecida mundialmente como o principal patógeno alimentar e os principais produtos relacionados à sua presença são os de origem avícola. Em algumas regiões da Argentina, a prevalência média de *Salmonella* spp. em frangos fica em torno dos 25%, contudo, em algumas propriedades este valor se aproxima de 70% (Xavier et al., 2011). Em suínos, a prevalência na Argentina pode variar de 24,1% a 45% (Ibar et al., 2009). Apesar de não termos detectado a presença dessa bactéria em produtos obtidos do Uruguai, *Salmonella* spp. é reconhecido como um importante patógeno neste país (Betancor, 2010). *Listeria monocytogenes* também é um patógeno que tem sido isolado em produtos na Argentina (Pelliceret al., 2002; Callejo et al., 2008). No Uruguai, o patógeno já foi isolado em embutidos e queijos, e causou a morte de quatro pessoas em 2016, o que levou as autoridades sanitárias a lançarem alertas para a população de modo a evitar o consumo de alimentos *in natura* ou mal cozidos, produtos sem tratamento térmico (sucos e leites) e produtos sem origem conhecida (El País, 2016).

O trânsito de alimentos entre os países vem despertando a atenção de pesquisadores. Contudo, devido à crescente movimentação de passageiros, estudos para monitorar as características destes alimentos foram observados de maneira mais significativa apenas na última década, tendo como foco principal alimentos apreendidos em aeroportos.

No Brasil, Melo et al. (2015) avaliaram apreensões da VIGIAGRO em Guarulhos e Galeão, dois dos maiores aeroportos brasileiros. A maioria das apreensões analisadas apresentou contaminação por coliformes a 35 °C e a 45 °C. Os autores também detectaram *L. monocytogenes* e *S. aureus* em produtos lácteos e carnes bovina, suína e ovina e *Salmonella* spp. em uma amostra de linguiça suína. Beutlich et al. (2015) avaliaram apreensões em dois grandes aeroportos na Alemanha, relatando que o maior número de apreensões foi de produtos lácteos, seguidos de carne *in natura* e produtos cárneos processados. Os autores relataram, também, que 5% destes produtos apresentavam micro-organismos patogênicos (*Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *Yersinia* spp., *E. coli*, *Brucella* spp.), sendo que os produtos com maior contaminação eram as carnes *in natura*, seguidas dos produtos cárneos e laticínios. Rodríguez-Lázaro et al. (2015) avaliaram 200 amostras de alimentos no aeroporto de Bilbao, na Espanha, e detectaram *L. monocytogenes* (10%) e *Salmonella* spp. (5,5%) em produtos oriundos de diversos países, na sua maioria provenientes da América do Sul. Schoder et al. (2015) avaliaram 600 amostras de produtos de origem animal apreendidos pelo serviço veterinário no Aeroporto de Viena, na Áustria, e alguns produtos apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. spp. e *E. coli* produtora de shiga toxina (STEC), sendo os produtos derivados da carne os que apresentaram maior número de amostras contaminadas.

Em regiões de fronteira seca, estudos foram conduzidos nos EUA, onde diversos surtos de DTA foram relacionados com a ingestão de produtos de origem animal importados ilegalmente do México. Entre 1997 e 2007, quatro grandes surtos de salmonelose ocorreram devido à ingestão de queijo fresco tipo mexicano, que ingressaram ilegalmente via fronteira (Joseph et al., 2013). Dados do Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet 2004-2009), apontam que surtos de listeriose em mulheres grávidas é muito mais frequente naquelas com origem hispânica, devido ao fato destas relatarem o consumo frequente de queijo fresco importado ilegalmente do México (Silk et al., 2012). Entre 2000 e 2001, um surto de listeriose causado pela ingestão desse tipo de queijo resultou na morte de cinco pessoas na Carolina do Norte, EUA (CDC, 2001). Surtos de tuberculose e brucelose envolvendo a ingestão de produtos ilegalmente importados para os EUA também já foram relatados (Joseph et al., 2013). Análises microbiológicas de alimentos apreendidos na fronteira entre Tijuana (México) e San Diego (EUA), verificaram a



presença de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *Mycobacterium bovis* em queijos frescos (Kinde et al., 2007).

Foi possível coletar junto à VIGIAGRO uma amostra de carne de caça (capivara), na qual não havia a presença dos patógenos avaliados. O risco da introdução de carnes de caça em um país se deve ao fato de que estas, na maioria das vezes, são obtidas de abates clandestinos, onde toda a manipulação ocorre de maneira incorreta, o que pode permitir a contaminação da carcaça e a veiculação de patógenos. *Listeria monocytogenes* já foi detectada em carnes de caça apreendidas no Aeroporto Charles de Gaulle, Paris, França (Chaber e Cunningham, 2016). Há de se considerar outros patógenos de importância para saúde pública que são exóticos no Brasil, porém, são endêmicos e causam surtos em algumas regiões da Argentina, como *Trichinella spiralis* (Cohen et al., 2010; Calcagno et al., 2014).

Os resultados deste estudo demonstram a necessidade de um controle rígido no trânsito de viajantes na região estudada, uma vez que os alimentos que circulam nesta região são potencialmente veiculadores de patógenos, sobretudo os produtos *in natura*. O fato da fiscalização de fronteira brasileira atuar de maneira não rígida, como já descrito (Pereira et al., 2017), expõe o país à outra situação sanitária crítica, que é a possibilidade da introdução de agentes patogênicos de importância para a saúde animal. Doenças como influenza aviária, Newcastle e micoplasmose aviária podem ser disseminadas pelo trânsito irregular de aves e produtos avícolas, bem como suínos e seus produtos podem disseminar febre aftosa, peste suína africana e clássica, doença vesicular suína ou síndrome reprodutiva e respiratória suína. Ruminantes e seus produtos podem disseminar enfermidades como brucelose, listeriose e febre aftosa (Hartnett et al., 2007; van den Berg, 2009; Brookes et al., 2014; Eidt et al., 2015). Deste modo, o controle sanitário de fronteira entre países é fundamental para evitar grandes prejuízos econômicos quando da ocorrência de uma emergência sanitária em saúde animal (Swallow, 2012).

Pelo nosso conhecimento, os dados obtidos neste estudo descrevem o primeiro estudo microbiológico realizado em alimentos procedentes de região de fronteira seca no Brasil e a relação dos produtos de origem animal que circulam nestas áreas com a presença de patógenos como *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. Apesar de não terem sido detectadas amostras contaminadas com *E. coli* O157:H7, os produtos que circulam na região de fronteira internacional do estado do RS podem veicular *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, indicando um

grave problema para a saúde pública na região. Estes resultados denotam a necessidade de uma maior vigilância, de modo a reduzir os riscos da introdução de patógenos de origem alimentar no Brasil.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à VIGIAGRO-MAPA, unidade de Uruguiana pelo fornecimento das amostras apreendidas e pela autorização de introdução de alimentos obtidos na Argentina e Uruguai. Agradecemos também à Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) pelo fornecimento de bolsa de pesquisa à Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos e pelo financiamento parcial deste estudo por meio do Edital de Apoio aos Grupos de Pesquisa.

## Referências

1. Andrews, W.H., Wang, H., Jacobson, A., Hammack, T., 2016. *Salmonella* spp.. In: United States Food and Drug Administration (Ed.), Bacteriological Analytical Manual. 8th Edition, Revision A. <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> (accessed 24 May 2017).
2. Ayaz, N.D., Gencay, Y.E., Erol, I., 2014. Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:H7(+)/H7(-) isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. *Int. J. Food Microbiol.* 174, 31-38.
3. Betancor, L., Pereira, M., Martinez, A., Giossa, G., Fookes, M., Flores, K., Barrios, P., Repiso, V., Vignoli, R., Cordeiro, N., Algorta, G., Thomson, N., Maskell, D., Schelotto, F., Chabalgoity, J.A., 2010. Prevalence of *Salmonella* spp. enterica in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella* spp. enterica serovar Enteritidis. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2413-2423.
4. Beutlich, J., Hammer, J.A., Appel, B., Nöckler, K., Helmuth, R., Jöst, K., Ludwig, M.L., Hanke, C., Bechtold, D., Mayer-Scholl, A., 2015. Characterization of illegal food items and identification of foodborne pathogens brought into the European Union via two major German airports. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 13-19.

5. Brasil - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2003. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003, Diário Oficial da República Federal do Brasil, Brasília, DF, <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851> (accessed 24 May 2017).
6. Brasil - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2006a. Instrução Normativa n. 36, de 10 de novembro de 2006, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17367> (accessed 24 May 2017).
7. Brasil - Tribunal de Contas da União, 2006b. Relatório de avaliação de programa: Ações de Vigilância e Fiscalização no Trânsito Internacional de Produtos Agropecuários. Secretaria de Fiscalização e Avaliação de Programas de Governo. <http://portal.tcu.gov.br/lumis/portal/file/fileDownload.jsp?inline=1&fileId=8A8182A14D92792C014D9280A65D4DD1> (accessed 24 May 2017).
8. Brasil - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2016. Instrução Normativa n. 11, de 10 de maio de 2016, Diário Oficial da República Federal do Brasil, Brasília, DF.
9. Brookes, V.J., Hernández-Jover, M., Holyoake, P., Ward, M.P., 2014. Import risk assessment incorporating a dose-response model: introduction of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome into Australia via illegally imported raw pork. *Prev. Vet. Med.* 113, 565-579.
10. Brusa, V., Aliverti, V., Aliverti, F., Ortega, E.E., de la Torre, J.H., Linares, L.H., Sanz, M.E., Etcheverría, A.I., Padola, N.L., Galli, L., Peral García, P., Copes, J., Leotta, G.A., 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 18, 2:171.
11. Calcagno, M.A., Bourlot, I., Taus, R., Saracino, M.P., Venturiello, S.M., 2014. Description of an outbreak of human trichinellosis in an area of Argentina historically regarded as *Trichinella*-free: the importance of surveillance studies. *Vet. Parasitol.* 200, 251-256.
12. Callejo, R., Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, F., Martínez, G., Palmieri, O., 2008. Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 40, 89-92.
13. Castilla, K.S., Ferreira, C.S.A., Moreno, A.M., Nunes, I.A., Ferreira, A.J.P., 2006. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* spp. Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37, 135-139.
14. Chaber, A.L., Cunningham, A., 2016. Public Health Risks from Illegally Imported African Bushmeat and Smoked Fish: Public Health Risks from African Bushmeat and Smoked Fish. *Ecohealth.* 13, 135-138.
15. Chen, J., Griffiths, M.W., 1998. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide

- sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 369-371.
16. Cohen, M., Costantino, S.N., Calcagno, M.A., Blanco, G.A., Pozio, E., Venturiello, S.M., 2010. *Trichinella* infection in wild boars (*Sus scrofa*) from a protected area of Argentina and its relationship with the presence of humans. *Vet. Parasitol.* 169, 362-366.
  17. da Silva Fernandes, M., Kabuki, D.Y., Kuaye, A.Y., 2015. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. *Int. J. Food Microbiol.*, 200, 5-12.
  18. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P., 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3819-3822.
  19. Eidt, M.J., Sá, M.E.P., McManus, C.M., Melo, C.B., 2015. Interception of animal-origin products at land borders in Brazil. *Ciênc. anim. bras.* 16, 388-398.
  20. El País, 2016. Alerta por bacteria mortal que abarca 4 departamentos. <http://www.elpais.com.uy/informacion/alerta-bacteria-mortal-abarca-departamento.html> (accessed 24 May 2017).
  21. Feng, P., Weagant, S.D., Jinneman, K. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: United States Food and Drug Administration (Ed.), *Bacteriological Analytical Manual*. 8th Edition, Revision A. <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm> (accessed 24 May 2017).
  22. Fernandes, F.P., Voloski, F.L.S., Ramires, T., Haubert, L., Reta, G.G., Mondadori, R.G., Silva, W.P., Conceição, R.C.S., Duval, E.H., 2017. Virulence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. spp. and *Escherichia coli* in the beef jerky production line. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, fnx083.
  23. Green, M.R., Sambrook, J., 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Edition. Cold Spring Harbor, New York.
  24. Hartnett, E., Adkin, A., Seaman, M., Cooper, J., Watson, E., Coburn, H., England, T., Marooney, C., Cox, A., Wooldridge, M., 2007. A quantitative assessment of the risks from illegally imported meat contaminated with foot and mouth disease virus to Great Britain. *Risk Anal.* 27, 187-202.
  25. Hueston, W., Travis, D., van Klink, E., 2011. Optimising import risk mitigation: anticipating the unintended consequences and competing risks of informal trade. *Rev. Sci. Tech.* 30, 309-316.
  26. Ibar, M.P., Quiroga, P., Piñeyro, P., Vigo, G., Perfumo, C., Centrón, D., Giacoboni, G., Caffer, M.I., 2009. Serovars of *Salmonella* spp. enterica subspecies *enterica* and its antimicrobial resistance in slaughterhouse pigs. *Rev. Argent. Microbiol.* 41, 156-162.

27. Joseph, R., Thornton, A., Waterman, S.H., 2013. Crossing Borders - Unpasteurized Cheese a Public Health Challenge for Hispanic and US–Mexico Binational Communities. *Clin. Infect. Dis.* 57.v-vi.
28. Jure, M.A., Condorí, M.S., Terrazzino, G.P., Catalán, M.G., Campo, A.L., Zolezzi, G., Chinen, I., Rivas, M., Castillo, M., 2015. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Rev. Argent. Microbiol.* 47, 125-131.
29. Käferstein, F.K., Motarjemi, Y., Bettcher, D.W., 1997. Foodborne disease control: a transnational challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 503-510.
30. Kinde, H., Mikolon, A., Rodriguez-Lainz, A., Adams, C., Walker, R.L., Cernek-Hoskins, S., Treviso, S., Ginsberg, M., Rast, R., Harris, B., Payeur, J.B., Waterman, S., Ardans, A., 2007. Recovery of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* from cheese entering the United States through a noncommercial land port of entry. *J. Food Prot.* 70, 47-52.
31. Leotta, G.A., Miliwebsky, E.S., Chinen, I., Espinosa, E.M., Azzopardi, K., Tennant, S.M., Robins-Browne, R.M., Rivas, M., 2008. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol.* 17, 8:46, 1-8.
32. Liu, D., Lawrence, M.L., Austin, F.W., Ainsworth, A.J., 2007. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol. Methods.* 71, 133-140.
33. Melo, C.B., Sá, M.E., Sabino, V.M., Souza, A.R., Oliveira, A.M., Mota, P.M.P.C., Campani, P.R., Luna, J.O., Pinto, S.C., Schwingel, F.F., Mcmanus, C., Seixas, L., 2014. Bacteria in Dairy Products in Baggage of Incoming Travelers, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1933-1935.
34. Melo, C.B., Sá, M.E., Sabino, V.M., Fernandes, M.F.B., Santiago, M.T., Schwingel, F.F., Freitas, C., Magioli, C.A., Pinto, S.C., McManus, C., Seixas, L., 2015. Microbiological detection of bacteria in animal products seized in baggage of international air passengers to Brazil. *Prev. Vet. Med.* 118, 22-27.
35. Morin, N.J., Gong, Z., Xing-Fang, L., 2004. Reverse transcription-multiplex PCR Assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O:157H:7, *Vibrio cholerae* O1 and *Salmonella* spp. *Typhi. Clin. Chem.* 50, 2037-2044.
36. Noordhuizen, J., Surborg, H., Smulders F.J., 2013. On the efficacy of current biosecurity measures at EU borders to prevent the transfer of zoonotic and livestock diseases by travellers. *Vet. Q.* 33, 161-171.
37. Pagotto, F., Daley, E., Farber, J., Warburton, D. 2011 Isolation of *Listeria monocytogenes* from all foods and environmental samples (MFHPB-30). In: Health Canada's, HPB Methods for the Microbiological Analysis of Foods, volume 2. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2-eng.php> (accessed 24 May 2017).

38. Paton, A.W., Paton, C.J., 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. 11, 450-79.
39. Pellicer, K., Copes, J., Malvestiti, L., Lanfranchi, M., Stanchi, N., Echeverria, G., Nosoetto, E., 2002. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in dry sausages obtained in markets in the city of La Plata, Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 34, 219-221.
40. Pereira, J.G., Soares, V.M., Santos, E.A.R., Tadielo, L.E., Pellegrin, D.C.P., Duval, E.H., Silva, W.P., 2017. Profile of the illegal import of products of animal origin to Brazilian cities at the border with Argentina and Uruguay. J. Food. Protec. In Press.
41. Rodríguez-Lázaro, D., Ariza-Miguel, J., Díez-Valcarce, M., Stessl, B., Beutlich, J., Fernández-Natal, I., Hernández, M., Wagner, M., Rovira, J., 2015. Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport. Int. J. Food Microbiol. 209, 20-25,
42. Sant'Ana, A.S., Igarashi, M.C., Landgraf, M., Destro, M.T., Franco, B.D.G.M., 2012. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. Int. J. Food Microbiol. 155, 1-9.
43. Schoder, D., Strauß, A., Szakmary-Brändle, K., Stessl, B., Schlager, S., Wagner, M., 2015. Prevalence of major foodborne pathogens in food confiscated from air passenger luggage. Int. J. Food Microbiol. 209, 3-12.
44. Silk, B.J., Date, K.A., Jackson, K.A., Pouillot, R., Holt, K.G., Graves, L.M., Ong, K.L., Hurd, S., Meyer, R., Marcus, R., Shiferaw, B., Norton, D.M., Medus, C., Zansky, S.M., Cronquist, A.B., Henao, L.O., Jones, T.F., Vugia, D.J., Farley, M.M., Mahon, B.E., 2012. Invasive listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups. Clin. Infect. Dis. 54, (suppl\_5): S396-S404.
45. Swallow, R., 2012. Risk of Foot-and-Mouth Disease for the Pacific NorthWest Economic Region. Transbound. Emerg. Dis. 59, 344-352.
46. van den Berg, T., 2009. The role of the legal and illegal trade of live birds and avian products in the spread of avian influenza. Rev. Sci. Tech. 28, 93-111.
47. Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G., 2013. In situ characterization and analysis of *Salmonella* spp. biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. Int. J. Food Microbiol. 167, 293-302.
48. Xavier, J., Pascal, D., Crespo, E., Schell, H.L., Trinidad, J.A., Bueno, D.J., 2011. Seroprevalence of *Salmonella* spp. and *Mycoplasma* infection in backyard chickens in the state of Entre Rios in Argentina. Poult Sci. 90, 746-751.

Tabela 1 - Produtos de origem animal obtidos na Argentina e Uruguai

| Produtos                       | Procedência |            | Total      |
|--------------------------------|-------------|------------|------------|
|                                | Argentina   | Uruguai    |            |
| <b>Carnes <i>in natura</i></b> |             |            |            |
| Bovina                         | 40          | 28         | 68         |
| Suína                          | 15          | 20         | 35         |
| Frango                         | 19          | 12         | 31         |
| Carne de caça                  | 1           | 0          | 1          |
| Total                          | 75          | 60         | 135        |
| <b>Laticínios</b>              |             |            |            |
| Iogurte                        | 20          | 12         | 32         |
| Queijo                         | 17          | 10         | 27         |
| Creme de leite                 | 7           | 1          | 8          |
| Doce de leite                  | 3           | 8          | 11         |
| Total                          | 47          | 31         | 78         |
| <b>Carnes processadas</b>      |             |            |            |
| Mortadela                      | 11          | 8          | 19         |
| Salsicha                       | 8           | 4          | 12         |
| Salame                         | 7           | 8          | 15         |
| Presunto                       | 2           | 3          | 5          |
| Pate                           | 0           | 6          | 6          |
| Total                          | 28          | 29         | 57         |
| <b>Total geral</b>             | <b>150</b>  | <b>120</b> | <b>270</b> |

Tabela 2 - Enumeração de mesófilos aeróbios e enterobactérias (log UFC.g<sup>-1</sup> ou UFC.mL<sup>-1</sup>) em produtos de origem animal *in natura* e processados obtidos na Argentina e Uruguai

| Amostras              | Mesófilos aeróbios            |                            | Enterobactérias             |                            |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                       | Argentina                     | Uruguai                    | Argentina                   | Uruguai                    |
| <b>Característica</b> |                               |                            |                             |                            |
| <i>In natura</i>      | 6,69 ± 1,09 <sup>A*;a**</sup> | 6,27 ± 0,82 <sup>A;a</sup> | 5,36 ± 1,19 <sup>A;a</sup>  | 5,22 ± 0,96 <sup>A;a</sup> |
| Processado            | 5,61 ± 1,71 <sup>B;a</sup>    | 5,20 ± 1,27 <sup>B;a</sup> | 2,77 ± 0,98 <sup>B;a</sup>  | 2,53 ± 0,65 <sup>B;a</sup> |
| <b>Produtos</b>       |                               |                            |                             |                            |
| Carne bovina          | 6,26 ± 0,92 <sup>AB;a</sup>   | 6,33 ± 0,84 <sup>A;a</sup> | 5,21 ± 1,16 <sup>AB;a</sup> | 5,49 ± 0,84 <sup>A;a</sup> |
| Carne suína           | 7,07 ± 1,11 <sup>B;a</sup>    | 6,21 ± 0,88 <sup>A;a</sup> | 5,77 ± 1,10 <sup>B;a</sup>  | 4,71 ± 0,84 <sup>A;a</sup> |
| Carne de frango       | 6,13 ± 1,09 <sup>A;a</sup>    | 6,25 ± 0,64 <sup>A;a</sup> | 4,86 ± 1,14 <sup>A;a</sup>  | 4,49 ± 0,41 <sup>A;a</sup> |
| Laticínios            | 5,47 ± 1,87 <sup>C;a</sup>    | 5,00 ± 1,64 <sup>B;a</sup> | 2,59 ± 0,96 <sup>C;a</sup>  | 2,76 ± 1,08 <sup>B;a</sup> |
| Carnes processadas    | 5,78 ± 1,28 <sup>C;a</sup>    | 5,35 ± 1,12 <sup>B;a</sup> | 2,97 ± 0,84 <sup>C;a</sup>  | 1,96 ± 0,28 <sup>B;a</sup> |
| Carne de caça         | 7,98 <sup>***</sup>           | -                          | 4,85 <sup>***</sup>         | -                          |

\*Letras maiúsculas: comparação de diferentes produtos na mesma origem para o mesmo grupo de bactérias indicadoras.

\*\*Letra minúscula: comparação do mesmo produto em diferentes origens para o mesmo grupo de bactérias indicadoras.

\*\*\*Contagem obtida a partir da análise de uma amostra. Sem análise estatística.



Tabela 3 - Frequência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em produtos de origem animal *in natura* e processados obtidos na Argentina e Uruguai

| Patógeno                       | Parâmetro             | Procedência   |                 | P valor* |
|--------------------------------|-----------------------|---------------|-----------------|----------|
|                                |                       | Argentina     | Uruguai         |          |
| <b><i>Salmonella</i> spp.</b>  | <b>Característica</b> |               |                 |          |
|                                | <i>In natura</i>      | 6/75 (8%)     | 0/60 (0%)       | 0,02     |
|                                | Processado            | 0/75 (0%)     | 0/60 (0%)       | -***     |
|                                | P valor**             | 0,01          | -               |          |
|                                | <b>Produtos</b>       |               |                 |          |
|                                | Carne bovina          | 0/40 (0%)     | 0/28 (0%)       | -        |
|                                | Carne suína           | 1/15 (6,66%)  | 0/20 (0%)       | 0,24     |
|                                | Carne de frango       | 5/19 (26,31%) | 0/12 (0%)       | 0,05     |
|                                | Laticínios            | 0/47 (0%)     | 0/31 (0%)       | -        |
|                                | Carnes processadas    | 0/28 (0%)     | 0/29 (0%)       | -        |
|                                | Carne de caça         | 0/1 (0%)      | -               | -        |
| P valor**                      | 0,001                 | -             |                 |          |
| <b><i>L. monocytogenes</i></b> | <b>Característica</b> |               |                 |          |
|                                | <i>In natura</i>      | 5/75 (6,66%)  | 20/120 (16,66%) | 0,001    |
|                                | Processado            | 0/75 (0%)     | 0/120 (0%)      | -        |
|                                | P valor**             | 0,023         | 0,001           |          |
|                                | <b>Produtos</b>       |               |                 |          |
|                                | Carne bovina          | 1/40 (2,5%)   | 8/28 (28,57%)   | 0,002    |
|                                | Carne suína           | 4/15 (26,66%) | 6/20 (30%)      | 0,829    |
|                                | Carne de frango       | 0/19 (0%)     | 6/12 (50%)      | 0,001    |
|                                | Laticínios            | 0/47 (0%)     | 0/31 (0%)       | -        |
|                                | Carnes processadas    | 0/28 (0%)     | 0/29 (0%)       | -        |
|                                | Carne de caça         | 0/1 (0%)      | -               | -        |
| P valor**                      | 0,001                 | 0,001         |                 |          |

\*P valor para comparação da mesma característica ou produto de diferentes de origem diferente.

\*\*P valor para comparação da característica e produtos da mesma origem.

\*\*\*P valor não calculado.

Tabela 4 - Presença de genes de virulência em isolados de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7

| Patógeno                       | Gene                                      | Origem       |              |
|--------------------------------|---|--------------|--------------|
|                                |   | Argentina    | Uruguai      |
| <b><i>Salmonella</i> spp .</b> | <i>hilA</i>                               | 6/6 (100%)   | -            |
|                                | <i>invA</i>                               | 6/6 (100%)   | -            |
|                                | <i>spvC</i>                               | 0/6 (0%)     | -            |
|                                | <i>pefA</i>                               | 0/6 (0%)     | -            |
|                                | <i>sefA</i>                               | 0/6 (0%)     | -            |
| <b><i>L. monocytogenes</i></b> | <i>prs</i>                                | 5/5 (100%)   | 20/20 (100%) |
|                                | <i>inlA</i> , <i>inlC</i> e <i>inlJ</i> * | 1/5 (20%)    | 19/20 (95%)  |
|                                | <i>inlA</i> e <i>inlJ</i> *               | 3/5 (60%)    | 1/20 (5%)    |
|                                | <i>inlA</i> e <i>inlC</i> *               | 1/5 (20%)    | -            |
| <b><i>E. coli</i> O157:H7</b>  | <i>uspA</i>                               | 37/37 (100%) | 15/15 (100%) |
|                                | <i>eae</i>                                | 1/37 (2,70)  | 0/15 (0%)    |
|                                | <i>rfb</i> <sub>O157</sub>                | 0/37 (0%)    | 0/15 (0%)    |
|                                | <i>fliC</i> <sub>H7</sub>                 | 0/37 (0%)    | 0/15 (0%)    |
|                                | <i>stx1</i>                               | 0/37 (0%)    | 0/15 (0%)    |
|                                | <i>stx2</i>                               | 0/37 (0%)    | 0/15 (0%)    |
|                                | <i>hlyA</i>                               | 0/37 (0%)    | 0/15 (0%)    |

\*Presença simultânea dos genes de virulência de *L. monocytogenes*.

**5 Capítulo 3 – Vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) em produtos de origem animal comercializados em região de fronteira entre Brasil, Argentina e Uruguai**

Manuscrito a ser enviado para publicação no periódico *Food Microbiology* (ISSN 0740-0020)

**Título:** Vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) em produtos de origem animal comercializados em região de fronteira entre Brasil, Argentina e Uruguai

Juliano Gonçalves Pereira<sup>a, b\*</sup>, Vanessa Mendonça Soares<sup>b</sup>, Fernanda Gil de Sousa<sup>c</sup>, Leonardo Ereno Tadielo<sup>b</sup>, Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos<sup>b</sup>, Mário Celso Sperotto Brum<sup>b</sup>, Andréia Henzel<sup>c</sup>, Eduarda Hallal Duval<sup>a</sup>, Fernando Rosado Spilki<sup>c</sup>, Wladimir Padilha da Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão. Avenida Eliseu Maciel, s/n, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 96010900.

<sup>b</sup>Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. BR 472, Km 585, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97501970.

<sup>c</sup>Universidade Feevale, Instituto de Ciências da Saúde. Rodovia ERS-239, 2755, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 93525075.

\*Autores para correspondência:

Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul – RS, Brazil, CEP 96010-900, Phone: +55 53 32757378

Email: julianopereira@unipampa.edu.br (J.G. Pereira),  
wladimir.padilha2011@gmail.com, (W.P. Silva)

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença do vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) em carnes *in natura* e processadas comercializadas em região de fronteira do Brasil com Argentina e Uruguai. Foram obtidas 150 amostras de produtos de origem animal em estabelecimentos comerciais de duas cidades que fazem fronteira com o Brasil, no estado do Rio Grande do Sul: Paso de Los Libres (Argentina) e Rivera (Uruguai). Na Argentina, foram obtidas 77 amostras (n=53 carnes *in natura*; n=24 carnes processadas) e no Uruguai, 73 (n=55 *in natura*; n=18 processadas). Também foram obtidas oito amostras de carne *in natura* junto ao VIGIAGRO, a partir de apreensão na averiguação de bagagens de passageiros que iriam ingressar no Brasil. As 159 amostras foram submetidas à pesquisa de HAV, por RT-qPCR, e HEV e RV, por RT-PCR. Material genético do HAV foi detectado em 18,23% (29/159) das amostras e RV em 23,89% (38/159). Não foram detectadas amostras positivas para HEV. Duas amostras positivas para HAV foram oriundas dos produtos apreendidos pela VIGIAGRO. As carnes processadas apresentaram maior frequência de detecção de HAV ( $P < 0,05$ ; OR=2,353; IC95%=1,012-5,473) e RV ( $P > 0,05$ ; OR=1,65; IC95% 0,749-3,633). Entre as amostras obtidas na Argentina, as carnes processadas foram as que apresentaram a maior frequência de detecção de HAV (33,33%) e RV (41,66%), contudo, não houve associação significativa entre a frequência de HAV e RV ( $P > 0,05$ ). A mediana da quantificação do HAV pela RT-qPCR nas amostras de origem Argentina foi de  $6,9 \times 10^4$  e nas amostras do Uruguai  $3,5 \times 10^3$  cópias/g. Nas amostras provenientes do Uruguai, os produtos processados também apresentaram maior frequência de detecção de HAV e RV, quando comparados com os *in natura* ( $P > 0,05$ ). Não houve associação entre a presença de HAV nas carnes *in natura* da Argentina quando comparadas com as do Uruguai, assim como em relação às carnes processadas ( $P > 0,05$ ). Para RV, houve associação da presença de material genético nos produtos *in natura* de origem argentina ( $P < 0,05$ ; OR=0,153; IC95%=0,049-0,481), porém nas carnes processadas, esta associação não foi observada. A presença de material genético de HAV e RV em uma parcela significativa de produtos provenientes da Argentina e Uruguai deve ser considerada como possível fonte de infecção para humanos e indica condições precárias de obtenção, processamento e manipulação. Este fator, associado com o trânsito internacional ilegal de alimentos que existe na região, pode favorecer a disseminação desses agentes entre os países.

**Palavras-chave:** alimentos; contaminação; fronteira; vírus patogênicos.

### 3.1 Introdução

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são um importante problema de saúde em todo mundo. De 2007 a 2016, no Brasil, foram notificados ao Ministério da Saúde, 6.632 surtos envolvendo 118.104 indivíduos, o que resultou em 109 óbitos. Dos agentes etiológicos envolvidos nestes surtos, 2,1% foram identificados como vírus da hepatite A (HAV), rotavírus (RV) e norovírus (NV) (Brasil, 2017). Porém, estes números podem estar muitos subestimados, devido a dificuldades relacionadas ao diagnóstico, notificação e identificação do agente. Nos Estados Unidos da América, de 2000 a 2015, ocorreram 5.165 surtos causados por estes patógenos, envolvendo 131.682 indivíduos e resultando em 23 mortes (CDC, 2017).

O HAV e o HEV são os maiores causadores de hepatite aguda em humanos, e o RV é um dos principais agentes de diarreia infantil do mundo. Porém, apesar das diferenças observadas nas manifestações clínicas causadas por estes vírus, ambos possuem transmissão fecal-oral, sendo transmitidos por contato pessoa-pessoa ou por alimentos contaminados. Desta forma, procedimentos higiênicos durante a obtenção e manipulação de alimentos são uma importante barreira para evitar a contaminação viral dos alimentos (White et al., 2016).

A globalização da comercialização de alimentos, o trânsito internacional de pessoas e o comércio ilegal de produtos de origem animal são fatores que aumentam a probabilidade da ocorrência de DTA (Käferstein et al., 1997). De modo a reduzir os riscos da disseminação de patógenos, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconiza que animais e seus produtos devem ser proibidos de trafegar entre países sem a anuência da fiscalização e o atendimento de normas sanitárias rígidas nacionais e internacionais, pois podem disseminar patógenos rapidamente, afetando diretamente a saúde dos consumidores e a saúde animal (OIE, 2016). A partir das recomendações da OIE, cabe aos países estabelecerem as medidas adequadas para o controle do trânsito de animais e seus produtos. Contudo, uma falha nos sistemas de vigilância de fronteira pode comprometer a saúde da população, uma vez que possibilita o ingresso e disseminação de agentes

patogênicos de importância em saúde pública (Hueston et al., 2011; Noordhuizen et al., 2013).

A vigilância das fronteiras internacionais no Brasil é de responsabilidade da Vigilância Agropecuária Internacional (VIGIAGRO), órgão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que opera em mais de 100 unidades localizadas em portos, aeroportos e postos de fronteira, realizando a fiscalização de animais vivos, inspeção de produtos de origem animal e averiguação de bagagens de passageiros (Brasil, 2006a).

Atualmente, o MAPA autoriza o ingresso de produtos de origem animal adquiridos no exterior e internalizados via aeroportos ou postos de fronteira, desde que sejam atendidos alguns requisitos: quantidade por pessoa que caracterize consumo próprio (10 kg de produtos cárneos processados, 5 kg de lácteos, derivados de ovos ou pescado processado); embalagem original, lacrada e sem vazamentos ou violações. Todas estas exigências devem ser verificadas quanto ao seu atendimento no momento em que os viajantes ingressam no Brasil, porém, muitas vezes a fiscalização não ocorre ou, quando ocorre, não consegue detectar irregularidades, permitindo o ingresso ilegal de alimentos que não atendam as especificações, como por exemplo, carnes *in natura* ou quantidades superiores as recomendadas (Brasil, 2016).

A entrada no país de alimentos sem fiscalização é preocupante sob o ponto de vista de saúde pública, pois não há garantia de que os alimentos estejam em condições de consumo. Além disso, os alimentos podem veicular patógenos exóticos ou introduzir novas variantes, já que muitas vezes não se conhece a procedência, o local e forma de abate, o tipo de industrialização, o atendimento à requisitos sanitários internacionais e se foram submetidos a algum tipo de fiscalização sanitária oficial no país de origem, garantindo a inocuidade dos produtos (Brasil, 2006b).

Patógenos bacterianos e virais já foram detectados em produtos de origem animal apreendidos de viajantes em aeroportos pelo mundo (Beutlich et al., 2015; Rodríguez-Lázaro et al., 2015). No Brasil, estudos realizados em produtos apreendidos em aeroportos já verificaram a presença de bactérias patogênicas (Melo et al., 2014a; 2015), contudo, nenhum estudo pesquisou a presença de vírus de importância em saúde pública em produtos que circulam em regiões de fronteira do país. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de HAV, HEV e RV

em produtos de origem animal *in natura* e processados comercializados em região de fronteira do Brasil com Argentina (ARG) e Uruguai (URU).

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Coleta das amostras

Este estudo foi conduzido no Rio Grande do Sul (RS), estado situado na região sul do Brasil, e que possui fronteiras internacionais com ARG e URU. A amostragem foi realizada entre setembro de 2015 e novembro de 2016, totalizando 159 produtos de origem animal (carnes *in natura* e processadas), sendo 77 oriundas da ARG, 73 do URU e nove originárias de apreensão da VIGIAGRO-MAPA (Tabela 1).

As amostras obtidas junto à VIGIAGRO, Unidade de Uruguaiana (RS) (n=9), foram coletadas após apreensão durante a fiscalização de bagagens na Ponte Internacional Getúlio Vargas - Agustín Pedro Justo (29°45'18"S, 57°05'16"O). Esta ponte liga as cidades de Uruguaiana (Brasil) e Paso de Los Libres (ARG). Destas amostras, oito foram de carne bovina *in natura* e uma de carne de caça (*Hydrochoerus hydrochaeris*; capivara) transportadas por viajantes que estavam ingressando no Brasil.

As demais amostras (n=150) foram obtidas por meio de amostragens em estabelecimentos situados na cidade de Paso de Los Libres, Província de Corrientes, ARG (29°43'00"S, 57°05'00"O) e Rivera, Departamento de Rivera, URU (30°54'09"S, 55°33'02"O), autorizadas e supervisionadas pela VIGIAGRO. Os produtos foram adquiridos em 16 estabelecimentos comerciais (supermercados, mercearias e açougues), sendo oito em cada cidade (ARG = estabelecimentos A a H; URU = estabelecimentos I a P). Em cada estabelecimento foram realizadas coletas em três momentos distintos. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. Na chegada ao laboratório, foram mantidas a 4°C até o momento das análises.



### 3.2.2 Detecção de HAV, HEV e RV

#### 3.2.2.1 Preparo das amostras, extração de RNA e síntese do cDNA

As amostras foram maceradas com 1 mL de Meio Essencial Mínimo (MEM) e homogeneizadas em vórtex. Logo após, 250 µL foram suspensos em 750 µL de Trizol, sendo incubados por 5 min e, posteriormente, centrifugados a 1.1000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 200 µL de clorofórmio, incubado em temperatura ambiente por 5 min e centrifugado a 1.1000 g durante 10 min a 4 °C, com separação da fase aquosa para outro tubo. As proteínas foram precipitadas com 500 µL de isopropanol, e incubadas em temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1.2000 g por 8 min e o sobrenadante descartado. Ao final do processo, adicionou-se 1 mL de etanol 75%, com última centrifugação a 9.000 g por 5 min. O etanol foi removido por inversão de tubos, os quais foram submetidos a secagem por 3 min. Os *pellets* de RNA extraídos foram ressuspensos em 60 µL de solução tampão de TE e armazenados a -80°C.

Para a preparação do cDNA, foram adicionados 10 µL de RNA total em 10 µL de master mix (High Capacity cDNA synthesis - Applied Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Cada solução de mix consistiu de 3,2 µL de água livre de DNase/RNase, 2 µL de tampão, 0,8 µL de dNTP, 2 µL de *random primers*, 1 µL de inibidor e 1 µL de enzima, com homogeneização por 5 s. As amostras foram amplificadas em termociclador (10 min a 20 °C, 120 min a 37 °C, 5 min a 85 °C) e, posteriormente, refrigeradas a 4 °C.

### 3.2.2.2 RT-qPCR para detecção de HAV

Na PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram utilizados *primers* para a região não codificante (5'- UTR) do genoma viral, de acordo com Jothikumar et al. (2005). A qPCR foi realizada com kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. O tempo total da reação foi de 60 min, com desnaturação a 95 °C por 15 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 10 s, 55 °C por 20 s e 72 °C por 15 s. Para a reação de 20µL foram utilizados 100 nM de cada *primer* e sonda.

A qPCR foi realizada em placa de 96 cavidades, contendo controles positivos e negativos (água ultrapura livre de DNase/RNase). A curva padrão foi preparada por diluição decimal seriada dos produtos purificados dos *primers* inseridos em plasmídios (controle positivo). Foram adicionados 15 µL da reação e 5 µL do cDNA, em seguida, a placa foi selada e depositada no equipamento Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Todos os controles e amostras foram testadas em duplicata e para determinação de eficiência e limite de sensibilidade da técnica, foi realizada uma curva padrão com diluições decimais seriadas dos controles em concentrações de  $10^1$  a  $10^{10}$  e, a partir da curva, foram obtidas eficiência de 103% e R2 de 0,99.

### 3.2.2.3 RT-Nested PCR para detecção HEV

A detecção de HEV foi realizada utilizando-se *primers* para região ORF1 de HEV (Tabela 2), de acordo com Heldt et al. (2016) e, como controle positivo, utilizou-se RNA extraído de fezes de macaco, positivas para HEV. A reação tem volume final de 50 µL, contendo 25 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 18 µL de água livre de DNase/RNase, 1 µl de cada *primer* (100 nM) e 5 µL de cDNA. Para amplificação, foram utilizadas duas corridas com temperatura inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 45 ciclos de 95 °C por 30 s, 59 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 72 °C por 7 min para alongação final. Após as reações, foi realizada a eletroforese dos produtos amplificados e os resultados visualizados com luz UV.

#### 3.2.2.4 RT-PCR para detecção de RV

Para detecção de RV foram utilizados *primers* para região do gene da VP6 (Spilki et al., 2013) com os mesmos volumes e concentrações de reagentes utilizados na detecção de HEV. Os controles positivos usados foram RNA extraído de cepas de RV vacinal amplificada em cultivo celular. O programa utilizado consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e, ao fim dos ciclos, 72,8°C por 7 min. Após as reações, foi realizada a eletroforese dos produtos amplificados e os resultados visualizados com luz UV.

#### 3.2.3 Análise dos dados

Os dados foram tabulados e os resultados expressos em frequência de positividade para cada patógeno analisado. A seguir, foram submetidos ao teste do Qui-quadrado para a verificação da associação do tipo do produto com a detecção do patógeno. Foi realizado o cálculo da OR (*odds ratio*) para estimar as chances da presença do material genético do vírus nos produtos analisados. As análises foram realizadas no programa estatístico IBM® SPSS® Statistics Version 20, usando nível de significância de 0,05.

### 3.3 Resultados

Entre as 159 amostras avaliadas, 29 (18,23%) foram positivas para presença de genoma do HAV e 38 (23,89%) para RV. Não foram detectadas amostras de produtos de origem animal contendo material genético de HEV (Tabela 3). As carnes processadas apresentaram maior frequência de presença de HAV e RV do que as carnes *in natura*, contudo, a associação foi significativa apenas para HAV ( $P < 0,05$ ).

Nestes, a OR para a presença de HAV nas amostras de carnes processadas foi de 2,353 (IC95%=1,012-5,473).

Observou-se que 23,25% dos produtos oriundos da Argentina, foram positivos para HAV e 36,04% para RV. Dentre as amostras de carne *in natura* positivas para HAV, duas foram obtidas junto à VIGIAGRO. Nas carnes processadas houve maior frequência de detecção de HAV e RV do que nas carnes *in natura*, contudo, esta associação não foi significativa ( $P > 0,05$ ). Entre as carnes *in natura*, 19,35% das amostras foram positivas para HAV, entretanto, nas carnes processadas a frequência foi de 33,33%. Para RV, a frequência nas amostras de carnes *in natura* foi de 33,87% e nas processadas 41,66%.

Nos produtos provenientes do Uruguai, 12,32% foram positivos para HAV e 9,58% para RV. Observou-se que 9,09% das carnes *in natura* e 22,22% das carnes processadas foram positivas para HAV. Porém, não houve associação significativa para a presença desse patógeno entre estas amostras ( $P > 0,05$ ). Com relação a RV, 7,27% das carnes *in natura* e 16,66% das processadas foram positivas ( $P > 0,05$ ).

Observou-se associação significativa nos produtos obtidos na ARG com relação à presença de RV, quando comparados com os produtos do URU. Esta associação foi observada na soma das amostras ( $P < 0,05$ ; OR=0,118; IC95%= 0,77-0,460) assim como nos produtos *in natura* ( $P < 0,05$ ; OR=0,153; IC95%= 0,049-0,481). Para HAV, não houve associação entre presença do patógeno e a procedência das amostras.

Entre os 16 estabelecimentos amostrados, 11 apresentaram amostras positivas para HAV ou RV em, pelo menos, uma das coletas. Na ARG, foi detectado genoma de HAV e/ou RV em amostras provenientes de sete dos oito estabelecimentos comerciais avaliados: estabelecimento A (n=15), B (n=8), C (n=7), D (n=6), E (n=3), F (n=2) e G (n=1). No URU, quatro estabelecimentos apresentaram amostras positivas (I=6; J=4; K=3 e L=2). Das 159 amostras analisadas, oito apresentaram contaminação simultânea por HAV e RV, sendo sete da ARG (três do estabelecimento A; três do B e um do E) e uma do URU (estabelecimento J).

A mediana da quantificação do HAV pela RT-qPCR nas amostras de origem Argentina foi de  $6,9 \times 10^4$  cópias de genoma/g, com mínima de  $1,3 \times 10^2$  cópias/g e máxima de  $3,2 \times 10^{13}$  cópias/g. As amostras positivas para HAV (n=2) apreendidas pela VIGIAGRO apresentaram contagens de  $3,2 \times 10^{13}$  cópias/g e  $3,2 \times 10^2$  cópias/g.

Nas amostras do Uruguai a mediana foi de  $3,5 \times 10^3$  cópias/g com mínimo de  $1,3 \times 10^1$  cópias/g e máxima de  $2,9 \times 10^9$  cópias/g.

### 3.4 Discussão

A presença de HAV e RV em um número significativo de produtos de origem animal, provenientes de diversos estabelecimentos comerciais da ARG e URU, demonstra um risco associado ao consumo dos produtos de origem animal que circulam em região de fronteira internacional do estado do RS, Brasil. Além disso, o fato de HAV e RV terem sido detectados em vários estabelecimentos, em momentos diferentes de coleta dos produtos, apontam que a detecção não foi casual, indicando que práticas inadequadas de obtenção e/ou manipulação, são rotinas nestes locais.

A presença destes vírus em alimentos e seu envolvimento em surtos de DTA estão associados à contaminação de origem fecal. Desta forma, alimentos e água utilizada nas diversas etapas do processamento podem se contaminar quando procedimentos higiênico-sanitários não são atendidos (Victoria et al., 2014; Sanguanmoo et al. 2015; White et al., 2016). Neste contexto, o comércio informal de alimentos (dentre eles a importação ilegal) é importante na disseminação de enteropatógenos, tais como HAV e RV, uma vez que muitas atividades envolvidas nestas práticas ocorrem de maneira clandestina, sem a presença de agentes de fiscalização sanitária que regulariam o processo higiênico de obtenção, comercialização e trânsito destes produtos.

A importação de alguns tipos de alimentos é permitida atualmente no Brasil, (Brasil, 2016), contudo, independente da liberação, a fiscalização sanitária nos postos de fronteira deve ser rigorosa, de forma a garantir que alimentos potencialmente veiculadores de patógenos não sejam introduzidos no país. Porém, mesmo com a atuação dos órgãos de fiscalização sanitária de fronteira, a importação ilegal de produtos de origem animal é uma prática comum em muitas regiões do Brasil, sejam em fronteiras terrestres (Pereira et al., 2017) ou aeroportos (Melo et al., 2014, 2015). Especificamente na região de fronteira do RS, estima-se que mais de 60% dos passageiros que viajam para Argentina ou Uruguai retornam ao Brasil portando algum produto de origem animal (*in natura* ou processado) e que

menos de 10% destes viajantes já passaram em algum momento pela fiscalização de bagagem no retorno ao Brasil (Pereira et al., 2017).

Na região de abrangência deste estudo, a VIGIAGRO apreendeu, entre 2014 e 2016, 3.095 kg de carne bovina *in natura*, 729 kg de pescados, 493 kg de carnes de caça, 436 kg de mel, 45 kg de queijo, 15 kg de carne suína, 13 kg de salame e 10 kg carne ovina (dados não publicados). Porém, há de se considerar a possibilidade destes dados estarem subestimados, uma vez que a averiguação de carros e bagagens no retorno ao Brasil é realizada por amostragem (Brasil, 2006b).

No caso do estado do RS, a principal forma de ingresso destes alimentos é via fronteira terrestre, porém, no Brasil, alimentos ilegais também são introduzidos via aeroportos. No ano de 2014, foram apreendidas mais de 65 t de produtos de origem animal ou vegetal, irregulares, em bagagens de passageiros, em três dos maiores aeroportos brasileiros (Confins, em Belo Horizonte; Guarulhos, em São Paulo, e Salgado Filho, em Porto Alegre). Os produtos mais apreendidos foram os de origem animal, como lácteos, embutidos, pescados, mel e carnes. As sementes, mudas e frutas foram as mais apreendidas entre os produtos de origem vegetal (Brasil, 2015).

Segundo Melo et al. (2014b), 657,4 kg de produtos de origem animal ilegalmente importados foram apreendidos pela fiscalização sanitária, os quais ingressariam no Brasil via os aeroportos de Guarulhos (São Paulo) e Galeão (Rio de Janeiro). Este mesmo estudo apontou que, entre 2006 e 2009, foram apreendidas cerca de 40 t de alimentos de origem animal em Guarulhos e, entre 2008 e 2009, a VIGIAGRO apreendeu 19 toneladas desses produtos no aeroporto do Galeão. Outros estudos demonstram que tais alimentos podem apresentar bactérias patogênicas (Melo et al., 2014a, 2015), porém, nenhum dado na literatura descreve a presença de vírus nestes tipos de alimentos no Brasil.

O vírus da hepatite A e RV são comumente envolvidos em casos de DTA (CDC, 2017; Brasil, 2016a). Na ARG, a hepatite A é considerada uma enfermidade endêmica (Blanco Fernandez et al., 2012), assim como no URU (Montano et al., 2001). Estes países indicam a vacinação como forma de prevenção da enfermidade, e a análise regressiva dos dados epidemiológicos demonstra que as taxas de incidência vêm reduzindo nestes países, após a utilização desta medida de saúde pública (Romero et al., 2012). O RV corresponde à 40% das causas de internação

por diarreia infantil aguda na ARG e no URU (Degiuseppe et al., 2013; Tort et al., 2015).

A detecção da presença de genoma nos alimentos avaliados é indicativo da presença, porém não pode-se atribuir a capacidade infectante destas amostras. Nosso estudo detectou contagens elevadas de HAV pela RT-qPCR nos alimentos obtidos tanto na Argentina quanto no Uruguai, com amostras superando  $10^{10}$  cópias de genoma. Apesar de não estar bem estabelecida a dose infectante para este vírus, estudos indicaram que o período de incubação diminuiu quanto maior a quantidade de inóculo. Além disso, estima-se que 0,1 g de fezes contaminadas com HAV pode ser considerada como a dose infectante para humanos (White et al., 2016). Deste modo, parte dos alimentos analisados pelo presente estudo poderia servir como fontes de infecção para os consumidores expostos. Obviamente, amostras com maior número de cópias de genoma possuem maior probabilidade de serem infecciosas.

Houve associação significativa entre HAV e carnes processadas, quando comparados com as carnes *in natura* de origem uruguaia. Contudo, mesmo não apresentando significância estatística, as carnes processadas apresentaram maior frequência de detecção de HAV e RV do que aquelas *in natura*. Em função destes produtos apresentarem mais etapas durante o seu processamento, a chance de contaminação por enteropatógenos é maior, como observado na OR significativa observada na comparação entre a contaminação por HAV nas carnes *in natura* e processadas, quando se soma todas as amostras (OR=2,353; IC95%=1,012-5,473). A introdução destes micro-organismos na cadeia de produção ocorre pela matéria-prima contaminada, uso de água não tratada, contaminação cruzada por fezes, manipulação inadequada de alimentos ou qualquer fonte ambiental contendo partículas virais (Shukla et al., 2016). Assim, é possível considerar que quanto maior o número de etapas da cadeia de produção, maior será sua manipulação e, conseqüentemente, maior será a probabilidade de contaminação.

Além disso, a presença de patógenos viáveis em alimentos prontos para o consumo pode elevar o risco de ocorrência de DTA, uma vez que estes produtos não passarão por nenhum processo de eliminação de micro-organismos, como por exemplo, tratamento térmico. Salienta-se que o fato de ter sido detectada a presença de HAV e RV não indica, necessariamente, que os alimentos servirão de fonte de infecção, uma vez que em nosso estudo utilizamos técnicas que avaliaram

a presença de genoma viral e não a viabilidade e infectividade dos patógenos detectados. Contudo, a presença de material genético é um indicativo da presença do vírus e aponta para deficiências higiênicas que permitiram a contaminação por HAV e RV durante a obtenção ou processamento dos produtos de origem animal analisados. Deficiências higiênicas em estabelecimentos argentinos e uruguaios já haviam sido reportadas por consumidores que importam ilegalmente alimentos, em pesquisa anterior realizada na região da fronteira do RS, Brasil (Pereira et al., 2017), o que foi comprovado neste estudo, pelo elevado número de estabelecimentos comercializando produtos de origem animal com presença de HAV e RV na ARG (7/8) e URU (4/8).

Não foi detectada a presença de HEV, indicando a ausência de circulação deste vírus na região estudada ou circulação limitada e em baixos níveis. No entanto, alguns estudos demonstram que produtos de origem animal são importantes veículos desse patógeno, inclusive aqueles que circulam em região de fronteira. Rodríguez-Lázaro et al. (2015) detectaram HEV em 53,3% das amostras de alimentos apreendidos no aeroporto de Bilbao, na Espanha, incluindo alimentos cárneos importados da América do Sul. A maior frequência de amostras positivas para HEV foi em produtos originários da Colômbia, Peru, Brasil e Argentina, sendo a carne suína, o principal produto contaminado com esse vírus.

Os suínos, assim como sua carne e derivados, são os principais veículos de HEV (Vasconcelos et al., 2015; Wilhelm et al., 2014), o qual tem sido detectado em amostras de fezes e carcaças obtidas em abatedouros e no comércio varejista (Intharasongkroh et al., 2016), bem como em amostras de produtos cárneos. Heldt et al. (2016) detectaram a presença de genoma do HEV em 36% de amostras de patês suínos comercializados na cidade de Novo Hamburgo, Brasil.

Os resultados obtidos neste estudo enfatizam a necessidade de um maior controle no trânsito de alimentos na região de fronteira do Brasil, uma vez que foi detectado material genético dos vírus HAV e RV, tanto em carnes *in natura*, quanto em processadas, obtidas da ARG e URU. Levando-se em consideração que na região do estudo, a prática de importação ilegal é comum e que produtos atualmente liberados de ingressar no Brasil (processados) podem conter patógenos de importância para a saúde pública, é necessária a implantação de programas de fiscalização de fronteira mais efetivos, tornando a vigilância agropecuária de fronteira mais ativa e operante, de modo a impedir a entrada de alimentos contendo



agentes patogênicos potencialmente causadores de DTA, protegendo a saúde da população brasileira que reside nesta região.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à VIGIAGRO-MAPA, unidade de Uruguaiana pelo fornecimento de amostras apreendidas e pela supervisão durante a coleta de amostras e introdução de alimentos obtidos na ARG e URU e à Profa. Dra. Célia Barardi da Universidade Federal de Santa Catarina, pela cedência dos plasmídeos. Agradecemos também à Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) pelo fornecimento de bolsa de pesquisa à Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos e pelo financiamento parcial deste estudo por meio do Edital de Apoio aos Grupos de Pesquisa.

## Referências

1. Beutlich, J., Hammer, J.A., Appel, B., Nöckler, K., Helmuth, R., Jöst, K., Ludwig, M.L., Hanke, C., Bechtold, D., Mayer-Scholl, A., 2015. Characterization of illegal food items and identification of foodborne pathogens brought into the European Union via two major German airports. *Int J. Food Microbiol.* 209, 13-19.
2. Blanco Fernández, M.D., Torres, C., Riviello-López, G., Poma, H.R., Rajal, V.B., Nates, S., Cisterna, D.M., Campos, R.H., Mbayed, V.A., 2012. Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E548-51.
3. Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2006a. Instrução Normativa n. 36, de 10 de novembro de 2006, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17367/> (accessed 01.06.2016).
4. Brasil. Tribunal de Contas da União, 2006b. Relatório de avaliação de programa: Ações de Vigilância e Fiscalização no Trânsito Internacional de Produtos Agropecuários. Secretaria de Fiscalização e Avaliação de Programas de Governo,

<http://portal.tcu.gov.br/lumis/portal/file/fileDownload.jsp?inline=1&fileId=8A8182A14D92792C014D9280A65D4DD1> (accessed 01.06.2016).

5. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015. Apreensões de produtos em aeroportos ultrapassaram 65 t em 2014. <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/02/apreensoes-de-produtos-em-aeroportos-ultrapassaram-65-toneladas-em-2014/> (accessed 01.06.2016).
6. Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2016. Instrução Normativa n. 11, de 10 de maio de 2016, Diário Oficial da República Federal do Brasil, Brasília, DF.
7. Brasil, Ministério da Saúde, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. 2017. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf/> (accessed 01.06.2016).
8. CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2017. Foodborne Outbreak Tracking and Reporting (FOOD Tool). <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> (accessed 01.06.2016).
9. Degiuseppe, J.I., Giovacchini, C., Stupka, J.Á., Virales, Red Nacional de Vigilancia de Gastroenteritis Virales, 2013. Rotavirus epidemiology and surveillance in Argentina: 2009-2011. *Arch. Argent. Pediatr.* 111, 148-154.
10. Heldt, F.H., Staggmeier, R., Gularte, J.S., Demoliner, M., Henzel, A., Spilki, F.R., 2016. Hepatitis E virus in surface water, sediments, and pork products marketed in southern Brazil. *Food Environ. Virol.*, 8, 200-205.
11. Hueston, W., Travis, D., van Klink, E., 2011. Optimising import risk mitigation: anticipating the unintended consequences and competing risks of informal trade. *Rev. Sci. Tech.* 30, 309-316.
12. Intharasongkroh, D., Sa-Nguanmoo, P., Tuanthap, S., Thongmee, T., Duang-In, A., Klinfueng, S., Chansaenroj, J., Vongpunsawad, S., Theamboonlers, A., Payungporn, S., Chirathaworn, C., Poovorawan, Y., 2016. Hepatitis E Virus in Pork and Variety Meats Sold in Fresh Markets. *Food Environ. Virol.* 9, 45-53.
13. Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D., Robertso, B.H., 2005. Development and Evaluation of a Broadly Reactive TaqMan Assay for Rapid Detection of Hepatitis A Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3359-3363.
14. Käferstein, F.K., Motarjemi, Y., Bettcher, D.W., 1997. Foodborne disease control: a transnational challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 503-510.
15. Melo, C.B., Sá, M.E., Sabino, V.M., Souza, A.R., Oliveira, A.M., Mota, P.M.P.C., Campani, P.R., Luna, J.O., Pinto, S.C., Schwingel, F.F., Mcmanus, C., Seixas, L., 2014a. Bacteria in Dairy Products in Baggage of Incoming Travelers, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1933-1935.

16. Melo, C.B., Sá, M.E.P., Alves, F.F., Mcmanus, C.M., Aragão, L.F., Belo, B.B., Campani, P.R., Damatta-Ribeiro, A.C., Seabra, C.I., Seixas, L., 2014b. Profile of international air passengers intercepted with illegal animal products in baggage at Guarulhos and Galeão airports in Brazil. Springerplus. 3, 69.
17. Melo, C.B., Sá, M.E., Sabino, V.M., Fernandes, M.F.B., Santiago, M.T., Schwingel, F.F., Freitas, C., Magioli, C.A., Pinto, S.C., McManus, C., Seixas, L., 2015. Microbiological detection of bacteria in animal products seized in baggage of international air passengers to Brazil. *Prev. Vet. Med.* 118, 22-27.
18. Montano, A., Barañano, R., Lageard, B., Moratorio, G., Dibarboure, H., García, A., González, M., Pérez M.C., Russi, J.C., Chiparelli, H., Ferrari, A.M., Zeballos, E., Dibarboure, M., Suárez, N., Giambruno, G., Fazio, S., 2001. Prevalencia de hepatitis A en niños de 2 a 14 años y en población laboral de 18 a 49 años en Montevideo, Uruguay. *Rev. Méd. Uruguay.* 17, 84-98.
19. Noordhuizen, J., Surborg, H., Smulders F.J., 2013. On the efficacy of current biosecurity measures at EU borders to prevent the transfer of zoonotic and livestock diseases by travellers. *Vet. Q.* 33, 161-171.
20. OIE, World Organisation for Animal Health, 2016. *Terrestrial Animal Health Code*. 25th ed. World Organisation for Animal Health, Paris. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/> (accessed 01.06.2016).
21. Pereira, J.G., Soares, V.M., Santos, E.A.R., Tadielo, L.E., Pellegrin, D.C.P., Duval, E.H., Silva, W.P., 2017. Profile of the illegal import of products of animal origin to Brazilian cities at the border with Argentina and Uruguay. *J. Food. Protec.* In Press.
22. Rodríguez-Lázaro, D., Díez-Valcarce, M., Montes-Briones, R., Gallego, D., Hernández, M., Rovira, J., 2015. Presence of pathogenic enteric viruses in illegally imported meat and meat products to EU by international air travelers. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 39-43.
23. Romero, C., Perdomo, V., Chamorro, F., Assandri, E., Pérez, M.C., Montano, A., 2012. Prevención de hepatitis A mediante vacunación en Uruguay (2005-2010). *Rev. Méd. Urug.* 28, 115-122.
24. Sa-nguanmoo, P., Posuwan, N., Vichaiwattana, P., Wutthiratkowit, N., Owatanapanich, S., Wasitthanasem, R., Thongmee, T., Poovorawan, K., Theamboonlers, A., Vongpunswad, S., Poovorawan, Y., 2015. Swine is a possible source of hepatitis E virus infection by comparative study of hepatitis A and E seroprevalence in Thailand. *PLoS One.* 10, e0126184.
25. Shukla, S., Cho, H.J., Kwon, O.J., Chung, S.H., Myunghee, K., 2016. Prevalence and evaluation strategies for viral contamination in food products: risk to human Health – a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31,0 (Epub ahead of print)
26. Spilki, F.R., Luz, R.B., Fabres, R.B., Soliman, M.C., Kluge, M., Fleck, J.D., Rodrigues, M.R., Comerlato, J., Cenci, A., Cerva, A., Dasso, M.G., Roehe,

- P.M., 2013. Detection of human adenovirus, rotavirus and enterovirus in water samples collected on dairy farms from Tenente Portela, Northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 44, 953-957.
27. Tort, L.F., Victoria, M., Lizasoain, A., García, M., Berois, M., Cristina, J., Leite, J.P., Gómez, M.M., Miagostovich, M.P., Colina, R., 2015. Detection of Common, Emerging and Uncommon VP4, and VP7 Human Group A Rotavirus Genotypes from Urban Sewage Samples in Uruguay. *Food Environ. Virol.* 7, 342-353.
  28. Vasconcelos, J., Soliman, M.C., Staggemeier, R., Heinzelmann, L., Weidlich, L., Cimirro, R., Silva, A.D., Esteves, P.A., Spilki, F.R., 2015. Molecular detection of hepatitis E virus in feces and slurry from swine farms, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 67, 777-782.
  29. Victoria, M., Tort, L.F., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Colina, R., 2014. Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol.* 6, 116-124.
  30. White, P.A., Netzler, N.E., Hansman, G.S., 2016. *Foodborne viral pathogens.* CRC Press, Boca Raton.
  31. Wilhelm, B., Leblanc, D., Houde, A., Brassard, J., Gagné, M.J., Plante, D., Bellon-Gagnon, P., Jones, T.H., Muehlhauser, V., Janecko, N., Avery, B., Rajić, A., McEwen, S.A., 2014. Survey of Canadian retail pork chops and pork livers for detection of hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus using real time RT-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 33-40

Tabela 1 – Alimentos avaliados na fronteira Brasil-Argentina-Uruguai quanto a presença de vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV)

| Produtos                       | Procedência |           | Total      |
|--------------------------------|-------------|-----------|------------|
|                                | Argentina   | Uruguai   |            |
| <b>Carnes <i>in natura</i></b> |             |           |            |
| Bovina*                        | 30          | 27        | 57         |
| Suína                          | 13          | 17        | 30         |
| Frango                         | 18          | 11        | 29         |
| Carne de caça**                | 1           | 0         | 1          |
| Total                          | 62          | 55        | 117        |
| <b>Carnes processadas</b>      |             |           |            |
| Mortadela                      | 5           | 3         | 8          |
| Salsicha                       | 8           | 4         | 12         |
| Salame                         | 9           | 5         | 14         |
| Presunto                       | 2           | 2         | 4          |
| Patê                           | 0           | 4         | 4          |
| Total                          | 24          | 18        | 42         |
| <b>Total geral</b>             | <b>86</b>   | <b>73</b> | <b>159</b> |

\*Oito amostras foram apreendidas junto à VIGIAGRO

\*\*Amostra apreendida junto à VIGIAGRO

Tabela 2 – *Primers* utilizados para a detecção de vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV)

| <b>Vírus</b> | <b>Nome</b>                    | <b>Sequência</b>                    | <b>Tamanho (pb)</b> | <b>Fonte</b>             |
|--------------|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| <b>HAV</b>   | 5'-UTR F                       | 5' GGTAGGCTACGGGTGAAAC 3'           | 100                 | Jothikumar et al. (2005) |
|              | 5'-UTR R                       | 5' GCGGATATTGGTGAGTTGTT 5'          |                     |                          |
|              | <i>Probe</i> (posição 413-441) | 5' CTTAGGCTAATACTTCTATGAAGAGATGC 5' |                     |                          |
| <b>HEV</b>   | HEVORF1con-s1                  | 5' CTGGCATYACYCTACTGCYATTGAGC 3'    | 800                 | Heldt et al. (2016)      |
|              | HEVORF1con-a1                  | 5' CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC 3'       |                     |                          |
|              | HEVORF1con-s2                  | 5' CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG 3'         | 287                 | Heldt et al. (2016)      |
|              | HEVORF1con-a2                  | 5' GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC 3'      |                     |                          |
| <b>RV</b>    | ROTAFAEEVALE F                 | 5' GATGTCCTGTACTCCTTGT 3'           | 160                 | Spilki et al. (2013)     |
|              | ROTAFAEEVALE R                 | 5' GGTAGATTACCAATTCCTCC 3'          |                     |                          |

Tabela 2 - Frequência e razão de chance (OR) para a presença de vírus da hepatite A (HAV), hepatite E (HEV) e rotavírus (RV) em produtos de origem animal obtidos da Argentina e Uruguai

| Vírus/alimentos          | Procedência         |                      | Total               | P Valor <sup>1</sup> | OR (IC 95%) <sup>1</sup> |
|--------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|--------------------------|
|                          | Argentina           | Uruguai              |                     |                      |                          |
| <b>HEV</b>               | 0/86 (0%)           | 0/73 (0%)            | 0/159 (0%)          |                      |                          |
| <b>HAV</b>               |                     |                      |                     |                      |                          |
| Carnes <i>in natura</i>  | 12/62 (19,35%)      | 5/55 (9,09%)         | 17/117 (14,52%)     | 0,116                | 0,417 (0,137-1,127)      |
| Carnes processadas       | 8/24 (33,33%)       | 4/18 (22,22%)        | 12/42 (28,57%)      | 0,506                | 0,571 (0,141-2,131)      |
| Total                    | 20/86 (23,25%)      | 9/73 (12,32%)        | 29/159 (18,23%)     | 0,075                | 0,464 (0,197-1,095)      |
| P Valor <sup>2</sup>     | 0,169               | 0,141                | 0,043               |                      |                          |
| OR (IC 95%) <sup>2</sup> | 2,083 (0,724-5,995) | 2,857 (0,675-12,085) | 2,353 (1,012-5,473) |                      |                          |
| <b>Rotavírus</b>         |                     |                      |                     |                      |                          |
| Carnes <i>in natura</i>  | 21/62 (33,87%)      | 4/55 (7,27%)         | 25/117 (21,36%)     | 0,001                | 0,153 (0,049-0,481)      |
| Carnes processadas       | 10/24 (41,66%)      | 3/18 (16,66%)        | 13/42 (30,23%)      | 0,083                | 0,280 (0,064-1,132)      |
| Total                    | 31/86 (36,04%)      | 7/73 (9,58%)         | 38/159 (23,89%)     | 0,001                | 0,118 (0,77-0,460)       |
| P Valor <sup>2</sup>     | 0,499               | 0,240                | 0,212               |                      |                          |
| OR (IC 95%) <sup>2</sup> | 1,395 (0,530-3,668) | 2,55 (0,513-12,679)  | 1,65 (0,749-3,633)  |                      |                          |

<sup>1</sup>Valor de P e OR para comparação do mesmo tipo de produto de origem diferente P < 0,05 indica associação da presença do patógeno.

<sup>2</sup>Valor de P e OR para comparação de produtos diferentes da mesma origem onde P < 0,05 indica associação da presença do patógeno.

**6 Capítulo 4 – Residues of veterinary drugs in animal products commercialised in the border region between Brazil, Argentina and Uruguay**

Manuscrito a ser enviado para publicação no periódico *Food Additives & Contaminants: Part A* (ISSN 1944-0057)



**Título:** Residues of veterinary drugs in animal products commercialised in the border region between Brazil, Argentina and Uruguay

Juliano Gonçalves Pereira<sup>a,b\*</sup>, Vanessa Mendonça Soares<sup>b</sup>, Fabiano Barreto<sup>c</sup>, Louise Jank, Renata Batista Rau<sup>c</sup>, Cristina Belíssimo Dias Ribeiro<sup>c</sup>, Tamara dos Santos Castilhos<sup>c</sup>, Caroline Andrade Tomaszewski<sup>c</sup>, Daniel Rodrigo Hillesheim<sup>c</sup>, Eduarda Hallal Duval<sup>a</sup>, Wladimir Padilha da Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão. Avenida Eliseu Maciel, s/n, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 96010900.

<sup>b</sup>Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. BR 472, Km 585, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 97501970.

<sup>c</sup>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários - Laboratório Nacional Agropecuário. Estrada da Ponta Grossa, 3036, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91780580.

\* Corresponding authors:

Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul – RS, Brazil, CEP 96010-900, Phone: +55 53 32757378

Email: [julianopereira@unipampa.edu.br](mailto:julianopereira@unipampa.edu.br) (J.G. Pereira),  
[wladimir.padilha2011@gmail.com](mailto:wladimir.padilha2011@gmail.com), (W.P. Silva)

## **Abstract**

International animal products traffic is a public health hazard when legal import sanitary procedures are not followed. In Brazil, due to its extensive border area, illegal animal products import is a common practice in many areas of the country; especially in Rio Grande do Sul (RS), a state that borders on Argentina and Uruguay. The objective of this study was to evaluate the presence of veterinary drug residues (antimicrobials and antiparasitics) in animal products consumed in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, border region with Argentina and Uruguay. In this study, the presence of residues of veterinary drugs (antimicrobials and antiparasitics) was assessed in 189 meat (beef, pork and chicken) and dairy and meat processed products samples, bought in Argentina (n=90) and Uruguay (n=99). Residues of veterinary drugs were detected in 50 (26.45%) samples, 28 presenting antimicrobials (14.81%) and 22 antiparasitic (11.64%) residues. From the 50 positive samples, 40% (15 from Argentina and 5 from Uruguay) had a maximum residue limit (MRL) above the legal parameters. From these, 12 presented MRL values above the legal limit for antiparasitics (11 beef samples with ivermectin and one pork sample with ivermectin and doramectin) and 8 for antimicrobials (two pork and two sausage samples with doxycycline; two cheese samples with doxycycline and chlortetracycline; one poultry meat sample with chloramphenicol; and one cheese sample with monensin). Due to its undesirable toxic effects on humans and the antimicrobial resistance, the presence of these residues above the legal parameters indicates a risk to the public health. The negative impact on public health of the consumption of illegally imported animal products can be reduced with an effective surveillance system and educational campaigns for the general populations.

**Keywords:** chloramphenicol; border; ivermectin; animal products; chemical residues.

## 6.1 Introduction

Illegal international transit of animal products may pose a risk to public and animal health (OIE 2016a). Meat and milk, including their products, may present chemical and biological hazards, particularly where commercialization does not comply with sanitary rules to assure their safety. In this context, international border regions have been identified as places where illegal animal products traffic between different countries can endanger the public health (Joseph et al. 2013; Nguyen et al. 2014; Oniuc et al. 2015).

Rio Grande do Sul (RS), a Brazilian southern region state, has an extensive border with Argentina and Uruguay, in which, despite the efforts of border health surveillance agencies, the transit of animal products and animals between countries occurs clandestinely. Many of the products that are commercialized across these borders are produced without proper sanitary control of the raw material, compromising their innocuousness and exposing consumers to numerous hazards. The risks for public health include veterinary drug residues, widely used in animal production to prevent and cure diseases. As observed in other countries, currently in Brazil, the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (Brasil 2016) authorizes the entry of processed animal products from international borders. These authorization and has been questioned for requiring a border health surveillance apparatus to prevent the entry of products that could lead to biological and chemical hazards (Noordhuizen et al. 2013).

Veterinary drug residues can be defined as a fraction of the drug, its metabolites, conversion or reaction products and impurities that remain in the animal products originated from treated animals (Brasil 1999). Drug use results in the presence of chemical residues in animal tissues and products, however, if administration is properly performed (dose, concentration, route of administration) and the withdrawal period is respected, such residues will be in concentrations below the maximum residue limit (MRL) (Reig & Toldra 2008). MRL is defined as the legally accepted limit for the presence of specific residue in the animal product, this parameter is determined according to the acceptable maximum daily intake limit

(FAO 2015). Consumption of animal products with drug residue concentrations above the MRL may result in toxic and/or allergic reactions or even induce carcinogenic, mutagenic or teratogenic effects (Doyle 2006; Beyene et al. 2016).

The most commonly used veterinary drugs are antimicrobials ( $\beta$ -lactams, tetracyclines, fluoroquinolones, sulfonamides and macrolides) (OIE 2016b) and antiparasitics (ivermectins and benzimidazole). For these, health authorities establish the permitted MRLs for each matrix (kidneys, liver, muscle, fat, milk or eggs) (Chopra & Roberts 2001; Navrátilová et al. 2009; European Commission 2010; Prado et al. 2015; Brasil 2017). Some drugs are banned due to their insecurity in administration and highly toxic effects for humans. Chloramphenicol is banned in several countries due to its relation to the occurrence of aplastic anaemia and cancer, even if present in low levels (Croubels & Daeseleire 2012; Rejtharová et al. 2017).

In Brazil, the monitoring of chemical residues in animal products is conducted by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), which, through the National Plan for the Control of Residues and Contaminants (PNCRC), aims the control and surveillance to identify and avoid violation of MRLs in the animal products produced in the country (Brasil 1999). As health authorities do not inspect products illegally commercialised across borders, public health is compromised.

Thus, the objective of this study was to evaluate the presence of veterinary drug residues (antimicrobials and antiparasitics) in animal products consumed in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, border region with Argentina and Uruguay.

## **6.2 Materials and methods**

### **6.2.1 Sample collection**

Samples were collected from two different sources:

(1) Animal products confiscated after baggage inspection carried out by the MAPA International Agricultural Surveillance Unit (VIGIAGRO), at Getúlio Vargas - Agustín Pedro Justo International Bridge (29°45'18"S, 57°05'16"O) between

Urugaiana (RS, Brazil) and Paso de Los Libres (Province of Corrientes, Argentina). From July to November 2015, six beef samples were confiscated and sent for laboratory analysis. It should be noted that these samples do not represent the total of seized products by the VIGIAGRO unit, i.e., not all seized samples were sent for analysis.

(2) Animal products bought in commercial establishments from Paso de Los Libres, Province of Corrientes, Argentina (29°43'00"S, 57°05'00"O) and Rivera, Department of Rivera, Uruguay (30°54'09"S, 55°33'02"O) and internalized in Brazil with authorization and supervision of VIGIAGRO. One hundred and eight three samples (84 in Paso de Los Libres and 99 in Rivera) of raw and processed animal products were obtained (Table 1). The samples were collected between September 2015 and November 2016 and kept frozen at -18°C, in plastic bags, until analysis.

### **6.2.2 Detection of veterinary drug residues**

Detection of veterinary drugs residues was carried out by the Laboratory for Analysis of Pesticides and Veterinary Drugs of the National Agricultural and Livestock Laboratory (LANAGRO/MAPA), official organ of the Brazilian PNCRC.

The detection of the drugs listed in Table 2 was performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Chemical reagents used were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germany), JT Baker (Phillipsburg, USA), Mallinckrodt-Baker (Phillipsburg, USA), Vetec (Rio de Janeiro, Brazil), Honeywell Riedel-de Haen or Macherey-Nagel (Düren, Germany).

For chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues detection, extraction from samples were performed with ethyl acetate and 2% of ammonium hydroxide followed by evaporation and lipid removal with hexane. Water and acetronil were used for liquid-liquid extraction. The analysis was conducted on an Agilent 1260 LC liquid chromatograph (Agilent Technologies, Germany) coupled to the Mass Spectrometer Sciex 5500 QTRAP (Toronto, Canada). Details of the technique, analytical and instrumental parameters are described in Barreto et al. (2016).

For analysis of the other antimicrobials and antiparasitics, the samples were extracted with acetronil and formic acid followed by purification at low temperature. Analysis was conducted on an Agilent 1100 LC liquid chromatograph (Agilent Technologies, Germany) coupled to the Applied Biosystems API 500 mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, USA). Analytical and instrumental parameters are described in Rübensam et al. (2013) and Jank et al. (2017).

The standard MRLs used were those published by MAPA (Brasil 2014) and European Commission (European Commission 2010). The results were expressed as <LOD (less than limit of detection or negative sample for analyte), >LOD (greater than limit of detection or positive sample for analyte) and >MRL (positive sample and MRL greater than legal standard parameter).

### **6.3 Results and discussion**

On our knowledge, this is the first study to describe chemical residues on illegally imported animal products. Residues of veterinary drugs were detected in 50 (26.45%) of the 189 animal products evaluated, 28 with antibiotic (14.81%) and 22 (11.64%) with antiparasitic residues (Table 3). The antimicrobials detected were monensin, doxycycline, oxytetracycline, chlortetracycline, chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol. Ivermectin and doramectin were the antiparasitic residues detected.

Argentinian products showed higher frequency of residue detection than those from Uruguay. From the 90 Argentinian products, 33 (36.16%) had some residue (15 samples (16.66%) with antimicrobials residues and 18 samples (20%) with antiparasitics residues). Residues were detected in 17 samples (17.17%) of Uruguayan products (n=99). Antimicrobials were detected in 13 samples (13.13%) and antiparasitics in four samples (4.04%).

Of the 50 animal products' samples with residues, 31 (59.61%) were raw products (23 of beef, four of poultry meat and four of pork), from this, 24 were obtained in Argentina. The 19 positive samples (10 Uruguayan and nine Argentinian) of processed products, were distributed as follow: 9 samples of cheese, four of

sausage, two of dulce de leche, one of mortadella, one of cream, one of yogurt, and one of salami.

From the 50 positive samples, 20 (10.58% - 15 raw and five processed products) had MRL values above the legal parameters (European Commission 2010; Brasil 2014). Fifteen of these products were purchased in Argentina (14 raw and 1 processed) and five in Uruguay (one raw and four processed). Regarding residue type, 12 had antiparasitics residues and eight antimicrobials residues. All samples from products confiscated in baggage inspection (n=6) had ivermectin residues, four of them with MRL above the legislation. Values are described in Table 4.

Our study showed a high percentage (10.58% - 20/189) of samples with MRL values above the legal parameters. This frequency was far above the normally observed in the official residue monitoring programs regularly carried out in the countries (Argentina 2017; Brasil 2015, 2016; Uruguay 2016), denoting a threat for public health. Argentina, Brazil and Uruguay, as MERCOSUR member countries, share MRL values for several chemical residues (Mercosul 1995). Each country should establish monitoring programs to ensure food safety.

In 2014 and 2015, Brazilian PNCRC analysed 25,320 samples of animal products, finding 143 (0.56%) samples with MRLs higher than the maximum established (Brasil 2015, 2016). Data from Argentina's National Service of Sanitation and Agrifood Quality (SENASA) indicate that in 2015, from the 24,024 samples of beef, pork and poultry meat evaluated, 228 (0.94%) were considered non-conforming (Argentina 2017). In Uruguay, the National Program of Biological Residues (PNR) analysed 5,977 beef samples, detecting five (0.08%) with MRLs higher than recommended, four of which had residues of cadmium and one had ivermectin residue (Uruguay 2016).

Higher MRLs values for ivermectin were found in 11 beef samples (from 11.12 to 126.99  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and ivermectin-doramectin (13.89  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 41.01  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively) together were found in one pork sample, all from Argentina. Ivermectin is a widely used antiparasitic drug, especially in cattle (Lopes et al. 2014). Brazilian PNCRC detected that antiparasitic residues corresponded to 70% and 100% of the beef samples with MRLs above limits the in the years 2014 and 2015, respectively (Brasil 2015, 2016). Despite the percentage of samples with high MRLs for antiparasitics found in our study, Argentina's official control did not detect these analytes in beef (Argentina 2017). The presence of avermectin residues (abamectin,

doramectin, ivermectin) demonstrates inadequate veterinary drug management and/or administration practices (FAO/WHO 2009) and ineffective or non-existent health education programs for rural producers.

In humans, signals of avermectins intoxication by ingestion of foods vary in severity, depending on the dose and route of administration. Acute intoxication normally causes allergic symptoms, vomiting, tachycardia and myalgia (Reeves 2007; Yang 2012). Besides the public health concerns, residues above the tolerated MRL can influence meat trade, since they may constitute a non-tariff barrier (Costa 2011).

Considering the eight samples that presented high MRL for antibiotic, four samples (two from Argentinean pork and two from Uruguayan sausages) had high doxycycline levels (from 118.80 to 162.30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), two (Uruguayan cheese) had high doxycycline and chlortetracycline levels (sum of the antimicrobials concentration varied from 106.30 to 281.80  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and one had high monensin level (Uruguayan cheese - 2.09  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). In addition, chloramphenicol (0.31  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) was also found in a sample of poultry meat from Uruguay. Antimicrobials have an important role in animal industry controlling pathogens, however, a veterinarian should supervise the use of these drugs to avoid the presence of residues in animal products. In addition, antimicrobial resistance is currently one of the most important public health concerns, with clinical and economic consequences (OIE 2016a; FAO/WHO 2009).

Tetracyclines are antibiotic drugs widely used in animal industry due to the action against Gram-negative and Gram-positive bacteria (Chopra & Roberts 2001). The Brazilian PNCRC monitoring system detected tetracycline residues above the MRL in pork and poultry meat samples during 2014 and 2015 (Brazil 2015, 2016). Navrátilová et al. (2009) detected tetracycline residues in milk samples from the Czech Republic and Prado et al. (2014) detected oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in Brazilian milk samples. Toxic effects of these drugs to humans implicate hypersensitivity reactions and increased susceptibility to new infections, due to the possibility of Gram-negative bacteria antibiotic resistance. Less frequently, hepatotoxic and nephrotoxic effects, as well as negative effects on bone and dental mineralization can also be observed (FAO/WHO 1996). On the other hand, mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects from intoxication by this group of antimicrobials are not described (Doyle 2006).



Monensin, detected above MRLs in a cheese sample, is largely used in animal industry as growth promoter and coccidiostat (Duffield & Bagg 2000; Chapman et al., 2010). Non-observance of withdrawal period caused the presence of residues of this drug in animal products (Olejnik et al. 2011; Pereira et al. 2015). The undesirable effects polyester ionophores (lasalocid, maduramicin, monensin, narasin, salinomycin and senduramycin) in humans involves their influence on muscle contractility causing effects such as increased blood flow and coronary dilatation, affecting mainly people with coronary heart disease (Croubels & Daeseleire 2012).

Due to its highly toxic effects, detection of chloramphenicol in poultry meat is a very relevant result of our study. From the end of the 1980s, several countries, including Brazil, Argentina and Uruguay, banned the chloramphenicol use in animal industry (Uruguay 1986; Argentina 1995; Brazil 2003). Beyond its carcinogenic effects, this drug can cause aplastic anaemia in humans (Hanekamp & Bast 2015). Due the efficacy against bacteria as *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* (Cerkvenik 2002) chloramphenicol is still illegally used in animal industry. In 2014 and 2015, Brazilian monitoring system detected one poultry meat sample with chloramphenicol, over 25,000 analysed samples (Brazil 2015, 2016). Slovenia's monitoring program detected the presence of this antimicrobial in only one sample between 1991 and 2000 (Cerkvenik 2002). In contrast, Argentina and Uruguay did not detect chloramphenicol in animal products (Uruguay 2016; Argentina 2017). Chloramphenicol in animal products also caused economic losses in beef (Argentina 2016) and shrimp (Hanekamp & Bast 2015) international market.

## 6.4 Conclusions

Antibiotic and antiparasitic residues were detected in 50 samples (26.45%) of raw and processed animal products, 20 samples (10.58%) had MRL above legal parameters, 12 for antimicrobials and eight for antiparasitics. Besides the alert for the general population, our results indicate necessity of more intensive actions of the international border surveillance agencies, to control the entry of animal products, reducing sanitary and public health risks.

## 6.5 References

1. Argentina. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Resolución 253/95 SENASA. Boletín Oficial 28.147, 1995.
2. Argentina. SENANA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria [internet]. 2016. Se investiga la existencia de un antibiótico prohibido en carne bovina exportada a China; [cited 2017 18 Apr]. Available from: <http://www.senasa.gov.ar/senasa-comunica/noticias/se-investiga-la-existencia-de-un-antibiotico-prohibido-en-carne-bovina-exportada-china>.
3. Argentina. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria [internet]. 2017. Resumen de Resultados - Plan CREHA 2015; [cited 2017 18 Apr]. Available from: <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/produccion-primaria/control-de-residuos-plan-creha>.
4. Barreto F, Ribeiro C, Hoff RB, Dalla Costa T. 2016. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1449:48-53.
5. Beyene T. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. 2016. *J Veterinar Sci Technol*. 7:285.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa 42, de 20 de dezembro de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 dez. Seção 1, p.213, 1999.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 9, de 27 de Junho de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 mar, Seção 1, p.1-2, 2003.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11, de 07 de Maio de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 maio, Seção 1, p.5, 2014.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 22, de 07 de abril de 2015. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2015.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [internet]. 2016. Resultados gerais do subprograma de monitoramento e subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC 2015; [cited 2017 18 Apr]. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/resultados-pncrc-2015.pdf>

11. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11, de 10 de maio de 2016, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 maio, Seção 1, p.18, 2016.
12. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 09, de 21 de fevereiro de 2017. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 8 mar, Seção 1, p.4, 2017.
13. Cerkvénik V. 2002. Analysis and monitoring of chloramphenicol residues in food of animal origin in Slovenia from 1991 to 2000. *Food Addit Contam.* 19:357-367.
14. Chapman HD, Jeffers TK, Williams RB. 2010. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult Sci.* 89:1788-1801.
15. Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracyclines antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:232-260.
16. Costa L [internet]. 2011. Rejeição de carne pelos EUA exige atenção; [cited 2017 18 Apr]. Available from: <http://economia.estadao.com.br/noticias/negocios,rejeicao-de-carne-pelos-eua-exige-atencao,81390e>.
17. Croubels S, Daeseleire, E. 2012. Chemical contaminants and residues in food. Woodhead Publishing Limited: Cambridge. Chapter 7, Veterinary drug residues in food; p. 148-182.
18. Doyle ME. 2006. Veterinary Drug Residues in Processed Meats-Potential Health Risk. A Review of the Scientific Literature. FRIBRIEFINGS, Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison; p.1-8.
19. Duffield TF, Bagg RN. 2000. Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. *Can Vet J.* 41:388-394.
20. European Commission. 2010. Regulamento UE 37/2010 da Comissão de 22 de dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Off J Eur Comm.* L15:1-72.
21. FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations /World Health Organization [internet]. 1996. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food; [cited 2017 18 Apr]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43506/1/9241660570\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43506/1/9241660570_eng.pdf).
22. FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations /World Health Organization [internet]. 2009. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food; [cited 2017 18 Apr]. Available from: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chemical-food/en/>
23. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. [internet]. 2015. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods - CAC/MRL 2-2015; [cited 2017 18 Apr]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/veterinary-drugs-mrls/pt/>

24. Hanekamp JC, Bast A. 2015 Antibiotics exposure and health risks: chloramphenicol. *Environ Toxicol Pharmacol.* 39:213-220.
25. Jank L, Martins MT, Arsand JB, Motta TMC, Feijó TC, Castilhos TS, Hoff RB, Barreto F, Pizzolato TM. 2017. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Multiclass Method for 46 Antibiotics Residues in Milk and Meat: Development and Validation. *Food Anal Methods.* 10:1-13.
26. Joseph R, Thornton A, Waterman SH. 2013. Crossing Borders - Unpasteurized Cheese a Public Health Challenge for Hispanic and US–Mexico Binational Communities. *Clin Infect Dis.* 57:5-6.
27. Lopes WDZ, Teixeira WF, Felipelli G, Cruz BC, Maciel W, Soares VE, Santos TR, Matos LM, Favero F, Costa AJ. 2014. Assessing resistance of ivermectin and moxidectin against nematodes in cattle naturally infected using three different methodologies. *Res Vet Sci.* 96:136-138.
28. Mercosul. Limites Máximos de Resíduos de princípios ativos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal. Mercosul/GMC/RES 75/94. 1995.
29. Navrátilová P, Ová IB, Dračková M, Janštová B, Vorlová L. 2009. Occurrence of Tetracycline, Chlortetracyclin, and Oxytetracycline Residues in Raw Cow's Milk. *Czech J Food Sci.* 27:379-385.
30. Nguyen AV, Cohen NJ, Gao H, Fishbein DB, Keir J, Ocana JM, Senini L, Flores A, Waterman SH. 2014. Knowledge, attitudes, and practices among border crossers during temporary enforcement of a formal entry requirement for Mexican-style soft cheeses, 2009. *J Food Prot.* 77:1571-1578.
31. Noordhuizen J, Surborg H, Smulders FJ. 2013. On the efficacy of current biosecurity measures at EU borders to prevent the transfer of zoonotic and livestock diseases by travellers. *Vet Q.* 33:161-171.
32. OIE – World Organisation for Animal Health [internet] 2016a. Terrestrial Animal Health Code - 25th ed.; [cited 2017 18 Apr]. Available from: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>
33. OIE - World Organisation for Animal Health [internet]. 2016b. OIE Annual report on the use of antimicrobial agents in animals, 2017; [cited 2017 18 Apr]. Available from: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/Survey\\_on\\_monitoring\\_antimicrobial\\_agents\\_Dec2016.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/Survey_on_monitoring_antimicrobial_agents_Dec2016.pdf).
34. Olejnik M, Szprengier-Juszkiewicz T, Jedziniak P, Sledzińska E, Szymanek-Bany I, Korycińska B, Pietruk K, Zmudzki J. 2011. Residue control of coccidiostats in food of animal origin in Poland during 2007-2010. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 4:259-67.
35. Oniciuc EA, Ariza-Miguel J, Bolocan AS, Diez-Valcarce M, Rovira J, Hernández M, Fernández-Natal I, Nicolau AI, Rodríguez-Lázaro D. 2015. Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int J Food Microbiol.* 209:37-38.

36. Pereira MU, Spisso BF, Jacob SC, Ferreira RG, Monteiro MA, Costa RF, Nóbrega AW. 2015. Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite UHT comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro. *Vigil sanit debate*. 3:70-77.
37. Prado CK, Ferreira FD, Bando E, Machinski Jr. M. 2015. Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in pasteurised cow's milk commercialised in Brazil. *Food Addit Contam Part B*. 8:81-84.
38. Reeves PT. 2007. Residues of veterinary drugs at injection sites. *J Vet Pharmacol Ther*. 30:1-17.
39. Reig M, Toldra F. 2008. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Sci*. 78:60-67.
40. Rejtharová M, Rejthar L, Bureš J, Vernerová E, Hera A. 2017. Persistence of chloramphenicol residues in chicken muscle tissue after a therapeutic dose administration. *Food Addit Contam Part B*. 34:547-551.
41. Rübensam G, Barreto F, Hoff RB, Pizzolato TM. 2013. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. *Food Control*. 29:55-60.
42. Uruguai. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [internet]. 2016. Programa Nacional de Residuos Biológicos Sustancias y Matrices evaluadas Resultados del Programa de Residuos en Alimentos 2015; [cited 2017 18 Apr]. Available from: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-ganaderos/institucional/programa-nacional-de-residuos-biologicos/sustancias-y-matrices>.
43. Uruguai. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [internet]. 1986. Resolución del MGAP de 27 de noviembre de 1986. Se cancelan las autorizaciones concedidas hasta el presente para la importación, fabricación y venta y uso de los productos veterinarios a base de cloranfenicol; [cited 2017 18 Apr]. Available from: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/resolucionministerial27\\_11\\_86.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/resolucionministerial27_11_86.pdf).
44. Yang CC. 2012. Acute Human Toxicity of Macrocyclic Lactones. *Curr Pharm Biotechnol*. 13:999-1003.

Table 1 – Animal products evaluated at the Brazil-Argentina-Uruguay border for the presence of antimicrobials and antiparasitics residues

| Animal product        | Origin    |         | Total |
|-----------------------|-----------|---------|-------|
|                       | Argentina | Uruguay |       |
| <b>Beef</b>           | 28*       | 27      | 55    |
| <b>Pork</b>           | 11        | 11      | 22    |
| <b>Poultry meat</b>   | 17        | 11      | 28    |
| <b>Meat products</b>  |           |         |       |
| <b>Mortadella</b>     | 5         | 4       | 9     |
| <b>Ham</b>            | 5         | 6       | 11    |
| <b>Pate</b>           | 0         | 4       | 4     |
| <b>Salami</b>         | 3         | 1       | 4     |
| <b>Sausage</b>        | 7         | 4       | 11    |
| <b>Dairy products</b> |           |         |       |
| <b>Cheese</b>         | 9         | 10      | 19    |
| <b>Dulce de leche</b> | 1         | 8       | 9     |
| <b>Cream</b>          | 1         | 1       | 2     |
| <b>Yogurt</b>         | 3         | 12      | 15    |
| <b>Total</b>          | 90        | 99      | 189   |

\*Six samples were confiscated by VIGIAGRO / MAPA

Table 2 – Veterinary drugs evaluated by LC-MS/MS in animal products on the Brazil-Argentina-Uruguay border

| <b>Animal product</b>         | <b>Group</b>           | <b>Analyte</b>  |
|-------------------------------|------------------------|---|
| <b>Meat and meat products</b> | <b>ATB<sup>1</sup></b> | Nalidixic acid, Oxolinic acid, Azithromycin, Ciprofloxacin, Clindamycin, Chloramphenicol, Chlortetracycline, Danofloxacin, Difloxacin, Doxycycline, Enrofloxacin, Erythromycin, Spiramycin, Florfenicol, Flumequine, Lincomycin, Monensin, Norfloxacin, Oxytetracycline, Sarafloxacin, Sulfaclopiridazine, Sulfadiazine, Sulfadimethoxine, Sulfadoxine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfamethoxazole, Sulfaquinoxaline, Sulfathiazole, Tetracycline, Tianfenicol, Tilmicosin and Tylosin.  |
|                               | <b>ATP<sup>2</sup></b> | Abamectin, Doramectin, Eprinomectin, Ivermectin and Moxidectin  |
| <b>Dairy products</b>         | <b>ATB</b>             | Nalidixic acid, Oxolinic acid, Amoxicillin, Ampicillin, Azithromycin, Bromexin, Cephalexin, Cephalone, Cefapirine, Cefoperazone, Cefquinoma, Ceftiofur, Ciprofloxacin, Clindamycin, Chloramphenicol, Chlortetracycline, Cloxacillin, Danofloxacin, Dicloxacillin, Difloxacin, Doxycycline, Enrofloxacin, Erythromycin, Spiramycin, Florfenicol, Flumequine, Lincomycin, Monensin, Nafcillin, Norfloxacin, Oxacillin, Oxytetracycline, Penicillin G, Penicillin V, Sarafloxacin, Sulphlorpyridazine, Sulphadiazine, Sulfadimethoxine, Sulfadoxine, Sulfadoxine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfamethoxazole, Sulfaquinoxaline, Sulfathiazole, Sulfizoxazole, Tetracycline, Tianfenicol, Tilmicosin, Tylosin and Trimethoprim |
|                               | <b>ATP</b>             | Abamectin, Doramectin, Eprinomectin, Ivermectin and Moxidectin  |

<sup>1</sup>ATB = Antimicrobials<sup>2</sup>ATP = Antiparasitics

Table 3 – Number and frequency of samples of animal products evaluated for the presence of antimicrobials and antiparasitic residues in the Brazil-Argentina-Uruguay border.

| Country             | Animal Product       | Antimicrobial (n and %) |                    |                    | Antiparasitics (n and %) |                   |              |
|---------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|--------------|
|                     |                      | n<LOD <sup>1</sup>      | n>LOD <sup>2</sup> | n>MRL <sup>3</sup> | n<LOD                    | n>LOD             | n>MRL        |
| Argentina           | Beef (n=28)          | 25 (89.28)              | 3 (10.71)          | 0 (0)              | 13 (46.43)               | 15 (53.57)        | 11 (39.29)   |
|                     | Pork (n=11)          | 9 (81.81)               | 2 (18.18)          | 2 (18.18)          | 10 (90.91)               | 1 (9.09)          | 1 (9.09)     |
|                     | Poultry meat (n=17)  | 14 (82.35)              | 3 (17.65)          | 0 (0)              | 17 (100.00)              | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Mortadella (n=5)     | 5 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 4 (80.00)                | 1 (20.00)         | 0 (0)        |
|                     | Ham (n=5)            | 5 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 5 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Salami (n=3)         | 2 (66.66)               | 1 (33.33)          | 0 (0)              | 3 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Sausage (n=7)        | 6 (85.71)               | 1 (14.29)          | 0 (0)              | 6 (85.71)                | 1 (14.29)         | 0 (0)        |
|                     | Cheese (n=9)         | 5 (55.55)               | 4 (44.44)          | 1 (11.11)          | 9 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Dulce de leche (n=1) | 1 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 1 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Cream (n=1)          | 0 (0)                   | 1 (100.00)         | 0 (0)              | 1 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Yogurt (n=3)         | 3 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 3 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
| <b>Total (n=90)</b> | <b>75 (83.33)</b>    | <b>15 (16.66)</b>       | <b>3 (3.33)</b>    | <b>72 (80.00)</b>  | <b>18 (20.00)</b>        | <b>12 (13.33)</b> |              |
| Uruguay             | Beef (n=27)          | 26 (96.30)              | 1 (3.7)            | 0 (0)              | 23 (85.18)               | 4 (14.82)         | 0 (0)        |
|                     | Pork (n=11)          | 10 (90.91)              | 1 (9.09)           | 0 (0)              | 11 (100.00)              | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Poultry meat (n=11)  | 10 (90.91)              | 1 (9.09)           | 1 (9.09)           | 11 (100.00)              | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Mortadella (n=4)     | 4 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 4 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Ham (n=6)            | 6 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 6 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Pate (n=4)           | 4 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 4 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Salami (n=1)         | 1 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 1 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Sausage (n=4)        | 2 (50.00)               | 2 (50.00)          | 2 (50.00)          | 4 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Cheese (n=10)        | 5 (50.00)               | 5 (50.00)          | 2 (20.00)          | 10 (100.00)              | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Dulce de Leche (n=8) | 6 (75.00)               | 2 (25.00)          | 0 (0)              | 8 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Cream (n=1)          | 1 (100.00)              | 0 (0)              | 0 (0)              | 1 (100.00)               | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | Yogurt (n=12)        | 11 (91.67)              | 1 (8.33)           | 0 (0)              | 12 (100.00)              | 0 (0)             | 0 (0)        |
|                     | <b>Total (n=99)</b>  | <b>86 (86.86)</b>       | <b>13 (13.13)</b>  | <b>5 (5.05)</b>    | <b>95 (95.95)</b>        | <b>4 (4.04)</b>   | <b>0 (0)</b> |

1n <LOD = Number of samples with values below the limit of detection.

2n > LOD = Number of samples with values higher than the limit of detection.

3n > MRL = Number of samples with values higher than the MRL for at least one of the analytes.



Table 4 – Samples (n = 20) with values higher than the Maximum Residue Limit (MRL) for the evaluated analytes

| Analyte                                 | Animal product                   | Country <sup>#</sup> | MRL ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ or $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Reference* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ or $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |
|---|----------------------------------|----------------------|--|---|
| <b>Doxiciclin</b>                       | Pork                             | ARG                  | 162.30   | 100.00 <sup>(A)</sup> ; 100.00 <sup>(B)</sup>                 |
|   | Pork                             | ARG                  | 102.10   |   |
|   | Sausage                          | URU                  | 122.50   |   |
|   | Sausage                          | URU                  | 118.80   |   |
| <b>Doxiciclin and Chlortetracycline</b> | Cheese                           | URU                  | 130.40/151.40  | Sum=100.00 <sup>(A)</sup> ; 100.00 e 100.00 <sup>(B)</sup>    |
|   | Cheese                           | URU                  | 63.70/42.60  |   |
| <b>Chloranphenicol</b>                  | Poultry meat                     | URU                  | 0.31   | 0.30 <sup>(A)**</sup>   |
| <b>Monensinn</b>                        | Cheese                           | ARG                  | 2.09   | 2.00 <sup>(A)</sup>   |
| <b>Ivermectin</b>                       | Beef                             | ARG                  | 126.99   | 10.00 <sup>(A)</sup> ; 100.00 <sup>(B)</sup>                  |
|   | Beef                             | ARG                  | 57.03  |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 20.17  |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 19.08 <sup>***</sup>                                   |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 17.43 <sup>***</sup>                                   |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 17.16 <sup>***</sup>                                   |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 16.67  |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 12.53  |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 11.94 <sup>***</sup>                                   |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 11.68  |   |
|   | Beef                             | ARG                  | 11.12  |   |
|   | <b>Ivermectin and Doramectin</b> | Pork                 | ARG  | 13.89/41.01   |

\* MRL Reference: <sup>A</sup>PNCRC (Brasil 2014); <sup>B</sup>European Union (European Commission 2010).

\*\* Substance of prohibited use. The value corresponds to the Minimum Required Performance Limit (MRPL) for the analysis. The MRPL is the baseline for action.

\*\*\* Samples confiscated by VIGIAGRO / MAPA.

#ARG – Argentina; URU – Uruguay.

## 7 Conclusões

A importação ilegal de alimentos é prática comum nas cidades de fronteira com a Argentina e Uruguai e os principais produtos introduzidos no Brasil são os derivados do leite, seguido de carnes *in natura* e processadas. O conhecimento de riscos associados à introdução de alimentos no Brasil sem fiscalização influenciou na decisão de importação ilegal de produtos de origem animal.

*Salmonella* spp. foi isolada de produtos *in natura* oriundos da Argentina. *Listeria monocytogenes* foi isolada em produtos *in natura* da Argentina e Uruguai. Em nenhum dos produtos processados foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, sugerindo que estes podem ser seguros quanto à presença destes patógenos. No entanto, na pesquisa viral, produtos cárneos *in natura* e processados apresentaram-se contaminados com HAV e RV. Não foram detectadas amostras com *E. coli* O157:H7 e HEV.

Resíduos de antibióticos (doxiciclina, clortetraciclina, cloranfenicol e monensina) em valores que extrapolam os LMR foram detectados em produtos *in natura* e processados obtidos tanto na Argentina quanto no Uruguai. Resíduos de antiparasitários (ivermectina e doramectina) foram detectados em amostras da Argentina.

## Referências

1. ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2016**. Disponível em: <[http://abpa-br.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)> Acesso em: 06 jun. 2017.
2. ALVES, D.D.; R.H.T.B., GOES; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasil**, v.6, n.3, 2005.
3. ANDREWS, W.H.; WANG, H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T.; *Salmonella* spp.. In: United States Food and Drug Administration (Ed.), Bacteriological Analytical Manual. 8th Edition, Revision A, 2016 Disponível em:< <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 24 mai 2017.
4. ARGENTINA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. **Resolucion 253/95 SENASA**. Boletin Oficial 28.147, 1995.
5. ARGENTINA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. **Se investiga la existencia de un antibiótico prohibido en carne bovina exportada a China**, 2016. Disponível em: <<http://www.senasa.gov.ar/senasa-comunica/noticias/se-investiga-la-existencia-de-un-antibiotico-prohibido-en-carne-bovina-exportada-china>>. Acesso em: 18 abr. 2017.
6. ARGENTINA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. **Resumen de Resultados - Plan CREHA 2015**, 2017 Disponível em: <<http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/produccion-primaria/control-de-residuos-plan-creha>>. Acesso em: 18 abr. 2017.
7. AYAZ, N.D.; GENÇAY, Y.E.; EROL, I. Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:H7(+)/H7(-) isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. **International Journal of Food Microbiology**, v.174, p.31-38, 2014
8. BARRETO, F.; RIBEIRO, C.; HOFF, R.B.; DALLA COSTA, T. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1449, p.48-53, 2016.
9. BERALDO, L.G.; BORGES, C.A.; MULATA, R.P.; CARDOZO, M.V.; RIGOBELLO, E.C.; ÁVILA, F.A. Detection of Shigatoxigenic (STEC) and

enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. **Veterinary Microbiology**, v.170, p.162-166, 2014.

10. BERSOT, L.S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Behaviour of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.9, p.514-516, 2008.
11. BETANCOR, L.; PEREIRA, M.; MARTINEZ, A.; GIOSSA, G.; FOOKES, M.; FLORES, K.; BARRIOS, P.; REPISO, V.; VIGNOLI, R.; CORDEIRO, N.; ALGORTA, G.; THOMSON, N.; MASKELL, D.; SCHELOTTO, F.; CHABALGOITY, J.A. Prevalence of *Salmonella* spp. enterica in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella* spp. enterica serovar Enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.2413-2423, 2010.
12. BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, S.; ZIMMERMANN, H.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2483–2488, 1993.
13. BEUTLICH, J.; HAMMER, J.A.; APPEL, B.; NÖCKLER, K.; HELMUTH, R.; JÖST, K.; LUDWIG, M.L.; HANKE, C.; BECHTOLD, D.; MAYER-SCHOLL, A. Characterization of illegal food items and identification of foodborne pathogens brought into the European Union via two major German airports. **International Journal of Food Microbiology**, v.209, p.13-19, 2015.
14. BEYENE, T. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. **Journal of Veterinary Science and Technology**, v.7, p.285, 2016.
15. BLANCO FERNÁNDEZ, M.D.; TORRES, C.; RIVIELLO-LÓPEZ, G.; POMA, H.R.; RAJAL, V.B.; NATES, S.; CISTERNA, D.M.; CAMPOS, R.H.; MBAYED, V.A. Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p.E548-51, 2012.
16. BOLLAERTS, K.; AERTS, M.; FAES, C.; GRIJSPEERDT, K.; DEWULF, J.; MINTIENS, K. Human salmonellosis: estimation of dose-illness from outbreak data. **Risk Analysis**, v.28, n.2, p.427-440, 2008.
17. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 183, de 9 de outubro de 1998. Reconhecimento de sistemas de inspeção sanitária e habilitação de estabelecimentos estrangeiros, licenças de importações, reinspeção, controles e trânsito de produtos de origem animal importados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1998.
18. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 42, de 20 de dezembro de 1999. Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1999.
19. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos

Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003

20. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 9, de 27 de Junho de 2003. Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2003.
21. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 36, de 10 de novembro de 2006. Manual de procedimentos operacionais da vigilância agropecuária internacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2006a.
22. BRASIL. Tribunal de Contas da União. **Relatório de avaliação de programa: Ações de Vigilância e Fiscalização no Trânsito Internacional de Produtos Agropecuários**. Secretaria de Fiscalização e Avaliação de Programas de Governo, 2006b
23. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Requisitos sanitários para importação de carnes, produtos à base de carne e miúdos de bovinos da Argentina**. 2009a.
24. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009b.
25. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11, de 07 de Maio de 2014. Subprogramas de monitoramento de controle de resíduos e contaminantes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2014.
26. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 22, de 07 de abril de 2015. Resultados do subprograma de monitoramento e do subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC do ano 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2015a.
27. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Apreensões de produtos em aeroportos ultrapassaram 65 t em 2014**, 2015b. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/02/apreensoes-de-produtos-em-aeroportos-ultrapassaram-65-toneladas-em-2014>>. Acesso em: 18 abr. 2017.
28. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11 de 10 de maio de 2016. Autoriza o ingresso no território nacional, dos produtos de origem animal destinados ao uso e ao consumo humano ou animal, classificados como não presumíveis veiculadores de doenças contagiosas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2016a.

29. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resultados gerais do subprograma de monitoramento e subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC 2015**, 2016b. Disponível em:  
<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/resultados-pncrc-2015.pdf>> Acesso em: 18 abr. 2017
30. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei n. 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017a.
31. BRASIL. Ministério da Saúde, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2017b. Disponível em:  
<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf/>>. Acesso em: 01 jun. 2017.
32. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 09, de 21 de fevereiro de 2017. Plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC de 2017 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos, na forma do Anexo desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017c.
33. BROOKES, V.J.; HERNÁNDEZ-JOVER, M.; HOLYOAKE, P.; WARD, M.P. Import risk assessment incorporating a dose-response model: introduction of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome into Australia via illegally imported raw pork. **Preventive Veterinary Medicine**, v.113, n.4, p.565-579, 2014.
34. BRUSA, V.; ALIVERTI, V.; ALIVERTI, F.; ORTEGA, E.E.; DE LA TORRE, J.H.; LINARES, L.H.; SANZ, M.E.; ETCHEVERRÍA, A.I.; PADOLA, N.L.; GALLI, L.; PERAL GARCÍA, P.; COPEL, J.; LEOTTA, G.A.; Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, V.18, 2:171, 2013.
35. CALCAGNO, M.A.; BOURLLOT, I.; TAUS, R.; SARACINO, M.P.; VENTURIELLO, S.M. Description of an outbreak of human trichinellosis in an area of Argentina historically regarded as *Trichinella*-free: the importance of surveillance studies. **Veterinary Parasitology**, v.200, p.251-256, 2014.
36. CALLEJO, R.; PRIETO, M.; MARTÍNEZ, C.; AGUERRE, L.; ROCCA, F.; MARTÍNEZ, G.; PALMIERI, O. Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.40, p.89-92, 2008.

37. CARDOSO, O. M. C.; SILVA, T. J. P.; SANTOS, W. L. M.; PESQUERO, J. L. Ocorrência de resíduos de dietilestilbestrol e zeranol em fígado de bovinos abatidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, p.305-310, 1999.
38. CARTWRIGHT, E.J.; JACKSON, K.A.; JOHNSON S.D.; GRAVES, L.M.; SILK B.J., MAHON, B.E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, p.1-9, 2013.
39. CASTILLA, K.S.; FERREIRA, C.S.A.; MORENO, A.M.; NUNES, I.A.; FERREIRA, A.J.P.; Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* spp. Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.135-139, 2006.
40. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese - North Carolina, October 2000–January 2001. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v.50, p.560-562, 2001.
41. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009–2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.62, n.3, p.41-60, 2013.
42. CDC – Centers for Disease Control and Prevention – Estados Unidos da América. **Foodborne Outbreak Tracking and Reporting (FOOD Tool)**, 2017. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>> Acesso em: 01 jun. 2017.
43. CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.'GUTH B.E.C.High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.60, p.177-180, 1997.
44. CERKVENIK, V. Analysis and monitoring of chloramphenicol residues in food of animal origin in Slovenia from 1991 to 2000. **Food Additives & Contaminants**, v.19, p.357-367, 2002.
45. CHABER, A.L.; CUNNINGHAM, A. Public Health Risks from Illegally Imported African Bushmeat and Smoked Fish: Public Health Risks from African Bushmeat and Smoked Fish. **Ecohealth**, v.13, p.135-138, 2016
46. CHAPMAN, H.D.; JEFFERS, T.K.; WILLIAMS, R.B. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. **Poultry Science**, v.89, p.1788-1801, 2010.
47. CHEN, J.; GRIFFITHS, M.W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.369-371, 1998
48. CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracyclines antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, p.232-260, 2001.

49. CLIVER, D. O. **Foodborne Diseases**. San Diego: Academic Press, Inc. 1990, 395 p.
50. COHEN, M.; COSTANTINO, S.N.; CALCAGNO, M.A.; BLANCO, G.A.; POZIO, E.; VENTURIELLO, S.M. *Trichinella* infection in wild boars (*Sus scrofa*) from a protected area of Argentina and its relationship with the presence of humans. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.362-366, 2010.
51. COSTA, L. **Rejeição de carne pelos EUA exige atenção. 2011**. Disponível em: <http://economia.estadao.com.br/noticias/negocios,rejeicao-de-carne-pelos-eua-exige-atencao,81390e>. Acesso em: 18 abr. 2017.
52. CROUBELS, S.; DAESELEIRE, E. **Chemical contaminants and residues in food**. Woodhead Publishing Limited: Cambridge. Chapter 7, Veterinary drug residues in food; p.148-182. 2012.
53. DA SILVA FERNANDES, M.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v.200, p.5-12, 2015.
54. DEGIUSEPPE, J.I.; GIOVACCHINI, C.; STUPKA, J.Á.; RED NACIONAL DE VIGILANCIA DE GASTROENTERITIS VIRALES. Rotavirus epidemiology and surveillance in Argentina: 2009-2011. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v.111, p.148-154, 2013.
55. DESTRO, M.T. *Listeria* and Listeriosis in South America: Where we are ? In: XVIII International symposium on problems of listeriosis – ISOPOL, **Anais do Evento**, Goa, Índia, 2013.
56. DOS RAMOS, F.J.  $\beta$ 2-Agonist extraction procedures for chromatographic analysis. **Journal of Chromatography A**, v.880, p.69-83, 2000
57. DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3819-3822, 2004
58. DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997.
59. DOYLE, M.E. **Veterinary Drug Residues in Processed Meats-Potential Health Risk**. A Review of the Scientific Literature. FRIBRIEFINGS, Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison; p.1-8. 2006.
60. DUFFIELD, T.F.; BAGG, R.N. Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. **Canadian Veterinary Journal**, v.41, p.388-394, 2000.
61. EFSA - European Food Safety Authority. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008, **EFSA Journal**, v.8, n.1, p.23-110, 2010.
62. EFSA - European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and



- Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, v. 11, 3129, 2013.
63. EIDT, M.J.; SÁ, M.E.P.; MCMANUS, C.M.; MELO, C.B. Interception of animal-origin products at land borders in Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.3, 2015.
  64. EL PAÍS. **Alerta por bacteria mortal que abarca 4 departamentos**, 2016. Disponível em: <<http://www.elpais.com.uy/informacion/alerta-bacteria-mortal-abarca-departamento.html>> Acesso em: 18 abr. 2017.
  65. EUROPEAN COMMISSION. Regulamento UE 37/2010 da Comissão de 22 de dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. **Official Journal of the European Communities**. L15:1-72, 2010
  66. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods - CAC/MRL 2-2015**, 2015; Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/veterinary-drugs-mrls/pt/>> Acesso em: 18 abr. 2017.
  67. FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations /World Health Organization. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**, 1996.; Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43506/1/9241660570\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43506/1/9241660570_eng.pdf)> Acesso em: 18 abr. 2017.
  68. FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations /World Health Organization. **Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food**, 2009 Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/chemical-food/en/>> Acesso em: 18 abr. 2017.
  69. FENG, P., WEAGANT, S.D., JINNEMAN, K. 2016. **Diarrheogenic *Escherichia coli***. In: United States Food and Drug Administration (Ed.), Bacteriological Analytical Manual. 8th Edition, Revision A, 2016. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>> Acesso em: 18 abr. 2017.
  70. FERNANDES, F.P.; VOLOSKI, F.L.S.; RAMIRES, T.; HAUBERT, L.; RETA, G.G.; MONDADORI, R.G.; SILVA, W.P.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; DUVAL, E.H. Virulence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. spp. and *Escherichia coli* in the beef jerky production line. **FEMS Microbiology Letters**, v.364, p.fnx083, 2017.
  71. FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo: ARTMED, 2005.

72. FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Food Microbiology**. 4 ed. New York: McGraw-Hill International Edition, 1988.
73. FREIRE, E. F.; BORGES, K. B.; TANIMOTO, H.; NOGUEIRA, R. T.; BERTOLINI, L. C. T.; GAITANI, C. M. Development and validation of a simple method for routine analysis of ractopamine hydrochloride in raw material and feed additives by HPLC. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 757-764. 2009.
74. FREITAS, C.G.; SANTANA, A.P.; SILVA, P.H.C.; GONCALVES, V.S.P.; BARROS, M.A.F.; TORRES, F.A.G.; MURATA, L.S.M.; PERECMANIS, S. PCR multiplex for detection of *Salmonella* spp. Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p.15-22, 2010.
75. GABRIELI, R.; MACALUSO, A.; LANNI, L.; SACCARES, S.; DI GIAMBERARDINO, F.; CENCIONI, B.; PETRINCA, A.R.; DIVIZIA, M. Enteric viruses in mollusk and shell fish. **New microbiológica**, v.30, n.4, p.471-475, 2007.
76. GARCÍA-AGUIRRE, L.; CRISTINA, J. Analysis of the full-length genome of hepatitis A virus isolated in South America: heterogeneity and evolutionary constraints. *Archives of Virology*, v. 153, p.1473–1478, 2008
77. GREEN, M.R.; SAMBROOK, J.; **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 4th Edition. Cold Spring Harbor, New York, 2012.
78. GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v.13, p.60-98, 1991.
79. GUDBJÖRNSDÓTTIR, B; SUIHKO, M.L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S. SJÖBERG, A.M.; NICLASEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, v.21, p.217-225, 2004.
80. HANEKAMP, J.C.; BAST, A. Antibiotics exposure and health risks: chloramphenicol. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.39, p.213-220, 2015
81. HARTNETT, E.; ADKIN, A.; SEAMAN, M.; COOPER, J.; WATSON, E.; COBURN, H.; ENGLAND, T.; MAROONEY, C.; COX, A.; WOOLDRIDGE. M. A quantitative assessment of the risks from illegally imported meat contaminated with foot and mouth disease virus to Great Britain. **Risk Analysis**, v.27, n.1, p.187-202, 2007.
82. HELDT, F.H.; STAGGMEIER, R.; GULARTE, J.S.; DEMOLINER, M.; HENZEL, A.; SPILKI, F.R. Hepatitis E virus in surface water, sediments, and pork products marketed in southern Brazil. **Food and Environmental Virology**, v.8, p.200-205, 2016.

83. HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 41, p.375-377, 1999.
84. HORST, H.S.; DIJKHUIZEN, A.A.; HUIRNE, R.B.M; DE LEEUW, P.W. Introduction of contagious animal disease into The Netherlands: elicitation of expert opinions. **Livestock Production Science**, v.53, p.253-264, 1998.
85. HUESTON, W.; TRAVIS, D.; VAN KLINK, E.; Optimising import risk mitigation: anticipating the unintended consequences and competing risks of informal trade. **Scientific and Technical Review**, v.30, p.309-316, 2011.
86. IBAR, M.P.; QUIROGA, P.; PIÑEYRO, P.; VIGO, G.; PERFUMO, C.; CENTRÓN, D.; GIACOBONI, G.; CAFFER, M.I. Serovars of *Salmonella* spp. enterica subspecies *enterica* and its antimicrobial resistance in slaughterhouse pigs. **Revista Argentina de Microbiología**, v.41, p.156-162, 2009.
87. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação**, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>> Acesso em: 18 abr. 2017.
88. HUANG, D.B.; OKHUYSEN, P.C.; JIANG, Z.D.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **The American Journal of Gastroenterology**, v.99, p.383-389, 2004.
89. INTHARASONGKROH, D.; SA-NGUANMOO, P.; TUANTHAP, S.; THONGMEE, T.; DUANG-IN, A.; KLINFUENG, S.; CHANSAENROJ, J.; VONGPUNSAWAD, S.; THEAMBOONLERS, A.; PAYUNGORN, S.; CHIRATHAWORN, C.; POOVORAWAN, Y. Hepatitis E Virus in Pork and Variety Meats Sold in Fresh Markets. **Food and Environmental Virology**, Epub ahead of print, ago. 31, 2016.
90. JANK, L.; MARTINS, M.T.; ARSAND, J.B.; MOTTA, T.M.C.; FEIJÓ, T.C.; CASTILHOS, T.S.; HOFF, R.B.; BARRETO, F.; PIZZOLATO, T.M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Multiclass Method for 46 Antibiotics Residues in Milk and Meat: Development and Validation. **Food Analytical Methods**, v.10, p.1-13. 2017
91. JOSEPH, R.; THORNTON, A.; WATERMAN, S.H. Crossing Borders - Unpasteurized Cheese a Public Health Challenge for Hispanic and US–Mexico Binational Communities. **Clinical Infectious Diseases**, v.57, n.1, 2013.
92. JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.
93. JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T.L.; SOBSEY, M.D.; ROBERTSO, B.H. Development and Evaluation of a Broadly Reactive TaqMan Assay for Rapid Detection of Hepatitis A Virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.3359-3363, 2005.
94. JUAN, C.; IGUALADA, C.; MORAGUES, F.; LEÓN, N.; MAÑES, J. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass

- spectrometry method for the analysis of  $\beta$ -agonists in animal feed and drinking water. **Journal of Chromatography**, v.1217, p.6061-6068, 2010.
95. JURE, M.A.; CONDORÍ, M.S.; TERRAZZINO, G.P.; CATALÁN, M.G.; CAMPO, A.L.; ZOLEZZI, G.; CHINEN, I.; RIVAS, M.; CASTILLO, M. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. **Revista Argentina de Microbiología**, v.47, p.125-13, 2015.
  96. KÄFERSTEIN, F.K.; MOTARJEMI, Y.; BETTCHER, D.W. Foodborne disease control: a transnational challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.503-510, 1997.
  97. KARMALI, M.A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 360-370, 2010.
  98. KINDE, H.; MIKOLON, A.; RODRIGUEZ-LAINZ, A.; ADAMS, C.; WALKER, R.L.; CERNEK-HOSKINS, S.; TREVISO, S.; GINSBERG, M.; RAST, R.; HARRIS, B.; PAYEUR, J.B.; WATERMAN, S.; ARDANS, A. Recovery of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* from cheese entering the United States through a noncommercial land port of entry. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, 2007.
  99. LEOMIL, L., AIDAR-UGRINOVICH, L., GUTH, B.E.C., IRINO, K., VETTORATO, M.P., ONUMA, D.L., CASTRO, A.F.P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.97, p.103-109, 2003.
  100. LEOTTA, G.A.; MILIWEBSKY, E.S.; CHINEN, I.; ESPINOSA, E.M.; AZZOPARDI, K.; TENNANT, S.M.; ROBINS-BROWNE, R.M.; RIVAS, M. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. **BMC Microbiology**, v. 17, 8:46, 2008
  101. LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AUSTIN, F.W.; AINSWORTH, A.J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, p.133-140, 2007.
  102. LOPES, W.D.Z.; TEIXEIRA, W.F.; FELIPELLI, G.; CRUZ, B.C.; MACIEL, W.; SOARES, V.E.; SANTOS, T.R.; MATOS, L.M.; FAVERO, F.; COSTA, A.J. Assessing resistance of ivermectin and moxidectin against nematodes in cattle naturally infected using three different methodologies. **Research in Veterinary Science**, v.96, p.136-138, 2014.
  103. MARTI, E.; BARARDI, C.R.M. Detection of human adenoviruses in organic fresh produce using molecular and cell culture-based methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 230, p.40-44, 2016.
  104. MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infection Disease**, v.5, p.607-625, 1999.

105. MELO, C.B.; SÁ, M.E.P.; ALVES, F.F. ; MCMANUS, C.M.; ARAGÃO, L.F.; BELO, B.B.; CAMPANI, P.R.; DAMATTA-RIBEIRO, A.C.; SEABRA, C.I.;SEIXAS, L. Profile of international air passengers intercepted with illegal animal products in baggage at Guarulhos and Galeão airports in Brazil. **Springer Plus**, v.3, p.69-77, 2014a.
106. MELO, C.B.; SÁ, M.E.; SABINO, V.M.; SOUZA, A.R.; OLIVEIRA, A.M.; MOTA, P.M.P.C.; CAMPANI, P.R.; LUNA, J.O., PINTO, S.C.; SCHWINGEL, F.F.; MCMANUS, C.; SEIXAS, L. Bacteria in Dairy Products in Baggage of Incoming Travelers, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n.11, 2014b.
107. MELO, C.B.; SÁ, M.E.; SABINO, V.M.; FERNANDES, M.F.B.; SANTIAGO, M.T.; SCHWINGEL, F.F.; FREITAS, C.; MAGIOLI, C.A.; PINTO, S.C.; MCMANUS, C.; SEIXAS, L. Microbiological detection of bacteria in animal products seized in baggage of international air passengers to Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.118, n.1, p.22-27, 2015.
108. MENG, J., DOYLE, M.P.; ZHAO, T. ZHAO. S. **Enterohaemorrhagic *Escherichia coli***. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. Food Microbiology: fundamental and frontiers. 3. Ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, cap. 12, p.249-269, 2007.
109. MERCOSUL. **Limites Máximos de Resíduos de princípios ativos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal**. Mercosul/GMC/RES 75/94. 1995.
110. MONTANO, A.; BARAÑANO, R.; LAGEARD, B.; MORATORIO, G.; DIBARBOURE, H.; GARCÍA, A.; GONZÁLEZ, M.; PÍREZ M.C.; RUSSI, J.C.; CHIPARELLI, H.; FERRARI, A.M.; ZEBALLOS, E.; DIBARBOURE, M.; SUÁREZ, N.; GIAMBRUNO, G.; FAZZIO, S. Prevalencia de hepatitis A en niños de 2 a 14 años y en población laboral de 18 a 49 años en Montevideo, Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, v.17, p.84-98, 2001.
111. MOREIRA, C.N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; RODRIGUES, D.P.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.93, p. 179-183, 2003.
112. MORIN, N.J.; GONG, Z.; XING-FANG, L. Reverse transcription-multiplex PCR Assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O:157H:7, *Vibrio cholerae* O1 and *Salmonella* spp. Typhi. **Clinical Chemistry**, v.50, p.2037-2044, 2004.
113. NATARO J.P., KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142-201, 1998.
114. NAVRÁTILOVÁ, P.; OVÁ, I.B.; DRAČKOVÁ, M.; JANŠTOVÁ, B.; VORLOVÁ, L. Occurrence of Tetracycline, Chlortetracyclin, and Oxytetracycline Residues in Raw Cow's Milk. **Czech Journal of Food Sciences**, v.27, p.379-385, 2009.
115. NGUYEN, A.V.; COHEN, N.J.; GAO, H.; FISHBEIN, D.B.; KEIR, J.; OCANA, J.M.; SENINI, L.; FLORES, A.; WATERMAN, S.H. Knowledge, attitudes, and practices among border crossers during temporary enforcement of a formal

- entry requirement for Mexican-style soft cheeses, 2009. **Journal of Food Protection**, v.77, p.1571-1578, 2014.
116. NOORDHUIZEN, J.; SURBORG, H.; SMULDERS, F.J. On the efficacy of current biosecurity measures at EU borders to prevent the transfer of zoonotic and livestock diseases by travellers. **Veterinary Quarterly**, v.33, p.161-171, 2013.
117. OIE - Organização Mundial de Sanidade Animal. **Terrestrial Animal Health Code**. 25 edição. 2016
118. OIE - Organização Mundial de Sanidade Animal. **OIE Annual report on the use of antimicrobial agents in animals**, 2017. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/Survey\\_on\\_monitoring\\_antimicrobial\\_agents\\_Dec\\_2016.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/Survey_on_monitoring_antimicrobial_agents_Dec_2016.pdf)> Acesso em: 18 abr. 2017.
119. OLEJNIK, M.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; JEDZINIAK, P.; SLEDZIŃSKA, E.; SZYMANEK-BANY, I.; KORYCIŃSKA, B.; PIETRUK, K.; ZMUDZKI, J. Residue control of coccidiostats in food of animal origin in Poland during 2007-2010. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v.4, p.259-67, 2011.
120. ONICIUC, E.A.; ARIZA-MIGUEL, J.; BOLOCAN, A.S.; DIEZ-VALCARCE, M.; ROVIRA, J.; HERNÁNDEZ, M.; FERNÁNDEZ-NATAL, I.; NICOLAU, A.I.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. **International Journal of Food Microbiology**, v.209, p.37-38, 2015.
121. ORSI, R.H.; WIEDMANN, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p.5273-5287, 2016.
122. PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. **Isolation of *Listeria monocytogenes* from all foods and environmental samples (MFHPB-30)**. In: Health Canada's, HPB Methods for the Microbiological Analysis of Foods, volume 2, 2001. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2-eng.php>>. Acesso em: 24 mai. 2017.
123. PARADA-FABIÁN, J.C.; JUÁREZ-GARCÍA, P.; NATIVIDAD-BONIFACIO, I.; VÁZQUEZ-SALINAS, C.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E.I. Identification of Enteric Viruses in Foods from Mexico City. **Food and Environmental Virology**, v.8, n.3, p.215-220, 2016.
124. PATON, A.W.; PATON, C.J. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, p.450-79, 1998.
125. PELLICER, K.; COPES, J.; MALVESTITI, L.; LANFRANCHI, M.; STANCHI, N.; ECHEVERRIA, G.; NOSETTO, E. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in dry sausages obtained in markets in the

- city of La Plata, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.34, p.219-221, 2002.
126. PEREIRA, M.U.; SPISSO, B.F.; JACOB, S.C.; FERREIRA, R.G.; MONTEIRO, M.A.; COSTA, R.F.; NÓBREGA, A.W. Ocorrência de resíduos de ionóforos poliéteres em leite UHT comercializado na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.3, p.70-77, 2015.
  127. PERERA, J.G.; KUBIÇA, C.; CASTRO, B.G.; SOARES, V.M. Consumo de alimentos importados ilegalmente da Argentina e Uruguai em cidades de fronteira no Rio Grande do Sul, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 13, 2015, **Anais...** Búzios, 2015.
  128. PRADO, C.K.; FERREIRA, F.D.; BANDO, E.; MACHINSKI JR., M. Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in pasteurised cow's milk commercialised in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v.8, p.81-84, 2015.
  129. QUIROZ-SANTIAGO, C.; VÁZQUEZ-SALINAS, C.; NATIVIDAD-BONIFACIO, I.; BARRÓN-ROMERO, B.L.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E.I. Rotavirus G2P[4] detection in fresh vegetables and oysters in Mexico City. **Journal of Food Protection**, v. 77, n.11, p.1953-1959, 2014.
  130. REEVES, P.T. Residues of veterinary drugs at injection sites. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, p.1-17. 2007.
  131. REIG, M.; TOLDRA, F. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. **Meat Science**, v.78, p.60-67, 2008.
  132. REJTHAROVÁ, M.; REJTHAR, L.; BUREŠ, J.; VERNEROVÁ, E.; HERA, A. Persistence of chloramphenicol residues in chicken muscle tissue after a therapeutic dose administration. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v.34, p.547-551, 2017.
  133. RIGOBELLO, E.C.; STELLA, A.E; ÁVILA, F.A; MACEDO, B.C.; MARIN, J.M. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. v.110, p.194-198, 2006.
  134. RIGOBELLO, E.C.; ÁVILA, F.A. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Beef Carcass. **Journal of Microbiology Research**. v.2, p.103-107, 2012.
  135. RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C.K.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, n.6, p.1979-1987, 2010.
  136. RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; ARIZA-MIGUEL, J.; DIEZ-VALCARCE, M.; FERNÁNDEZ-NATAL, I.; HERNÁNDEZ, M.; ROVIRA, J. Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus* transmission. **International Journal of Food Microbiology**, v.209, p.29-33, 2015a.

137. RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; ARIZA-MIGUEL, J.; DIEZ-VALCARCE, M.; STESSL, B.; BEUTLICH, J.; FERNÁNDEZ-NATAL, I.; HERNÁNDEZ, M.; WAGNER, M.; ROVIRA, J. Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport. **International Journal of Food Microbiology**, v.209, p.20-25, 2015b.
138. RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; DIEZ-VALCARCE, M.; MONTES-BRIONES, R.; GALLEGO, D.; HERNÁNDEZ, M.; ROVIRA, J. Presence of pathogenic enteric viruses in illegally imported meat and meat products to EU by international air travelers. **International Journal of Food Microbiology**, v.209, p.39-43, 2015c.
139. ROMERO, C.; PERDOMO, V.; CHAMORRO, F.; ASSANDRI, E.; PÍREZ, M.C.; MONTANO, A. Prevención de hepatitis A mediante vacunación en Uruguay (2005-2010). **Revista Médica del Uruguay**, v.28, p.115-122, 2012.
140. RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R.B.; PIZZOLATO, T.M. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, v.29, p. 55-60, 2013.
141. SA-NGUANMOO, P.; POSUWAN, N.; VICHAIWATTANA, P.; WUTTHIRATKOWIT, N.; OWATANAPANICH, S.; WASITTHANKASEM, R.; THONGMEE, T.; POOVORAWAN, K.; THEAMBOONLERS, A.; VONGPUNSAWAD, S.; POOVORAWAN, Y. Swine is a possible source of hepatitis E virus infection by comparative study of hepatitis A and E seroprevalence in Thailand. **PLoS One**, v.10, p.e0126184, 2015.
142. SANT'ANA, A.S.; IGARASHI, M.C.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.155, p.1-9, 2012.
143. 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 Infectious Diseases**.v.17, n.1, p.7-15, 2011.
144. SCHODER, D.; STRAUß, A.; SZAKMARY-BRÄNDLE, K.; STESSL, B.; SCHLAGER, S.; WAGNER, M. Prevalence of major foodborne pathogens in food confiscated from air passenger luggage. **International Journal of Food Microbiology**, v.209, p.3-12, 2015.
145. SHUKLA, S.; CHO, H.J.; KWON, O.J.; CHUNG, S.H.; MYUNGHEE, K. Prevalence and evaluation strategies for viral contamination in food products: risk to human Health – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 31:0, 2016.



146. SILK, B.J.; DATE, K.A.; JACKSON, K.A.; POUILLOT, R.; HOLT, K.G.; GRAVES, L.M.; ONG, K.L.; HURD, S.; MEYER, R.; MARCUS, R.; SHIFERAW, B.; NORTON, D.M.; MEDUS, C.; ZANSKY, S.M.; CRONQUIST, A.B.; HENAO, L.O.; JONES, T.F.; VUGIA, D.J.; FARLEY, M.M.; MAHON, B.E. Invasive listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, 2012.
147. SPILKI, F.R.; LUZ, R.B.; FABRES, R.B.; SOLIMAN, M.C.; KLUGE, M.; FLECK, J.D.; RODRIGUES, M.R.; COMERLATO, J.; CENCI, A.; CERVA, A.; DASSO, M.G.; ROEHE, P.M. Detection of human adenovirus, rotavirus and enterovirus in water samples collected on dairy farms from Tenente Portela, Northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n.3, p.953-957, 2013.
148. SPISSO, B.F.; NÓBREGA, A.W.; MARQUES, M.A.S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.14, p.2091-2106. 2009.
149. STEINFELD, H. The livestock revolution - a global veterinary mission. **Veterinary Parasitology**, v.125, p.19-41, 2004.
150. SWALLOW, R. Risk of Foot-and-Mouth Disease for the Pacific NorthWest Economic Region. **Transboundary and Emerging Diseases**, Dis. v.59, p.344-352, 2012.
151. TORT, L.F.; VICTORIA, M.; LIZASOAIN, A.; GARCÍA, M.; BEROIS, M.; CRISTINA, J.; LEITE, J.P.; GÓMEZ, M.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; COLINA, R.. Detection of Common, Emerging and Uncommon VP4, and VP7 Human Group A Rotavirus Genotypes from Urban Sewage Samples in Uruguay. **Food and Environmental Virology**, v.7, p.342-353, 2015
152. URUGUAI. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca .. Resolución del MGAP de 27 de noviembre de 1986. **Se cancelan las autorizaciones concedidas hasta el presente para la importación, fabricación y venta y uso de los productos veterinarios a base de cloranfenicol**. Disponível em: <[http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/resolucionministerial27\\_11\\_86.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/resolucionministerial27_11_86.pdf).> Acesso em: 18 abr. 2017.
153. URUGUAI. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. **Programa Nacional de Resíduos Biológicos Sustancias y Matrices evaluadas - Resultados del Programa de Resíduos en Alimentos 2015**, 2016. Disponível em: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-ganaderos/institucional/programa-nacional-de-residuos-biologicos/sustancias-y-matrices>. Acesso em: 18 abr. 2017.
154. VAN DEN BERG, T. The role of the legal and illegal trade of live birds and avian products in the spread of avian influenza. **Scientific and Technical Review**, v.28, p.93-111, 2009.

155. VASCONCELOS, J.; SOLIMAN, M.C.; STAGGEMEIER, R.; HEINZELMANN, L.; WEIDLICH, L.; CIMIRRO, R.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; SPILKI, F.R. Molecular detection of hepatitis E virus in feces and slurry from swine farms, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p.777-782, 2015.
156. VICTORIA, M.; TORT, L.F.; GARCÍA, M.; LIZASOAIN, A.; MAYA, L.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P.; CRISTINA, J.; COLINA, R.. Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. **Food and Environmental Virology**, v.6, p.116-124, 2014
157. WANG, H.; DING, S.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. In situ characterization and analysis of *Salmonella* spp. biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.167, p.293-302, 2013.
158. WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; DEN BAKKER, H.C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.286-292, 2015.
159. WHITE, P.A.; NETZLER, N.E.; HANSMAN, G.S. **Foodborne viral pathogens**. CRC Press: Boca Raton, 2016
160. WILHELM, B.; LEBLANC, D.; HOUDE, A.; BRASSARD, J.; GAGNÉ, M.J.; PLANTE, D.; BELLON-GAGNON, P.; JONES, T.H.; MUEHLHAUSER, V.; JANECKO, N.; AVERY, B.; RAJIĆ, A.; MCEWEN, S.A.. Survey of Canadian retail pork chops and pork livers for detection of hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus using real time RT-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.185, p.33-40, 2014
161. WILHELM. B.; FAZIL. A.; RAJIĆ. A.; HOUDE.A.; MCEWEN.S.A. Risk Profile of Hepatitis E Virus from Pigs or Pork in Canada. **Transboundary and Emerging Diseases**, Epub ahead of print, out. 7, 2016
162. XAVIER, J.; PASCAL, D.; CRESPO, E.; SCHELL, H.L.; TRINIDAD, J.A.; BUENO, D.J.. Seroprevalence of *Salmonella* spp. and *Mycoplasma* infection in backyard chickens in the state of Entre Rios in Argentina. **Poultry Science**, v.90, p.746-751, 2011.
163. YANG, C.C. Acute Human Toxicity of Macrocyclic Lactones. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.13, p.999-1003, 2012.

## **Apêndices**

## Apêndice 1 – Questionário de perfil de importação ilegal

### **IDENTIFICAÇÃO PESSOAL E FAMILIAR**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_  
 Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_  
 Quantas pessoas moram com você? \_\_\_\_\_ Idade das pessoas: \_\_\_\_\_  
 Qual a sua atividade? ( ) Estuda ( ) Trabalha ( ) Estuda e trabalha ( ) Não tem atividade  
 Qual seu grau de escolaridade? ( ) Ensino médio/fundamental ( ) Superior incompleto ( ) Superior completo

### **PERFIL DE CONSUMO**

Você ingere produtos de origem animal, como carne, leite, ovos...

( ) Sim ( ) Não

Quais produtos você consome:

- Carne: bovina ( ) suína ( ) ovina ( ) pescado ( ) aves ( ) outras: \_\_\_\_\_
- Derivados da carne: ( ) salame ( ) linguiças ( ) mortadela ( ) presunto ( ) outros: \_\_\_\_\_
- Leite: ( ) bovino cru ( ) bovino pasteurizado ( ) bovino UHT ( ) outros: \_\_\_\_\_
- Derivados do leite: ( ) queijo ( ) doce de leite ( ) leite condensado ( ) creme de leite ( ) outros: \_\_\_\_\_
- Mel: ( ) Sim ( ) Não
- Ovos: ( ) Sim ( ) Não
- Outros produtos: \_\_\_\_\_

Você já comprou alimentos na Argentina/Uruguai?

( ) Sim ( ) Não (Obs: se a resposta for não, passar para "conhecimentos sobre o tema da pesquisa")

Que alimentos costuma comprar na Argentina/Uruguai:

- Carne: bovina ( ) suína ( ) ovina ( ) pescado ( ) aves ( ) outras: \_\_\_\_\_
- Derivados da carne: ( ) salame ( ) linguiças ( ) mortadela ( ) presunto ( ) outros: \_\_\_\_\_
- Leite: ( ) bovino cru ( ) bovino pasteurizado ( ) bovino UHT ( ) outros: \_\_\_\_\_
- Derivados do leite: ( ) queijo ( ) doce de leite ( ) leite condensado ( ) iogurtes ( ) outros: \_\_\_\_\_
- Mel: ( ) Sim ( ) Não
- Ovos: ( ) Sim ( ) Não
- Outros produtos: \_\_\_\_\_

Qual a frequência de compra destes alimentos?

( ) diariamente ( ) semanalmente ( ) algumas vezes durante o mês ( ) eventualmente

Quais os locais de compra na Argentina e Uruguai?

( ) supermercados ( ) açougues ( ) direto com o produtor ( ) estabelecimento não identificado

Identificação nominal do local: \_\_\_\_\_

Qual a razão da compra destes produtos na Argentina/Uruguai ?

- Preço ( )
- Qualidade ( )
- Preço + Qualidade ( )

Atributos de qualidade: \_\_\_\_\_

Em comparação com o Brasil...

- Os locais de venda são mais limpos? ( ) Sim ( ) Não ( ) Iguais ( ) Não sei
- Os produtos são menos contaminados... ( ) Sim ( ) Não ( ) Iguais ( ) Não sei

Alguma vez teve os produtos apreendidos na fronteira quando retornava ao Brasil?

( ) Sim ( ) Não

Quantas vezes: \_\_\_\_\_

### **CONHECIMENTOS SOBRE O TEMA DA PESQUISA**

Você sabe se estes produtos podem trazer riscos à sua saúde ?

( ) Sim, Qual: \_\_\_\_\_ ( ) Não

Sabe qual órgão que deve fiscalizar a entrada destes produtos no Brasil?

( ) Sim, Qual: \_\_\_\_\_ ( ) Não

Você já recebeu algum tipo de informação à respeito dos perigos à saúde pública e animal quando se ingressa no Brasil com alimentos comprados na Argentina/Uruguai ?

( ) Sim, Qual: \_\_\_\_\_ ( ) Não

Gostaria de receber informações a respeito deste tema?

( ) Sim ( ) Não Contato: \_\_\_\_\_

## Apêndice 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

|     |   |
|-----|---|
| ID= | 1 |
|-----|---|

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Via pesquisador

**Título do projeto:** Perigos associados ao comércio internacional informal de produtos de origem animal na região de fronteira internacional entre o Brasil, Argentina e Uruguai

**Pesquisador responsável:** Juliano Gonçalves Pereira

**Instituição:** Universidade Federal do Pampa – Unipampa

**Telefone celular do pesquisador para contato (inclusive a cobrar):** (55) 8123 8116

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), em uma pesquisa científica da Unipampa intitulada "Perigos associados ao comércio internacional informal de produtos de origem animal na região de fronteira internacional entre o Brasil, Argentina e Uruguai" que tem por objetivo determinar o perfil de consumo de alimentos em cidades do Rio Grande do Sul.

Por meio deste documento e a qualquer tempo você poderá solicitar esclarecimentos adicionais sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar. Também poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento, sem sofrer qualquer tipo de penalidade ou prejuízo.

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra será arquivada pelo pesquisador responsável.

A pesquisa consiste em realizar perguntas diretas sobre os hábitos de consumo de alimentos de você e sua família e, a partir da avaliação dos dados, a equipe de pesquisa da Universidade Federal do Pampa traçará o perfil de consumo de alimentos nas cidades da região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

Fique ciente que este estudo não terá nenhum custo para você, nem receberá qualquer vantagem financeira. Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores.

Seu nome e identidade serão mantidos em sigilo, e os dados da pesquisa serão armazenados pelo pesquisador responsável. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Os dados desta pesquisa ajudarão a determinar estudos em segurança alimentar e saúde pública auxiliando no desenvolvimento social e econômico da região.

Nome do Participante: \_\_\_\_\_



Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador Responsável: Prof. Juliano G. Pereira

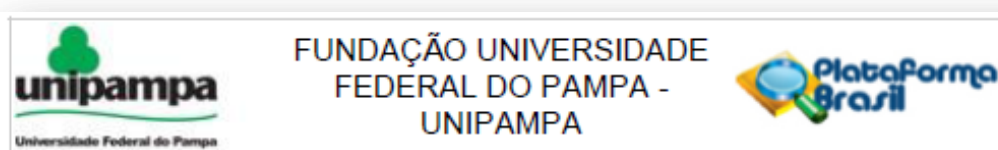
Assinatura:



### Apêndice 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

|   |  |   |
|---|--|---|
| <br>Universidade Federal do Pampa  | <b>FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE<br/>FEDERAL DO PAMPA -<br/>UNIPAMPA</b> |  |
| <b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>   |  |   |
| <b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>   |  |   |
| <b>Título da Pesquisa:</b> Perigos associados ao comércio internacional informal de produtos de origem animal na região de fronteira internacional entre o Brasil, Argentina e Uruguai  |  |   |
| <b>Pesquisador:</b> Juliano Gonçalves Pereira   |  |   |
| <b>Área Temática:</b>   |  |   |
| <b>Versão:</b> 5  |  |   |
| <b>CAAE:</b> 42695215.7.0000.5323   |  |   |
| <b>Instituição Proponente:</b> Fundação Universidade Federal do Pampa UNIPAMPA  |  |   |
| <b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio  |  |   |
| <b>DADOS DA NOTIFICAÇÃO</b>   |  |   |
| <b>Tipo de Notificação:</b> Envio de Relatório Final  |  |   |
| <b>Detalhe:</b>   |  |   |
| <b>Justificativa:</b> Prezados membros do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIPAMPA,  |  |   |
| <b>Data do Envio:</b> 02/02/2017  |  |   |
| <b>Situação da Notificação:</b> Parecer Consubstanciado Emitido   |  |   |
| <b>DADOS DO PARECER</b>   |  |   |
| <b>Número do Parecer:</b> 2.036.682   |  |   |
| <b>Apresentação da Notificação:</b>   |  |   |
| Apresentação de relatório final da pesquisa: Perigos associados ao comércio internacional informal de produtos de origem animal na região de fronteira internacional entre o Brasil, Argentina e Uruguai  |  |   |
| <b>Objetivo da Notificação:</b>   |  |   |
| O objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar o perfil de importação ilegal de alimentos de origem animal em cidades brasileiras de fronteira internacional no estado do Rio Grande do Sul.  |  |   |
| <b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b>   |  |   |
| Manteve texto do projeto original (PO)  |  |   |
| <b>Endereço:</b> Campus Uruguaiana BR 472, Km 592<br><b>Bairro:</b> Prédio Administrativo - Sala 23 - Caixa <b>CEP:</b> 97.500-970<br><b>UF:</b> RS <b>Município:</b> URUGUAIANA<br><b>Telefone:</b> (55)3911-0202 <b>E-mail:</b> cep@unipampa.edu.br |  |   |
| Página 01 de 02   |  |   |

## Apêndice 4 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (continuação)



Continuação do Parecer: 2.036.682

**Comentários e Considerações sobre a Notificação:**

Pesquisa relevante que demonstra em relatório o atendimento dos objetivos propostos

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos apresentados no projeto original (PO)

**Recomendações:**

Não há recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento           | Arquivo             | Postagem               | Autor                     | Situação |
|--------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------|----------|
| Envio de Relatório Final | relatorio_final.pdf | 02/02/2017<br>15:13:12 | Juliano Gonçalves Pereira | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

URUGUAIANA, 27 de Abril de 2017

Assinado por:  
**JUSSARA MENDES LIPINSKI**  
 (Coordenador)

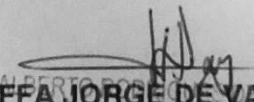
Endereço: Campus Uruguaiana BR 472, Km 592  
 Bairro: Prédio Administrativo - Sala 23 - Caixa CEP: 97.500-970  
 UF: RS Município: URUGUAIANA  
 Telefone: (55)3911-0202 E-mail: cep@unipampa.edu.br

**Apêndice 5 – Autorização para importação de produtos de origem animal**

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.  
SUPERINTENDÊNCIA FEDERAL DE AGRICULTURA/RS  
SERVIÇO DE VIGILÂNCIA AGROPECUÁRIA/URUGUAIANA/RS

## AUTORIZAÇÃO

Tendo por base o projeto de pesquisa apresentado pelo Professor Juliano Gonçalves Pereira SIAPE 1875727, pertencente ao quadro de professores da UNIPAMPA, e os pareceres do SIPOA/RS e SSA/RS, não colocando objeções a pesquisa, desde que seja seguida a legislação do Vigiaagro quanto a destruição dos produtos, autorizo o Professor Juliano a retirar amostras de produtos de origem animal aprendidos no transito vicinal, e internalizar pequenas quantidades, devidamente acondicionadas, a fim de fazer às análises laboratoriais propostas no Projeto de Pesquisa apresentado ao MAPA.

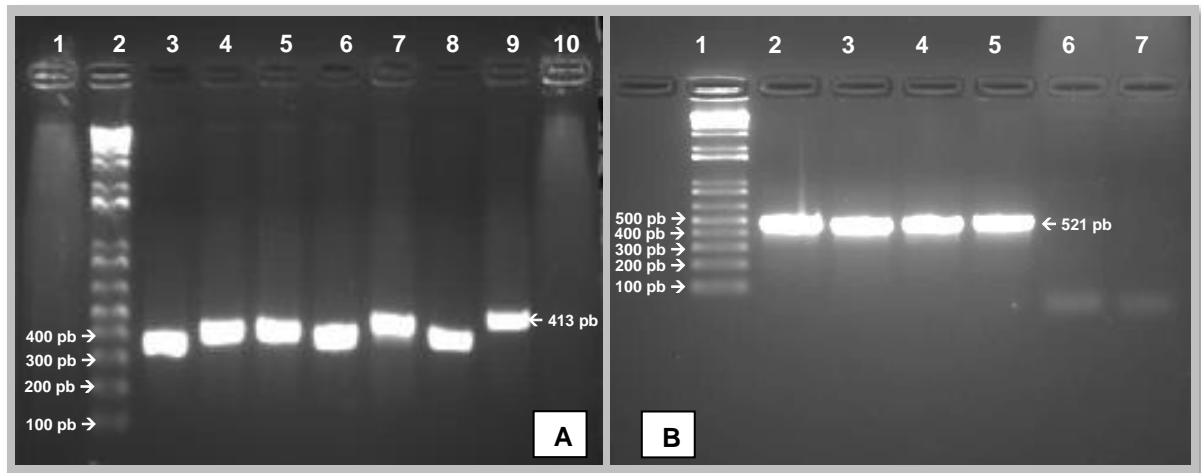
  
JORGE ALBERTO ROSÁRIO  
**FFA JORGE DE VARGAS**  
**CHEFE DO SVA DE URUGUAIANA**  
Carteira Fiscal nº 1109  
Engenheiro Agrônomo  
Chefe do SVA/URG/DDA/RS



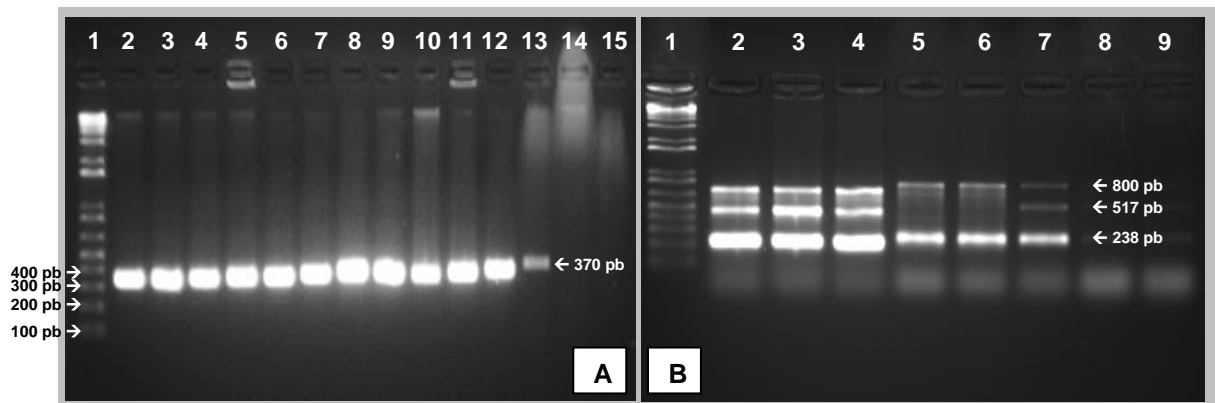
**Apêndice 6** – Primers utilizados para confirmação molecular e pesquisa de genes de virulência de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7

| Patógeno                | Gene                        | Sequência                        | Produto (pb) |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------|
| <i>Salmonella</i> spp.  | <i>hilA</i> F               | 5' GCGAGATTGTGAGTAAAAACACC 3'    | 413          |
|                         | <i>hilA</i> R               | 5' CTGCCCGGAGATATAATAATCG 3'     |              |
|                         | <i>invA</i> F               | 5' TTGTTACGGCTATTTTGACCA 3'      | 521          |
|                         | <i>invA</i> R               | 5' CTGACTGCTACCTTGCTGATG 3'      |              |
|                         | <i>spvC</i> F               | 5' CGGAAATACCATCTACAAATA 3'      | 669          |
|                         | <i>spvC</i> R               | 5' CCCAAACCCATACTTACTCTG 3'      |              |
|                         | <i>sefA</i> F               | 5' GCAGCGGTTACTATTGCAGC 3'       | 330          |
|                         | <i>sefA</i> R               | 5' TGTGACAGGGACATTTAGCG 3'       |              |
|                         | <i>pefA</i> F               | 5' TTCCATTATTGCACTGGGTG 3'       | 497          |
| <i>pefA</i> R           | 5' AAGCCACTGCGAAAGATGCC 3'  |                                  |              |
| <i>L. monocytogenes</i> | <i>prs</i> F                | 5' GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG 3'     | 370          |
|                         | <i>prs</i> R                | 5' CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG 3'     |              |
|                         | <i>inlA</i> F               | 5' ACGAGTAACGGGACAAATGC 3'       | 800          |
|                         | <i>inlA</i> R               | 5' CCCGACAGTGGTGCTAGATT 3'       |              |
|                         | <i>inlC</i> F               | 5' AATTCCCACAGGACACAACC 3'       | 517          |
|                         | <i>inlC</i> R               | 5' CGGGAATGCAATT 3'              |              |
|                         | <i>inlJ</i> F               | 5' TGTAACCCCGCTTACACAGTT 3'      | 238          |
| <i>inlJ</i> R           | 5' AGCGGCTTGGCAGTCTAATA 3'  |                                  |              |
| <i>E. coli</i> O157:H7  | <i>uspA</i> F               | 5' CCGATACGCTGCCAATCAGT 3'       | 884          |
|                         | <i>uspA</i> R               | 5' ACGCAGACCGTAGGCCAGAT 3'       |              |
|                         | <i>eae</i> F                | 5' GACCCGGCACAAGCATAAGC 3'       | 384          |
|                         | <i>eae</i> R                | 5' CCACCTGCAGCAACAAGAGG 3'       |              |
|                         | <i>rfbO157</i> F            | 5' GCGCGAATTCTTTTCAAATTGCTGAT 3' | 239          |
|                         | <i>rfbO157</i> R            | 5' GCGCGAATTCGTGCCGAGTACATTGG 3' |              |
|                         | <i>fliCH7</i> F             | 5' GCTGCAACGGTAAGTGAT 3'         | 984          |
|                         | <i>fliCH7</i> R             | 5' GGAGCAAGCGGGTTGGTT 3'         |              |
|                         | <i>hlyA</i> F               | 5' GCATCATCAAGCGTACGTTCC 3'      | 534          |
|                         | <i>hlyA</i> R               | 5' AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT 3'     |              |
|                         | <i>stx1</i> F               | 5' ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC 3'    | 180          |
|                         | <i>stx1</i> R               | 5' AGAACGCCCACTGAGATCATC 3'      |              |
|                         | <i>stx2</i> F               | 5' GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC 3'      | 255          |
| <i>stx2</i> R           | 5' TCGCCAGTTATCTGACATTCT 3' |                                  |              |

**Apêndice 7** – Figura A - Imagem do gel de agarose para o gene *hilA* (413 pb). Coluna 1: Controle da reação (água); Coluna 2: Marcador de peso molecular (100pb); Colunas 3 a 8: Isolados testados; Coluna 9: Controle positivo (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076); Coluna 10: Controle negativo (*S. aureus* ATCC 25933). Figura B - Imagem do gel de agarose para o gene *invA* (521 pb). Coluna 1: Marcador de peso molecular (100pb); Colunas 2 a 4: Isolados testados; Coluna 5: Controle positivo (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028); Coluna 6: Controle negativo (*S. aureus* ATCC 25933); Coluna 7: Controle da reação (água)



**Apêndice 8** – Figura A - Imagem do gel de agarose para o gene *prs* (370 pb). Coluna 1: Marcador de peso molecular (100pb); Colunas 2 a 12: Isolados testados; Coluna 13: Controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); Coluna 14: Controle negativo (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076); Coluna 15: Controle da reação (água). Figura B - Imagem do gel de agarose para os gene *inlA* (800 pb) , *inlC* (517 pb) e *inlJ* (238 pb). Coluna 1: Marcador de peso molecular (100 pb); Colunas 2 a 6: Isolados testados; Coluna 7: Controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644); Coluna 8: Controle negativo (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076); Coluna 9: Controle da reação (água)



**Apêndice 9** – Figura A - Imagem do gel de agarose para o gene *uspA* (884 pb). Coluna 1: Marcador de peso molecular (100pb); Coluna 2: Isolado testado; Coluna 3: Controle positivo (*E. coli* O157:H7 EDL 933); Coluna 4: Controle negativo (*S. aureus* ATCC 25933). Coluna 5: Controle da reação (água). Figura B - Imagem do gel de agarose para o gene *eae* (384 pb). Coluna 1: Marcador de peso molecular (100pb); Colunas 2 a 9: Isolados testados; Coluna 10: Controle positivo (*E. coli* O157:H7 EDL 933); Coluna 11: Controle negativo (*S. aureus* ATCC 25933); Coluna 12: Controle da reação (água)

