

VANESSA AGLAÊ MARTINS TEODORO

***Yersinia enterocolitica* COMO PERIGO MICROBIOLÓGICO EM DOIS
AMBIENTES DE ABATE DE SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
“*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que habita em mim, que me fortalece e me conduz; aos meus pais, a quem nada desse mundo seria suficiente para agradecer tamanho amor e dedicação, sem os quais não teria chegado até aqui, por tudo que me ensinaram a ser e por nunca deixarem de acreditar; agradeço aos meus irmãos Maycoln, Thiago e Pacelli pelo companheirismo, pela alegria, por deixarem a minha vida mais feliz; a minha cunhada Janine pela boa vontade e pelo grande “apoio técnico”.

Agradeço ao meu orientador, professor Paulo Sérgio de Arruda Pinto, pela paciência, compreensão e apoio, principalmente nessa reta final; às minhas conselheiras, professoras Paula Dias Bevilacqua por me ajudar a expandir meu horizonte profissional e Maria Cristina Dantas Vanetti pelos conselhos nos momentos certos e apoio laboratorial; ao professor Mauro Pires Moraes, praticamente um conselheiro, por toda ajuda e atenção desprendida; à professora Márcia Rogéria pelas dicas e sugestões; aos funcionários da preventiva, em especial o Luís Carlos, Monteiro e Dagô pela dedicação ao trabalho, facilitando a vida daqueles que necessitam; à Rose, pelos “galhos quebrados”, boa vontade e por estar sempre disposta a ajudar; à Mayara e ao pessoal do Laboratório de Virologia Molecular Animal do BIOAGRO, em especial à Sabrina, Abelardo, Fernandinha e Andreza, pelo apoio técnico; ao Departamento de Veterinária e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade concedida; à Capes, pelo auxílio financeiro.

A todos meus amigos de Viçosa por tornar mais amena essa jornada, por dividirem medos, incertezas e inseguranças... por somarem alegrias, entusiasmos, forças..., em especial à G7 (Lilinha, Gya, Sharita, Fab's, Cris, Silvinha), aos companheiros do “Cavaleiros de Jedi” (Nilo, Titico, Marcinho, Léo, Danilo, Mocô e André), ao Sid, à Lili e em especial à Lolô, companheira de coletas e análises laboratoriais, que me fez aprender que, às vezes, o melhor mesmo é ficar calada; ao Alexandre por me mostrar que tudo é possível, basta ter fé; à Lu pela energia positiva e espiritualidade transmitidas através do Yoga; às moradoras do JD (Lili, Cynthinha, Fê, Katita, Let's Go e Let's Talk), às ex-moradoras e agregados (Rê, Flá, Gabi, Fê, Gaby, Veto, Rafa e Marcelo) por tudo que passamos juntos e por todos os momentos

que ainda virão, pela força e pelo carinho que somente entendem aqueles que fazem da república, sua casa e dos moradores, sua família. À Dona Maria, minha mãe viçosense, que nunca poupou esforços, que sempre deu o melhor de si, obrigada pelo carinho, pela compreensão, pela alegria que irradia, mesmo quando as coisas não andam bem.

Ao Handley pelo carinho, pela força, paciência e atenção, principalmente na fase final da defesa; pela tranquilidade e pela alegria, por deixar mais felizes meus últimos meses aqui em Viçosa e por me fazer acreditar que no final as coisas sempre dão certo.

Aos meus colegas de trabalho, Edson, Alcilene, André, Roni e, em especial, à Alessandra, pelo companheirismo e pela descoberta de novas amizades; aos meus alunos pelos momentos de alegria e descobertas a mim proporcionados.

Aos meus amigos de Monlevade, que nem todos esses anos de distância foram suficientes para nos afastar; à “turma do handball” (Dri, Ione, Grá, Nadja, Pati) pelas esporádicas reuniões que me fazem mais feliz, em especial à Ninha que, embora tenha partido tão cedo, sei que sempre está ao meu lado em todos os momentos de minha vida, sejam eles bons ou ruins; ao pessoal do terceiro ano e agregados em especial ao Gui, Chiquito, Zó, Kelber, Gabriel, Andinho, Gil, Marcelo, Caio, Silviane, Jussara, Karine, Karina, Giane e Cíntia por transformarem em festa qualquer encontro casual.

Enfim, agradeço a todos aqueles que passaram por minha vida e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional, pessoal ou espiritual.

BIOGRAFIA

Vanessa Aglaê Martins Teodoro, filha de José das Graças Teodoro e Maria das Graças Martins Teodoro, nasceu em João Monlevade, Minas Gerais, em 26 de março de 1978.

Em 1995, concluiu o segundo grau no Centro Educacional de João Monlevade. Em 1997, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, no curso de Medicina Veterinária, concluindo a graduação em maio de 2002.

Em abril de 2002 começou a cursar o mestrado na mesma instituição onde defendeu tese no dia 18 de fevereiro de 2004.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1.1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. <i>Yersinia enterocolitica</i> : características gerais	03
2.2. <i>Yersinia enterocolitica</i> : detecção e isolamento	04
2.3. <i>Yersinia enterocolitica</i> como um perigo para saúde pública	06
2.4. Presença de <i>Yersinia enterocolitica</i> em suínos	08
2.5. Influência do processo de abate na microbiota da carne suína e o controle de PCC's	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Amostragem e delineamento experimental	15
3.2. Análise Microbiológica Convencional	19
3.3. PCR	22
3.4. Análise estatística	24
3.5. Análise de Custos	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
7. APÊNDICES	41

RESUMO

TEODORO, Vanessa Aglaê Martins, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. ***Yersinia enterocolitica* como perigo microbiológico em dois ambientes de abate de suínos.** Orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Conselheiras: Maria Cristina Dantas Vanetti e Paula Dias Bevilacqua.

Foi objetivo deste trabalho avaliar a contaminação de carcaças suínas a partir de amostras de swab de superfície e de tonsilas suínas por *Yersinia enterocolitica* em ambientes de abate de suínos inspecionados e não inspecionados e comparar as técnicas de análise microbiológica convencional e Reação de Polimerase em Cadeia-PCR quanto à eficácia, rapidez, custo dos reagentes e tipo de amostra utilizada. No ambiente de abate inspecionado, as amostras coletadas em um matadouro-frigorífico de Minas Gerais, Brasil, se constituíram de esfregaços superficiais de 120 carcaças para análise microbiológica convencional, sendo 30 amostras nos seguintes pontos de coleta: após a depilação, antes da evisceração, após a evisceração/serragem e após 24 a 48 horas de refrigeração. No ambiente não inspecionado as amostras foram coletadas ao final do abate, constituindo-se de 30 carcaças e 30 tonsilas de suínos e se destinaram à análise microbiológica convencional e pela PCR. Nenhuma amostra apresentou contaminação por *Yersinia* quando se empregou a técnica microbiológica convencional nos matadouros inspecionados ou não. Por outro lado, quando se utilizou a técnica de PCR, 73% dos suínos não inspecionados apresentaram-se contaminados com *Y. enterocolitica*. Esta contaminação foi de 40% nas carcaças e 43% nas tonsilas; sendo que dessas últimas, 10% possuía amostras de *Y. enterocolitica* patogênica. Além da aparente maior sensibilidade, o PCR ainda mostrou ser uma técnica mais rápida e de menor custo que a análise microbiológica convencional. Tanto as tonsilas quanto os esfregaços de carcaças são alternativas viáveis para a coleta de amostras com vistas à determinação de *Y. enterocolitica* em suínos abatidos. *Y. enterocolitica* pode ser considerada um perigo microbiológico que ocorre ao longo do processo de abate. A aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do APPCC com a identificação de Pontos Críticos de Controle (PCCs) pode ser uma boa alternativa para o controle da *Y. enterocolitica* no abate de suínos.

ABSTRACT

TEODORO, Vanessa Aglaê Martins, M.S., Federal University of Viçosa, february 2004. ***Yersinia enterocolitica* as a microbiological hazard in two swine slaughterhouse pattern.** Adviser: Paulo Sérgio de Arruda Pinto. Committee members: Maria Cristina Dantas Vanetti and Paula Dias Bevilacqüa.

The purpose of this work was to evaluate the contamination of swine carcasses from samples of surfaces swabbling and swine tonsils with *Yersinia enterocolitica* in inspected and not inspected places of swine slaughter and compare the conventional microbiological analyses and Polymerase Chain Reaction-PCR taking as reference its effectiveness, quickness, reagents cost, and type of samples used, as subsidy to the HACCP system. In the inspected place slaughter the samples were collected in a inspected slaughterhouse in Minas Gerais, Brazil, were constituted of surfaces swabbling of 120 carcasses for conventional microbiologic analyses, thirty samples were collected in the following processing collecting point: after scalding/dehairing, immediately before evisceration, after evisceration/splitting and after 24 to 48 hours of refrigeration. In the not inspected places the samples were collected in the end of slaughter and were constituted by 30 carcasses and 30 swine tonsils and were destined to conventional microbiological analyses and PCR. When the conventional microbiologic analyses were used both in inspected and not inspected places contaminated samples were not found. However, when the PCR techinc was used 73% of the not inspected swine showed to be positives to *Y. enterocolitica*. This contamination was of 40% in the car casses and 43% in the tonsils; 10% of this animals presented samples contaminated with *Y. enterocolitica*. Beside its higher apparent sensibility, the PCR showed to be a faster technic and with lower cost than the conventional microbiologic analyses. Both the tonsils and the carcasses swabbling are viable alternatives for samples collection for the *Y. enterocolitica* determination in the slaughtered swine. *Y. enterocolitica* can be considered an microbiological hazard that happens in the slaughter process. The application of the GMP and the HACCP with the identification of the Critical Control Points (CCPs) can be a good alternative to the control of *Y. enterocolitica* in the swine slaughter.

1. INTRODUÇÃO

Yersinia enterocolitica é uma bactéria causadora da doença denominada yersiniose que possui como manifestação clínica mais freqüente, a enterocolite. Os sintomas variam de acordo com a idade da pessoa infectada, sendo mais intensos em crianças.

Essa bactéria se encontra amplamente distribuída no ambiente terrestre e na água. Pode ser isolada de animais de produção como suínos, bovinos, ovinos e caprinos, animais silvestres, pássaros, peixes, moluscos e insetos. A principal fonte de contaminação para os seres humanos é a carne suína. Porém, o leite cru ou inadequadamente pasteurizado, bem como seus derivados, produtos de ovos e vegetais crus também podem veiculá-la.

A detecção da *Y. enterocolitica* em alimentos tem-se mostrado cada vez mais importante quanto à segurança alimentar dos consumidores, principalmente devido a sua capacidade de crescer em alimentos crus e cozidos à temperatura de refrigeração.

Nos últimos anos, houve um aumento considerável da incidência dessa enterobactéria nos seres humanos e do seu isolamento a partir de alimentos. No Brasil, *Y. enterocolitica* foi isolada no ser humano, em cães e suínos, enfermos ou saudáveis, na água e em alimentos como carne e derivados, leite e vegetais, principalmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul.

As enfermidades transmitidas pelos alimentos (ETA) encontram-se entre as principais causas de morte nos países da América Latina e do Caribe. Além disso, o desenvolvimento econômico e a globalização do mercado mundial, as alterações nos hábitos alimentares, com crescente utilização de alimentos industrializados e

consumidos fora de casa, a introdução de medidas de saneamento, entre outros fatores, alteram o perfil epidemiológico das ETA, expondo a população a variados tipos de contaminantes (OPAS/INPPAZ, 2001).

A inspeção sanitária, em qualquer nível da administração pública, preconiza um controle sanitário do abate, de modo a assegurar a saúde dos consumidores da carne ou produtos cárneos oriundos dos referidos estabelecimentos. Porém, ainda hoje, grande parte da carne consumida pela população brasileira é proveniente de abates sem inspeção ou clandestinos. Esses animais não possuem certificado de procedência e são frutos de um longo processo de sonegação fiscal. Esse tipo de abate permite que chegue à mesa dos consumidores carnes oriundas de animais doentes ou de descarte.

A adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do Sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) por parte de governos, indústria e consumidores, pode alterar, consideravelmente, este panorama, pois pode-se identificar os perigos concretos e adotar as devidas medidas preventivas. Estas tecnologias de aplicação recente buscam oferecer aos consumidores alimentos que não apresentem riscos à saúde (OPAS/INPPAZ, 2001).

O sistema APPCC baseia-se na identificação, avaliação e controle dos perigos advindos do processo de abate e do processamento dos alimentos nas linhas de produção, distribuição e consumo. Dessa forma, propicia condições para minimizar a contaminação microbiana, diminuindo o risco de doenças causadas pela ingestão de alimentos impróprios para o consumo. Para garantir sua exequibilidade, o monitoramento na linha de abate deve ser conduzido tendo como parâmetros os Pontos Críticos de Controle (PCCs) para assegurar que os perigos sejam posteriormente prevenidos, reduzidos ou eliminados.

Esse trabalho teve como objetivos avaliar a contaminação de carcaças e tonsilas suínas por *Y. enterocolitica* nos ambientes de abate, inspecionados e não inspecionados e comparar a pesquisa microbiológica convencional e a PCR, em relação ao custo dos reagentes, duração, eficácia e tipo de amostra analisada, tonsila e carcaça.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Yersinia enterocolitica*: características gerais

Yersinia é um gênero da família Enterobacteriaceae composto por 11 espécies, três claramente patogênicas para o ser humano: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*. As oito espécies restantes (*Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. rucherii* e *Y. aldovae*) são consideradas não-patogênicas ou ambientais (De Boer, 1992; Sulakveilidze, 2000; Aarts et al., 2001).

A espécie de *Y. enterocolitica* é muito heterogênea dos pontos de vista bioquímico, sorológico, grau de virulência e distribuição geográfica. Dentre os seis biotipos identificados, cinco (biotipos 1B, 2, 3, 4, e 5) são considerados patogênicos para humanos. Suas cepas estão distribuídas em mais de 60 sorotipos, entretanto, apenas alguns são patogênicos (Leal et al., 1997b; Wannet et al., 2001). Segundo De Boer & Nouws (1991), os principais sorotipos associados com a doença humana são: O:3, O:5,27, O:8 e O:9.

Y. enterocolitica se caracteriza por apresentar-se na forma de bastonete Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não esporulada, oxidase negativa e usualmente urease e nitrato redutase positiva; fermenta a glicose com pouca ou nenhuma produção de gás (Silva et al., 1997).

Quanto à temperatura de crescimento, é psicrotrófica, multiplica-se entre -1,3°C e 42°C, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 37°C (Germano & Germano, 2001). Devido a sua propriedade de se desenvolver a 4°C, se multiplica nos alimentos refrigerados como carne e derivados, leite e derivados e vegetais crus (Leal

et al, 1997b). As temperaturas usuais de cocção empregadas para a maioria dos alimentos destroem esse agente (Germano & Germano, 2001).

Y. enterocolitica é particularmente sensível a ácidos orgânicos como o lático e o acético nas concentrações de 1 a 3% que, geralmente, não têm efeito sobre as características sensoriais desejáveis quando utilizados como descontaminantes de carcaças e possuem bom efeito residual durante a armazenagem (Smulders & Greer, 1998).

2.2. *Yersinia enterocolitica*: detecção e isolamento

Nos últimos 10 a 15 anos, o aumento da incidência da infecção causada pela *Y. enterocolitica* e o envolvimento dos alimentos em muitos surtos de yersiniose, levaram ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para o isolamento desse patógeno em alimentos (De Boer, 1992).

Segundo Marques (1991), o isolamento da *Y. enterocolitica* em alimentos complica-se mais pela dificuldade da técnica utilizada do que pelo requerimento nutricional, uma vez que seu crescimento é mais lento do que o de outros microrganismos e que suas colônias são rapidamente inibidas e facilmente mascaradas, mesmo quando semeadas em ágar seletivo. Em alimentos, o isolamento do microrganismo é geralmente mais difícil devido ao número de *Y. enterocolitica* ser bem menor e existir uma grande variedade de microrganismos competidores (Doyle & Hugdahl, 1983).

O isolamento da *Y. enterocolitica* requer meios seletivos que forneçam nutrientes suficientes e inibam o crescimento da microbiota contaminante do alimento (Sulakveilidze, 2000). Assim, vários meios têm sido desenvolvidos, cada um apresentando vantagens e desvantagens. Em geral, o Ágar Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina (CIN), desenvolvido por Schiemann, em 1979, é considerado o meio mais adequado para isolar *Yersinia*. O ágar CIN inibe o crescimento da maioria das outras bactérias, sendo uma excelente escolha para o isolamento seletivo da *Y. enterocolitica* de praticamente qualquer tipo de amostra (Sulakveilidze, 2000).

Ao avaliar as técnicas de isolamento e enriquecimento que têm sido propostas para *Y. enterocolitica* em gêneros alimentícios, Walker & Gilmour (1986) observaram que o pré-enriquecimento em caldo tripticase de soja (TSB), seguido pelo enriquecimento seletivo em meio bile-oxalato-sorbose (BOS), e pelo plaqueamento em ágar CIN propiciou um crescimento considerável de *Yersinia* e inibiu satisfatoriamente a microbiota competidora.

Meios alcalinos também têm sido recomendados para isolar *Yersinia*, porque inibem grande número de contaminantes. Assim, o uso desses meios constitui-se em uma alternativa rápida, sensível e simples para isolar *Yersinia* de culturas mistas, proporcionando uma rápida identificação da etiologia da infecção alimentar, facilitando a remoção dos alimentos contaminados do mercado consumidor (Aulisio et al. 1980; Marques, 1991).

A capacidade da *Y. enterocolitica* de crescer a 4°C também pode ser utilizada para selecioná-la, porém, segundo De Boer (1992), esse tipo de enriquecimento requer longo período de incubação, tornando-se inviável para o controle de qualidade alimentar.

O enriquecimento em duas fases também tem sido adotado para isolar *Y. enterocolitica* em alimentos. Em um estudo realizado na França, por Delmas & Vidon (1985), foi verificado que, dentre todos os diferentes procedimentos de enriquecimento e isolamento utilizados, o melhor foi aquele efetuado com o caldo de enriquecimento BOS, seguido por tratamento alcalino antes do isolamento em ágar CIN. Segundo Schiemann (1982), tais procedimentos, são mais eficazes e rápidos que o enriquecimento a frio e o caldo Rappaport modificado. O uso do caldo BOS como um enriquecimento seletivo também apresentou melhor desempenho quando comparado ao caldo de enriquecimento com salina fosfatada tamponada.

O crescimento bacteriano em ágar seletivo é somente uma indicação da presença do gênero de *Yersinia*, o que não exclui a utilização de testes bioquímicos padronizados para a identificação final da espécie (Sulakveilidze, 2000).

Atualmente, como recurso adicional, para detecção de *Y. enterocolitica*, testes de PCR têm sido padronizados. Na maioria dos casos, esses testes apontam genes de patogenicidade localizados no cromossomo bacteriano *yst* ou no *ail* (Aarts et al.,

2001). Outros testes são direcionados para seqüências localizadas no plasmídeo *pYV*. Esses testes, entretanto, podem ser pouco confiáveis quando ocorre perda do plasmídeo durante o cultivo, o que pode induzir a um resultado falso negativo (Aarts et al., 2001; Wannet et al., 2001).

A análise por PCR propicia meios mais rápidos, sensíveis e específicos de identificação de *Y. enterocolitica*, patogênica ou não, do que os métodos microbiológicos convencionais, que são demorados e laboriosos. Sua utilização reduz significativamente o tempo exigido para identificar *Y. enterocolitica*, sendo ainda dispensados os passos de biotipagem e sorotipagem (Wannet et al., 2001).

Foi realizado por Johannessen et al. (2000), um experimento com produtos de suínos noruegueses, utilizando um método de cultura tradicional e um ensaio de PCR, analisando-se um total de 300 amostras. Pelo método de cultura, *Y. enterocolitica* O:3 foi isolada de seis amostras (2%), enquanto o método de PCR indicou sua presença em 50 amostras (17%). O estudo realçou a necessidade de desenvolver e melhorar os métodos aplicados à detecção da *Y. enterocolitica* em alimentos.

2.3. *Yersinia enterocolitica* como um perigo para a Saúde Pública

Y. enterocolitica é amplamente distribuída no ambiente terrestre, lagos e água corrente (Ryser & Marth, 1989). A principal fonte de contaminação de humanos é a carne de suíno contaminada, mas o leite cru ou inadequadamente pasteurizado, bem como seus derivados, produtos de ovos, vegetais crus, alimentos processados e a água também podem transmiti-la (De Boer & Nows, 1991; De Boer, 1992; Leal et al., 1997a; Lantz et al., 1998; Aarts et al., 2001). Esse patógeno também pode ser isolado de animais de produção como bovinos, ovinos e caprinos, animais silvestres, pássaros, peixes, moluscos e insetos (Swaminathan et al., 1982; Ryser & Marth, 1989; Asplund et al., 1990).

A yersiniose é uma doença gastroentérica humana e ocasionalmente animal, causada pela *Y. enterocolitica* e pela *Y. pseudotuberculosis* (Fukushima et al., 1997). O período de incubação é de 24 a 48 horas e os sintomas variam de acordo com a pessoa infectada. Na população, de modo geral, os mais susceptíveis à infecção e suas

complicações são as crianças menores de sete anos de idade, seguidas pelas pessoas debilitadas, idosos e imunocomprometidos (Germano & Germano, 2001).

A mais freqüente manifestação clínica da infecção é a enterocolite, caracterizada por diarreia com ou sem sangue, febre e dores abdominais, principalmente no quadrante direito do abdômen, podendo ser confundida com apendicite (Ryser & Marth, 1989; Ackers et al., 2000). A infecção também tem sido associada com linfadenite mesentérica, ileite terminal, abscessos esplenohepáticos, septicemia, eritemas nodosos e artrites (Wannet et al, 2001).

Os mecanismos de patogenicidade da *Y. enterocolitica* são complexos e envolvem numerosos fatores. Atualmente, vários marcadores de patogenicidade já foram identificados no genoma dessa bactéria. A presença de um plasmídeo denominado *pYV*, é essencial à virulência das cepas e aquelas que não o possuem são avirulentas (Leal et al., 1997a; Sulakveilidze, 2000; Wannet et al., 2001).

Os primeiros passos da infecção requerem, pelo menos, dois fatores cromossômicos, chamados *ail* (relacionado ao local de invasão) e *inv* (invasão) (Leal et al., 1997a; Wannet et al., 2001). Sequências homólogas do *ail* foram encontradas exclusivamente em cepas patogênicas, ao passo que sequências homólogas do *inv* apresentavam-se em todas as cepas (Aarts et al., 2001; Wannet et al., 2001). Portanto, tem sido utilizada a amplificação de sequências específicas do gene *ail* para diagnóstico por PCR e identificação de *Y. enterocolitica* patogênica (Leal et al., 1997a; Wannet et al., 2001).

Numerosas cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* produzem uma enterotoxina estável designada YST I. Embora a atuação de YST I na patogenicidade da doença humana tenha sido questionada por alguns pesquisadores, estudos recentes sugerem que esta pode ter um papel importante na causa de diarreia (Sulakveilidze, 2000).

Dados de prevalência da bactéria em estudo em infecções intestinais são pouco conhecidos, não notificados ou incertos (Rajic, 2000). Porém, segundo Skjerve et al. (1998), sua ocorrência constitui um problema de saúde pública importante, com impacto clínico e econômico consideráveis. Em países desenvolvidos, a *Y. enterocolitica* tem sido isolada em 1 a 2% dos casos humanos de enterite aguda (De Boer, 1992).

Na Dinamarca, a prevalência de *Y. enterocolitica* O:3, em 1985, foi de 29 casos por 100.000 habitantes. Em 1996, houve um declínio para aproximadamente 9 casos por 100.000 habitantes, o que pode ser explicado pela implementação de um programa para controle de *Salmonella* nos matadouros, contribuindo para redução do número de casos humanos de yersiniose (Rajic, 2000).

Na Noruega, a *Y. enterocolitica* é o terceiro agente mais frequentemente relatado em infecções bacterianas transmitidas por alimentos, superada por infecções causadas por *Salmonella* e *Campylobacter* (Skjerve et al., 1998). Nos últimos anos, entretanto, a incidência de yersiniose humana tem decrescido significativamente; em 1992, 222 casos foram registrados, ao passo que 108 casos foram relatados em 1997. Nesse país, o risco aumentado de yersiniose foi associado ao consumo da carne e lingüiça suínas (Johannessen et al., 2000).

Segundo Rajic (2000), no Canadá, são notificados de 600 a 700 casos por ano.

Na Europa e no Japão, a maioria dos casos de infecção bacteriana transmitida por alimentos se deve a *Y. enterocolitica* O:3 e O:9, causados pelo alto consumo de produtos da carne suína (Ackers et al., 2000; Wannet et al., 2001). Nos Estados Unidos, entre 1976 e 1982, dos cinco casos notificados, quatro foram causados pelo sorogrupo O:8. A partir de 1988, vários casos de yersiniose em crianças foram causados pelo sorogrupo O:3 e atribuídos à preparação doméstica de intestinos de suínos (Ackers et al., 2000).

A identificação de *Y. enterocolitica*, em material de origem clínica, nos laboratórios de análise locais, é muito rara (Leal et al., 1988; Falcão, 1989). Considerando que a metodologia empregada na rotina desses laboratórios não visa o isolamento de *Y. enterocolitica*, sua ocorrência poderia estar sendo subestimada. Entretanto, no sul do Brasil, *Y. enterocolitica* e espécies ambientais têm sido encontradas fortuitamente ou sempre que são pesquisadas (Falcão, 1989; Falcão, 1991). Numerosos isolamentos de *Y. enterocolitica* têm sido realizados em amostras clínicas na cidade de São Paulo sem emprego de alguma metodologia especial (Ceccarelli et al., 1990). No Estado do Rio de Janeiro, esta bactéria também foi encontrada em suínos, no homem e em cães sadios (Nunes & Ricciardi, 1986; Mendonça et al, 1995), em diversos alimentos comercializados (leite, carnes e

derivados, vegetais crus) e na água (Warnken et al., 1987; Tassinari et al., 1994). No Rio Grande do Sul, *Y. enterocolitica* foi isolada de suínos diarréicos (Castro et al., 1983).

2.4. Presença de *Yersinia enterocolitica* em suínos

A epidemiologia da yersiniose é, em grande parte, não compreendida (De Boer & Nouws, 1991), mas muitos estudos têm demonstrado que alguns sorogrupos patogênicos para o ser humano têm sido isolados frequentemente de suínos, sugerindo constituir, esse mamífero, um importante reservatório dessa enterobactéria (Nesbakken, 1988; Asplund et al., 1990; De Boer, 1992; Kotula & Sharar, 1993; Nesbakken et al., 1994; Funk et al., 1998; Letellier et al., 1999).

A *Y. enterocolitica* pode causar problemas clínicos em suínos, predominando a agressão entérica, embora possa ocorrer também ao nível extraintestinal (Lázaro & Hofer, 1997). Um fato importante observado tem sido a ocorrência de portadores assintomáticos. Assim, animais clinicamente saudáveis podem ser fonte de *Y. enterocolitica* patogênica para humanos (Rajic, 2000). Há uma forte correlação entre a presença da *Y. enterocolitica* 0:3 no ser humano e no suíno compartilhando a mesma área geográfica (Lázaro & Hofer, 1997).

Pesquisas na União Européia, Canadá, E.U.A. e Nova Zelândia relataram alta taxa de recuperação de *Y. enterocolitica* das fezes, conteúdos intestinais e da cavidade oral de suínos. A língua e as tonsilas apresentaram taxas de isolamento frequentemente mais altas que as de conteúdos intestinais ou fezes, variando segundo regiões geográficas diferentes (Rajic, 2000).

Segundo Asplund et al. (1990) e De Boer & Nouws (1991), existe uma forte associação da incidência da infecção com o consumo de alimentos contaminados, especialmente da carne suína. No Japão, a ocorrência da yersiniose está intimamente relacionada com o aumento da produção de suínos e, conseqüente, ampliação do consumo de seus produtos cárneos (Fukushima et al., 1997).

Embora a maioria das cepas de *Y. enterocolitica* seja inofensiva, os sorogrupos O:3, O:8 e O:9, patogênicos para o ser humano, são mais frequentemente

isolados de suínos. Cepas enteropatogênicas são encontradas em níveis significativos em produtos suínos nos países Europeus (Neubauer et al., 2000) e os sorogrupos O:3 e O:9 predominam em casos de yersiniose humana, segundo Ryser & Marth (1989) e De Boer & Nouws (1991).

Nos Estados Unidos, os suínos são reservatórios comuns dos sorotipos O:3 e O:9 da *Y. enterocolitica*, porém, nos últimos anos, a frequência de isolamento do sorotipo O:8 vem aumentando. Na Bélgica e Suécia, o sorotipo O:3 predomina nestes animais (Castañeda et al., 2001). Na Dinamarca, 70 a 90% dos rebanhos suínos estavam infectados com *Y. enterocolitica* O:3. No Canadá, estudos realizados em Ontario, Quebec, Saskatchewan e Prince Edward Island demonstraram *Y. enterocolitica* O:3 como principal cepa isolada em suínos (Rajic, 2000).

Em um estudo realizado no México, por Castañeda et al. (2001), analisaram-se 100 amostras de tecido linfático de suínos recém-abatidos, dentre as quais 20% apresentaram-se positivas para *Y. enterocolitica*. Foram encontradas oito amostras com o sorotipo O:3 e oito com o sorotipo O:9, todas pertencentes ao biotipo 1.

Kotula & Sharar (1993) estudaram a presença do sorotipo O:5,27 em suínos aparentemente saudáveis, abatidos em estabelecimentos inspecionados, observando que 4% das amostras analisadas apresentaram-se positivas.

Nesbakken et al. avaliaram a presença de *Y. enterocolitica* O:3 em amostras de sangue, tonsilas, linfonodos submaxilares e mesentéricos, conteúdo do estômago, íleo, ceco, cólon, fezes e swabs de carcaças suínas coletadas em abatedouros com inspeção federal da Noruega. 75% dos animais testados possuíam *Y. enterocolitica* em suas tonsilas, além da contaminação em outros pontos da coleta. Uma das amostras de carcaças se apresentou positiva sem que houvesse contaminação da tonsila, linfonodos ou trato gastrointestinal. Esse fato foi atribuído à contaminação cruzada entre as carcaças.

Lázaro & Hofer (1997) realizaram uma pesquisa no Rio de Janeiro utilizando o teste de soro-aglutinação lenta em 119 suínos saudáveis para a determinação da possível presença de aglutininas anti-*Yersinia enterocolitica* O:3. Dos 63,9% animais reativos (título 1:20), 8,4% tinham título positivo (1:80), indicando que a presença

deste patógeno entre os suínos também pode ser um problema de saúde pública no Brasil.

2.5. Influência do processo de abate na microbiota da carne suína e o controle de PCC's

A avaliação microbiológica da carcaça de suínos no seu processo de abate tem sido objeto de estudos experimentais e de revisão, nos últimos anos, na Europa e nos EUA (Borch et al., 1996; Miller et al., 1997; Berends et al., 1998; Carr et al., 1998; Korsak et al., 1998; Yu et al., 1999). Contudo este panorama permanece obscuro nas condições brasileiras de obtenção da carne suína, em face da escassez de registros de pesquisa científica nacional dessa natureza.

Segundo Borch et al. (1996) e Berends et al. (1997), *Y. enterocolitica* é uma das principais bactérias patogênicas incorporadas na linha de abate pelo próprio suíno. Por isso, Berends et al. (1996) consideram importante o controle em etapas anteriores ao abate, incluindo o transporte e o sistema de criação. Ademais, Miller et al. (1997) concluíram que o repouso dos suínos, durante um período inferior a quatro horas, no matadouro, predispõe à ruptura das vísceras, indicando que o perigo de contaminação, sobretudo por enterobactérias, está sempre presente nestas condições.

Considerando que a carne suína é um alimento que, inevitavelmente, é contaminada, durante o abate, seja a partir da pele e intestinos do animal, ou de equipamentos e até mesmo dos próprios manipuladores (Carr et al., 1998), algumas etapas do abate configuradas como PPCs em potencial devem ser monitoradas, visando controlar essas contaminações microbianas, principalmente as que acarretam problemas para a saúde pública e perda alimentar, levando, também, a prejuízos financeiros.

A implementação de inspeção obrigatória, associada à melhoria de higiene em matadouros, pode conduzir a uma diminuição significativa de *Y. enterocolitica* na carne suína. Porém, a inspeção tradicional é incapaz de controlar e prevenir patógenos, como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Toxoplasma* e *Trichinella*. Esses patógenos, na maioria das vezes, não causam sinais clínicos em animais, ou

lesões que podem ser descobertas durante inspeção *pós-mortem* das carcaças (Rajic, 2000). Nesse contexto, o sistema APPCC torna-se fundamental para o controle de contaminações microbianas.

Durante o processo de abate, as bactérias da cavidade oral e do conteúdo intestinal podem contaminar as carcaças e o ambiente do matadouro. As operações mais críticas são a liberação do reto, sua oclusão e a evisceração. A oclusão com saco plástico e a liberação manual ou mecânica do reto reduzem, expressivamente, a contaminação de 10% para 0,8%. O treinamento dos operadores e a secção do esôfago em ponto distante do estômago também são medidas muito eficientes neste sentido (Nesbakken et al. 1994; Borch et al., 1996; Rajic, 2000).

Nesbakken et al. (1994) enfatizaram a necessidade de mudanças nas técnicas de abate e nas práticas de inspeção, tais como remoção da língua e faringe no início da operação de abate evitando-se assim, contatos com a região tonsilar altamente contaminada.

De Boer & Nouws (1991), ao realizarem um estudo com suínos, isolaram *Y. enterocolitica* de 42% das tonsilas analisadas, porém nenhuma carcaça foi contaminada e somente 1% das amostras de carne foi positiva. Asplund et al. (1990) também investigaram a prevalência dessa bactéria em suínos e carnes suínas e observaram que 17,7% e 36,4% das amostras fecais e tonsilas, respectivamente, foram positivas para a cepa O:3, sendo que nenhuma amostra de carne foi positiva. Entretanto, esses autores afirmaram que muitos suínos abatidos estão contaminados com cepas patogênicas de *Yersinia sp.*, e desse modo, a prevenção da contaminação das carcaças com fezes e tonsilas passou a ser uma importante medida sanitária. A baixa incidência de carnes contaminadas nesses estudos foi atribuída à prática de remoção cuidadosa das tonsilas e da oclusão do reto, prevenindo a contaminação.

Nesbakken (1988) também avaliou a incidência do sorogrupo O:3 biotipo 4 em línguas e tonsilas suínas e investigou a ocorrência dessa bactéria na superfície da carcaça e no ambiente de abate, concluindo que existe um número considerável deste sorogrupo na cavidade oral suína (83,3%) e verificando que, a partir da cavidade oral, esse agente pode ser disseminado para outras partes da carcaça. Constatou-se assim,

que a prática de inspeção da carne também contribuiu para os altos níveis de contaminação da superfície da carcaça (63,3%).

Segundo Borch et al. (1996), procedimentos de inspeção, particularmente da região tonsilar, constituem-se riscos para a carcaça e vísceras a partir das mãos e facas. Porém a incisão dos linfonodos sub-maxilares é compulsória e prevê o diagnóstico de outras doenças como a tuberculose, sendo por isso, indispensável.

A incisão de linfonodos mesentéricos, estômago, íleo, ceco e cólon apresenta risco de contaminação com *Y. enterocolitica* O:3 que varia de 4,2 a 16,7%. Facas e equipamentos podem contaminar outras partes das carcaças quando não há descontaminação entre uma carcaça e outra. A toailete e a inspeção também representam risco de contaminação cruzada das carcaças (Nesbakken et al., 2003).

Em outro estudo, também sobre a incidência de *Y. enterocolitica* em carcaças suínas, Mafu et al. (1989), observaram que, respectivamente, 18%, 2,2% e 6,2% dos isolados de amostras fecais, diafragmáticas e esfregaços da câmara frigorífica, apresentaram-se positivos. Comentaram ainda, que a presença desse agente nas câmaras frigoríficas reforça a sua capacidade de sobreviver em baixas temperaturas, podendo-se tornar um perigo potencial em fluxogramas de abate, quando a desinfecção neste setor é negligenciada.

Na fase de escaldamento, realizada a 60,0 a 61,5°C por 6 a 8 minutos, ocorre uma redução acentuada de *Y. enterocolitica* (Borch et al., 1996). Como o chamoscamento é a última etapa que provoca redução de bactérias, a carga final de enterobactérias na carcaça é determinada pelas operações de toailete, evisceração, inspeção e outras em etapas posteriores (Berends et al., 1997).

Durante a evisceração, bactérias disseminam-se para a carcaça devido ao conteúdo gastrintestinal e à contaminação oral e esofágica (Borch et al., 1996). Segundo Berends et al. (1997), o equipamento de toailete sujo e a evisceração mal conduzida representam um fator de risco de contaminação com enterobactérias e a evisceração contribui com 90% do número de carcaças contaminadas.

A serragem das carcaças promove a transferência de microrganismos da incisão retal e da cabeça para a carcaça, requerendo a desinfecção da serra a cada carcaça, cuja eficiência está diretamente ligada à velocidade de abate. A lavagem das

carcaças, sobretudo da cabeça, leva à contaminação microbiana do ambiente de abate a partir de sangue e contaminações orais e gastrointestinais, predispondo a multiplicações posteriores (Borch et al., 1996).

Uma vez contaminada a linha de abate, principalmente máquinas, facas e mãos, essas superfícies servem de fontes de contaminação cruzada, as duas últimas mais intensamente, até que a higienização seja efetuada, ou seja, nos intervalos ou no final do abate (Borch et al., 1996; Berends et al., 1997).

Borch et al. (1996) reforçaram que a eficácia das operações de abate sobre a minimização dos riscos está intimamente relacionada com o emprego do sistema APPCC, prevendo um plano sistemático de higienização em todas as suas etapas.

Esses mesmos autores consideram como PCCs no abate de suínos, a evisceração, devido à contaminação da carcaça a partir das fezes e a inspeção *post mortem*, pela contaminação da carcaça a partir dos linfonodos incisados e, como Pontos de Controle (PCs), as demais etapas de abate, exceto a insensibilização. Conforme Berends et al. (1997), o chamuscamento também é um PCC, com respeito à possibilidade de eliminação dos riscos de contaminação da pele.

Considerando a qualidade e a quantidade de dados científicos atualmente disponíveis sobre a contaminação de carcaças e carne com enteropatógenos, Berends et al. (1997) enfatizaram que mais pesquisas são necessárias, a fim de que sejam feitas avaliações de risco mais acuradas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem e delineamento da pesquisa

A coleta de amostras foi dividida em duas etapas. Na primeira, foram realizadas apenas as análises microbiológicas convencionais, sendo as amostras coletadas em um matadouro-frigorífico de suínos, localizado em Minas Gerais. Este matadouro era fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) e tinha capacidade de abate de 2000 suínos/dia, entretanto, operava na ocasião, com uma velocidade de 600 suínos/dia. Na segunda etapa, foram realizadas a pesquisa microbiológica convencional e a PCR, sendo as amostras coletadas em três ambientes de abate sem inspeção, localizados em Minas Gerais.

As amostras provenientes do abate inspecionado foram constituídas, aleatoriamente, de esfregaços superficiais com “swabs” de 120 carcaças de suínos. Os esfregaços foram obtidos em diversos dias de coleta, abrangendo quatro pontos distintos do processo de abate, constituindo-se de 30 amostras por ponto.

Em cada ponto, foram coletadas sete subamostras de partes pré-estabelecidas da superfície externa e interna da carcaça, em quatro diferentes etapas do abate: após o escaldamento/depilação (ponto A) e imediatamente antes da evisceração (ponto B), onde foram selecionadas para coleta as superfícies externas dos quatro pernís, dos flancos direito e esquerdo e do ventre na sua região central; após a evisceração (ponto C) e após o resfriamento de 24 a 48 horas (ponto D), onde foram selecionadas as superfícies externas dos quatro pernís, dos flancos direito e esquerdo e de um ponto interno do abdômen, de uma das meias carcaças, próximo à inserção do diafragma (Figuras 1 e 2).

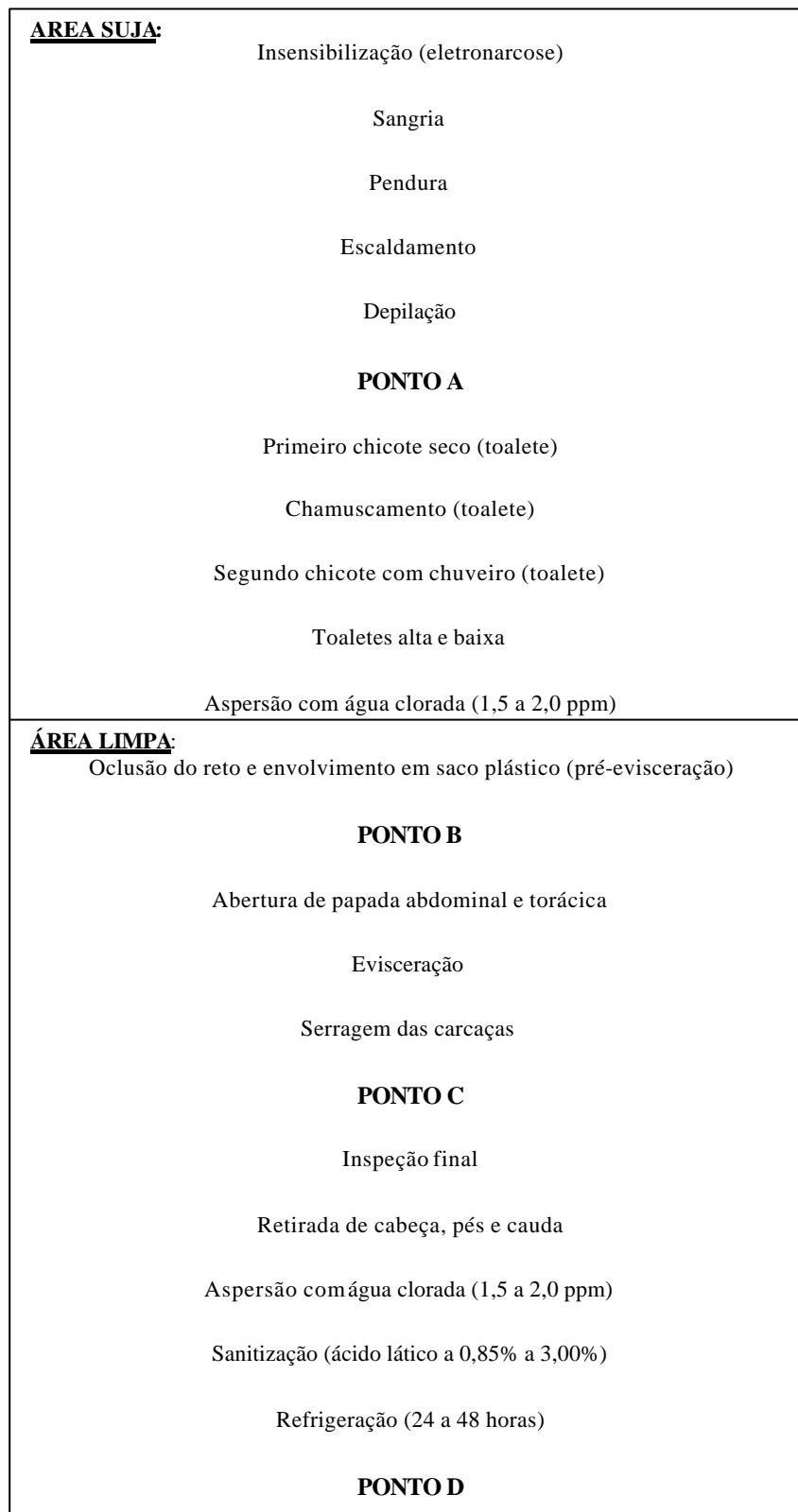


FIGURA 1 - Fluxograma de abate em matadouro-frigorífico de suínos inspecionado

As amostras oriundas dos ambientes não inspecionados foram constituídas, aleatoriamente, de 30 carcaças e 30 tonsilas de suínos. Cada amostra de carcaça foi composta de sete subamostras coletadas através de esfregaços com “swabs” nas superfícies externas dos quatro pernis, dos flancos direitos e esquerdos e de um ponto interno do abdome, de uma das meias carcaças, próximo à inserção do diafragma (Figura 2).

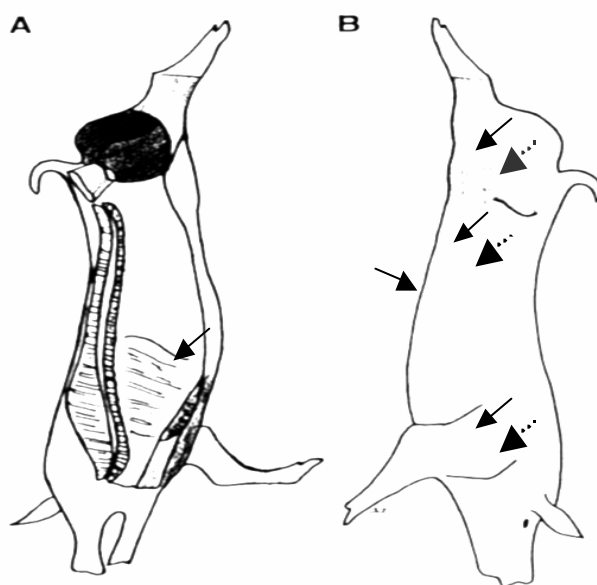


FIGURA 2: Pontos de coleta (seta) das amostras pela técnica de esfregaços superficiais nas faces interna (A) e externa (B) das carcaças suínas, nos seus lados direito e esquerdo.

Nos ambientes não inspecionados, as amostras foram coletadas apenas na fase final do abate, após a evisceração, antes de serem submetidas ao resfriamento. Esse ponto correspondeu ao ponto C da primeira etapa de coleta (Figuras 2 e 3).

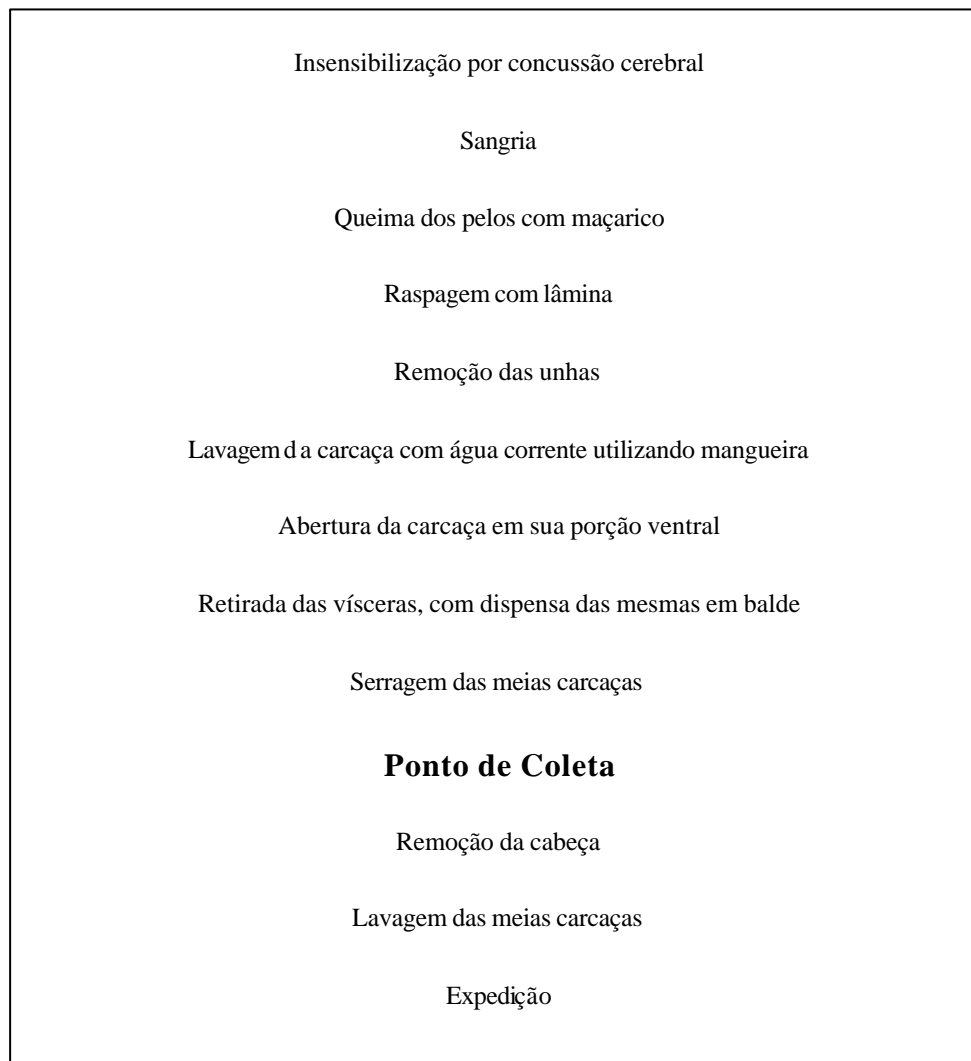


FIGURA 3 – Etapas do abate de suínos em ambientes não inspecionados.

A área da carcaça a ser amostrada foi delimitada por moldes estéreis com área interna livre de 20 cm² por ponto de coleta, onde foram efetuados os esfregaços com o uso de “swabs” (5 mm de diâmetro) devidamente esterilizados e previamente umedecidos em solução salina a 0,85%, também estéril.

Durante a coleta, os “swabs” obtidos das superfícies de cada carcaça foram reunidos em um mesmo saco plástico estéril e remetidos, imediatamente, sob refrigeração, aos Laboratórios de Inspeção de Produtos de Origem Animal e de Virologia Molecular Animal, do Departamento de Veterinária e BIOAGRO, respectivamente, da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras de carcaças do matadouro inspecionado foram analisadas por métodos microbiológicos convencionais, constituindo das etapas de isolamento e identificação bioquímica de *Y. enterocolitica*. As amostras de carcaças e de tonsilas dos ambientes não inspecionados, foram analisadas por meio de pesquisa microbiológica convencional e pela técnica de Reação da polimerase em cadeia-PCR de *Y. enterocolitica*.

3.2. Análise microbiológica convencional (Figura 4)

As amostras de “swabs” das carcaças foram homogeneizadas, no dia da coleta, em 140 mL de água peptonada estéril, durante 1 minuto, em homogeneizador peristáltico (Stomacher). Cinquenta mililitros do homogenato foram destinados à pesquisa de *Y. enterocolitica*, sendo cada 25 mL utilizados em métodos de enriquecimento primário distintos, 225 mL de Caldo Trypticase de Soja (TSB) e 225 mL de Caldo Rappaport Modificado (RAP); 2,5 g de tonsilas foram cultivados em 22,5 mL de caldo RAP e em 22,5 mL de caldo TSB.

A verificação da presença da *Yersinia* foi realizada segundo técnica descrita por Silva et al. (1997), adaptada por Johannessen et al. (2000), conforme etapas a seguir.

No enriquecimento primário, 25 mL da amostra, previamente homogeneizada, foram adicionados a 225 mL de caldo não seletivo TSB e incubados a 15°C por 48 horas. Os outros 25 mL foram cultivados em caldo seletivo RAP e incubados de 22 a 25°C por 2 ou 3 dias.

O enriquecimento secundário foi realizado somente para o enriquecimento primário não seletivo, transferindo-se 0,1 mL do caldo TSB para 10 mL de uma solução de salina fosfatada com 2% de sorbitol e 0,15% de sais biliares (PBS

Modificado) e incubados de 22 a 25°C, por 3 a 5 dias. Após este período, foi feito um tratamento com KOH 0,5% em uma solução aquosa de 0,5% de NaCl, transferindo-se 0,5 mL da solução salina para 4,5 mL de KOH e agitando por 3 a 4 segundos. A seguir, foi feito o plaqueamento em meios diferenciais, estriando os cultivos anteriores em placas de Ágar MacConkey (Mc) (22 a 25°C/48hs) e Ágar Cefsulodina Irgasan Novobiocina (CIN) (32°C/18 a 24hs).

Após o enriquecimento primário seletivo com o meio RAP, as amostras foram plaqueadas em Ágar MacConkey (22 a 25°C/48hs) e Ágar Salmonella-Shigella Desoxicolato (SSDC) (30°C/24hs).

A partir do plaqueamento diferencial, as colônias típicas foram passadas para a etapa da confirmação preliminar. Nesta etapa, foram realizados dois testes bioquímicos. O primeiro constituiu no teste de crescimento em Ágar Kligler Ferro (KIA), onde as colônias foram inoculadas por picadas e estrias em tubos do ágar inclinado e incubados por 18 a 24 horas, a 35°C. O segundo teste bioquímico, teste de urease, consistiu em passar as colônias típicas do ágar KIA para tubos inclinados com Ágar Uréia de Christensen, incubando-os a 35°C por 2 a 3 horas. Os resultados negativos, após esse período, foram reincubados por mais 24 horas.

As colônias urease positivas foram então, submetidas à confirmação definitiva. As culturas foram repicadas novamente para tubos com KIA e incubadas por 18 a 24 horas de 25 a 28°C. Essa massa celular que foi utilizada nos testes de utilização de citrato conduzido em tubos de Ágar Citrato de Simmons inclinados e com incubação de 25 a 28°C por até 4 dias; fermentação da sacarose, L-ramnose, D-rafnose, D-melibiose e á.-metil-D-glicosídeo realizado em tubos com caldo vermelho de fenol suplementados com 1% de cada carboidrato a ser testado com incubação de 25 a 28°C por até 4 dias.

A técnica de isolamento microbiológico convencional utilizada foi testada com um controle positivo que consistiu da cultura de *Y. enterocolitica* ATCC 9610, fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz. O controle positivo foi reativado em meio Brain Heart Infusion - BHI a 30°C por 24 horas, segundo instruções do Laboratório de Materiais de Referência da referida Fundação.

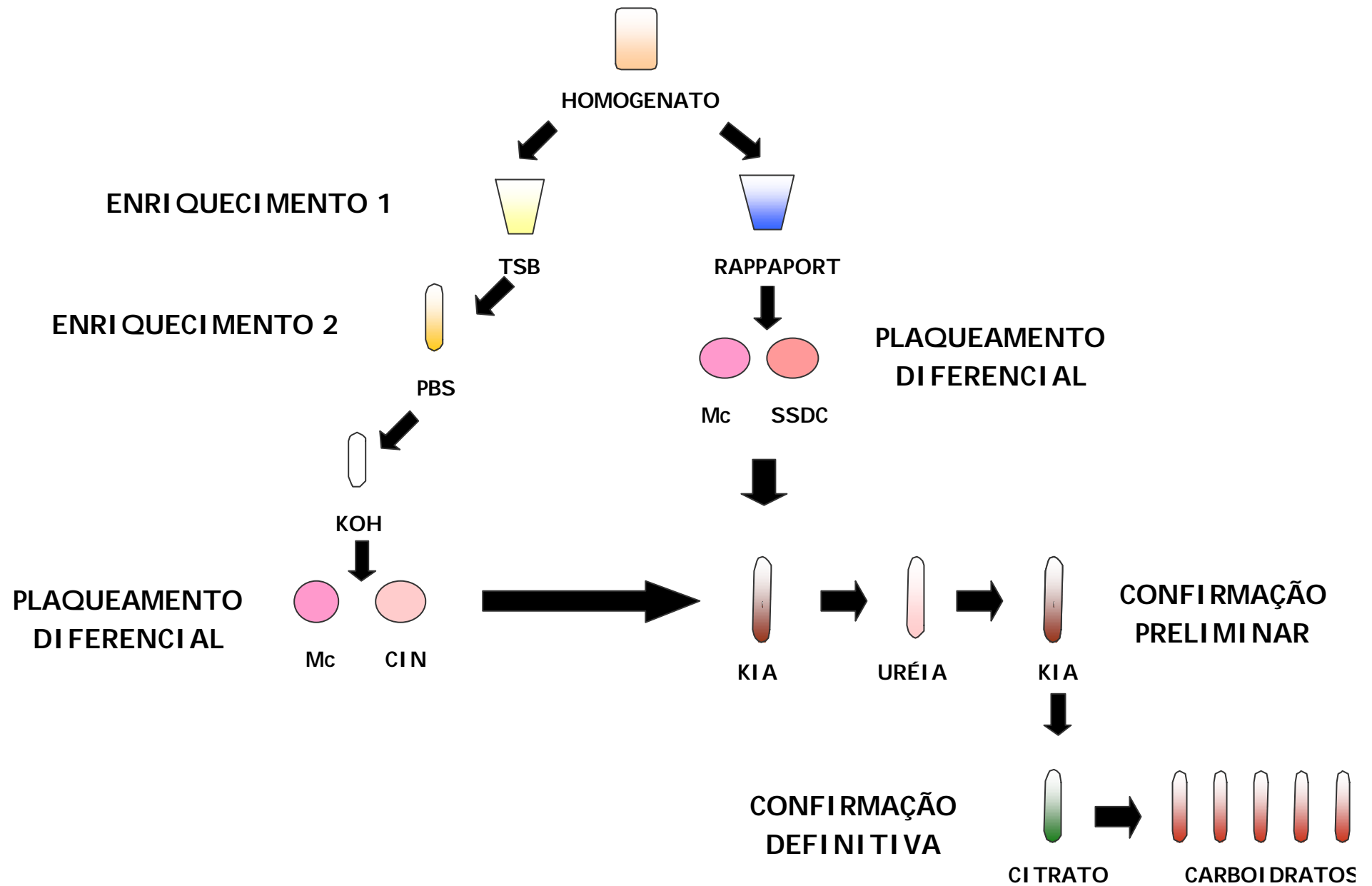


FIGURA 4– Esquema representativo da Análise Microbiológica Convencional, segundo Silva *et al.* (1997) e Johannessen *et al.* (2000).

3.3. PCR

Para a reação de PCR foram utilizados os homogenatos obtidos por centrifugação, partindo de “swabs” e de fragmentos das tonsilas. As amostras de DNA foram obtidas pelo método de extração fenol:clorofórmio, realizado segundo metodologia padrão descrita por Sambrook et al. (1989), distribuídas em tubos eppendorf e estocadas a -20°C . Antes da utilização, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente.

A extração do DNA bacteriano consistiu na centrifugação das alíquotas estocadas em eppendorf, com dispensa do sobrenadante e resuspensão do centrifugado em 200 μL de Tampão TE. Adicionou-se mais 500 μL de tampão de extração. A nova solução foi homogeneizada e incubada a 37°C , por aproximadamente uma hora, até que o material se tornasse viscoso. Após o que se adicionou 20 μL de proteinase K seguido de nova homogeneização e banho-maria a 56°C até que todo o material estivesse lisado, em torno de 30 minutos. Após esse período, adicionou-se um volume de fenol que correspondesse ao mesmo volume presente no eppendorf, que foi homogeneizado por inversão, seguido de centrifugação a 5000 g por 15 minutos. Após esse período, coletou-se a fase aquosa superior para um novo tubo eppendorf, onde se adicionou igual volume de fenol: clorofórmio (1:1), homogeneizando e centrifugando a 5000 g por 15 minutos. Mais uma vez, a fase aquosa superior foi coletada para um novo tubo eppendorf, seguido de adição de igual volume de clorofórmio. Também seguido de homogeneização e centrifugação a 5000 g por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada para um novo tubo e adicionou-se 0,4 volumes de acetato de amônia 5 M, seguido de 2 volumes de etanol 100%, homogeneização e centrifugação a 5000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado presente no fundo do eppendorf foi lavado (centrifugação por 5 minutos a 5000 g) com etanol 70% por duas vezes seguidas, com o último descarte de sobrenadante, colocou-se o centrifugado para secar em temperatura ambiente e, quando o mesmo já estava seco, adicionou-se 50 μL de TE.

As técnicas de PCR foram realizadas segundo Wannet et al. (2001) e Uyeda et al. (2003). Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos: *16SrRNA I* (5'-AAT ACC GCA TAA CGT CTT CG-3') e *16SrRNA II* (5'-CTT CTT CTG CGA GTA ACG TC-3'), com 330 pb, específicos da espécie *Y. enterocolitica* e *ail I* (5'-TTA ATG TGT ACG CTG GGA GTG-3') e *ail II* (5'-GGA GTA TTC ATA TGA AGC GTC-3'), com 425 pb, indicadores de cepas patogênicas da *Y. enterocolitica*.

A mistura de reação para a PCR continha 15,5 μ L de água (SIGMA), 0,5 μ L de 2 mM de mistura dNTP, 1U (0,2 μ L) de *Taq* DNA polimerase, 2,5 μ L de tampão PCR 10 X, 1,5 μ L de 50 mM de tampão de cloreto de magnésio e 20 pmol (2,5 μ L) do par de oligonucleotídeos (*16SrRNA* ou *ail*).

As condições de amplificação para a reação com os oligonucleotídeos *16SrRNA I* e *II* foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 36 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu na desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento do oligonucleotídeo a 62°C por 45 segundos, e extensão do oligonucleotídeo a 72°C por 45 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. O DNA amplificado foi analisado em eletroforese com 1 a 2% de gel de agarose corado com 2 μ L de brometo de etídio por 1 hora, juntamente com marcador molecular λ X174, e sua corrida foi, posteriormente, visualizada em aparelho de luz UV.

As condições de amplificação para a reação com os oligonucleotídeos *ail I* e *II* foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu na desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento do oligonucleotídeo a 57°C por 2 minutos, e extensão do oligonucleotídeo a 72°C por 45 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. O DNA amplificado foi analisado em eletroforese com 1 a 2% de gel de agarose corado com 2 μ L de brometo de etídio por 1 hora, juntamente com marcador molecular λ X174, e sua corrida foi, posteriormente, visualizada em aparelho de luz UV.

Após a extração do DNA bacteriano, foi realizada a PCR, específica para identificação da espécie *Y. enterocolitica*. Somente das amostras positivas, foi feita a reação de PCR para reconhecimento das cepas patogênicas. Foi utilizada uma cultura de *Y. enterocolitica* ATCC 9610 como controle positivo para todas as reações, exceto

para aquelas específicas de cepas patogênicas. Este controle positivo foi testado pelo método microbiológico convencional, com perfil bioquímico característico, para visualização do tamanho correto da banda. O controle negativo utilizado se constituiu em cultura de *Listeria monocytogenes*, também fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz.

A cepa de *Y. enterocolitica* ATCC 9610, segundo Uyeda et al. (2003), é de baixa patogenicidade por ser uma amostra de alta passagem. Assim, nesse estudo, não foi possível utilizá-la como controle positivo nas reações de PCR em que se utilizou oligonucleotídeo com seqüências específicas de cepas patogênicas (*ail*). Assim, utilizou-se, sempre, uma das amostras positivas (T14) para acompanhamento das outras amostras testadas quanto à patogenicidade (gene *ail*).

3.4. Análise estatística

As taxas de frequência de contaminação por *Y. enterocolitica* nas carcaças e tonsilas, na análise convencional e PCR, nos abates inspecionados e não inspecionados foram determinadas por estatística descritiva.

3.5. Análise de custos

Realizou-se a análise de custos das provas microbiológica convencional e PCR no que se refere à despesa com material de consumo, não sendo consideradas as despesas com mão de obra, vidrarias, equipamentos e encargos sociais, entre outros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho não foi detectada a presença de *Y. enterocolitica* nas amostras coletadas nos pontos selecionados ao longo da linha de abate inspecionado, utilizando-se a técnica microbiológica convencional. Também não foi observada no abate não inspecionado quando se realizou a mesma técnica. Por outro lado, quando se utilizou a técnica de PCR nas amostras coletadas nos estabelecimentos não inspecionados, foi possível detectar a presença deste patógeno em amostras de carcaças e de tonsilas. Além disso, a PCR permitiu determinar a presença de cepas patogênicas nas tonsilas positivas para *Y. enterocolitica* (Tabela 1).

Como não se isolou *Y. enterocolitica* no matadouro-frigorífico inspecionado, ficou inviabilizada a avaliação deste perigo microbiológico em diferentes operações de abate com o propósito de identificar pontos críticos de controle no referido estabelecimento. Além disso, não foi possível a realização da PCR nas amostras provenientes do estabelecimento inspecionado devido a problemas relacionados ao período da coleta.

TABELA 1 - Frequência de *Y. enterocolitica* e *Y. enterocolitica* patogênica por carcaça, tonsilas suínas e suínos analisados através da PCR no abate não inspecionado.

	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. enterocolitica</i> patogênica
Carcaça	12/30 (40%)	00/30 (0%)
Tonsila	13/30 (43%)	03/30 (10%)
Suínos	22/30 (73%)	03/30 (10%)

A não detecção de *Y. enterocolitica* no abate inspecionado pode ser atribuída a alguns fatores como interferência metodológica e o uso de boas práticas durante o abate, sendo devidamente aplicadas e obtendo efeitos positivos no controle desta bactéria, conforme discutido a seguir.

As temperaturas de 61 a 62°C por 6 minutos usadas no escaldamento podem ter eliminado a *Y. enterocolitica*, eventualmente presente nas carcaças, embora a sua contaminação anterior não tenha sido analisada. Segundo Borch et al. (1996), nessa fase, utilizando-se uma temperatura de 60,0 a 61,5°C durante 6 a 8 minutos, ocorre uma redução acentuada de *Y. enterocolitica*.

No estabelecimento pesquisado, as operações de toailete são muito eficientes, abrangendo uma extensa seção de limpeza após o escaldamento/depilação, incluindo uma primeira toailete mecanizada (chicote seco), seguida pelo chamuscamento e uma segunda composta pelo chicote com chuveiro, seguida de raspagens manuais, o que também contribui para a redução da carga microbiana da carcaça.

São realizados ainda, oclusão retal e seu envolvimento em saco plástico. Essas técnicas reduzem, expressivamente, a contaminação das carcaças com *Y. enterocolitica* de 10% para menos de 1%, contribuindo para baixa ocorrência de carnes contaminadas (Asplund et al., 1990; Nesbakken et al., 1994; Borch et al., 1996; Johannessen et al., 2000; Rajic, 2000).

Além disso, ao final do abate, antes da refrigeração, é realizada no estabelecimento pesquisado, uma sanitização das carcaças com ácido lático a 0,85 a 3%, o que pode contribuir para a redução da contaminação por *Y. enterocolitica*. Segundo Smulders & Greer (1998), *Y. enterocolitica* é particularmente sensível a ácidos orgânicos como lático e acético, nas concentrações de 1 a 3%. Esses ácidos, nessas concentrações, possuem bom efeito residual durante a armazenagem.

Apesar de ser uma bactéria psicrófila e se desenvolver a 4 °C (Leal et al., 1997b), talvez o tempo de refrigeração de 24 a 48 horas não tenha sido suficiente para permitir a multiplicação de células eventualmente remanescentes do processo de abate e atingir números detectáveis pela análise microbiológica convencional. Deve-se, entretanto, ponderar que a carne suína, provavelmente, levará mais tempo até ser consumida, podendo nesse intervalo haver proliferação da *Y. enterocolitica*. Além disso, uma carcaça contaminada pode levar à contaminação da câmara frigorífica e assim contaminar outras carcaças. Segundo Castañeda et al. (2001), *Y. enterocolitica* pode alcançar números capazes de causar infecção em quatro dias de refrigeração da carne suína. Este patógeno também tem sido isolado da carne embalada a vácuo, quando esta é submetida a processos repetidos de congelamento e descongelamento.

Assim, apesar de não ter sido detectada, não se deve descartar a possibilidade de contaminação das carcaças em outras oportunidades de abate. Tal contaminação pode ocorrer através das fezes de animais portadores saudáveis ou doentes, durante o processo de remoção das vísceras e serragem das carcaças, bem como do ambiente, equipamentos ou manipuladores. Deve-se considerar, ainda, a possibilidade de multiplicação do patógeno em temperaturas baixas, podendo até mesmo comprometer a higiene do processamento da carne suína, no caso de sua industrialização.

Em pesquisa realizada com as mesmas 120 amostras de carcaças do estabelecimento inspecionado utilizadas neste trabalho, Lima (2002) pesquisou a presença de *Escherichia coli*, encontrando uma frequência de 0,56; 0,05; 0,05 e 0,1 log NMP/cm², nos pontos A, B, C e D, respectivamente. A autora atribuiu esta baixa contaminação às BPF adotadas, à técnica de oclusão retal que antecede à evisceração, à separação entre as zonas suja e limpa e, conseqüentemente, movimentação de operários entre essas zonas, e à lavagem da serra entre a divisão de uma carcaça e

outra. Ainda assim, considerou a fase de escaldamento/depilação como PC e a evisceração um PCC que devem ser monitorados evitando-se o acréscimo da carga microbiana nas etapas posteriores. Esses resultados permitem inferir que a contaminação de origem fecal no referido estabelecimento não foi tão evidente, explicando a ausência de *Y. enterocolitica* nas amostras procedentes do estabelecimento inspecionado.

Embora os resultados da análise microbiológica convencional obtidos nesta pesquisa não permitam uma comparação entre os ambientes de abate inspecionado ou não, as marcantes diferenças observadas nas condições operacionais e higiênicas de abate, bem como o elevado número de suínos contaminados com *Y. enterocolitica* no abate não inspecionado, segundo a técnica de PCR (73%), indicam piores condições no abate não inspecionado. Reafirma-se, portanto, que a devida estruturação do estabelecimento de abate, acrescida do serviço de inspeção, exercem um decisivo papel no atendimento aos padrões de qualidade para garantir a segurança da carne suína para a saúde pública.

O resultado negativo à análise microbiológica convencional de amostras positivas à PCR, coletadas no estabelecimento que adota o abate não inspecionado, pode ser explicado pelo fato de *Y. enterocolitica* ser pouco competitiva na presença de outros microrganismos. Devido à característica de crescer mais lentamente, suas colônias são rapidamente inibidas e facilmente mascaradas, mesmo quando semeadas em ágar seletivo (Marques, 1991). Além disso, o isolamento do microrganismo geralmente é mais difícil em alimentos, devido ao baixo número de *Y. enterocolitica* e uma grande variedade da microbiota competidora (Doyle & Hugdahl, 1983). Ressalta-se ainda que pode ter ocorrido uma possível interferência metodológica. Embora tenha sido utilizado na metodologia microbiológica convencional, um meio de cultura seletivo mais indicado para o isolamento de colônias, o Ágar CIN (Walker e Gilmour, 1986; Sulakveildze, 2000), o meio de enriquecimento secundário, o Caldo BOS recomendado por Schiemann (1982); Delmans & Vidon (1985); Walker e Gilmour (1986), não foi utilizado. Esta interferência também pode ter ocorrido na análise de amostras procedentes do abate inspecionado.

O método microbiológico convencional mostrou-se menos sensível que a PCR, o que pode ser comprovado pela não detecção de *Y. enterocolitica* no abate não inspecionado e sua detecção através da PCR. Johannessen et al. (2000), também compararam estas duas técnicas em experimento com produtos derivados da carne suína. Pela técnica convencional, *Y. enterocolitica* O:3 foi isolada de seis amostras (2%), enquanto a PCR indicou a presença da *Y. enterocolitica* patogênica em 50 amostras (17%). Nesse estudo, também se realçou a necessidade de desenvolver e melhorar a técnica microbiológica convencional aplicada na detecção da *Y. enterocolitica* em alimentos.

A pesquisa microbiológica convencional de *Y. enterocolitica* demanda um tempo de até 20 dias, somente para a confirmação da espécie; para a identificação da cepa, são necessárias provas adicionais de biotipagem e sorotipagem, absorvendo mais tempo ainda. Por outro lado, a prova de PCR pode ser realizada no prazo de 24 horas. Segundo Wannet et al. (2001), a análise por PCR reduz significativamente o tempo necessário para identificar a *Y. enterocolitica* patogênica e não patogênica. Diante de um surto de infecção alimentar, a pesquisa convencional torna-se demorada e menos oportuna, não devendo, entretanto, ser descartada.

Além disso, ao se comparar as duas técnicas no que se refere ao custo dos reagentes utilizados em cada reação, percebeu-se que a PCR é mais econômica do que a análise microbiológica convencional. Para cada amostra analisada através da PCR, há um gasto com reagentes em torno de U\$ 1,50 e, na análise convencional, de U\$9,21. Ressalta-se, entretanto, que a análise de custos se referiu apenas aos reagentes, não sendo considerados nos cálculos o gasto com equipamentos, vidrarias, mão de obra, entre outros.

Nesbakken et al. (2003) compararam o método microbiológico convencional, a PCR e o ELISA, não encontrando diferença significativa entre eles. Apesar disso, esses autores consideraram a PCR e o ELISA melhores alternativas do que a análise microbiológica convencional na avaliação e verificação do sistema APPCC em abatedouros por se constituírem métodos mais rápidos e econômicos.

Segundo Wannet et al. (2001), a técnica de PCR parece ser uma ferramenta útil para a rápida, sensível e específica detecção de *Y. enterocolitica*. Porém, a

detecção de *Y. enterocolitica* pela PCR deve ser analisada com cuidado devido ao fato da técnica ser muito sensível e identificar a presença do DNA bacteriano, mesmo sem a viabilidade da bactéria; neste caso o patógeno não representaria risco para a saúde pública. Por outro lado, a detecção de *Y. enterocolitica* pelo método convencional pode subestimar sua presença, caso a bactéria se encontre injuriada, dificultando seu isolamento.

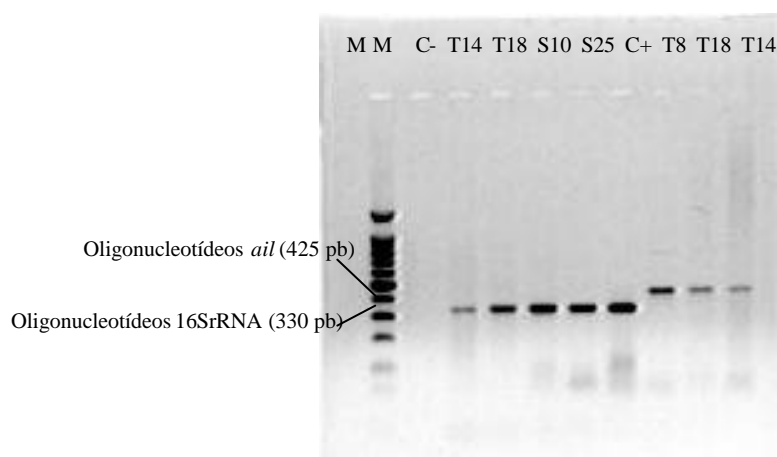


FIGURA 5: Resultados da PCR de algumas amostras de tonsilas (T) e carcaças (S) procedentes do abate de suínos não inspecionados e dos controles positivo (C+), negativo (C-), segundo o marcador molecular (MM), evidenciando a presença de *Y. enterocolitica* (*16srRNA*) e *Y. enterocolitica* patogênica (*ail*).

No que se refere aos tipos de amostras utilizadas nesse trabalho, observa-se que não houve diferença apreciável entre o número de amostras positivas quando se utilizou carcaça ou tonsilas, analisadas pela técnica de PCR. No abate não inspecionado, foi possível o isolamento de *Y. enterocolitica*, em 22 dos 30 animais testados (73%), considerando os dois tipos de amostras, carcaça e tonsila: oito animais apresentaram-se negativos para *Y. enterocolitica* (27%); três foram positivos para carcaça e tonsila (10%); nove positivos somente para as amostras de carcaças (30%) e 10 positivos somente para as amostras de tonsilas (33%) (figura 5).

Considerando que houve resultados positivos simultâneos para a presença de *Y. enterocolitica* em carcaças e tonsilas em apenas três suínos (10%), a influência da tonsila na contaminação da carcaça não foi tão evidente nesta pesquisa, o mesmo observado por Asplund (1990) e De Boer e Nouws (1991). Deduz-se que a contaminação da maioria das carcaças com *Y. enterocolitica* (9/30) resultou de uma maior influência de outras fontes de contaminação, possivelmente operações de abate associadas com contaminação fecal, pessoal e ambiental. Carr et al., (1998) também considerou que, em condições não higiênicas de abate, a contaminação da carne suína pode ser decorrente do próprio animal abatido, devido à contaminação da carcaça pelas fezes, tonsila ou língua, e até mesmo proveniente do ambiente ou dos próprios manipuladores.

A presença de *Y. enterocolitica* patogênica nas amostras de tonsilas alerta para presença de animais doentes ou portadores assintomáticos (10%) apontando para possíveis falhas no processo produtivo animal e potencial risco de contaminação da linha de abate. Além disso, amostras de tonsilas contaminadas pela *Y. enterocolitica* (10/30), quando não houve contaminação da carcaça, explicam a possibilidade de uma contaminação restrita ao órgão, considerando os dois tipos de amostras analisadas, com frequência elevada de contaminação animal (33%), que não pode ser negligenciada no processo de abate, sobretudo na contaminação ambiental e que pode ser prevenida com procedimentos adequados de abate. Considerações quanto à possibilidade de contaminação da carne suína a partir das tonsilas também foram feitas por Asplund (1990) e Nesbakken et al. (1994).

A opção por amostrar a carcaça ou a tonsila de suínos para a análise de *Y. enterocolitica* passa a ser influenciada pela praticidade da coleta e risco de contaminação da unidade amostral, da carcaça ou do ambiente. A coleta de tonsila dispensa a interrupção da linha de abate para a realização da pesquisa, o que não ocorre quando a coleta é realizada por esfregaços de superfície da carcaça. Assim, o estabelecimento em estudo não tem seu fluxo de abate afetado durante a execução desta atividade. Por outro lado, segundo Borch et al. (1996), procedimentos de inspeção, particularmente da região tonsilar, constituem-se riscos para a carcaça e vísceras a partir das mãos e facas. Muitos suínos abatidos estão contaminados com

cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* e, assim, a prevenção da contaminação das carcaças com fezes e tonsilas passou a ser uma importante medida sanitária (De Boer & Nouws, 1991).

Mais estudos são necessários para se desenvolver e aperfeiçoar as técnicas de detecção da *Yersinia*, bem como definir qual o melhor tipo de amostra a ser utilizada para monitoramento da *Y. enterocolitica* em situações isoladas de controle ou inseridas em plano APPCC.

5. CONCLUSÕES

O isolamento de *Y. enterocolitica* de carcaças e tonsilas de suínos foi conduzido utilizando-se o método microbiológico convencional e a PCR. Verificou-se que não houve isolamento de *Y. enterocolitica* quando se adotou a técnica microbiológica convencional mas, no entanto, por meio da PCR, foi possível o isolamento deste patógeno com elevada frequência, tanto na carcaça (40%), quanto na tonsila (43%). Assim, a PCR apresentou-se como uma boa alternativa na identificação do agente, mostrando-se ser uma técnica aparentemente mais eficaz, rápida e econômica, que pode, eventualmente, ser aliada à técnica microbiológica convencional em casos de surtos e até mesmo para monitoramento da qualidade da carne.

Considerando que não houve diferença apreciável entre os resultados positivos para *Y. enterocolitica* nas amostras de tonsilas e esfregaços de superfície das carcaças, a escolha de uma ou outra vai depender das condições experimentais ou do interesse da análise. A coleta das amostras de tonsilas evita interrupção da linha de abate, ao contrário da carcaça, porém deve-se ter maior cuidado durante a coleta para não haver contaminação da amostra, do ambiente ou mesmo da carcaça.

Embora durante o abate inspecionado não tenham sido encontrados animais contaminados por *Y. enterocolitica*, no abate não inspecionado, essa frequência foi relativamente alta (73%). Dos suínos amostrados, 10% possuíam cepas patogênicas em suas tonsilas, indicando a presença de animais doentes ou portadores assintomáticos. Assim, a *Y. enterocolitica* pode ser considerada um perigo

microbiológico que ocorre ao longo do processo de abate e que pode ser incorporada pelo próprio suíno através de fezes e tonsilas contaminados, principalmente.

Os resultados negativos para *Y. enterocolitica* acusados na análise microbiológica convencional para o estabelecimento inspecionado, bem como as observações das operações e higiene do abate e a baixa frequência de contaminação com indicadores de contaminação fecal, indicam uma maior segurança da carne suína obtida em estabelecimentos inspecionados, embora possa ter ocorrido interferência metodológica. Nestes estabelecimentos, a aplicação das BPF e do APPCC, com a identificação de PCCs torna-se viável para manter uma permanente condição de controle microbiano, inclusive de *Y. enterocolitica*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTS, H.J.M.; JOOSTEN, R.G.; HENKENS, M.H.C.; STEGEMAN, H.; VAN HOEK, A.H.A.M. Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Y. enterocolitica* strains. *Journal of Microbiological Methods*, v.47, n.2, p.209-217, 2001.
- ACKERS, M.L.; SCHOENFELD, S.; MARKMAN J.; SMITH, M.G.; NICHOLSON, M.A.; DE WITT, W.; CAMERON, N.D.; GRIFFIN, M.P.; SLUTSKER, L. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. *The Journal of Infectious Diseases*, n.181, p.1834-1837, 2000.
- ASPLUND, K.; TUOVINEM, V.; VEIJALAINEN, P.; HIRN, J. The prevalence of *Yersinia enterocolitica* O:3 in finnish pigs and pork. *Acta veterinaria Scandinavica*, v.31, n.1, p.39-43, 1990.
- AULISIO, C.C.G.; MCHLMAN, I.J.; SANDERS, A.C. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.39, n.1, p.135-140, 1980.
- BERENDS, B.R.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A.; KNAPEN, F. VAN. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*, v.3, p.37-53, 1996.

- BERENDS, B.R.; KNAPEN, F. VAN; SNIJDERS, J.M.A.; MOSSEL, D.A.A. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, v.36, p.199-206, 1997.
- BERENDS, B.R.; KNAPEN, F. VAN; MOSSEL, D.A.A.; BURT, S.A.; SNIJDERS, J.M.A. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*, v.44, n.3, p.219-229, 1998.
- BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H.. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.30, n.1/2, p.9-25, 1996.
- CARR, M.A; THOMPSON, L.D.; MILLER, M.F.; RAMSEY, C.B.; KASTER, C.S.. Chilling and trimming effects on the microbial populations of pork carcasses. *Journal of Food Protection*, v.61, n.4, p.487-489, 1998.
- CASTAÑEDA, P.E.; APARICIO, E.D.; ANDRADE, L.H.; ARANGO,C.J.J. Identificación y tipificación de biotipos y serotipos de *Yersinia enterocolitica*. *Revista de Saúde Pública*, v.35, n.4, 2001
- CASTRO, A.F.P; RICCI, L.C; ALMEIDA, A.C.P; OLIVEIRA, M.S.. Virulence factors of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs. *Revista de Microbiologia*, v.14, p.48-54, 1983.
- CECCARELLI, V.R.S.M.; SCHMIDT, C.; TRABULSI, L.R.. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em um laboratório da cidade de São Paulo. *Revista de Microbiologia*, v.21, p.364-365, 1990.
- DE BOER, E.. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.27, n.2, p.75-84, 1992.

- DE BOER, E.; NOWS, J. F. M.. Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology*, v.12, n.4, p.375-378, 1991.
- DELMANS, C.L.; VIDON, D.J.M.. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from foods in France. *Applied and Environmental Microbiology*, v.50, n.4, p.767-771, 1985.
- DOYLE, M.P.; HUGDAHL, M.B.. improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, n.1, p.127-135, 1983.
- FALCÃO, D.P.. Yersiniosis in Brazil. *Contribution Microbiology and Immunology* v.9, p.68-75, 1989.
- FALCÃO, D.P.. Occurrence of *Yersinia* spp in foods in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* v.14, p.179-182, 1991.
- FUKUSHIMA, H.; HOSHIMA, K.; ITOGAWA, U.; GOMYODA, M.. Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork beef and fuwl. *International Journal of Food Microbiology*, v.35, n.3, p.205-212, 1997.
- FUNK, J.A.; TROUTT, H.F.; ISAACSON, R.E.; FOSSIER, C.P.. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in groups of swine at slaughter *Journal of Food Protection*, v.61, n.6, p.677-682, 1998.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. Ed. Varela, p.243-247, 2001.
- JOHANNESSEN, G.S.; KAPPERUD, G.; KRUSE, H.. Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in norwegian pork products determined by a PCR method and a traditional culturing method. *International Journal of Food Microbiology*, v.54, n.1-2, p.75-80, 2000.

- KORSAK, N.; DAUBE, G.; GHAFIR, Y.; CHAHED, A.; JOLLY, S.; VINDEVOGEL, H.. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine belgian abattoirs. *Journal of Food Protection*, v.61, n.5, p.535-541, 1998.
- KOTULA, A.W.; SHARAR, A.K.. Presence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:5,27 in slaughter pigs. *Journal of Food Protection*, v.56, n.3, p.215-218, 1993.
- LANTZ, P.G.; KNUTSSIN, R.; BLIXT, Y.; AL-SOUD, W.A.; BORCH, E.; RADSTRÖM, E.. Detection of pork pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-INHIBITORY components. *International Journal of Food Microbiology*, v.45, n.2, p.93-105, 1998.
- LÁZARO, N.S.; HOFER, E.. Anti-*Yersinia enterocolitica* serotype 3 agglutinins in swine sera from Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.1, 1997.
- LEAL, N.C.; CAVALCANTI, T.I.R.; SILVA, M.J.B.; REIS, E.M.F.; SOLARI, C.A.; HOFER, E.. Frequência de enterobactérias patogênicas em processos diarreicos infantis na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.83, p.475-479, 1988.
- LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P.. Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* 0:3 isoladas de suínos no Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.1, 1997a.
- LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P.. Ausência de *Yersinia enterocolitica* em alimentos e reservatórios animais, em áreas do Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.30, n.3, 1997b.
- LIMA, E.S.C. Avaliação microbiológica em carcaças suínas e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em um frigorífico em Minas Gerais. Viçosa - Minas gerais - Brasil. [Tese de Mestrado]. p.21-38, 2002.

- MAFU, A.A.; HIGGINS, R.; NADEAU, M.; COUSINEAU, G.. The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and slaughterhouse environments. *Journal of Food Protection*, v.52, n.9, p.642-645, 1989.
- MARQUES, K.P.S.. Efeito da moagem no isolamento da *Yersinia enterocolitica* em carne bovina. Piracicaba – São Paulo – Brasil. [Tese de Doutorado]. p.70, 1991.
- MENDONÇA, C.L.; LÁZARO, N.S.; DUQUE, V.M.; HOFER, E.. Fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos sadios. *Pesquisa Veterinária Brasileira* v.15, p.11-14, 1995.
- MILLER, M.F.; CARR, M.A; BAWCOM, D.B.; RAMSEY, C.B.; THOMPSON, L.D.. Microbiology of pork carcasses from pigs with differing origins and feed withdraw times. *Journal of Food Protection*, v.60, n.3, p.242-245, 1997.
- NESBAKKEN, T.. Enumeration of *Yersinia enterocolitica* 0:3 from the porcine oral cavity, and its occurrence on out surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, v.60, n.4, p.287-293, 1988.
- NESBAKKEN, T.; NERBRINK, F.; ROTTERUD, O.; BORCH, E.. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria spp.* on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, v.23, n.2, p.197-208, 1994.
- NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HOIDAL, H. K.; ROTTERUD, O.. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter spp.* in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. *International Journal of Food Microbiology*, v.80, p.231-240, 2003.
- NEUBAUER, H.; HENSEL, A.; ALEKSIC, S.; MEYER, H. Evaluation of na adhesion gene of *Yersinia (yadA)* PCR-specific for identifications of

- enteropathogenic *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology*, v.57, n.3, p.225-227, 2000.
- NUNES, P.M.; RICCIARDI, I.D.. *Yersinia enterocolitica*: isolamento concomitante de fezes de humanos e cão. *Revista de Microbiologia*, v.17, p.220-224, 1986.
- OPAS/INPPAZ. HACCP: Instrumento essencial para a inocuidade de alimentos, p.153-156, 2001.
- RAJIC, A.. Does *Yersinia enterocolitica* from pork deserve more attention as a food safety problem? *Issue of Animal Health Forum*. Mar 31, 2000. Acessado em jan. 2004. Online. Disponível no site http://www.nal.usda.gov/fsrio/topics/tpy_enterocolitica.htm
- RYSER, E. T.; MARTH, E. H.. New food-borne pathogens of public health significance. *Perspectives and Practice*, v.89, n.7, p.948-954, 1989.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Printed in the United States of America, by Cold Spring Harbor Laboratory Press, pag. E-3 e E-4, 396 págs.,1989.
- SCHIEMANN, D.A.. Development of a two -step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food. *Applied and Environmental Microbiology*, v.43, n.1, p.14-27, 1982.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Sd., Varela, p.125-131, 1997.
- SKJERVE, E.; LIUM, B.; NIELSEN, B.; NESBAKKEN, T.. Control of *Yersinia enterocolitica* in pigs at herd level. *International Journal of Food Microbiology*, v.45, n.3, p.195-203, 1998.
- SMULDERS, F.J.M.; GREER, G.G.. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and

- controversies. *International Journal of Food Microbiology*, v.44, n.3, p.149-69, 1998.
- SULAKVEILIDZE, A.. *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes and Infection*, v.2, n.5, p.497-513, 2000.
- SWAMINATHAN, B.; HARMON, M.C.; MEHLMAN, I.J.. *Yersinia enterocolitica*: A review. *Journal Applied Microbiology*, v.54, p.151-183, 1982.
- TASSINARI, A.D.; FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.. Incidence of *Yersinia* spp. in food in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v.21, p.263-270, 1994.
- UYEDA, J.; HARMON, K.; WESLEY, I.. A PCR ELISA method for the detection of *Yersinia enterocolitica*. Acessado em set 2003. Online. Disponível no site: <http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swuinereposts/asl-1419.pdf>
- YU, S.L.; BOLTON, D.; LAUBACH, C.; KLINE, P.; OSER, A.; PALUMBO, S.A.. Effect of dehairing operations on microbiological quality of swine carcasses. *Journal of Food Protection*, v.62, n.12, p.1478-1481, 1999.
- WALKER, S.J.; GILMOUR, A.. A comparison of media and methods for the recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria from milk containing simulated raw milk microfloras. *Journal Applied Microbiology*, v.60, n.3, p.175-183, 1986.
- WANNET, W.J.B.; REESSINK, M.; BRUNINGS, H.A.; MAAS, H.M.E. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid duplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.12, p.4483-4486, 2001.
- WARNKEN, M.B., NUNES, M.B., NOLETO, A.L.S.. Incidence of *Yersinia* in meat samples purchased in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista de Microbiologia*, v.50, p.578-579, 1987.

7. APÊNDICES

7.1 Resultados de *Y. enterocolitica* no abate não inspecionado (PCR)

AMOSTRAS	CARCAÇAS	TONSILAS
1	-	-
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	-
6	-	+
7	-	+
8	+	+ Patogênica
9	-	-
10	+	+
11	-	-
13	-	+
14	-	+ Patogênica
16	+	-
17	-	-
18	-	+ Patogênica
19	-	+
20	-	-
21	+	+
22	-	+
23	+	-
24	+	-
25	+	-
26	+	-
27	+	-
28	+	-
29	-	-
30	-	-
31	+	-
32	+	-
Total de amostras positivas para <i>Y. enterocolitica</i>	12	13

7.2. Custo dos reagentes consumidos na pesquisa microbiológica de *Y. enterocolitica* por amostra:

Orçamento de reagentes utilizados na pesquisa microbiológica (Cotação do Dólar: R\$ 2,87)

Reagentes da pesquisa microbiológica	R\$	U\$
Caldo Rappaport (RAP)	13,943	4,8582
Carbenicilina	0,4255	0,1482
Caldo Trypticase de Soja (TBS)	1,2285	0,4280
PBS	0,2577	0,0898
KOH	0,0002	0,00007
Ágar Salmonella Shigella Desoxicolato (SSDC)	2,6439	0,9212
Ágar Cefsulodia Irgasan Novobiocina (CIN)	0,8667	0,3020
Ágar MacConkey	0,4416	0,1539
Ágar Kligler Ferro (KIA)	0,8418	0,2933
Ágar Uréia de Christensen	1,9059	0,6640
Ágar Citrato de Simmons	0,1331	0,0464
Caldo Vermelho de Fenol	1,4528	0,5062
Sacarose	0,0005	0,00017
L-rhamnose	0,6202	0,2161
D-rafinose	0,3942	0,1373
D-melibiose	1,2288	0,4282
∞-metil-D-glicosídeo	0,0367	0,0128
TOTAL	26,4211	9,2059

7.3. Custo dos reagentes consumidos na reação de PCR de *Y. enterocolitica* por amostra:

Orçamento de Reagentes na pesquisa PCR (Cotação do Dólar: R\$ 2,87)

Reagentes utilizados na extração do DNA e PCR	R\$	U\$
TE	0,020518	0,00725
Tampão de extração	1,42632	0,504
Proteinase K	0,996726	0,3522
Fenol	0,048898	0,017279
Clorofórmio	0,1188	0,041979
Acetato de amônia 5M	0,000601	0,000212
Álcool etílico absoluto	0,014784	0,005224
Corante	0,010222	0,003612
Agarose	0,095331	0,033686
Brometo de etídeo	0,001146	0,000405
Oligonucleotídeos <i>16SrRNA</i> forward e reverse	0,2775	0,096689
Oligonucleotídeos <i>Ail</i> forward e reverse	0,2905	0,101219
Buffer 10X	0,0056	0,001979
DNTP	0,140028	0,04948
Taq DNA polimerase	0,363598	0,12848
Cloreto de magnésio	0,0965	0,034099
Marcador Molecular	0,41	0,142857
TOTAL	4,317072	1,504206