

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**RASTREAMENTO DA CONTAMINAÇÃO POR *Yersinia enterocolitica* NA
CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017**

BRUNA TORRES FURTADO MARTINS

**RASTREAMENTO DA CONTAMINAÇÃO POR *Yersinia enterocolitica* NA
CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA**

Dissertação 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
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M386r
2017
Martins, Bruna Torres Furtado, 1992-
Rastreamento da contaminação por *Yersinia enterocolitica*
na cadeia produtiva de carne suína / Bruna Torres Furtado
Martins. – Viçosa, MG, 2017.
xii, 75f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luís Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Carne de porco - Indústria - Doenças. 2. *Yersinia
enterocolitica*. 3. Suíno - Doença. 4. Agentes antiinfecciosos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 664.9

BRUNA TORRES FURTADO MARTINS

**RASTREAMENTO DA CONTAMINAÇÃO POR *Yersinia enterocolitica*
NA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA**

Dissertação 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*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2017.




Maria Cristina Dantas Vanetti



Ricardo Seiti Yamatogi
(Coorientador)



Maria Emilene Martino Campos-Galvão



Luís Augusto Nero
(Orientador)

*“Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina”.*

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido as oportunidades, saúde e sabedoria para alcançar esse objetivo.

Ao meu orientador, professor Dr. Luís Augusto Nero, pelos ensinamentos, ideias, compreensão e apoio total.

Ao professor Dr. Ricardo Seiti Yamatogi, coorientador, que chegou quando o projeto já estava em andamento, mas não deixou de contribuir e ser essencial na finalização.

Ao professor Dr. Luciano Bersot por estar trabalhando junto conosco e enriquecer a proposta com seu conhecimento e pesquisa no estado do Paraná.

A prof. Dra. Juliana Falcão pela disponibilidade de ajudar nos questionamentos e identificação dos isolados.

A todos os demais professores, que colaboraram com seus conhecimentos nas aulas e nas conversas.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, especialmente ao Dagô, Sr. Luís e Rosi.

Aos colegas; Clarisse, Juliana, Danilo, Fred, e a todos os outros que por vezes nos ajudaram no preparo de material e também nos dias difíceis, mas prazerosos e de aprendizado que eram os dias de coleta e tratamento das amostras.

À equipe de trabalho paranaense da UFPR - Campus Palotina, por serem parceiros no projeto e compartilharem essa ideia.

A Emilene, pós-doutoranda, uma pessoa de coração enorme que teve participação e contribuição fundamental no meu trabalho com os seus conhecimentos e disponibilidade, sou eternamente grata.

A todos do laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, que sempre se mostraram solícitos, dispostos a ouvir e contribuir.

Aos estagiários da UFV e também de outras universidades que passaram pelo laboratório e de alguma forma se tornaram importantes na realização das atividades.

Aos colegas de convivência diária do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Laboratório de Biologia Molecular.

Aos proprietários das granjas e suas equipes de trabalho que se prontificaram a contribuir abrindo as porteiras para a realização das coletas.

A equipe do Frigorífico, que me concedeu além do estágio na graduação também a oportunidade de realizar as coletas no mestrado, agradeço imensamente a contribuição de todos os funcionários que sempre me recebiam com um sorriso no rosto.

A minha família, meu alicerce, por entender minhas escolhas, me dar apoio e amor incondicional.

Ao Victor, por dividir comigo sua vida e ser tão especial.

Aos queridos amigos, Sâmara, Mariana A., Mariana J., Núbia, Joana, Marcela, Roberta, Valéria, Rodrigo, Emilene pelo apoio e momentos de descontração.

A todos que contribuíram de alguma maneira na execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e a FAPEMIG pelo financiamento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica.....	3
1. Monitoramento da contaminação microbiológica na cadeia produtiva de alimentos	4
2. Suinocultura, abate e processamento	7
3. <i>Yersinia enterocolitica</i>	12
3.1. Patogenicidade de <i>Yersinia enterocolitica</i>	15
3.2. <i>Yersinia enterocolitica</i> versus resistência a antimicrobianos	19
3.3. Detecção e caracterização de <i>Yersinia enterocolitica</i>	21
4. Referências	25
OBJETIVOS.....	39
Objetivo Geral.....	39
Objetivos Específicos.....	39
CAPÍTULO 2. Rastreamento da contaminação por <i>Yersinia enterocolitica</i> na cadeia produtiva de carne suína.	40
Resumo	41
Abstract.....	42
1. Introdução	43
2. Material e Métodos	44
2.1. Área de estudo e coleta de amostras.....	44
2.2. Pesquisa de <i>Y. enterocolitica</i>	45
2.3. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	49
2.4. Potencial patogênico.....	50
2.5. Resistência a antimicrobianos.....	51
3. Resultados e Discussão	53
3.1. Pesquisa de <i>Y. enterocolitica</i>	53

3.2.	PFGE	57
3.3.	Potencial patogênico	59
3.4.	Resistência a antimicrobianos.....	63
4.	CONCLUSÃO.....	66
	AGRADECIMENTOS.....	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Fluxograma simplificado do abate de suínos..... 10

Figura 2. Modelo da patogênese de *Y. enterocolitica*. (1) *Y. enterocolitica* interage com células epiteliais e chegam a submucosa (2) Na submucosa os macrófagos fagocitam o patógeno e quando entram no sistema linfático atingem assim o LM. (3) Outra rota é quando as bactérias são englobadas pelas células M. (4) Quando estão nas placas de PP podem ser formadas microcolônias e inicia-se a replicação. (5) Na última etapa, as células bacterianas estão no LM e também podem formar microcolônias e se replicarem. Fonte: FÀBREGA; VILA, 2012. 18

CAPÍTULO 2

Figura 1: Resultados da PCR multiplex para identificação de isolados de *Y. enterocolitica*. M: 1-kb DNA ladder, B: amostra em branco. Tamanho do amplicon: *16s rRNA*: 330 bp e *inv*: 1009 bp.....55

Figura 2: Resultados da PCR multiplex para sorotipagem de isolados de *Y. enterocolitica*. M: 1-kb DNA ladder, B: amostra em branco. Tamanho do amplicon: *wbbU*: 463 bp e *wbcA*: 269 bp.....55

Figura 3. Representação esquemática dos perfis genéticos obtidos por PFGE após a macro-restrição com enzima *XbaI* dos isolados de *Y. enterocolitica* obtidos na cadeia produtiva de carne suína. A similaridade foi estimada utilizando o coeficiente de Dice (5% de tolerância).....58

Figura 4. Géis com produtos de PCRs para detecção de genes relacionados a patogenicidade de *Y. enterocolitica*. Em todas as figuras: M: 1-kb DNA ladder, B: branco, e números indicam os isolados avaliados. A: *ail*, 129 bp e *ystB*, 281 bp, B: *virF*, 591 bp, C: *myf*, 272 bp, D: *ystA*, 79 bp, E: *fepA*, 438 bp, F: *fepD*, 381 bp, G: *fes*, 561 bp, H: *tccC*, 1035 bp, I: *ymoA*, 330 bp, J: *ystC*, 83 bp, K: *hreP*, 757 bp, L: *sat*, 456 bp.....60

Figura 5. Géis com produtos de PCRs para detecção de genes relacionados a múltipla resistência a antimicrobianos por *Y. enterocolitica*. Em todas as figuras: M: 1-kb DNA ladder, B: branco, e números indicam os isolados avaliados. A: *emrD*, 551 bp, B: *marC*, 460 bp, C: *yfhD*, 632 bp.65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Diferenciação fenotípica de algumas espécies do gênero *Yersinia*. .23

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Número de amostras e procedimentos de coleta na cadeia produtiva de carne suína na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.....44

Tabela 2. Genes pesquisados, funções, sequências de nucleotídeos dos *primers*, e características das reações de PCR utilizadas para a identificação e caracterização da patogenicidade e resistência a antimicrobianos em isolados de *Yersinia enterocolitica* obtidos na cadeia produtiva de carne suína.....47

Tabela 3. Concentrações de antimicrobianos utilizados para avaliação da resistência por isolados de *Y. enterocolitica* obtidos da cadeia produtiva de carne suína.51

Tabela 4. Número de amostras e procedimentos de coleta na cadeia produtiva de carne suína na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.....54

Tabela 5. Frequências de isolados de *Y. enterocolitica* obtidos da cadeia produtiva de carne suína com resistência a diferentes antimicrobianos63

Tabela 6. Frequências de isolados de *Y. enterocolitica* obtidos na cadeia produtiva de carne suína com múltiplos padrões de resistência a antimicrobianos.....64

RESUMO

MARTINS, Bruna Torres Furtado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Rastreamento da contaminação por *Yersinia enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

A carne suína é um dos produtos de origem animal mais consumido no mundo. O Brasil tem destaque nesse cenário, já que está entre os principais países produtores de suínos e com grande potencial de exportação dos produtos derivados da carne suína, além de um grande mercado interno para ser explorado. A pesquisa de *Yersinia enterocolitica* é extremamente importante nessa cadeia produtiva, por estar frequentemente associada a esses animais. No homem, *Y. enterocolitica* causa uma gastroenterite denominada yersiniose, que se caracteriza por diarreia aguda e febre (principalmente em crianças), dor abdominal, linfadenite mesentérica aguda simulando apendicite, com complicações em alguns casos como eritema nodoso, artrite pós-infecciosa e infecção sistêmica. O objetivo desse trabalho foi realizar o rastreamento da contaminação por *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína, assim como caracterizar o potencial patogênico e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados. Amostras das baias e de diferentes etapas do abate de suínos e do processamento de carne suína (ambiente, carcaças, tonsilas palatinas, linfonodos mesentéricos, utensílios, equipamentos e produtos finais; n = 870) foram obtidas de duas granjas de criação de suínos em fase de terminação e de um matadouro-frigorífico localizados na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram submetidas à detecção de *Y. enterocolitica* conforme ISO 10273:2003 e os isolados obtidos foram submetidos a testes fenotípicos e moleculares para identificação e sorotipagem. Os isolados identificados como *Y. enterocolitica* foram submetidos a macro-restrição com *Xba*I e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), a reações de PCR para detecção de genes associados a patogenicidade, e caracterizados quanto ao seu perfil de resistência a 17 antimicrobianos, pela técnica do *breakpoint* e por PCR. *Y. enterocolitica* foi identificado em 8 amostras, sendo cinco de tonsilas palatinas, duas de linfonodos mesentéricos e uma de carcaça suína após a sangria, das quais foram obtidos 16 isolados. Todos os isolados foram identificados como pertencentes ao bio-sorotipo 4/O:3, envolvido em vários surtos de yersiniose

pelo mundo. Considerando os perfis genéticos obtidos por PFGE, os isolados apresentaram identidade entre 60% e 80%, demonstrando o alto grau de indentidade, além de identificação de tonsilas palatinas como potencial fonte de contaminação. Vários genes de virulência relevantes para a patogenicidade de *Y. enterocolitica* foram detectados nos isolados. Todos os isolados apresentaram altas frequências de resistência a antimicrobianos (15 substâncias), além da presença dos genes *emrD*, *yfhD* e *marC*, relacionados a resistência múltipla a antimicrobianos. Os isolados apresentaram sensibilidade apenas a ciprofloxacina e kanamicina. Esse estudo demonstrou a importância dos suínos na disseminação de *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína, ressaltando a importância do controle e monitoramento desse patógeno nas etapas iniciais da produção, que deve ser realizado com auxílio das ferramentas disponíveis atualmente, para a garantia de um alimento inócuo e de qualidade.

ABSTRACT

MARTINS, Bruna Torres Furtado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Tracking of the contamination by *Yersinia enterocolitica* in the pork production chain.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Ricardo Seiti Yamatogi.

Pork is the main animal origin protein consumed around the world, and Brazil is one of the main world producer of swines, presenting a large potential for exportation and consumption of pork products. *Yersinia enterocolitica* is a relevant foodborne pathogen in pork products, once swines are reservoirs of this pathogen and work as sources of contamination in slaughterhouses. *Y. enterocolitica* is responsible for human yersiniosis, a gastroenteritis that causes acute diarrhea and fever (especially in children), abdominal pain, acute mesenteric lymphadenitis, mimicking appendicitis, with complications in some cases as erythema nodosum, post-infectious arthritis and septicemia. This study aimed the tracking of *Y. enterocolitica* contamination in the pork production chain, and to characterize the pathogenic potential and antimicrobial resistance profiles of isolates. Samples from different steps of pork production (environment, carcasses, palatine tonsils, mesenteric lymph nodes, utensils, equipment, and end products; n = 870) were obtained from two finishing pig farms and one slaughterhouse located in Viçosa region, Minas Gerais, Brazil. Samples were subjected to *Y. enterocolitica* detection according ISO 10273:2003, and the obtained isolates were subjected to phenotypical and molecular analysis for identification and serotyping. *Y. enterocolitica* isolates were subjected to *Xba*I macrorestriction and pulsed field gel electrophoresis (PFGE), PCR to detect virulence related genes, and to *breakpoint* and PCR to characterize their antimicrobial resistance profiles against 17 substances. *Y. enterocolitica* was isolated in 8 samples, specifically palatine tonsils (5), mesenteric lymph nodes (2) and carcasses after bleeding (1), and 16 isolates were obtained. All isolates were identified as belonging to bio-serotype 4/O:3, associated to various yersiniosis cases and outbreaks around the world. PFGE demonstrated 60 to 80% identify indexes among isolates, and allowed the identification of palatine tonsils as relevant contamination sources in the pork production chain. The isolates presented different virulence related genes, demonstrating the pathogenic potential of *Y. enterocolitica*. All isolates presented high frequencies of antimicrobial resistance (to 15 substances),

despite the presence of *emrD*, *yfhD* and *marC*, related to multi-drug resistance. Only ciprofloxacin and kanamycin were effective against all isolates. The present study demonstrated the relevance of swines in the distribution of *Y. enterocolitica* in the pork production chain, highlighting the need for proper control of contamination and tracking of this foodborne pathogen in the initial steps of production, what must be conducted with the support for available tools to assure the quality and safety of pork products.

INTRODUÇÃO GERAL

A carne suína é o produto de origem animal mais consumido no mundo, sendo o Brasil um dos principais produtores mundiais e com uma produção em crescimento ininterrupto desde 2011. Embora seja uma importante fonte de proteína animal para a alimentação humana, a carne suína e seus derivados estão frequentemente associados a casos e surtos de doenças relacionadas a patógenos veiculados por alimentos. Esses produtos são susceptíveis a contaminação por diferentes agentes patogênicos em várias etapas da cadeia produtiva.

Entre os diferentes patógenos que podem contaminar a carne suína, *Yersinia enterocolitica* merece destaque, uma vez que suínos são os seus reservatórios naturais. Adicionalmente, *Y. enterocolitica* é apontado como um dos principais agentes patogênicos causadores de gastroenterite aguda no mundo. Entretanto, no Brasil não existem dados consistentes sobre a prevalência desse patógeno em suínos e como causador de enterites em humanos.

A patogenicidade de *Y. enterocolitica* é baseada em fatores de virulência de adesão e invasão das células. Esse patógeno tem tropismo por tecido linfóide e infecta principalmente a porção final do intestino delgado, o íleo e regiões adjacentes, podendo atingir os linfonodos. Através do sistema linfático, *Y. enterocolitica* alcança órgãos mais distantes como, por exemplo, fígado e baço, gerando complicações sistêmicas. Doenças gastrointestinais geralmente não são tratadas com antimicrobianos, com exceção do conhecido grupo de risco, compreendido por idosos, crianças e pessoas imunodeprimidas. *Y. enterocolitica* possui duas enzimas β -lactamases, A e B, que são codificadas por genes cromossomais que codificam produtos de resistência a determinados medicamentos, sendo esta uma característica variável entre os diferentes sorotipos do patógeno.

A determinação da presença de *Y. enterocolitica* é fundamental para a aplicação de medidas de controle. Dentro da cadeia de produção suína, várias etapas podem ser consideradas importantes. Existe a influência imposta pelo modelo de criação, uma vez que os animais estão confinados em contato direto uns com os outros. Além disso, os portadores assintomáticos eliminam o patógeno pelas fezes, que infectam outros animais por via oral, localizando-se principalmente nos linfonodos. Finalmente, o procedimento de abate dos animais inclui etapas que possibilitam a contaminação das carcaças por *Y. enterocolitica*. Nesse sentido, as

etapas de evisceração, desossa da cabeça, excisão da língua, faringe, incisão do linfonodo mandibular e, particularmente, as tonsilas, merecem destaque.

Assim, o controle e identificação dos pontos de contaminação por *Y. enterocolitica* ao longo da cadeia produtiva de carne suína é fundamental para garantia da inocuidade desse produto e seus derivados, principalmente devido a tendência crescente no consumo interno e exportações. O presente estudo teve como objetivo identificar os principais pontos de contaminação por *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína, assim como caracterizar os principais fatores de patogenicidade e o padrão de resistência a antimicrobianos dos isolados obtidos.

CAPÍTULO 1. Revisão bibliográfica

Bruna Torres Furtado Martins

1. Monitoramento da contaminação microbiológica na cadeia produtiva de alimentos

O monitoramento da contaminação microbiológica ao longo da cadeia produtiva dos alimentos é de fundamental importância para identificar as fontes de contaminação e determinar medidas corretivas. Além da pesquisa de indicadores de higiene, a pesquisa de patógenos também é fundamental para a garantia da inocuidade microbiológica dos alimentos, atendendo à exigências de segurança alimentar. Especificamente em relação a carne suína, a diversidade de contaminantes microbiológicos naturalmente presentes nos animais e nas indústrias de processamento determina que esse monitoramento seja realizado em toda a cadeia produtiva.

A União Europeia enfrentou na década de 90, problemas relacionados a alimentação, como presença de dioxina nos alimentos, azeites adulterados e o mal-da-vaca-louca, reforçaram a necessidade de uma legislação mais rigorosa para segurança alimentar (EUROPEAN COMMISSION, 2004; ALLAIN ; CAMARGO, 2007). Dessa forma, foi desenvolvida uma lei mais abrangente e atualizada, que dava mais atenção aos riscos associados a alimentos consumidos por humanos e animais (EUROPEAN COMMISSION, 2004). Essa nova abordagem determinou uma ampla reformulação nas diretrizes relacionadas a qualidade de alimentos, resultando em uma legislação que é aplicada a produção interna e a todo produto importado pelos países da União Europeia, que foi publicada em 2002 como *General Food Law* (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Nesse sentido, a Comunidade Europeia passou a adotar um modelo de garantia de qualidade e inocuidade de alimentos conhecido pela expressão “*from farm to fork*” (em tradução direta: “da fazenda ao garfo”), que considera o monitoramento da produção de alimentos desde suas etapas iniciais até a ingestão pelos consumidores, introduzindo o conceito de rastreabilidade além de contribuir com a garantia da segurança alimentar. Assim, toda a cadeia produtiva do alimento é avaliada quanto ao cumprimento das legislações vigentes e normas de qualidade para garantia da inocuidade, além de informar aos consumidores sobre os potenciais perigos e riscos inerentes àquele alimento e quais procedimentos devem ser adotados para minimizá-los (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Segundo a European Commission (2004) existem quatro elementos importantes nos procedimentos a serem considerados para garantia de inocuidade

dos alimentos oferecidos a população na União Europeia: 1) Regras sobre a inocuidade dos alimentos e alimentação animal; 2) Pareceres científicos e acessíveis ao público; 3) Medidas para cumprimento de regras e controle dos processos; e 4) Reconhecimento do direito do consumidor em escolher os alimentos a serem consumidos considerando sua origem e composição. Dessa forma, produtores, processadores ou importadores devem assegurar que todos os alimentos e seus componentes, assim como os destinados aos animais de produção, possam ser rastreados por meio da cadeia produtiva, do produtor ao consumidor (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Considerando o conceito “*from farm to fork*”, é importante salientar que a produção de alimentos só ocorre se todos os elos da cadeia estiverem envolvidos, ou seja, todas as etapas produtivas devem ser monitoradas pelas diversas ferramentas disponíveis, a fim de permitir um controle adequado da contaminação para que o objetivo final de inocuidade seja atingido (KAFERSTEIN, 2003). Desta maneira, na produção primária devem ser tomadas as primeiras medidas para minimizar a contaminação pelos possíveis patógenos presentes na cadeia produtiva da carne suína, formando-se a primeira linha de defesa necessária para prevenir e controlar os perigos de origem biológica, gerando, conseqüentemente, uma matéria prima de melhor qualidade higiênico-sanitária (KAFERSTEIN, 2003).

Os fatores de risco descritos e associados a perigos que envolvem a carne suína são diversos. Na Europa, são relatados 35 perigos biológicos que podem ser veiculados pela carne suína aos consumidores (FOSSE et al., 2008). Esses perigos devem ser avaliados separadamente, já que os micro-organismos possuem características peculiares, como condições de multiplicação e capacidade de formação de biofilmes, fatores que são importantes para o desenvolvimento de planos para detecção e controle (FOSSE et al., 2009). Dentre os perigos bacterianos conhecidos, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes* são considerados importantes associados ao consumo de carne suína (FOSSE et al., 2008). Esses patógenos podem estar presentes sem o desenvolvimento da doença e sinais clínicos nos animais produtores, não sendo possível a detecção desses agentes na inspeção *ante e post mortem*. A contaminação dos produtos cárneos pode acontecer pela introdução de animais contaminados no frigorífico desde etapas iniciais da produção, nas granjas, através de fômites, além de contato com outros animais infectados, alimentação, água e ambiente. Adicionalmente, a contaminação pode

acontecer durante o abate dos animais e processamento das carcaças, pelo conteúdo intestinal, tecidos contaminados, ambiente, utensílios e manipuladores (FOSSE et al., 2009).

As empresas, consumidores e os órgãos de regulamentação estão sempre em busca de padrões e sistemas que garantam a qualidade na produção animal e na indústria de alimentos (TRIENEKENS; ZUURBIER, 2008). Essas medidas podem reduzir a presença dos perigos veiculados por alimentos na cadeia produtiva de carne suína e contribuir com a qualidade do produto final (FOSSE et al., 2009). O modelo de inspeção sanitária no Brasil está baseado no controle dos processos; sua filosofia é a utilização da inspeção contínua e sistemática de tudo que possa, de alguma forma, interferir na qualidade higiênico-sanitária dos produtos (BRASIL, 2005a). A Portaria 711, de 01 de novembro de 1995 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), busca padronizar e contribuir com o desenvolvimento das fases operacionais de abate de suínos desde a recepção dos animais até a expedição de matéria-prima, regulamentando as instalações, equipamentos, higiene e a racionalização das atividades (BRASIL, 1995).

Além dessa legislação específica para a cadeia produtiva de suínos (BRASIL, 1995), o MAPA possui outros programas e ações que visam complementar e auxiliar as atividades convencionais de inspeção em indústrias de alimentos. Assim, esses programas também possuem aplicação direta em indústrias que processam carne suína, auxiliando a obtenção de produtos finais com qualidade e inocuidade. Os Programas de Autocontrole merecem destaque nesse contexto, uma vez que conferem dinamismo a inspeção convencional em uma indústria de alimentos, enfatizando o controle sanitário e requisitos básicos para a garantia da inocuidade dos produtos pela implantação de Programas de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Boas Práticas de Fabricação (BPFs) (BRASIL, 2005a). Esses programas são baseados na avaliação da implantação e execução dos Programas de Autocontrole da empresa inspecionada, que possuem como base, a realização da inspeção contínua e sistemática de todos os fatores que, de alguma forma, possam interferir na qualidade higiênico-sanitária dos produtos finais (BRASIL, 2005b).

O programa APPCC tem como objetivo principal, a eliminação ou redução dos perigos de todas as etapas da cadeia produtiva, sendo um sistema de análise

que identifica perigos específicos e medidas preventivas para seu controle, objetivando a inocuidade do alimento através de uma abordagem científica e sistemática do processo (BRASIL,1998). O desenvolvimento desse programa depende de etapas preliminares como, os programas de BPF e PPHO, que são as principais ferramentas utilizadas na atualidade para garantia da integridade, inocuidade e qualidade dos produtos (BRASIL, 1998). As normas de BPF consistem em uma abordagem ampla que cobre muitos aspectos operacionais da planta e do pessoal aplicados em todo o fluxo de produção (BRASIL, 1997). O PPHO são procedimentos descritos, desenvolvidos, monitorados e implantados no estabelecimento industrial para a criação de uma rotina de higienização que possa evitar a contaminação direta ou cruzada e a adulteração do produto por meio das superfícies dos equipamentos, utensílios, instrumentos de processo e manipuladores (BRASIL, 1998).

Todos esses programas são amplamente utilizados em grandes indústrias processadoras de carne suína no Brasil, visando a obtenção de produtos finais com qualidade e inocuidade, e atendendo as exigências dos consumidores e demandas de países importadores.

2. Suinocultura, abate e processamento

A produção de carne suína mundial passou por um desenvolvimento relevante nos últimos anos; de 78,2 milhões de toneladas em 1995 para 111,7 milhões de toneladas em 2012. A Ásia é o continente que mais produz, com 55,16% do total, sendo a China o país de destaque, seguido da Europa com 24,7% e América com 18,2% (ABCS, 2014a).

De acordo com dados do *United States Department of Agriculture* (USDA), a carne suína é a principal fonte de proteína de origem animal para consumo humano (USDA, 2014). Nos últimos 40 anos, o consumo de carne suína por habitante no mundo aumentou de 9,2 kg para 15,5 kg, representando média de crescimento de 1,52% ao ano, com previsão de manutenção desse ritmo até pelo menos 2020 (ABCS, 2014a).

A carne suína possui vários aspectos estruturais que facilitam a sua transformação em demais produtos de grande aceitação pelo mercado, como os embutidos cárneos, o que contribui para o consumo em larga escala dessa proteína (OLIVO, 2006). Dentre os grandes consumidores de carne suína no

mundo, a Dinamarca é o principal país, cuja média anual chega a 73 kg *per capita*; a Espanha vem logo em seguida, com 67 kg *per capita* e Hong Kong está na terceira posição, com 66 kg *per capita* (ABCS, 2014a). Em 2015, o consumo de carne suína no Brasil foi de 14,15 kg *per capita*, inferior ao consumo de carne de aves e bovinos (PORK CHECKOFF, 2015). Em julho de 2015, a Associação Brasileira dos Criadores de Suínos começou um programa de estímulo ao consumo de carne suína no mercado interno brasileiro, trabalhando todo o potencial e versatilidade da carne suína (ABCS, 2014b).

Atualmente, o maior exportador mundial de carne suína são os Estados Unidos, seguido pela União Europeia, Canadá e Brasil, sendo este último responsável por 8% do comércio mundial, posição que conquistou após o acesso ao mercado russo em 2001 (ABCS, 2014a). A Rússia é o principal país importador de carne suína brasileira: no 4º trimestre de 2014, a sua participação foi de 50,9% do volume total. Ainda, o Brasil exporta carne suína para Hong Kong (14,1%), Angola (9,2%), Cingapura (5,8%) e Uruguai (4,1%) (IBGE, 2015). O Brasil exportou no segundo trimestre de 2016, um volume de 161.463.710 kg de carne suína *in natura*, com um faturamento de 326,44 milhões de dólares (IBGE, 2016). Neste mesmo período, um total de 10,46 milhões de cabeças de suínos foram abatidas no Brasil, representando um aumento de 3,9% em relação ao trimestre anterior, e aumento de 8,0% em comparação com o mesmo período de 2015 (IBGE, 2016). De acordo com o IBGE (2014), o rebanho brasileiro de suínos em 2014 era de 37,93 milhões de cabeças, o que representa um aumento de 3,2% em relação ao registrado em 2013. Quase metade do número total de suínos (49,3%) encontrava-se na região Sul, seguida pelas regiões Sudeste (18,5%), Nordeste (14,9%), Centro-Oeste (13,8%) e Norte (3,4%): em todos os estados brasileiros os animais são criados predominantemente em regime de confinamento (IBGE, 2015). O modelo de criação adotado pelo produtor é um fator importante na determinação da presença de patógenos na cadeia produtiva (LAUKKANEN et al., 2008).

O sistema de criação intensiva é considerado como o principal fator responsável pelo aumento da produtividade na suinocultura nos últimos anos (D'SILVA, 2000). Nesse sistema, os animais são confinados em todas as fases de produção, sendo que os tipos de produção podem ser divididos em sistemas de ciclo completo e sistemas com múltiplos locais (AMARAL et al., 2006). Nos sistemas de ciclo completo, as propriedades detêm todo o processo de produção, desde a recepção do material genético até a entrega dos suínos em idade de abate

para os frigoríficos, como ocorre tipicamente no estado de Minas Gerais. Nos sistemas de múltiplos locais, existem basicamente duas propriedades envolvidas: a Unidade Produtora de Leitões (UPL) e a Unidades de Terminação, modelo predominante na região Sul do Brasil (AMARAL et al., 2006).

O confinamento possui alguns pontos que podem ser considerados negativos, principalmente os relacionados ao bem-estar animal, comportamento, poluição ambiental e disseminação de patógenos (D'SILVA, 2000). O uso de bebedouros e comedouros coletivos, presença de fezes, contato entre os animais e lotação das baias tem grande influência sobre a disseminação de micro-organismos entre os animais (LAUKKANEN et al., 2008). Todos esses aspectos possuem interferência direta sobre a qualidade e inocuidade dos produtos finais que são produzidos a partir da carne suína.

No passado, a qualidade da carne era determinada subjetivamente por atributos sensoriais (PELOSO, 1999). Atualmente, a qualidade da carne pode ser avaliada sob outras características: composição química, estrutura morfológica, propriedades físicas e químicas, qualidades bioquímicas, contaminação microbiana, propriedades sensoriais, valor nutritivo, propriedades tecnológicas para o processamento, qualidades higiênicas e propriedades culinárias (PELOSO, 1999). As carnes *in natura* possuem nível de contaminação natural, mas podem veicular micro-organismos patogênicos para humanos (CÁRDENAS et al., 2008; CHOI et al., 2013).

Assim, as indústrias que processam carne suína e seus derivados tem apresentado uma preocupação crescente em oferecer aos consumidores, produtos que atendam as demandas de qualidade e inocuidade. A produção e o beneficiamento da carne suína passam por um processo de adaptação às exigências do mercado consumidor, com aplicação de ferramentas que garantam a inocuidade alimentar, restrição ao uso de antimicrobianos, proteção ambiental e conceitos de bem estar animal (AMARAL et al., 2006). Especificamente, em relação a micro-organismos patogênicos, produtos suínos são frequentemente associados a *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Yersinia enterocolitica* (OLIVEIRA et al., 2002; PIGATTO; BARROS, 2003; DAMME, VAN et al., 2015).

A qualidade da carne suína está diretamente relacionada a sua inocuidade, uma vez que os micro-organismos são os principais responsáveis pela deterioração do alimento, infecções e intoxicações alimentares (MELLO JUNIOR, 2004). Estes

micro-organismos estão presentes em todos os ambientes, inclusive no próprio animal, e desta forma é de grande importância a redução da carga microbiana durante todo o processo de abate (MELLO JUNIOR, 2004). O abate de suínos (Figura 1) é um procedimento onde existem várias oportunidades para a contaminação das carcaças por micro-organismos patogênicos, e alguns pontos representam elevado risco, não havendo nenhuma etapa que elimine totalmente esses perigos microbiológicos (BORCH et al., 1996). Desta forma, os matadouros frigoríficos devem buscar constantemente aperfeiçoar seus procedimentos de abate e processamento para garantir a inocuidade da carne suína (BORCH et al., 1996).

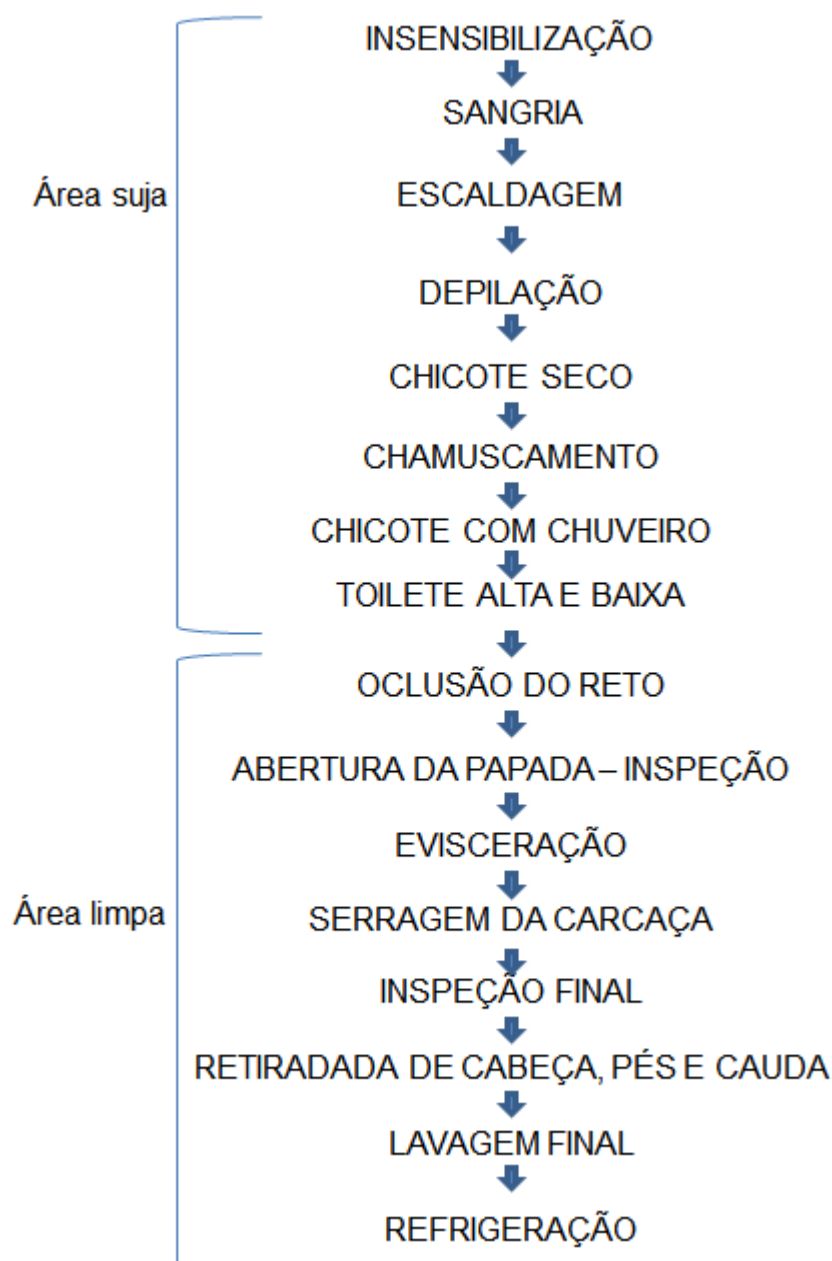


Figura 1. Fluxograma simplificado do abate de suínos.

Os próprios animais são considerados como importantes fontes de contaminação durante o abate, devido a eventuais contatos com fezes, faringe, língua e tonsilas, que representam também fontes de contaminação para o ambiente de processamento (FONDREVEZ et al., 2010). A disseminação dos micro-organismos ocorre pela superfície das carcaças; assim, as boas práticas de higiene e limpeza de equipamentos nos abatedouros tem grande influência no nível de contaminação (BONARDI et al., 2013).

O processo de escaldagem, realizado após a sangria do animal (Figura 1), deve ser realizado em temperatura de, aproximadamente, 72 °C, para facilitar a remoção dos folículos pilosos nos estágios subsequentes (BOLTON et al., 2013). Vários suínos são escaldados no mesmo tanque e a água pode estar contaminada pelas fezes, conteúdo intestinal e sangue (BOLTON et al., 2013). Caso a temperatura permaneça abaixo do recomendado, ou a quantidade de matéria orgânica esteja muito alta, o risco de sobrevivência de micro-organismos nessa etapa transforma a escaldagem em um ponto crítico, devido à possibilidade de contaminação cruzada (SIMONSEN, 1987; BOLTON et al., 2013). De acordo com a legislação brasileira, a temperatura da água no tanque de escaldagem deve estar entre 62 °C e 72 °C, dependendo da pelagem do animal, e o tempo do procedimento deve ser entre 2 e 5 minutos (BRASIL, 1995).

Após a escaldagem, outra etapa crítica é a retirada das cerdas (depilação), que é realizada em um equipamento especializado com “dedos” giratórios. Nessa etapa pode acontecer a compressão do ânus mecanicamente pelo equipamento e liberação de fezes (BORCH et al., 1996). Em seguida, a etapa de chamuscamento tem como objetivo principal a retirada das cerdas restantes, além da redução da contaminação superficial das carcaças; entretanto, eventuais micro-organismos presentes em regiões mais profundas, como folículos pilosos e orifício auricular, podem sobreviver (MORGAN et al., 1987).

A evisceração é considerada a etapa de maior risco pela possibilidade de disseminação de conteúdo das vísceras abdominais sobre a carcaça, demandando extremo cuidado no procedimento para evitar rupturas de alças intestinais (BORCH et al., 1996; DICKSON et al., 2002). Berends et al. (1997) consideram que 90% da contaminação microbiológica em carcaças de suínos está relacionada a falhas no procedimento de evisceração.

Entretanto, outras etapas do processamento de carne suína, além do abate, podem determinar contaminação microbiológica nos produtos finais, como

refrigeração, corte, desossa, contato com superfícies contaminadas, água, ar, mão de manipuladores, utensílios e equipamentos (BERENDS et al., 1998; CHOI et al., 2013). Assim, as condições higiênicas nas quais a matéria-prima é submetida influenciam diretamente a qualidade microbiológica dos produtos finais (CHOI et al., 2013).

O Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu estabelece regras específicas relativas à higiene dos alimentos de origem animal. Esse regulamento determina que carcaças animais, incluindo suínos, não devem apresentar qualquer contaminação fecal visível e, que qualquer contaminação que possa ser vista a olhos nus deve ser retirada imediatamente por cortes e descarte por pessoal treinado ou meios alternativos de efeito equivalente (LINDBLAD; BERKING, 2013). Adicionalmente, esse regulamento estabelece que apenas água potável deve ser utilizada para a remoção da contaminação superficial em carcaças animais, exceto por substâncias sanitizantes previamente aprovadas para diferentes animais (LINDBLAD; BERKING, 2013). Atualmente, não existem substâncias sanitizantes permitidas na União Europeia para esse tipo de higienização de carcaças de suínos (BELLUCO et al., 2015).

Fosse et al., (2009) relataram que a utilização de boas práticas de higiene e biossegurança nas granjas produtoras de suínos pode contribuir com a diminuição da pressão de contaminação nos abatedouros. Além disso, já existem várias ferramentas modernas de gerenciamento e higiene voltados para a qualidade, que podem contribuir, significativamente, para que os produtos finais tenham maior valor agregado e baixo risco para os consumidores (LAUKKANEN et al., 2008).

3. *Yersinia enterocolitica*

Em relação aos micro-organismos patogênicos frequentemente associados a carne suína, *Y. enterocolitica* possui grande destaque (DAMME, VAN et al., 2015). O gênero *Yersinia* é composto por bactérias gram negativas, e apresenta atualmente, 14 espécies (HURST et al., 2011), das quais três são patogênicas para seres humanos: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* (BIBEL; CHEN, 1976; BOTTONE, 1999; DUAN et al., 2014).

Y. enterocolitica foi inicialmente descrita em 1939 como um agente bacteriano causador de enterocolites, com características semelhantes a de um isolado obtido de um abscesso facial de um trabalhador rural nos Estados Unidos,

obtido em 1934: após testes bioquímicos, foi constatado que tratava-se do mesmo agente patogênico, que ainda não havia sido descrito. Assim, esse agente patogênico foi inicialmente denominado como *Bacterium enterocoliticum*, e em seguida *Y. enterocolitica* (BOTTONE, 1999).

Y. enterocolitica é um micro-organismo cosmopolita, móvel devido a presença de flagelos peritríquios a 25 °C e imóvel quando cultivado a 37 °C, que causa gastroenterite em humanos associada ao consumo de produtos crus e processados (BOTTONE, 2015). Esse patógeno pode ser classificado em seis diferentes biotipos, com características heterogêneas e definidos como 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5. O biotipo 1B é considerado altamente patogênico, enquanto os biotipos 2 a 5 possuem patogenicidade baixa à moderada (BHAGAT; VIRDI, 2011). A maioria das cepas envolvidas em casos de doenças em humanos são classificadas nos biotipos considerados patogênicos (BOTTONE, 2015). O biotipo 1A era descrito como não-patogênico, mas estudos demonstraram potencial patogênico nessas cepas, inclusive isolados de casos clínicos em humanos (BISSETT et al., 1990; RAMAMURTHY et al., 1997; BHAGAT; VIRDI, 2007).

Adicionalmente, os isolados identificados como *Y. enterocolitica* podem ser classificados sorologicamente considerando características do lipopolissacarídeo da membrana (ALEKSIC et al., 1986; SKURNIK; TOIVONEN, 2011) o que permite a definição de mais de 70 sorotipos (WAUTERS et al., 1991). Atualmente os principais sorotipos patogênicos descritos são O:1, 2, 3; O:2,3; O:3; O:8; O:9; O:4,32; O:5,27; O:13A,13b; O:18; O:20; e O:21 (DRUMMOND et al., 2012). Os sorotipos O:3, O:5,27, O:8 e O:9 são os mais relacionados com doenças em humanos (FALCÃO; FALCÃO, 2006b). Assim, o potencial patogênico de *Y. enterocolitica* deve ser baseado tanto na classificação de biotipo como na classificação de sorotipos (BOTTONE, 2015).

Apesar de estar amplamente distribuída no mundo, na água e em vários animais, estudos evidenciaram que o suíno é o principal reservatório de cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* para humanos (ANDERSEN, 1988; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; EFSA, 2009; DAMME, VAN et al., 2010; POLJAK et al., 2010; DRUMMOND et al., 2012; CAMPIONI; FALCÃO, 2014; FONDREVEZ et al., 2014; SCHNEEBERGER et al., 2015). A enterocolite causada por *Y. enterocolitica* é denominada yersiniose, uma doença gastrointestinal adquirida pela via feco-oral por meio de alimentos e água contaminados, especialmente carne suína e seus derivados (GUPTA et al., 2015). A detecção

desse patógeno em alimentos e a criação de medidas de inocuidade alimentar para minimizar a infecção humana são de extremo interesse, devido ao fato de ser um micro-organismo psicrotrófico, com capacidade de se desenvolver em alimentos crus e cozidos em temperatura de refrigeração (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2012).

Andersen (1988) destaca a importância das fezes na transmissão de cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* para carcaças de suínos devido a manipulação inadequada durante o abate e ruptura de alças intestinais. A presença inicial de *Y. enterocolitica* nas tonsilas palatinas e fezes também pode contribuir com a contaminação dos alimentos, devido a divisão da cabeça junto com a carcaça, incisão de linfonodos craniais e língua (DAMME, VAN et al., 2015). *Y. enterocolitica* pode permanecer viável em aglomerados linfáticos do intestino delgado, que usualmente são utilizados para a produção de derivados embutidos. Essas características evidenciam a importância das etapas de processamento da carne suína como potenciais fontes de contaminação. (NESBAKKEN, 2013).

Em 2007, yersiniose foi a terceira zoonose mais relatada em humanos na União Europeia, pelo terceiro ano consecutivo, com um total de 8.792 casos confirmados, dos quais foi possível isolar *Y. enterocolitica* em 93,8% (EFSA, 2009). Em 2012, 92 surtos foram associados a *Y. enterocolitica* em 12 países membros da União Europeia, o que representou 1,7% do total de surtos relatados (EFSA, 2014).

Na Noruega, em 2006, foi relatado um surto envolvendo *Y. enterocolitica* O:9, provavelmente veiculado por produto elaborado a partir de carne suína (GRAHEK-OGDEN et al., 2007). Outro surto foi relatado em 2014, em uma base militar ao norte da Noruega, com envolvimento de vegetais (alface e repolho roxo) como fontes potenciais do patógeno (MACDONALD et al., 2016). *Y. enterocolitica* não é associado frequentemente a surtos descritos nos Estados Unidos; entretanto, no FoodNet há a descrição de 1.903 casos ocorridos no país entre 1996 e 2007, com isolamento de *Y. enterocolitica* em 92% dos mesmos (LONG, 2010). A quantidade de surtos causados por *Y. enterocolitica* no Japão é muito pequena, com relato de quatro surtos entre 2012 e 2013, com confirmação do agente patogênico em dois desses surtos (*Y. enterocolitica* O:8) (KONISHI, 2016).

Os casos de yersiniose registrados em todo o mundo são subestimados, porque não são realizadas pesquisas em busca do patógeno na rotina e também pela dificuldade de detecção nos alimentos supostamente envolvidos. A heterogeneidade entre as cepas de *Y. enterocolitica* e a similaridade dessas com

outras enterobactérias dificultam o desenvolvimento de protocolos adequados para o rastreamento (GUPTA et al., 2015).

No Brasil não são relatados, com frequência, casos de yersiniose humana, uma vez que esse patógeno é pouco estudado no país, o que dificulta o estabelecimento preciso de seu envolvimento como causador de doenças em animais e humanos, além dos seus impactos na inocuidade dos alimentos (FALCÃO et al., 2006a). A doença tem grande variedade de características clínicas, podendo resultar em infecções agudas e/ou complicações autoimunes, sendo assim de difícil diagnóstico. Devido a todos esses fatores deve-se pensar no desenvolvimento de técnicas eficientes para identificação e rastreamento, principalmente no Brasil, onde *Y. enterocolitica* ainda é pouco conhecida e caracterizada (FALCÃO; FALCÃO, 2006b).

3.1. Patogenicidade de *Yersinia enterocolitica*

O potencial patogênico de *Y. enterocolitica* é essencialmente determinado pelos fatores de virulência localizados em seu cromossomo e também em um plasmídeo de virulência de 70 kb, designado pYV, presente apenas em estirpes virulentas (FÀBREGA; VILA, 2012). Genes localizados no cromossomo são associados com identificação e virulência, como por exemplo, *inv* e *ail*. Genes localizados no plasmídeo pYV estão relacionados com virulência e utilizados em estudos como alvos para detectar cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003).

O lipolissacarídeo (LPS), uma endotoxina, é o componente principal da membrana externa de bactérias gram negativas (SKURNIK; TOIVONEN, 2011). Essa estrutura é composta por: 1) um lipídeo, ancorado na membrana e está associado a toxicidade, 2) o núcleo, incluindo tanto porções interior e exterior (principalmente açúcares), e 3) o antígeno O na cadeia de polissacarídeo, componente externo associado com propriedades antigênicas. O LPS pode estimular a virulência por aumentar a hidrofobicidade e, dessa maneira, facilitar a passagem da bactéria através do muco que reveste o epitélio intestinal (FÀBREGA; VILA, 2012). Os genes responsáveis pela biossíntese das três estruturas do LPS geralmente estão localizados em *operons* situados em diferentes partes do cromossomo bacteriano (SKURNIK; TOIVONEN, 2011). No estudo realizado por Skurnik e Bengoechea (2003) foi demonstrada a importância do LPS na virulência

de *Y. enterocolitica* através da infecção de camundongos com cepas mutantes, que não foram capazes de colonizar as Placas de Peyer com a mesma eficiência que cepas selvagens.

Dentre os fatores de virulência, a presença de fímbrias codificada pelo gene *myf* (*mucoide Yersinia fibrillae*) merece destaque. A síntese das fímbrias é induzida a 25 °C, e desempenham a função de auxiliar na aderência da bactéria ao epitélio. As fímbrias são expressas na superfície bacteriana, o que confere às colônias um aspecto mucoide (FALCÃO; FALCÃO, 2006b). *Y. enterocolitica* perde a capacidade de produzir fímbrias a 37 °C, o que determina bloqueio de sua mobilidade (KAPATRAL et al., 1996). O operon onde está inserido o *myf* é um *locus* cromossômico que tem sido relatado como responsável pela codificação de vários genes (CARNIEL, 2001). No entanto, sua função biológica, patogenicidade e imunidade ainda são pouco conhecida (IRIARTE et al., 1993; YANG et al., 1996). Estudos mais recentes demonstraram que as fímbrias codificadas por esse gene tem capacidade imunogênica no início da doença principalmente em crianças (RASTAWICKI; GIERCZYNSKI, 2009).

A invasina codificada pelo gene *inv* é altamente conservada no cromossomo de *Y. enterocolitica* e modula a ligação na célula hospedeira (DRUMMOND et al., 2012). O gene *inv* está presente no cromossomo de todas as cepas de *Y. enterocolitica*, mas é expresso apenas em sorovarietades patogênicas, o que remete ao fato da invasina desempenhar papel importante na virulência (PIERSON; FALKOW, 1990; CARNIEL, 2001). A proteína de membrana externa, codificada pelo *ail*, está altamente correlacionada com a virulência; esse gene é encontrado apenas em cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* e está envolvido na adesão e invasão de células de tecidos específicos, bem como na sobrevivência contra os efeitos bactericidas do soro (PIERSON; FALKOW, 1993; FALCÃO; FALCÃO, 2006b; BOTTONE, 2015).

As cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* possuem o plasmídeo pYV, cuja função é a produção da invasina YadA e outras proteínas denominadas Yops (*Yersinia outerproteins*) (FALCÃO; FALCÃO, 2006b). YadA tem sido relatada como a mais importante na adesão e fixação, sendo então responsável pelo início da doença, permanência no tecido infectado e replicação nas placas de Peyer, interferindo assim na resposta imune (PEPE; MILLER, 1993; PEPE et al., 1995; DRUMMOND et al., 2012). A secreção das proteínas Yops ocorre por meio da maquinaria de Secreção do Tipo III. As Yops causam inibição da fagocitose nos

macrófagos, do *burst* respiratório, da produção de citocina pró-inflamatória e da apoptose (CORNELIS, 2002). Já em leucócitos polimorfonucleares, Yops são responsáveis pela resistência à fagocitose e morte pelos peptídeos antimicrobianos (CORNELIS, 2002). A citotoxicidade e a alteração da resposta à liberação da citocinas são consequências da ação de Yops em células epiteliais (CORNELIS, 2002).

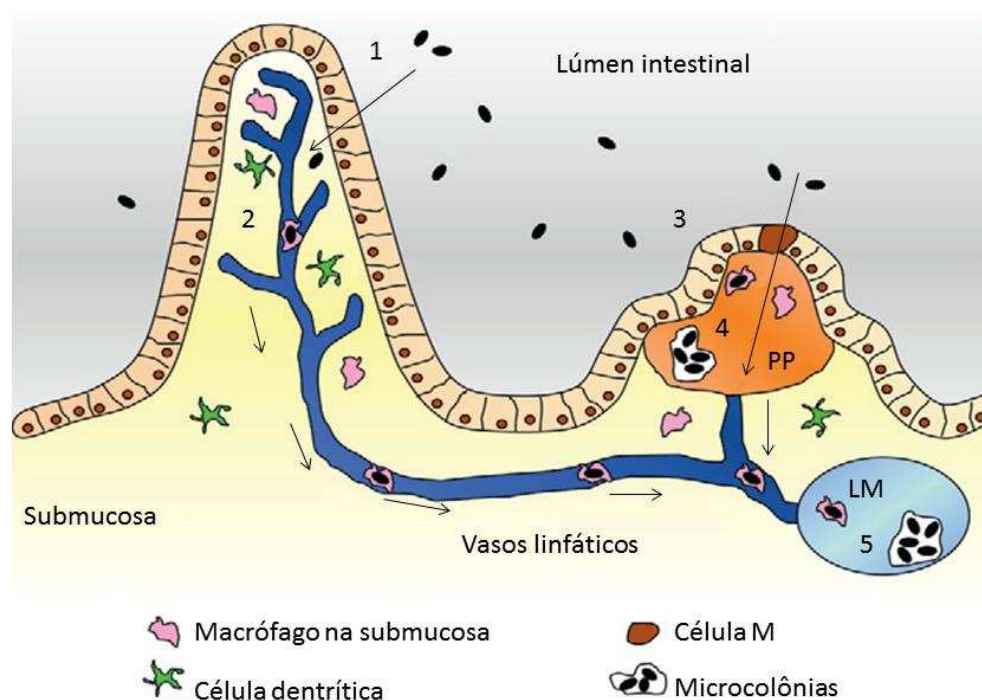
O gene *ystA* só foi encontrado em cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* (FALCÃO; FALCÃO, 2006b). Os genes *ystA* e *ystB* codificam uma enterotoxina termoestável, que ainda não possui uma associação direta com a enfermidade determinada por *Y. enterocolitica*: essa toxina ainda não foi detectada em modelos experimentais de infecção e algumas cepas possuem esses genes mas não produzem a enterotoxina, como por exemplo isolados não-clínicos (RAMAMURTHY et al., 1997; FÀBREGA; VILA, 2012; BOTTONE, 2015).

Outro conjunto de genes de virulência é denominado de ilha de alta patogenicidade (HPI). Essa região cromossômica é a parte que codifica a maquinaria secretora do tipo III, usada por bactérias gram negativas para translocar proteínas bacterianas no citoplasma da célula hospedeira (FALCÃO; FALCÃO, 2006b). A maioria dos genes localizados nesta ilha estão envolvidos na biossíntese, transporte e regulação do sideróforo *yersiniabactin*, considerado uma ilha de captura de ferro, contribuindo para a sobrevivência de *Y. enterocolitica*. HPI é composta por um *locus* que possui 11 genes organizados em quatro operons (*fyuA*, *IRP2*, *ybtA* e *ybtP*), que podem ser divididos em três grupos funcionais: biossíntese de *yersiniabactin*, transporte para dentro da célula bacteriana (receptor de membrana externa e transportadores) e regulação (CARNIEL et al., 1999; DRUMMOND et al., 2012).

Os genes *fepA* e *fepD* são responsáveis pela captura e utilização de ferro, componente importante para a multiplicação de *Y. enterocolitica*. Alguns genes estão presentes nas cepas mais virulentas de *Y. enterocolitica*, que são as que possuem o plasmídeo pYV, codificam os genes *yop* e realizam a síntese de um conjunto de proteínas responsáveis pela montagem e funcionamento do sistema de secreção tipo III. O gene *virF* é o principal regulador da expressão desses genes transcricionais (PLATT-SAMORAJ et al., 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; FRAZÃO; FALCÃO, 2015).

O modelo de patogênese proposto para *Y. enterocolitica* (Figura 2) sofre grande influência da temperatura em condições abaixo de 28 °C e sob condições

ácidas, a 37 °C, é capaz de produzir invasina (BOTTONNE, 2015). O processo de patogênese é iniciado pela ingestão de alimentos ou água contaminados, com a adesão bacteriana e translocação através da barreira do epitélio intestinal pelas células M sobrepostas dos folículos linfóides (placas de Peyer) da porção distal do intestino (íleo terminal e cólon proximal). Após atravessar a membrana basal e a lâmina própria, *Y. enterocolitica* é capaz de se replicar no espaço extracelular e formar agregados monoclonais de bactérias, formando microabscessos que podem causar a destruição das placas de Peyer (FÀBREGA; VILA, 2012; BOTTONNE, 2015).



PP – Placas de Peyer

LM – Linfonodo mesentérico

Figura 2. Modelo da patogênese de *Y. enterocolitica*. (1) *Y. enterocolitica* interage com células epiteliais e chegam a submucosa (2) Na submucosa os macrófagos fagocitam o patógeno e quando entram no sistema linfático atingem assim o LM. (3) Outra rota é quando as bactérias são englobadas pelas células M. (4) Quando estão nas placas de PP podem ser formadas microcolônias e inicia-se a replicação. (5) Na última etapa, as células bacterianas estão no LM e também podem formar microcolônias e se replicarem. Fonte: FÀBREGA; VILA, 2012.

A infecção causada por *Y. enterocolitica* atinge o trato gastrointestinal que resulta em uma enterite aguda que pode estar acompanhada de febre e inflamação

no intestino (BHAGAT; VIRDI, 2011; BOTTONE, 2015). A diarreia é aquosa, geralmente sem sangue. O período de incubação depois da ingestão de *Y. enterocolitica* varia entre 1 e 11 dias (BOTTONE, 2015). A síndrome, geralmente apresentada em crianças acima de cinco anos e adolescentes, é conhecida como pseudoapendicite, que é uma dor e sensibilidade no quadrante inferior direito do abdômen, causada pela inflamação do íleo terminal e da linfadenite mesentérica (FALCÃO; FALCÃO, 2006b; BOTTONE, 2015). Algumas complicações devido à disseminação via corrente sanguínea da bactéria para o fígado e baço podem acontecer, por exemplo, eritema nodoso, artrite séptica, abscessos, entre outras (FÀBREGA; VILA, 2012; BOTTONE, 2015).

3.2. *Yersinia enterocolitica* versus resistência a antimicrobianos

Devido a variações nas populações bacterianas, alguns micro-organismos podem adquirir em seu material genético, mutações que os tornam resistentes aos antibióticos. Além disso, existe a possibilidade de transferência dessas características através de plasmídeos entre as populações (LANDERS et al., 2012). A transferência de resistência entre as bactérias se intensificou grandiosamente com o uso regular de antimicrobianos como promotores de crescimento, controle, prevenção ou tratamento de doenças na pecuária moderna (JAMALI et al., 2014; BOECKEL et al., 2015). O uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções bacterianas na medicina humana e veterinária é um grande risco para a população mundial (SIMONOVA et al., 2008).

O uso de antimicrobianos em animais de produção nos Estados Unidos é estimado em cerca de 80% do consumo total de antimicrobianos nesse país anualmente e uma fração importante também é utilizada para o tratamento de infecções e procedimentos em humanos (FDA, 2014). O consumo mundial de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal foi estimado em 63.151 (\pm 1.560) toneladas em 2010 e tem previsão de aumentar em 67%, para 105.596 (\pm 3.605) toneladas, em 2030. Os cinco países que mais utilizaram antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal em 2010 foram China (23%), Estados Unidos (13%), Brasil (9%), Índia (3%) e Alemanha (3%) (BOECKEL et al., 2015). Os suínos se destacam na média de consumo de antibióticos por unidade da população corrigida (UPC) com 172 mg/UPC, ficando à frente do frango (148 mg/UPC) e de bovinos (45 mg/UPC) (BOECKEL et al., 2015).

Apesar da grande maioria das infecções gastrointestinais serem auto-limitantes e restritas ao TGI, os pacientes inseridos em grupos de risco ou que apresentam septicemia necessitam de tratamento (FÀBREGA; VILA, 2012; BOTTONE, 2015). *Y. enterocolitica* é usualmente susceptível a aminoglicosídeos, cloranfenicol, tetraciclina, cefalosporinas de terceira geração e fluorquinolonas, mas resistente a penicilina, ampicilina e cefalosporinas de primeira geração (PHAM et al., 2000; FÀBREGA; VILA, 2012). Esse patógeno possui resistência intrínseca à ampicilina, amoxicilina-clavulanato, ticarcilina e as cefalosporinas de primeira geração, característica inata da espécie que auxilia no reconhecimento de fenótipos, e permite o direcionamento de testes para verificação da susceptibilidade acumulada a antibióticos (CLSI 2012; CLSI, 2014).

A resistência de *Y. enterocolitica* a antimicrobianos está relacionada a duas lactamases codificadas por genes localizados no cromossomo, conhecidas como β -lactamases A e B (PHAM et al., 2000; FALCÃO; FALCÃO, 2006b). Cepas de *Y. enterocolitica* dos biotipos 2, 4 e 5 possuem os genes para as β -lactamases, sendo a expressão de genes reguladores diferentes entre os biotipos 2 e 5 (STOCK et al., 1999). O exame de sequência genômica de *Y. enterocolitica* 8081 revelou que as β -lactamases são codificadas por duas ORF's, YE2019 e YE2440, sendo essas fases de leitura abertas denominadas BlaA e BlaB, respectivamente (BENT; YOUNG, 2010). A diferença na atividade destas duas enzimas determina o nível e espectro de resistência da cepa: *blaA* codifica proteínas envolvidas na resistência à penicilinas e cefalosporinas enquanto *blaB* está ligada principalmente a cefalosporinas (FÀBREGA; VILA, 2012). Além disso, observou-se que culturas de *Y. enterocolitica* expostas a concentrações sub-inibitórias do imipenem no meio de cultura, apresentaram *blaA* e *blaB* em maior quantidade, confirmando que a produção dessas enzimas é indutível, sujeita a um controle regulatório, e reduz a susceptibilidade do patógeno a uma variedade de antibióticos β -lactâmicos (BENT; YOUNG, 2010).

Falcão e Falcão, (2006b) relataram que cepas de *Y. enterocolitica* obtidas de diferentes amostras (fezes de casos clínicos em humanos, animais, meio ambiente e alimento) apresentaram resistência, pelo menos, a ampicilina e cefalotina. Na rotina médica, o uso de cefalosporinas de amplo espectro frequentemente é feita em combinação com aminoglicosídeos para o tratamento de pacientes com infecções extraintestinais, como em casos de septicemia (BOTTONI, 1997).

Os procedimentos terapêuticos na medicina humana e veterinária devem ser orientados por investigações de perfil de sensibilidade e resistência à antimicrobianos (BAÚ et al., 2001). O uso adequado de antimicrobianos para animais destinados ao consumo humano preservará a utilização desses medicamentos em longo prazo, contribuindo com a saúde e bem-estar animal, e limitando a pressão de seleção de cepas resistentes (LATHERS, 2001). Nesse sentido, a caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos por isolados de *Y. enterocolitica* é fundamental para o tratamento adequado de yersinioses.

3.3. Detecção e caracterização de *Yersinia enterocolitica*

As doenças de origem alimentar geram grandes impactos em saúde pública, o que demanda a identificação e caracterização dos patógenos nos alimentos envolvidos em surtos causados por patógenos veiculados por alimentos. A associação de patógenos com as mesmas características em alimentos e em amostras clínicas permite identificar a origem de casos e surtos, e é importante para a adoção de medidas de controle (VONGKAMJAN; WIEDMANN, 2014).

A investigação de *Y. enterocolitica* é um desafio para a microbiologia de alimentos, devido a baixa taxa de multiplicação desse micro-organismo e também pela usual baixa concentração em que se encontra em amostras de alimentos (GUPTA et al., 2015). Um protocolo de isolamento de *Y. enterocolitica* em amostras de alimentos foi descrito pelo *International Standard Organization* (ISO 10273:2003) e se baseia em técnicas de amostragem e cultivo bacteriano. Esse método para a detecção de *Y. enterocolitica* em amostras de alimento é recomendado pelo *United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service* (USDA/FSIS) (GUPTA et al., 2015). Para fins de monitoramento e caracterização da patogenicidade, a EFSA recomenda o uso da norma ISO 10273:2003, utilizada na Bélgica para o controle oficial de *Y. enterocolitica* patogênica nas carcaças e carne de suínos fatiada. As principais amostras recomendadas para análises são as tonsilas palatinas recolhidas na linha de abate (EFSA, 2009).

A pesquisa de *Y. enterocolitica* em alimentos gera resultados falso-negativos com relativa frequência, uma vez que esse patógeno usualmente está presente em baixas concentrações, além de possuir baixa capacidade de competição com a

microbiota autóctone das amostras. Características fenotípicas e moleculares de *Y. enterocolitica* são frequentemente utilizadas para a sua identificação e caracterização, como a presença do plasmídeo de virulência (pYV) que pode não ser expresso devido ao tempo de cultivo por longos períodos (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003; DAMME, VAN et al., 2013). Os protocolos de detecção de *Y. enterocolitica* em alimentos foram desenvolvidos com o objetivo de favorecer a multiplicação do patógeno, considerando algumas de suas características, como multiplicação em baixas temperaturas, resistência em ambiente alcalino, e utilização de meios de cultura seletivos suplementados com antimicrobianos aos quais apresenta resistência (GUPTA et al., 2015).

Ao final das metodologias convencionais de detecção, isolados bacterianos com características morfológicas típicas de *Y. enterocolitica* devem ser submetidos a testes bioquímicos com o objetivo de identificar essa espécie, e diferenciá-las das demais 13 espécies descritas no gênero *Yersinia* (Tabela 1) (SOUZA et al., 2011; SILVA et al., 2013). Além das características bioquímicas, a sorotipagem é frequentemente utilizada para identificar *Y. enterocolitica*. A sorotipagem é baseada na expressão de proteínas de membrana, antígenos somáticos (O), que são lipopolissacarídeos da superfície celular (WAUTERS et al., 1991; SKURNIK; BENGOCHEA, 2003). Este método fenotípico ainda é considerado de referência, mas existem muitas desvantagens devido a questões práticas, antissoros com preço elevado, necessidade de mão-de-obra qualificada, controle de qualidade, resultado demorado e existência de isolados não-tipáveis. A sorotipagem convencional é desenvolvida por aglutinação usando um antissoro com antígeno O-específico, obtido em laboratório, por meio da imunização de ratos com cepas específicas (ALEKSIC et al., 1986).

Apesar das desvantagens, a sorotipagem ainda é uma técnica indispensável para caracterizar *Y. enterocolitica* epidemiologicamente, uma vez que o conhecimento prévio dos sorotipos patogênicos permite um diagnóstico preliminar na rotina de trabalho (ALEKSIC; BOCKEMUHL, 1984). Isolados de *Y. enterocolitica* de casos clínicos são, predominantemente, dos sorotipos O:3, O:9, O:8 e O:5,27; apenas 11 sorotipos tem sido associados com yersiniose em humanos, com uma certa variabilidade entre os continentes (BOTTONNE, 1997; FÀBREGA; VILA, 2012).

Tabela 1 Diferenciação fenotípica de algumas espécies do gênero *Yersinia*.

Característica	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. frederiksenii</i>
Motilidade (22 °C)	+	-	+	+	+	+
Motilidade (37 °C)	-	-	-	-	-	-
Produção de urease	+	-	+	+	+	+
Tween-esterase	v	-	-	-	v	+
Reação Voges-Proskauer	+	-	-	-	+	+
Produção de indol	v	-	-	-	+	+
Utilização do citrato	-	-	-	-	+	V
Descarboxilação da lisina	-	-	-	-	-	-
Descarboxilação da ornitina	+	-	-	+	+	+
Hidrólise da esculina	v	v	+	-	+	V
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Fermentação:						
Celobiose	+	-	-	+	+	+
Meliobiose	-	v	+	-	+	-
Rafinose	-	-	v	-	+	-
L-Ramnose	-	-	+	-	+	+
D-Sorbitol	v	-	-	+	+	+
L-Sorbose	v	-	-	+	+	+
Sacarose	+	-	-	+	+	+

v: variável; +: positivo; -: negativo. Fonte: SOUZA et al., 2011; SILVA et al., 2013.

Embora apresente limitações quanto a sensibilidade e tempo de obtenção de resultados finais, a análise microbiológica convencional ainda é considerada como o padrão para a pesquisa de *Y. enterocolitica* em alimentos (GUPTA et al., 2015). Como alternativa, diferentes metodologias moleculares tem sido propostas para a identificação direta de patógenos em alimentos (AKIBA et al., 2011). Além disso, existe grande necessidade por metodologias eficientes e rápidas para a detecção de patógenos em alimentos, o que facilita o rastreamento em toda a cadeia de produção com o objetivo de identificar as fontes de contaminação (VONGKAMJAN; WIEDMANN, 2014). Com os recentes avanços nas técnicas moleculares de detecção de patógenos em alimentos, diversos protocolos foram descritos para a

identificação de *Y. enterocolitica* (GUPTA et al., 2015). Essas técnicas moleculares podem representar alternativas para a pesquisa de patógenos em alimentos, pois são mais padronizadas, eficientes e específicas (GARZETTI et al., 2014).

Além da pesquisa direta nos alimentos, os testes moleculares são importantes para a caracterização precisa dos isolados de *Y. enterocolitica* obtidos, como por exemplo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, microarranjos, restrições enzimática para *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e outros (FALCÃO et al., 2006a; GUPTA et al., 2015). A PCR, devido à sua rapidez, baixo custo, efetividade, facilidade na reprodução, emergiu como uma poderosa ferramenta no diagnóstico microbiológico de patógenos de origem alimentar. Vários ensaios de PCR foram descritos para detecção de *Y. enterocolitica* a partir de amostras clínicas, ambientais e laboratoriais. A maioria destes ensaios de PCR empregam genes cromossômicos alvos de virulência, como *ail* (ligação e locus de invasão), *inv* (invasina), e *yst* (toxina estável). Esse método tem mais sensibilidade quando comparado aos métodos de cultura tradicionais (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006; GARZETTI et al., 2014; GUPTA et al., 2015). GARZETTI et al., (2014) desenvolveu e validou um PCR baseado em métodos simultâneos de identificação e pato-sorotipo de *Y. enterocolitica*, estudando a organização genômica dos *clusters* O-para a análise dos sorotipos O:8, O:3, O:9, O:5,27.

Outras técnicas, como PFGE, são consideradas como padrão ouro para investigações epidemiológicas, permitindo a identificação e rastreamento dos patógenos envolvidos em surtos de intoxicação e infecções alimentares (FALCÃO et al., 2006a; SOUZA et al., 2010; LUCERO ESTRADA et al., 2011; CAMPIONI; FALCÃO, 2014). A PFGE tem como objetivo digerir o DNA cromossômico com enzimas de restrição, resultando em uma série de fragmentos de diferentes tamanhos que quando analisados formam diferentes padrões em bandas (SINGH et al., 2006). Os protocolos de PFGE têm sido desenvolvidos pelos órgãos de vigilância das doenças de origem alimentar, como o PulseNet, onde fazem parte do programa de vigilância laboratorial de patógenos nosocomiais e saúde pública (SINGH et al., 2006). A análise da variabilidade genética é feita através de um programa de computador, o que permite uma comparação rápida e fácil dos dados, podendo associar os perfis obtidos com outros perfis. Esta técnica é ainda mais discriminatória que a sorotipagem, pois evidencia a possibilidade de culturas

pertencentes ao mesmo sorotipo apresentarem diferentes perfis genéticos (SINGH et al., 2006).

Dessa maneira, a caracterização adequada e detalhada de isolados de *Y. enterocolitica* e de outros patógenos, deve considerar a associação de diferentes técnicas laboratoriais, fenotípicas e moleculares, auxiliando assim as investigações epidemiológicas (BOTTONNE, 1997; GUPTA et al., 2015).

4. Referências

ABCS, Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Produção de Suínos: Teoria e Prática**. Coordenação Editorial da ABCS. Coordenação Técnica da Integrall Soluções em Produção Animal. Brasília, 2014. 908p.a.

ABCS, Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Manual de Industrialização de Suínos**. Coordenação Editorial da ABCS. Brasília, 2014. 378p.b.

AKIBA, M.; KUSUMOTO, M.; IWATA, T. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 1, p. 9–15, 2011.

ALEKSIC, S.; BOCKEMUHL, J. Proposed revision of the Wauters et al. antigenic scheme for serotyping of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 99–102, 1984.

ALEKSIC, S.; BOCKEMUHL, J.; LANGE, F. Studies on the serology of flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related *Yersinia* species. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology**, v. 261, n. 3, p. 299–310, 1986.

ALLAIN, J. M.; CAMARGO, B. V. O papel da mídia brasileira na construção das representações sociais de segurança alimentar. **Psicologia: Teoria e Prática**, v. 9, n. 2, p. 92–108, 2007.

AMARAL, A. L.; SILVEIRA, P. R. S.; LIMA, G. J. M. M.; et al. Boas Práticas de Produção de Suínos. **Circular Técnica - Embrapa Suínos e Aves**, v. 50, p. 1–60, 2006.

ANDERSEN, J. K. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 193–202, 1988.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 303–307, 2001.

BELLUCO, S.; BARCO, L.; ROCCATO, A.; RICCI, A. Variability of *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae counts on pig carcasses: a systematic review. **Food Control**, v. 55, p. 115–126, 2015.

BENT, Z. W.; YOUNG, G. M. Contribution of BlaA and BlaB β -lactamases to antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 4000–4002, 2010.

BERENDS, B. R., VAN KNAPEN, F., SNIDJERS J.M.A., MOSSEL, D. D. 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. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 207–217, 1998.

BHAGAT, N. & VIRDI, J. S. Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, n. 2, p. 177–183, 2007.

BHAGAT, N. & VIRDI, J. S. The enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 25–39, 2011.

BIBEL, D. J.; CHEN, A. T. H. Diagnosis of Plague: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, p. 633–651, 1976.

BISSETT, M. L.; POWERS, C.; ABBOTT, S. L.; JANDA, J. M. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency and serogroup distribution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 910–912, 1990.

BOECKEL, T. P. VAN; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 16, p. 1–6, 2015.

BOLTON, D. J.; IVORY, C.; MCDOWELL, D. Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in pork slaughter plant scald tank water. **Meat Science**, v. 95, n. 3, p. 668–671, 2013.

BONARDI, S.; BASSI, L.; BRINDANI, F.; et al. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2–3, p. 248–257, 2013.

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.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 257–276, 1997.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: Overview and epidemiologic correlates. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 4, p. 323–333, 1999.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an enduring human pathogen. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n.º 711, de 01 de novembro de 1995. Aprova as normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 1995.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 368, 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 46, de 10 de fevereiro de 1998. Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular 175, de 16 de maio de 2005. Procedimentos de verificação dos programas de autocontrole. Brasília, 2005a.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular 176, de 16 de maio de 2005. Modificação das instruções para a verificação do PPHO, encaminhados pela Circular N° 201/97/DIPOA e aplicação dos procedimentos de verificação dos elementos de inspeção previstos na Circular N° 175/2005 CGPE/DIPOA. Brasília, 2005b.

CAMPIONI, F.; FALCÃO, J. P. G Genotyping of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains from clinical and nonclinical origins by pulsed-field gel electrophoresis. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, p. 419–424, 2014.

CÁRDENAS, F. C.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E. Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. **Meat Science**, v. 79, n. 3, p. 509–520, 2008.

CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island. **International Microbiology**, v.2 p. 161–167, 1999.

CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 561–569, 2001.

CHOI, Y. M.; PARK, H. J.; JANG, H. I.; et al. Changes in microbial contamination levels of porcine carcasses and fresh pork in slaughterhouses, processing lines, retail outlets, and local markets by commercial distribution. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 413–418, 2013.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2014.

CORNELIS, G. R. The *Yersinia* YSC – YOP —TYPE IIII Weaponry. **Nature**, v. 3, p. 742–752, 2002.

DAMME, I. VAN; HABIB, I.; ZUTTER, L. DE. *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: Enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 158–161, 2010.

DAMME, I. VAN; BERKVEN, D.; BOTTELDOORN, N.; et al. Evaluation of the ISO 10273:2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 170–175, 2013.

DAMME, I. VAN; BERKVEN, D.; VANANTWERPEN, G.; et al. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with enteropathogenic *Yersinia* spp.: distribution, quantification and identification of risk factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 33–40, 2015.

DICKSON, J. S.; HURD, H. S.; ROSTAGNO, M. H.; et al. *Salmonella* in the pork production chain. **Pork Information Gateway**, p. 1–15, 2002.

DRUMMOND, N.; MURPHY, B. P.; RINGWOOD, T.; PRENTICE, M. B.; BUCKLEY, J. F. *Yersinia Enterocolitica* : A brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges and the pork production chain. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 9, n. 3, 2012.

D'SILVA J., Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing. **Compassion in World Farming Trust**, Petersfield, Hampshire, Inglaterra, 2000. 17p.

DUAN, R.; LIANG, J.; SHI, G.; et al. Homology analysis of pathogenic *Yersinia* species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on Multilocus Sequence Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 20–29, 2014.

EUROPEAN COMMISSION. From farm to fork - Safe food for Europe's consumers, p. 28, 2004. Disponível em: http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/information_sources/docs/from_farm_to_fork_2004_en.pdf. Acesso em: 23 jan. 2017.

EFSA, European Food Safety Authority; Technical specifications for harmonised national surveys of *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs on request of EFSA. **EFSA Journal**, v. 7, n. 11, p. 1–23, 2009.

FÀBREGA, A. & VILA, J. *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 1, p. 24–32, 2012.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P.; MALASPINA, A. C.; BROCCHI, M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 1539–1548, 2006a.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 9–19, 2006b.

FDA, Food and Drug Administration, reports on antimicrobials sold or distributed for food-producing animals. **Departamento of Health and Human Services**, Setembro, 2014.

FONDREVEZ, M.; LABBÉ, A.; HOUARDAYER, E.; et al. A simplified method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pig tonsils. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 244–249, 2010.

FONDREVEZ, M. LABBÉ, A., HOUDAYER, C. Genetic characterization of *Yersinia enterocolitica* collected from tonsils of slaughtered pigs. **SafePork**, 2011.

FONDREVEZ, M.; MINVIELLE, B.; LABBÉ, A.; et al. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 56–62, 2014.

FOSSE, J.; SEEGER, H.; MAGRAS, C. Foodborne zoonoses due to meat: A quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. **Veterinary Research**, v. 39, n. 1, 2008.

FOSSE, J.; SEEGER, H.; MAGRAS, C. Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 8, p. 429–454, 2009.

FRAZÃO, M. R.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* biotype 2 strains isolated in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 1058–1067, 2015.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food and environmental samples: a methodological problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 220–229, 2003.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; KORKEALA, H. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 47, p. 315-329, 2006.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 207–212, 2007.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; MURROS-KONTIAINEN, A.; SÄDE, E.; PUOLANNE, E.; BJÖRKROTH, J. High number of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in cold-stored modified atmosphere-packed pig cheek meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 1–2, p. 69–72, 2012.

GARZETTI, D.; SUSEN, R.; FRUTH, A.; et al. A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3–4, p. 275–283, 2014.

GRAHEK-OGDEN, D., SCHIMMER, B., CUDJOE, S. K., NYGÅRD, K., KAPPERUD, G. Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 754-756, 2007.

GUPTA, V.; GULATI, P.; BHAGAT, N.; DHAR, M. S.; VIRDI, J. S. Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 641–650, 2015.

HURST, M. R. H.; BECHER, S. A.; YOUNG, S. D.; NELSON, T. L.; GLARE, T. R. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 844–849, 2011.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal. v. 42, p. 1–39, 2014.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária. p.13-17, 2015.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária, p. 12-15, 2016.

IRIARTE, M.; VANOOTEGHEM, J.; DELOR, I.; et al. The *Myf* fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 507–520, 1993.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria*, *Salmonella*, and *Yersinia* species isolates in ducks and geese. **Poultry Science Association**, v. 93, p. 1023–1030, 2014.

KÄFERSTEIN, F. K. Actions to reverse the upward curve of foodborne illness. **Food Control**, v. 14, n. 2, p. 101–109, 2003.

KAPATRAL, V.; OLSON, J. W.; JEFFREY, C.; MILLER, V. L.; MINNICH, S. A. Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* Class III flagellar genes. **Molecular Microbiology**, v. 19, p. 1061–1071, 1996.

KONISHI, N., ISHITSUKA, R., YOKOYAMA, K., SAIKI, D., AKASE S., et al. Two outbreaks of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections in Tokyo and the characterization of isolates. **The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases**, v. 90, p. 66-72, 2016.

LANDERS, T. F. A Review of antibiotic use in food animals: perspective, policy and potential. **Public Health Reports**, v. 127, p. 4 - 22, 2012.

LATHERS, C. M. Role of veterinary medicine in public health: antibiotic use in food animals and humans and the effect on evolution of antibacterial resistance. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 595–599, 2001.

LAUKKANEN, R.; MARTI, P. O.; SIEKKINEN, K.; RANTA, J. Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to

slaughterhouse. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5444–5450, 2008.

LINDBLAD, M.; BERKING, C. A meat control system achieving significant reduction of visible faecal and ingesta contamination of cattle, lamb and swine carcasses at Swedish slaughterhouses. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 101–105, 2013.

LONG, C., JONES T. F., et al. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* Infections, FoodNet, 1996–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 566–567, 2010.

LUCERO ESTRADA, C. S. M.; VELÁZQUEZ, L. D. C.; ESCUDERO, M. E.; et al. Pulsed field, PCR ribotyping and multiplex PCR analysis of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from meat food in San Luis Argentina. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 21–28, 2011.

MACDONALD, E.; BORGEN, K.; BRANDAL, L. T.; et al. National outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections in military and civilian populations associated with consumption of mixed salad, Norway, 2014. **Surveillance and Outbreak Report**, v. 21, n. 34 , p. 1–9, 2016.

MELLO JUNIOR, A. S. Considerações importantes durante o processamento de carcaças suínas. **Revista Nacional da Carne**, nº326, p. 132-140, 2004.

MORGAN, I. R.; KRAUTIL, F. L.; CRAVEN, J. A. Effect of time in lairage on caecal and carcass *Salmonella* contamination of slaughter pigs. **Epidemiology and Infection**, v. 98, n. 3, p. 323–30, 1987.

NESBAKKEN, T. Chapter 10 - *Yersinia*, p. 187-198. In: Glenn, J.M. and Morris, P. (Eds.), **Foodborne Infections and Intoxications** (Fourth Edition). Academic Press, San Diego, 2013.

OLIVEIRA, N.S.S; NASCIMENTO, L.C; FLORIN, J.E. Isolamento e identificação de bactérias facultativas mesófilas em carnes frescas bovinas e suínas. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.94, p.68-74, 2002.

OLIVO, R.; OLIVO, N. O mundo das Carnes: ciência, tecnologia & mercado. 4 ed. Criciúma: Ed. Do autor, p. 214, 2006.

PELOSO, J. V. Qualidade da carne. **Revista Suinocultura Industrial**. Abr/mai, n. 138, 1999.

PEPE, J. C.; MILLER, V. L. *Yersinia enterocolitica* invasion : A primary role in the initiation of infection. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 90, n. July, p. 6473–6477, 1993.

PEPE, J. C.; WACHTEL, M. R.; WAGAR, E.; et al. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4837–4848, 1995.

PHAM, J. N.; BELL, S. M.; MARTIN, L.; CARNIEL, E. The β -lactamases and β -lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 951–957, 2000.

PIERSON, D. E.; FALKOW, S. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 1059–1064, 1990.

PIERSON, D. E.; FALKOW, S. The *ail* Gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 5, p. 1846–1852, 1993.

PIGATTO, C.P. BARROS, A.R. Qualidade da carne moída bovina resfriada, comercializada em açougues da região de Curitiba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n°108, p.53 –57, 2003.

PLATT-SAMORAJ, AUGORSKI, M.; SZWEDA, W.; et al. Analysis of the presence of *ail*, *ystA* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from aborting sows and aborted fetuses. **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, n. 7, p. 341–346, 2006.

POLJAK, Z.; DEWEY, C. E.; MARTIN, S. W.; et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* shedding and bioserotype distribution in Ontario finisher pig herds in 2001, 2002, and 2004. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 2–3, p. 110–120, 2010.

PORK CHECKOFF, 2016. World Per Capita Pork Consumption. Disponível em: <<http://www.pork.org/pork-quick-facts/home/stats/u-s-pork-exports/world-per-capita-pork-consumption-2>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

RAMAMURTHY, T.; YOSHINO, K.; HUANG, X.; et al. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene *ystB* of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. **Microbial Pathogenesis**, v. 23, n. 4, p. 189–200, 1997.

RASTAWICKI, W.; GIERCZYNSKI, R. Expression, purification, and characterization of the humoral immune response to recombinant MyfA protein of *Yersinia enterocolitica*. **European Journal Clinical Microbiology Infection Diseases**, v. 28, n. 12, p. 1491–1494, 2009.

SCHNEEBERGER, M.; BRODARD, I.; OVERESCH, G. Virulence-associated gene pattern of porcine and human *Yersinia enterocolitica* biotype 4 isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 198, p. 70–74, 2015.

SILVA, N. DA; TANIWAKI, M. H.; CHRISTINA, V.; et al. **Examination Methods of Food and Water**. 2013. 456p.

SIMONOVA, J.; BORILOVA, G.; STEINHAUSEROVA, I. V. A. Occurrence of pathogenic strains of *Yersinia Enterocolitica* in pigs and their antimicrobial resistance. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, p. 39–43, 2008.

SIMONSEN, B., BRYAN, F. L., CHRISTIAN, J. H B., et al. Prevention and control of foodborne salmonellosis through the application of the hazard analysis critical control point system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 227-247, 1987.

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512–530, 2006.

SKURNIK, M. & BENGOCHEA, J. A. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersinia*. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 23, p. 2521–2529, 2003.

SKURNIK, M. & TOIVONEN, S. Identification of Distinct Lipopolysaccharide Patterns among *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica* Like Bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, n. 7, 2011.

SOUZA, R. A.; PITONDO-SILVA, A.; FALCÃO, D. P.; FALCÃO, J. P. Evaluation of four molecular typing methodologies as tools for determining taxonomy relations and for identifying species among *Yersinia* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 2, p. 141–150, 2010.

STOCK, I.; HEISIG, P.; WIEDEMANN, B. Expression of β -lactamases in *Yersinia enterocolitica* strains of biovars 2, 4 and 5. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 1023–1027, 1999.

TRIENEKENS, J.; ZUURBIER, P. Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. **International Journal of Production Economics**, v. 113, n. 1, p. 107–122, 2008.

USDA, United States Department of Agriculture. **Industry & Trade Summary**. Office of Industries Publication ITS-11 N. Control 2014002, Outubro, 2014.

VONGKAMJAN, K.; WIEDMANN, M. Starting from the bench-prevention and control of foodborne and zoonotic diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 2–3, p. 189–195, 2015.

WAUTERS G.; ALEKSIC S.; CHARLIER J.; SCHULZE G.; Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. **Contributions to Microbiology and Immunology**, v. 12, p.239-243, 1991.

YANG, Y.; MERRIAM, J. J.; MUELLER, J. P. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2483–2489, 1996.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O estudo apresentado teve como objetivo geral identificar os principais pontos de contaminação por *Yersinia enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína.

Objetivos Específicos

- ✓ Isolamento de *Y. enterocolitica* do ambiente de produção e abate de suínos, e processamento de carne suína.
- ✓ Identificar isolados de *Y. enterocolitica* pelos métodos microbiológicos convencionais, moleculares e bioquímicos.
- ✓ Caracterizar o perfil genético dos isolados.
- ✓ Caracterizar a presença de genes relacionados a virulência e resistência a antimicrobianos.
- ✓ Caracterizar fenotipicamente o perfil de resistência a antimicrobianos.

CAPÍTULO 2. Rastreamento da contaminação por *Yersinia enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína.

Bruna Torres Furtado Martins

Resumo

O objetivo desse estudo foi rastrear a contaminação por *Yersinia enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína. Amostras de várias etapas da produção foram coletadas (granjas, carcaças, processamento e produtos finais, n = 870) e submetidas a detecção de *Y. enterocolitica*. Oito amostras apresentaram resultado positivo para *Y. enterocolitica*, em tonsilas palatinas (5), linfonodos mesentéricos (2) e carcaça suína após sangria (1), com obtenção de 16 isolados do bio-sorotipo 4/O:3. Os isolados apresentaram similaridade entre 60 e 80% por PFGE e, as tonsilas palatinas foram identificadas como potenciais fontes de contaminação para a cadeia produtiva. Os genes de patogenicidade pesquisados foram identificados em altas frequências nos isolados. Os isolados apresentaram alta taxa de resistência e, dos 17 antimicrobianos testados, todos foram sensíveis somente a ciprofloxacina e kanamicina. Foram identificados três perfis de resistência a diferentes classes de antimicrobianos além da presença dos genes *emrD*, *yfhD* e *marC*, relacionados a resistência múltipla a antimicrobianos. Os resultados obtidos evidenciam a importância dos suínos como reservatórios e disseminadores de *Y. enterocolitica* no ambiente de abate, além da patogenicidade e resistência a antimicrobianos dos isolados obtidos. Ainda, os resultados demonstram a necessidade do controle e monitoramento de *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína, especialmente nas granjas produtoras de suínos.

Palavras chave: *Yersinia enterocolitica*, rastreamento, virulência, PFGE, antimicrobianos

Abstract

This study aimed to track the *Yersinia enterocolitica* contamination in a pork production chain. Samples from different steps of pork production (pig farms, carcasses, processing environment and end products, n = 870) were obtained and subjected to *Y. enterocolitica* detection. Eight samples presented positive results for *Y. enterocolitica*, in palatine tonsils (5), mesenteric lymph nodes (2) and carcass after bleeding (1), and 16 isolates were obtained and identified as belonging to bio-serotype 4/O:3. Isolates presented high similarity indexes, varying from 60 to 80%, and palatine tonsils were characterized as potential contamination sources in the pork production chain. Virulence genes were present in high frequencies among isolates. Isolates presented high resistance to 15 of 17 tested antimicrobials, being susceptible to only ciprofloxacin and kanamicin, despite 3 multi-drug resistance profiles and positive results for *emrD*, *yfhD* e *marC*, related to multi-drug resistance. The obtained results highlighted the relevance of swines as *Y. enterocolitica* reservoirs and spreaders in the slaughtering and processing environment, and also the virulence potential and the antimicrobial resistance of the obtained isolates. Still, the obtained results demonstrated the demand for controlling and tracking the *Y. enterocolitica* in the pork production chain, specially in the pig production farms.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, tracking , virulence, PFGE, antimicrobials

1. Introdução

O Brasil atualmente ocupa papel de destaque no mercado mundial como importante produtor de alimentos cárneos, demonstrando significativo potencial de produção e exportação de alimentos de origem animal, dentre eles a carne suína (AMARAL et al., 2006). Como consequência, as empresas processadoras de carne suína devem atender plenamente aos padrões de qualidade e inocuidade, o que demanda o constante monitoramento nas diferentes etapas da produção (BRASIL, 2005a).

A carne suína é a proteína animal mais consumida no mundo e frequentemente, está envolvida em casos de surtos de origem alimentar, devido a diferentes patógenos que podem contaminá-la em toda a sua cadeia produtiva (BORCH et al., 1996). *Yersinia enterocolitica* é um patógeno frequentemente associado a esse produto e seus derivados, principalmente em países europeus, e é responsável pela yersiniose em humanos, uma enterocolite também denominada como pseudo-apendicite, que em casos mais graves, pode resultar em septicemia (FÀBREGA; VILA, 2012). A maioria das infecções relatadas por *Y. enterocolitica* é causada pelo bio-sorotipo 4/O:3 (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; DRUMMOND et al., 2012). Porém, a virulência desse patógeno é determinada por diferentes genes que não são restritos a esse bio-sorotipo (BHAGAT; VIRDI, 2007; BOTTONE, 2015; SCHNEEBERGER et al., 2015).

Os suínos são considerados reservatórios naturais de *Y. enterocolitica*, o que justifica a sua presença em abatedouros de suínos e a associação da carne suína a casos de yersiniose (ANDERSEN, 1988; FONDREVEZ et al., 2010; BONARDI et al., 2013; VILAR et al., 2015). Assim, esse patógeno está sujeito a diferentes pressões ambientais as quais os suínos são submetidos durante as etapas de produção, como tratamentos com antimicrobianos (BAUMGARTNER et al., 2007). Como consequência, vários estudos têm demonstrado a resistência de isolados de *Y. enterocolitica* a esses medicamentos (PRESTON et al., 1994; PHAM et al., 2000; SIMONOVA et al., 2008; JAMALI et al., 2010; JAMALI; ISMAIL, 2015). Por estar naturalmente presente em suínos, *Y. enterocolitica* pode contaminar as carcaças e produtos cárneos durante as diferentes etapas de criação e abate, principalmente durante a manipulação da cabeça, língua e tonsilas na cavidade oral (DAMME,

VAN et al., 2015). Adicionalmente, o patógeno pode estar presente no conteúdo intestinal e em linfonodos mesentéricos, considerados também como importantes fontes de contaminação durante o abate de suínos (BORCH et al., 1996).

Considerando a limitação de dados no Brasil sobre a presença de *Y. enterocolitica* em alimentos, esse estudo teve como objetivo caracterizar esse patógeno em diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína, abrangendo etapas da produção, abate e processamento.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo e coleta de amostras

O estudo foi conduzido em duas granjas de suínos de ciclo completo e em um matadouro-frigorífico localizado na região de Viçosa (MG), regularmente fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, com consentimento dos proprietários. Cada uma das granjas foi visitada cinco vezes para coleta de amostras ambientais nas baias de terminação, onde permaneciam os animais que seriam abatidos no mesmo dia da coleta. O matadouro-frigorífico foi visitado 10 vezes em um período de 7 meses (outubro de 2015 a abril de 2016), quando as amostras eram coletadas nos pontos determinados (BOTTELDOORN et al., 2003). Os pontos de coletas e unidades amostrais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Número de amostras e procedimentos de coleta na cadeia produtiva de carne suína na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

local	etapa	Amostra	unidade	n
Granja	Terminação	Piso	<i>overshoes</i> ¹	20
Frigorífico	Abate	carcaça após sangria	400 cm ²	100
		carcaça após chameamento	400 cm ²	100
		carcaça após evisceração	400 cm ²	100
		carcaça após a lavagem final	400 cm ²	100
		linfonodos mesentéricos	12,5 g	100
		tonsilas palatinas	12,5 g	100
	Processamento	mesa de manipulação	400 cm ²	60
		Faca	400 cm ²	60
		mãos de manipuladores	400 cm ²	60
		cordeiro final (embalado)	unidade	60

linguiça	25 g	10
----------	------	----

¹ Obtido conforme descrito por BOTTELDOORN et al., 2003

Amostras superficiais (carcaças, cortes cárneos, mãos de manipuladores, equipamentos e utensílios) foram obtidas por *swabs* de áreas de 400 cm² (quatro regiões de 10 x 10 cm) com esponjas esterilizadas pré-umedecidas com 10 mL de solução salina peptonada 0,1% (m/v) (Oxoid Ltda., Basingstoke, Inglaterra). Amostras superficiais de baias foram obtidas utilizando-se *overshoes* esterilizados, conforme descrito por Botteldoorn et al. (2003). As carcaças suínas eram marcadas no início do processo do abate, para permitir amostragem das mesmas carcaças em diferentes etapas do abate (Tabela 1). Amostras de tonsilas palatinas (12,5 g), linfonodos mesentéricos (12,5 g) e linguiça (25 g) foram obtidas durante o abate.

Todas as amostras obtidas foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados (Nasco™, Fort Atkinson, WI, EUA) e mantidas sob refrigeração até o processamento. Em condições assépticas, as amostras superficiais, linfonodos e linguiça receberam, respectivamente, 160 mL, 112,5 mL e 225 mL de solução salina peptonada 0,1% (m/v) (Oxoid) e homogeneizadas em Stomacher 400 (Seward Limited, Worthing, Inglaterra) por 2 minutos.

2.2. Pesquisa de *Y. enterocolitica*

Todas as amostras coletadas foram submetidas a pesquisa de *Y. enterocolitica* conforme o protocolo ISO 10273:2003, validado como o mais eficiente por Damme, Van et al. (2013). A cepa de *Y. enterocolitica* ATCC 9610 foi utilizada como controle positivo nas análises. Essa estirpe foi mantida em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Becton Dickinson - BD, Heidelberg, Germany) suplementado com glicerol a 20% (v/v), a -20 °C.

Alíquotas de 40 mL das amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 2.000 × *g* por 15 minutos sob refrigeração, e o *pellet* obtido suspenso em 10 mL de caldo Peptone-Sorbitol-Bile (PSB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), com incubação a 25 °C por 72 h. Em seguida, alíquotas de 0,5 mL das culturas obtidas em PSB foram transferidas para 4,5 mL de uma solução de hidróxido de potássio 0,5% (m/v) por 20 segundos em temperatura ambiente, estriadas em Yersina Selective Agar (BD) e incubadas a 30 °C por 48 h. Após incubação, as placas eram examinadas quanto à presença de colônias com

morfologia típica de *Y. enterocolitica*: pequenas e com centro vermelho (*bull's eye*) (DAMME, VAN et al., 2013).

Alíquotas dos isolados suspeitos de serem *Y. enterocolitica* foram transferidas para caldo BHI (BD), incubadas a 30 °C por 24 h, e submetidas a extração do DNA genômico utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop Lite, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) (concentração mínima: 40 ng/μL) e submetido a PCR multiplex para detecção dos genes *16s rRNA* e *inv* conforme Garzetti et al. (2014). As reações de amplificação foram conduzidas com 12,5 μL do Gotaq Green Master Mix (Promega), 200 nMol de cada *primer*, 1 μL da amostra (concentração mínima: 40 ng/μL), e água livre de nuclease até completar o total de 25 μL. As condições de amplificação da PCR estão descritas na Tabela 2. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (m/v) (Promega) corado com GelRed™ (Biotium, Inc., Fremont, CA, EUA) em tampão TBE 0,5X e visualizados em transiluminador L-PIX-HE (Loccus do Brasil) sob luz ultravioleta, para identificação de produtos com tamanhos típicos para cada um dos genes pesquisados (Tabela 2).

Isolados identificados como *Y. enterocolitica* foram estriados em ágar BHI (BD), incubadas a 30 °C por 24 h e, colônias isoladas eram submetidas a testes bioquímicos complementares para confirmação dos resultados: tween esterase, utilização do citrato, descarboxilação da ornitina e lisina, fermentação da sacarose, rammnose e xilose (SILVA et al., 2013). Todos os isolados identificados como *Y. enterocolitica* foram armazenadas em BHI (BD) suplementado com glicerol a 20% (v/v), a - 20 °C.

Adicionalmente, o DNA obtido dos isolados foi submetido a uma reação de PCR multiplex descrita por Garzetti et al. (2014), para genes associados aos principais sorotipos de *Y. enterocolitica*: *per* (O:9), *wbbU* (O:3), *wbcA* (O:8) e

Tabela 2. Genes pesquisados, funções, sequências de nucleotídeos, e características das reações de PCR utilizadas para a identificação e caracterização da patogenicidade e resistência a antimicrobianos em isolados de *Yersinia enterocolitica* obtidos na cadeia produtiva de carne suína.

gene	função	sequências	Tamaho do produto (bp)	desnaturação	anelamento	extensão	referência
<i>16s rRNA</i>	proteínas estruturais	F - AAT ACC GCA TAA CGT CTT CGG A R - CTT CTT CTG CGA GTA ACG TCA AT	330	95 °C, 40 s	58 °C, 40 s	72 °C, 60 s ¹	GARZETTI et al., 2014
<i>inv</i>	invasina/ligação a célula	F - TGG CAT CAA TCT CGT GAT TTC G R - GTT GCC CCT GAA TAT CTA AAG TGAC	1009	95 °C, 40 s	58 °C, 40 s	72 °C, 60 s ¹	GARZETTI et al., 2014
<i>per</i>	biossíntese de O-ag (O:9)	F - TCC TTC TCC AAA TAT ATA GGT GCC A R - ATG CGG CAT TAG ATG AGA TGG A	837	95 °C, 40 s	58 °C, 40 s	72 °C, 60 s ¹	GARZETTI et al., 2014
<i>wbbU</i>	biossíntese de O-ag (O:3)	F - ACC TCG TAT TTT TGA AGA TGA TCG C R - GTA CTC AAT AAC TTG CTG TTC GGA	463	95 °C, 40 s	58 °C, 40 s	72 °C, 60 s ¹	GARZETTI et al., 2014
<i>wbcA</i>	biossíntese de O-ag (O:8)	F - TGA TGA ACG AGG CGA GTT TGT T R - TAC TCC GTC TGT TAT GCG GAT TTA G	269	95°C, 40 s	58 °C, 40 s	72 °C, 60 s ¹	GARZETTI et al., 2014
<i>wzt</i>	biossíntese de O-ag (O:5,27)	F - GTT AGT TCC TGC ATC TGA TCG CC R - ATC CAG CAT CCA TGG CTC C	662	95 °C, 40 s	58 °C, 40 s	72 °C, 60 s ¹	GARZETTI et al., 2014
<i>ail</i>	<i>locus</i> de invasão/adesão e invasão	F - GGC CAT CTT TCC GCA TCA AC R - CTG CCC CGT ATG CCA TTG A	129	95°C, 40 s	58 °C, 40 s	72 °C, 60 s ¹	Nesse estudo
<i>ystB</i>	enterotoxina	F - GGA CAC CGC ACA GCT TAT ATT R - TGA CTC TGG TGC CCT CTT TT	198	95 °C, 40 s	58 °C, 40 s	72 °C, 60 s ¹	Nesse estudo
<i>virF</i>	regulador da expressão de genes transcricionais	F - TCA TGG CAG AAC AGC AGT CAG R - ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAG	591	94 °C, 30 s	55 °C, 60 s	72 °C, 120 s ²	BHADURI et al., 1997 <i>apud</i> BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>myfA</i>	produção de fímbrias	F - CAG ATA CAC CTG CCT TCC ATC T R - CTC GAC ATA TTC CTC AAC ACG C	272	94 °C, 60 s	58 °C, 110 s	72 °C, 110 s ³	KOT; TRAFNY, 2004 <i>apud</i> BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>ystA</i>	enterotoxina	F - ATC GAC ACC AAT AAC CGC TGA G R - CCA ATC ACT ACT GAC TTC GGC T	79	94 °C, 5 s	61 °C, 30 s	72 °C, 30 s ⁴	THOERNER et al., 2003 <i>apud</i> BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>ystC</i>	enterotoxina	F - GAG GCT GAG TGC GG R - GCA GGA TTG CAA CA	83	94 °C, 60 s	38 °C, 60 s	72 °C, 60 s ²	HUANG et al., 1997 <i>apud</i> BHAGAT; VIRDI, 2007

Continuação da Tabela 2

gene	função	Sequências	produto (bp)	desnaturação	anelamento	extensão	referência
<i>fepA</i>	captura e utilização de ferro	F - TAC GCC AAA ATA CCT TAC GAT R - TGT AAA TAC ACC CCC ACC TGA	438	56 °C, 60 s	56 °C, 60 s	72 °C, 60 s ²	SCHUBERT et al., 1999 <i>apud</i> BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>fepD</i>	captura e utilização de ferro	F - GTG TGA TTG CCT TAC TAT TG R - CGG TCA TCC TTT TAT TAC GG	381	94 °C, 60 s	55 °C, 60 s	72 °C, 60 s ²	SCHUBERT et al., 1999 <i>apud</i> BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>fes</i>	liberação de ferro	F - GCC GGC AGG CAC AGC GTA AT R - GGC CAA CCC ACC CAA AAC TT	561	94 °C, 60 s	58 °C, 60 s	72 °C, 60 s ²	SCHUBERT et al., 1999 <i>apud</i> BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>tccC</i>	toxina do complexo insecticida	F - GGG CAA AAA ATG CGT GAA GAG AG R - TTT ACC GGA ATA ACG CAC AGT TTT A	1035	94 °C, 60 s	51 °C, 110 s	72 °C, 110 s ²	BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>ymoA</i>	modulador do <i>ystA</i>	F - GAC TTT TCT CAG GGG AAT AC R - GCT CAA CGT TGT GTG TCT	330	94 °C, 60 s	50 °C, 60 s	72 °C, 60 s ²	GRANT et al., 1998 <i>apud</i> BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>hreP</i>	proteases	F - GCC GCT ATG GTG CCT CTG GTG TG R - CCC GCA TTG ACT CGC CCG TAT C	757	94 °C, 60 s	60 °C, 60 s	72 °C, 60 s ³	BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>sat</i>	enzima/resistência a estreptograminas	F - CCG ATG GTG GGG TTT TCT CAA G R - GGG ATT ACC GCC GAC CAC ACT A	456	55 °C, 60 s	55 °C, 60 s	72 °C, 60 s ²	BHAGAT; VIRDI, 2007
<i>emrD</i>	fator multi-droga resistente	F – AAC CAT TTA CGT TCC TGT TG R – CGC GGT CTG ATA ACA ARA AG	551	95 °C, 30 s	52 °C, 30 s	72 °C, 60 s ⁵	Nesse estudo
<i>yfhD</i>	fator multi-droga resistente	F – CGT CTT CTA CCA TCT CAC TG R – ACT GCC AGT TAG CAC AAT AA	632	95 °C, 30 s	50 °C, 30 s	72 °C, 60 s ⁵	Nesse estudo
<i>marC</i>	fator multi-droga resistente	F – CCC CAT AAA ATC AGC GAA AC R – CAA ACC CAT TAA CGA TG	460	95 °C, 30 s	54 °C, 30 s	72 °C, 60 s ⁵	Nesse estudo

¹ PCR com desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, a extensão final foi feita a 72 °C por 8 minutos.

² PCR com desnaturação inicial de 94 °C por 10 minutos, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, a extensão final foi feita a 72 °C por 10 minutos.

³ PCR com desnaturação inicial de 94 °C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, a extensão final foi feita a 72 °C por 10 minutos.

⁴ PCR com desnaturação inicial de 94 °C por 10 minutos, 25 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, a extensão final foi feita a 72 °C por 10 minutos.

⁵ PCR com desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, a extensão final foi feita a 72 °C por 5 minutos.

wzt (O:5,27). As reações de PCR foram feitas com volume total de 25 µL, contendo 12,5 µL do Gotaq Green Master Mix (Promega), 200 nMol de cada *primer*, 1 µL da amostra e água livre de nuclease até completar o volume final. As condições de amplificação estão descritas na Tabela 2. Os produtos das reações foram visualizados conforme descrito anteriormente, assim como a identificação dos tamanhos típicos dos produtos dos genes pesquisados (Tabela 2).

Cepas referência do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Manguinhos, RJ, Brasil) foram utilizadas como controles positivos: *Y. enterocolitica* CLIST 3438, *Y. enterocolitica* CLIST 3439, *Y. enterocolitica* CLIST 3440, *Y. enterocolitica* CLIST 3443, *Y. enterocolitica* 3445, *Y. enterocolitica* 3450, *Y. enterocolitica* CLIST 3457, *Y. enterocolitica* CLIST 3458, *Y. enterocolitica* CLIST 3459 e *Y. enterocolitica* CLIST 3469.

Os isolados identificados como *Y. enterocolitica* foram encaminhados ao Laboratório de Referência em Pesquisa de *Yersinia* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, para confirmação dos resultados, onde os seguintes testes bioquímicos foram realizados: produção de gás em EPM (Escola Paulista de Medicina) a 37 °C, produção de H₂S, hidrólise da ureia, desaminação do triptofano, produção de gás e H₂S no agar tríplice açúcar-ferro, motilidade, descarboxilação da lisina e produção de indol no meio MILI (Motilidade, Indol e Lisina), utilização do citrato a 37 °C, fermentação de diversos carboidratos (sacarose, ramnose, celobiose, melibiose, sorbose, sorbitol e rafnose) a 25 °C, e hidrólise da esculina, descarboxilação da ornitina, produção de indol a partir do triptofano, motilidade, urease e Voges-Proskauer em meio Clark Lubs. A identificação das diferentes espécies do gênero *Yersinia* foi realizada conforme o esquema proposto por Hurst et al. (2011).

2.3. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Os isolados identificados como *Y. enterocolitica* foram submetidos à macro-restrição do DNA como indicado pelo PulseNet (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA, EUA), seguindo o protocolo descrito por Ribot et al. (2006), com modificações. Resumidamente, alíquotas dos isolados foram transferidas para BHI (BD) e incubadas a 30 °C por 24 h e submetidas a diluição em BHI (BD) para obtenção de culturas com densidades ópticas entre

0,7 e 0,9 ($\lambda = 610 \text{ nm}$). Alíquotas de 400 μL das culturas obtidas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e submetidos a centrifugação a 12.000 $\times g$ por 5 minutos, com descarte do sobrenadante. Em seguida, 20 μL de proteinase K (20 mg/mL) e 400 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 1% (m/v) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), mantido de 55 a 60 °C, foram adicionados e transferidos para moldes para confecção de *plugs*. Os *plugs* então foram colocados em solução de Cell Lysis Buffer, incubados a 55 °C por 1,5 hora. Após incubação, os *plugs* foram retirados da Cell Lysis Buffer e lavados com solução de água Mili Q pré-aquecida. Após esse procedimento, foram feitas três lavagens subsequentes com TE buffer a 55 °C em intervalos de 15 minutos em banho-maria a 55°C. Os *plugs* foram armazenados em geladeira a 4 °C para posterior utilização. A digestão enzimática foi realizada com 50 U da enzima *XbaI* (Promega) a 37 °C por 2 horas, em aproximadamente 1/3 do *plug* original, e os produtos oriundos da restrição foram então colocados em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (m/v) (Bio-Rad) em tampão TBE 0,5X pH 8,3 específico para PFGE. A corrida foi realizada em aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad) seguindo os parâmetros: *initial switch time* de 2,2 segundos, *final swicth time* de 63,8 segundos, ângulo de 120°, 6 V/cm, tempo de corrida de 16 horas. Os géis obtidos foram corados por banho de imersão em GelRed (Biotium) e a visualização dos padrões de bandas em transiluminador L-PIX-HE (Loccus do Brasil) sobre luz ultravioleta. Os padrões obtidos foram comparados ao padrão da *Salmonella* Braenderup ATCC BAA664 no programa Bionumerics 6.6 (Applied Maths, Gand, Bélgica), considerando otimização de 1% e coeficiente de Dice a 5%.

2.4. Potencial patogênico

Os isolados identificados como *Y. enterocolitica* foram submetidos a reações de PCR para detecção de genes relacionados a patogenicidade. Os genes *ail* e *ystB* foram pesquisados em uma reação de PCR multiplex, sendo os *primers* elaborados através de do banco de dados de sequências de nucleotídeos do *PrimerBlast* com genoma da *Y. enterocolitica* 8081 (NC AM286415.1) disponível no *site do National Center for Biotechnonology Information* (NCBI) (Tabela 2). As reações de PCR foram compostas por 12,5 μL do Gotaq Green Master Mix (Promega), 200 nMol de cada *primer*, 1 μL da amostra de DNA concentração mínima: 40 ng/ μL) e água livre de nucleasse

para completar o volume final da reação. Os genes *virF*, *myfA*, *ystA*, *ystC*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC*, *ymoA*, *hreP* e *sat* foram pesquisados individualmente por reações de PCR, utilizando *primers* compilados no trabalho de Bhagat e Viridi, (2007). As condições das reações de PCR realizadas estão descritas na Tabela 2. Os produtos das reações foram visualizados conforme descrito anteriormente, assim como a identificação dos tamanhos típicos dos produtos dos genes pesquisados (Tabela 2). Produtos obtidos na PCR para detecção do gene *ail* foram submetidos ao sequenciamento no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil), para confirmação dos resultados após verificação de identidade com sequências previamente depositadas no GenBank do mesmo gene.

2.5. Resistência a antimicrobianos

Os isolados de *Y. enterocolitica* foram testados quanto à resistência a antimicrobianos de diferentes classes pela metodologia do *breakpoint* (BAE et al., 2005). Foram considerados as concentrações mínimas inibitórias de diferentes antimicrobianos para determinação de resistência por enterobactérias, conforme CLSI (2014), descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações de antimicrobianos utilizados para avaliação da resistência por isolados de *Y. enterocolitica* obtidos da cadeia produtiva de carne suína.

classe ¹	subclasse	antimicrobiano	concentração ¹
aminoglicosídeos		gentamicina	10 µg/mL
		kanamicina	64 µg/mL
		neomicina	4 µg/mL
		streptomicina	16 µg/mL
ansamicinas		rifampicina	4 µg/mL
carbapenemas		imipenem	4 µg/mL
sulfonamidas		sulfametoxazol	512 µg/mL
glicopeptídeos		vancomicina	16 µg/mL
nitroimidazóis		nitroimidazol	32 µg/mL
β-lactâmicos	aminopenicilinas	amoxicilina	32 µg/mL
		ampicilina	16 µg/mL
fenicóis		cloranfenicol	32 µg/mL
		florfenicol	16 µg/mL

pleuromutilinas		tiamulina	32 µg/mL
quinolonas	fluoroquinolonas	ciprofloxacina	4 µg/mL
	quinolonas	ácido nalidíxico	30 µg/mL
tetraciclinas		tetraciclina	30 µg/mL

¹ Classes e concentrações definidas de acordo com o CLSI, 2014

O ágar Mueller-Hinton (BD) foi previamente preparado e suplementado com diferentes antimicrobianos, em suas concentrações mínimas inibitórias para enterobactérias, e distribuído em placas de Petri com 150 mm de diâmetro. Em seguida, alíquotas de 20 µL dos isolados identificados como *Y. enterocolitica* foram distribuídas em poços de uma placa de ELISA de 96 poços, contendo previamente 180 µL de BHI (BD), e incubados a 30 °C por 24 h. Após incubação, as culturas obtidas foram transferidas com o auxílio de um *pin-replicator* para as placas contendo ágar Mueller-Hinton suplementado com os diferentes antimicrobianos. As placas foram incubadas a 30 °C e avaliadas quanto ao crescimento de colônias após 24 h. Os isolados que apresentaram crescimento foram considerados resistentes ao antimicrobiano na concentração testada (Tabela 3). Todos os testes foram conduzidos em duplicata, e considerando os seguintes controles: uma placa de Ágar Mueller-Hinton sem antimicrobianos foi utilizada para verificação da viabilidade das culturas avaliadas, poços não inoculados foram utilizados como controle de contaminação em cada placa e *Streptococcus salivarius* 20P3 foi utilizado como controle de resistência.

Em complementação, os isolados foram submetidos a reações de PCR para detecção dos genes *emrD*, *yfhD* e *marC*, relacionados a capacidade de resistência a múltiplos antimicrobianos. Os pares de oligonucleotídeos foram construídos com base no genoma de *Y. enterocolitica* 8081 (Acesso NC AM286415.1) com auxílio do *PrimerBlast* disponível no NCBI (Tabela 2). Cada reação de PCR de 25 µL foi composta por 12,5 µL do Gotaq Green Master Mix (Promega), 200 nMol de cada *primer* (Tabela 2), 1 µL da amostra de DNA (concentração mínima: 40 ng/µL) e água livre de nuclease para completar o volume final de 25 µL da reação. Todas as condições das reações de PCR realizadas estão descritas na Tabela 2. Os produtos das reações foram visualizados conforme descrito anteriormente, assim como a identificação dos tamanhos típicos dos produtos dos genes pesquisados (Tabela 2).

Os produtos da PCR para detecção dos genes *emrD*, *yfhD* e *marC* foram purificados com QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante e enviados para o sequenciamento no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo, para confirmação dos resultados após verificação de similaridade com sequências de *Y. enterocolitica* que serão depositadas no *GenBank*.

3. Resultados e Discussão

3.1. Pesquisa de *Y. enterocolitica*

Considerando as amostras analisadas, 53 (6,1%) apresentaram formação de colônias suspeitas após o plaqueamento seletivo, das quais foram selecionados 106 isolados típicos. Após identificação molecular dos isolados suspeitos, 42 apresentaram amplificação de produtos de PCR com o gene *16srRNA* porém, apenas 16 foram confirmados como *Y. enterocolitica* por apresentarem amplificação de produtos de PCR com o gene *inv* (Figura 1), resultando em oito amostras positivas: tonsilas palatinas, linfonodos mesentéricos e *swab* de carcaça após sangria (Tabela 4). Todos os isolados identificados como *Y. enterocolitica* apresentaram amplificação de produtos de PCR com o gene *wbbU*, caracterizando - os como pertencentes ao sorotipo O:3 (Figura 2), descrito como o mais comum em casos clínicos humanos (GARZETTI et al., 2014; DAMME, VAN et al., 2015; GUPTA et al., 2015). Esses resultados foram confirmados pelos testes fenotípicos realizados na USP, exceto por um isolado que foi identificado como *Y. molaretti* (isolado 27) e mais outros três isolados que não apresentaram alguns resultados típicos para *Y. enterocolitica* (isolados 12, 85 e 101). Considerando a especificidade do gene *inv* para *Y. enterocolitica*, esses quatro isolados foram considerados como

Y. *enterocolitica* atípicos.

Tabela 4. Número de amostras e resultados de coleta na cadeia produtiva de carne suína na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

local	etapa	amostra	n ₁ *	isolados	n ₂ *	<i>Y. enterocolitica</i>	
granja	terminação	piso	20	13	0	0	
frigorífico	abate	carcaça após sangria	100	3	1	3	
		carcaça após chamuscamento	100	4	0	0	
		carcaça após evisceração	100	5	0	0	
		carcaça após a lavagem final	100	1	0	0	
		linfonodos mesentéricos	100	35	2	3	
	processamento	tonsilas palatinas	100	21	5	10	
		mesa de manipulação	60	9	0	0	
		faca	60	1	0	0	
		mãos de manipuladores	60	4	0	0	
		corte final (embalado)	60	2	0	0	
		linguiça	10	8	0	0	
		total		870	106	8	16

*n₁ = número de amostras coletadas

*n₂ = número de amostras positivas



Figura 1: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR *multiplex* para identificação de isolados de *Y. enterocolitica*. M: 100 bp DNA *ladder*, B: amostra em branco, 9610: amostra ATCC de *Y. enterocolitica*. Cada número da sequência corresponde ao código do isolado. Tamanhos dos *amplicons*: *16s rRNA*: 330 bp e *inv*: 1009 bp

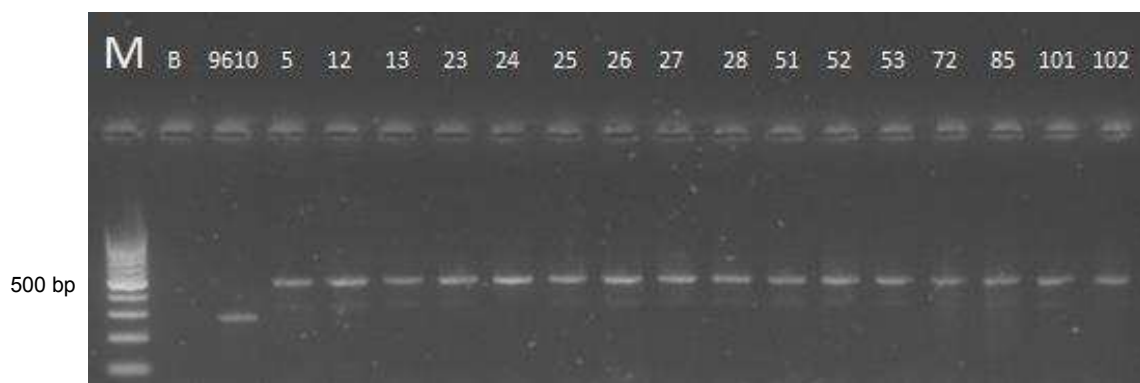


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR *multiplex* para identificação de isolados de *Y. enterocolitica*. M: 100 bp DNA *ladder*, B: amostra em branco, 9610: amostra ATCC de *Y. enterocolitica*. Cada número da sequência corresponde ao código do isolado. Tamanhos do *amplicons*: *wbbU*: 463 bp e *wbcA*: 269 bp.

Tonsilas palatinas de suínos são amostras rotineiramente analisadas para a detecção de *Y. enterocolitica* em abatedouros (DAMME, VAN et al., 2010). Outros autores também descreveram as tonsilas palatinas como importante fonte de entrada do patógeno em frigoríficos (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; FONDREVEZ et al., 2010, 2014), sendo consideradas fontes mais importantes de contaminação por *Y. enterocolitica* em abatedouros do que as fezes dos próprios animais (JOHANNESSEN, 2000). Apesar de *Y. enterocolitica* não ter sido isolada de amostras ambientais em nosso estudo (Tabela 4), a possibilidade de contaminação cruzada durante os procedimentos que apresentam maior risco não deve ser descartada (BORCH et al., 1996; BOLTON et al., 2013; BONARDI et al., 2013).

Na França foi pesquisada *Y. enterocolitica* em 900 amostras de tonsilas palatinas de suínos e 316 isolados (35,1%) foram identificados como sendo esse

patógeno pelo uso de testes bioquímicos (FONDREVEZ et al., 2010; FONDREVEZ, 2011). Em todos os abatedouros amostrados por DAMME, VAN et al. (2015), as amostras de tonsilas palatinas foram as que apresentaram maior prevalência de *Y. enterocolitica*, seguida por fezes e amostras de carcaças. Poljak et al. (2010) verificaram a presença de cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* principalmente em animais na fase de terminação, representando potenciais fontes de contaminação do patógeno durante as diferentes etapas do abate. De acordo com Borch et al., (1996), medidas de controle nos pontos mais críticos do abate devem ser tomadas para reduzir a disseminação de *Y. enterocolitica*, considerando que as etapas mais relevantes para a contaminação são a remoção dos intestinos, excisão da língua, faringe, tonsilas e linfonodos mesentéricos, desossa da cabeça e procedimentos de inspeção *post mortem* (BORCH et al., 1996; NESBAKKEN et al., 2003).

O gene *inv* é utilizado com frequência na identificação de *Y. enterocolitica*, sendo sua ocorrência relatada por Falcão et al. (2006a) em 106 cepas do patógeno oriundos de diferentes tipos de amostras. Adicionalmente, a pesquisa molecular de marcadores genéticos dos diferentes sorotipos também apresenta alta especificidade e pode ser utilizada com segurança para a caracterização de isolados de *Y. enterocolitica* obtidos de diferentes tipos de amostras (GARZETTI, 2014). Em estudo realizado com 442 cepas de *Y. enterocolitica* isoladas de amostras de produtos cárneos suínos e ambientais provenientes de abatedouros e casas de carnes, 122 foram identificadas como pertencentes a biotipo 1A mas nenhuma dessas eram de tonsila palatina ou língua. As outras 320 amostras foram classificadas como pertencentes ao biotipo 4, sorotipo O:3; (PAIXÃO et al., 2013).

O predomínio de *Y. enterocolitica* do sorotipo O:3 em amostras provenientes de animais pode ser observado em diferentes países. Em estudo realizado no Canadá, o patógeno foi identificado em fezes de suínos ao longo de 3 anos (2001-2003) em frequências variando entre 5,1 a 35,1%, com predomínio do sorotipo O:3 (POLJAK et al., 2010). Fondrevez et al. (2011) também identificaram predomínio de *Y. enterocolitica* pertencente ao biotipo 4, sorotipo O:3 e positivas para a presença do plasmídeo pYV em tonsilas, confirmando o potencial patogênico de cepas provenientes desse tipo de amostra. Em estudo realizado na Bélgica, *Y. enterocolitica* foi isolada em 11,4% das carcaças suínas amostradas e 4,9% das amostras de carne fatiada; isolados do biotipo 4 e sorotipo O:3 foram os mais prevalentes, e apenas uma amostra superficial de carcaça suína foi positiva para *Y. enterocolitica* do biotipo 2 e sorotipo O:9 (DAMME, VAN et al., 2013).

Damme, Van et al. (2010) identificaram a presença de *Y. enterocolitica* do biotipo 4, sorotipo O:3, em 37,4% de tonsilas palatinas de suínos destinados ao abate, indicando esses órgãos como importantes fontes de contaminação do patógeno na cadeia produtiva da carne suína. Essa rota de contaminação foi descrita por Damme, Van et al. (2015) novamente, em um estudo que avaliou 2.160 amostras de diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína para pesquisa de bactérias enteropatogênicas do gênero *Yersinia*. A espécie *Y. enterocolitica* do sorotipo O:3 foi a mais comum em tonsilas (55,3%), fezes (25,6%), região mandibular dos animais (28,9%) e carcaças (39,7%). Em estudo realizado na França, com amostragem de tonsilas palatinas de 3.120 suínos destinados ao abate, *Y. enterocolitica* foi identificado em 13,7% das amostras, e isolados do biotipo 4 foram os mais frequentes (91,9%) (FONDREVEZ et al., 2014).

Os estudos apresentados e os resultados obtidos confirmam a importância das tonsilas palatinas como fontes de contaminação por *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína, principalmente cepas com potencial patogênico do bio-sorotipo 4/O:3. Portanto, as boas práticas de fabricação e o controle dos procedimentos são indispensáveis para garantir a qualidade e inocuidade na cadeia de produção de carne suína, minimizando os potenciais riscos associados a contaminação por *Y. enterocolitica*.

3.2. PFGE

No presente estudo os isolados foram agrupados em três *clusters* com identidade variando entre 62 a 70%, (Figura 3). Um isolado (85) não apresentou perfil genético que permitisse o agrupamento em nenhum dos *clusters* formados. Isolados com perfis genéticos idênticos e provenientes de amostras diferentes foram identificados em duas situações (isolados 25 e 52, e isolados 23 e 51), indicando uma rota de contaminação proveniente de tonsilas palatinas para carcaças suínas (Figura 3). Adicionalmente, também foi possível identificar isolados obtidos de amostras de diferentes granjas com perfis genéticos idênticos, o que indica a circulação de uma mesma cepa de *Y. enterocolitica* na área de estudo (Figura 3, isolados 25 e 52, e 23 e 51).

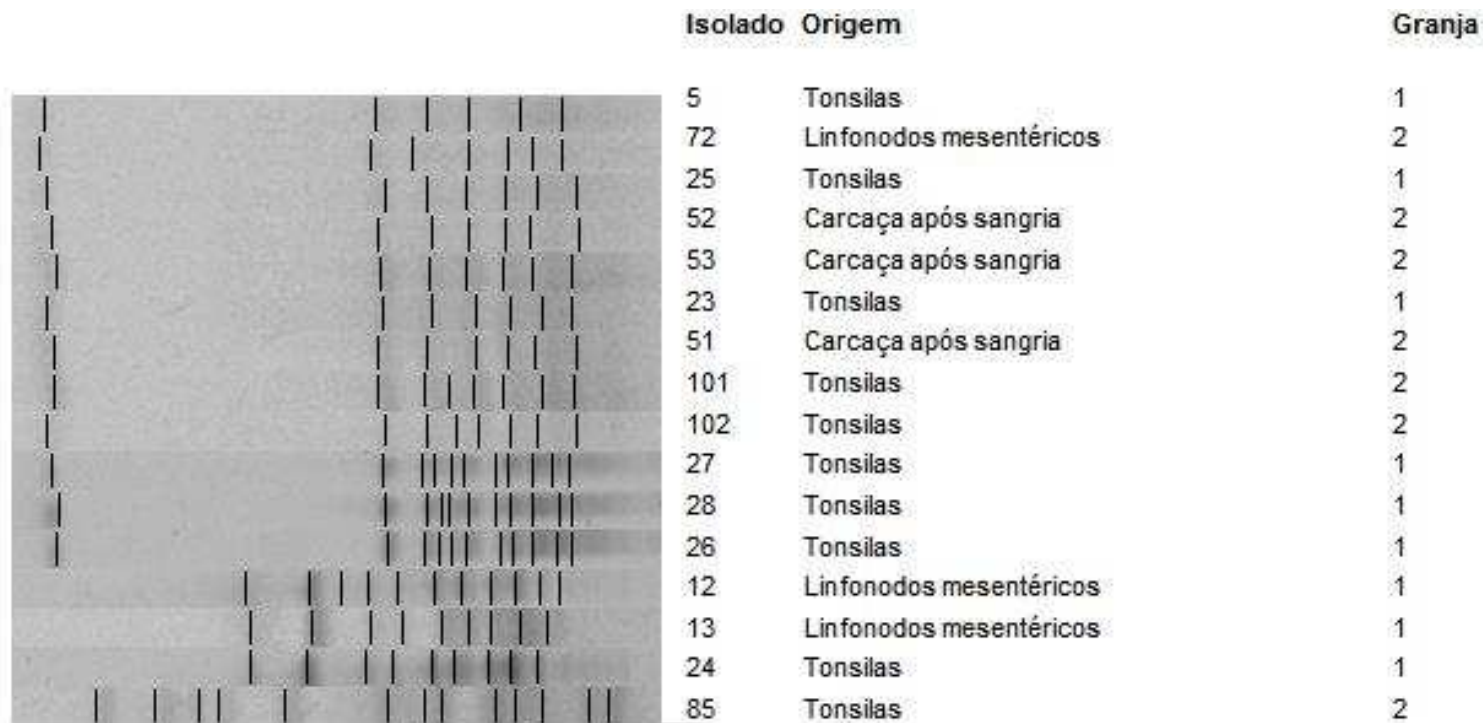
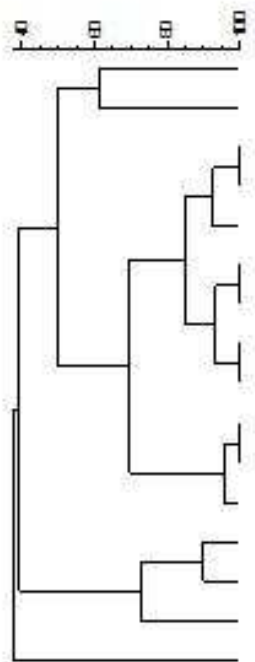


Figura 3. Representação esquemática dos perfis genéticos obtidos por PFGE após a macro-restrição com enzima XbaI dos isolados de *Y. enterocolitica* obtidos na cadeia produtiva de carne suína. A similaridade foi estimada utilizando o coeficiente de Dice (5% de tolerância).

Os resultados obtidos são coerentes com o estudo de Falcão et al. (2006a), que descreveram os perfis genéticos de 103 cepas de *Y. enterocolitica* isoladas de humanos e animais utilizando o PFGE após restrição por *Xba*I, e demonstraram alta identidade no bio-sorotipo 4/O:3, variando de 84 a 99%. Ainda nesse estudo, Falcão et al. (2006a) identificaram isolados de *Y. enterocolitica* obtidos de fezes e alimentos com perfis genéticos idênticos, e que isolados do biotipo 1A foram obtidos apenas de alimentos, e apresentaram alta diversidade por PFGE. Em estudo realizado por Lucero Estrada et al. (2011), oito cepas de *Y. enterocolitica* do bio-sorotipo 2/O:9 foram agrupados em cinco *clusters* por PFGE, enquanto 25 isolados do biotipo 1A foram organizados em 10 *clusters*, indicando a maior diversidade genética desses grupos. Um total de 316 isolados de *Y. enterocolitica* obtido de *swab* de tonsilas de suínos foram submetidos a PFGE e organizados em cinco grandes grupos: 21,8% dos isolados foram distribuídos em dois grupos relacionados ao biotipo 4 e o restante dentro de três grupos relacionados aos biotipos 3 e 4 (FONDREVEZ, 2011).

Recentemente, foi realizado um estudo randomizado no Brasil com amostras de *Y. enterocolitica* provenientes de suínos, alimentos e pacientes clínicos. A análise do PFGE formou nove *clusters* e, os isolados pertencentes ao bio-sorotipo 4/O:3 provenientes de animais e humanos foram agrupados em apenas um desses *clusters*. As outras estirpes foram distribuídas entres os *clusters* restantes, o que confirma o alto nível de similaridade genética desse grupo e a importância do suíno na epidemiologia desse patógeno (RUSAK et al., 2014). Na China foi demonstrado pelo uso do PFGE que isolados de *Y. enterocolitica* obtidos de animais apresentaram os mesmos perfis genéticos que isolados provenientes de fezes diarreicas de humanos, indicando o animais como potenciais fontes de infecção nas áreas estudadas (LIANG et al., 2015).

Considerando que os isolados obtidos no estudo foram identificados como pertencentes ao bio-sorotipo 4/O:3, a similaridade genética identificada é justificada e indica uma potencial rota de contaminação na área estudada e na cadeia produtiva de carne suína (Figura 3).

3.3. Potencial patogênico

Os isolados de *Y. enterocolitica* avaliados nesse estudo apresentaram resultados positivos com os genes de virulência *ail*, *virF*, *myfA*, *ystA*, *tccC*, *ymoA*, *hreP* e *sat*, e negativos com os genes *ystB*, *ystC*, *fepA*, *fepD*, e *fes*, o que indica o potencial patogênico dos mesmos (Figura 4).

Considerando os resultados obtidos nessa etapa do estudo, o potencial patogênico dos isolados de *Y. enterocolitica* obtidos na cadeia produtiva de suínos foi caracterizado através de PCR (Figura 4).

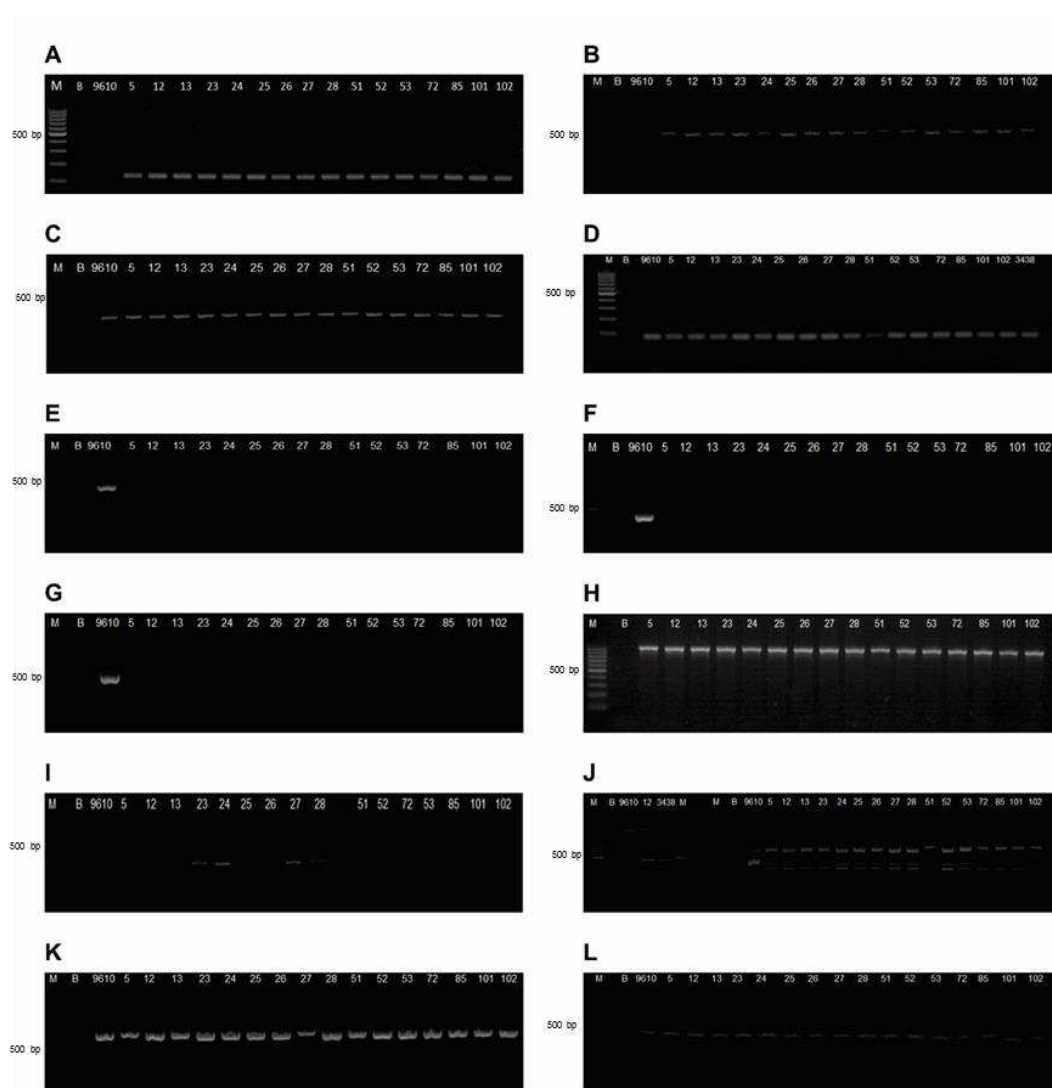


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para identificação de isolados de *Y. enterocolitica*. Em todas as figuras: M: 100 bp DNA ladder, B: branco, 9610: amostra ATCC de *Y. enterocolitica*. Cada número da sequência corresponde ao código do isolado. A: *ail*, 129 bp e *ystB*, 281 bp, B: *virF*, 591 bp, C: *myf*, 272 bp, D: *ystA*, 79 bp, E: *fepA*, 438 bp, F: *fepD*, 381 bp, G: *fes*, 561 bp, H: *tccC*, 1035 bp, I: *ymoA*, 330 bp, J: *ystC*, 83 bp, K: *hreP*, 757 bp, L: *sat*, 456 bp.

O sequenciamento dos produtos de PCR obtidos com o gene *ail* apresentou identidade e similaridade de 100% com amostras de *Y. enterocolitica* cepa KNG22703, *Y. enterocolitica* cepa 2616-87, *Y. enterocolitica* cepa W22703 biovar 2 sorotipo O:9, *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* 105.5R(r), *Y. enterocolitica* subsp.

paleartica Y11 quando comparadas ao banco genômico (NCBI) depositadas no banco de dados *on-line* do *Blast*, indicando a especificidade dos *primers* desenhados para esse gene. O gene *ail* só está presente em cepas de *Y. enterocolitica* consideradas patogênicas (MILLER et al., 1989) e já foi detectado em isolados obtidos em diversos estudos relacionados a esse patógeno (BURNENS et al., 1996; BHADURI et al., 1997; THOERNER et al., 2003; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; VIRTANEN et al., 2011; GARZETTI et al., 2014; FRAZÃO; FALCÃO, 2015).

Thoerner et al. (2003) fizeram um estudo com isolados de *Y. enterocolitica* de várias origens e demonstraram que o sorotipo O:3 apresenta predominantemente os genes *ail* e *ystA*, além de genes plasmidiais. Além disso, confirmou que a classificação dos biotipos patogênicos clássicos de *Y. enterocolitica* pode ser presumida pela presença do gene *ystA* e ausência do gene *ystB*. Os resultados obtidos nesse estudo são compatíveis com essas características (Figura 4).

Os genes *ail*, *ystA* e *ystB* foram identificados em 36 isolados de *Y. enterocolitica* provenientes de castores, incluindo 12 amostras de tonsilas palatinas; esse estudo identificou amplicons referentes ao gene *ystB*, geralmente associados com cepas *Y. enterocolitica* do biotipo 1A de baixa ou nenhuma patogenicidade (PLATT-SAMORAJ et al., 2006, 2015; GARZETTI et al., 2014). O gene *ystB* não foi identificado nos isolados de *Y. enterocolitica* obtidos no presente estudo (Figura 4), o que confirma os seus potenciais patogênicos.

O gene *ymoA* é responsável pela modulação do gene *ystA*, indicando participação direta na patogenicidade de *Y. enterocolitica* e considerado altamente conservado (GRANT et al., 1998; BHAGAT; VIRDI, 2007). A presença desse gene nos isolados obtidos reforça a identificação dos isolados 12, 27, 85 e 101 (Figura 4), que embora não tenham apresentado perfis bioquímicos compatíveis com *Y. enterocolitica*, tiveram resultados positivos com o gene *ymoA*.

A porcentagem de similaridade entre os nucleotídeos sequenciados do gene do gene *myfA* em cepas consideradas pouco patogênicas e cepas patogênicas foi de 94,5% (IRIARTE et al., 1993). Além disso, Grant et al. (1998) detectaram a presença do gene *myfA* em 11,7% do total de isolados avaliados, enquanto Bhagat e Viridi (2007) encontraram prevalência do gene *myfA* em torno de 44% nas cepas do biotipo 1A avaliadas. Esses números demonstram que há uma variação na distribuição desse gene entre *Y. enterocolitica* (BHAGAT; VIRDI, 2007). A presença do gene *myfA* foi associada apenas a sorotipos patogênicos de *Y. enterocolitica*,

como o O:3 e O:9, em isolados provenientes principalmente de casos clínicos de yersiniose em humanos (KOT; TRAFNY, 2004).

O gene *sat* foi identificado em todos os isolados obtidos nesse estudo, pertencentes ao biotipo 4 (Figura 4). Está relacionado a expressão de uma enzima de resistência a antimicrobianos (estreptograminas) e foi descrito como presente em 21% de cepas de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A e em apenas uma cepa do biotipo 1B em um estudo conduzido por Bhagat; Viridi (2007).

Todos os isolados obtidos no presente estudo apresentaram resultado positivo para *virF*, indicando a presença do plasmídeo pYV e a patogenicidade dos mesmos. O gene *virF* é utilizado para identificar a presença do plasmídeo pYV nos isolados de *Y. enterocolitica* e está presente em grande parte das cepas patogênicas dessa espécie (BHADURI et al., 1997; RUSAK et al., 2014) Damme, Van et al. (2013) detectaram o gene *virF* em 81,9% dos isolados de *Y. enterocolitica* estudados provenientes de carne suína, confirmando que as cepas isoladas de carcaças e seus derivados podem apresentar elevado potencial patogênico para humanos...

Os isolados apresentaram resultados positivos para o gene *tccC* que está associado a capacidade de bactérias sobreviverem em insetos. No entanto, não há relação descrita de *Y. enterocolitica* com insetos, dessa forma acredita-se que a proteína codificada por esse gene tenha algum envolvimento na patogenicidade do agente que ainda não foi elucidada. Sabe-se que cepas de *Y. enterocolitica* 1A mutantes, que não possuíam esse gene, perderam a capacidade de invadir o trato gastrointestinal de ratos durante uma infecção com essas cepas mutantes (TENNANT et al., 2005).

O gene *hreP* codifica uma protease que leva o mesmo nome que tem influência direta sobre as proteínas das células do hospedeiro, inclusive nas proteínas importantes do sistema imune, foi comprovado que cepas de *Y. enterocolitica* mutantes no gene *hreP* tiveram a virulência reduzida (HEUSIPP et al., 2001).

O ferro é essencial para a sobrevivência da maioria dos seres vivos, em *Y. enterocolitica* (SCHUBERT et al., 1999). Os genes *fepA*, *fepD* e *fes* estão relacionados a produção e liberação de ferro em sideróforos heterocíclicos do tipo yersiniabactin em cepas altamente patogênicas de *Y. enterocolitica* (SCHUBERT et al., 1999). Os isolados desse estudo não foram positivos na PCR para nenhum desses três genes, o que sugere que esses não fazem uso desse sideróforo para capturar ferro.

3.4. Resistência a antimicrobianos

As frequências de resistência dos isolados em relação aos diferentes antimicrobianos avaliados no presente estudo são apresentadas na Tabela 5. Todos os isolados avaliados foram resistentes nas concentrações testadas, a florfenicol, nitroimidazol, tiamulina, vancomicina, ampicilina, estreptomicina, ácido nalidíxico, imipinem, neomicina, sulfametoxazol e amoxicilina; apenas em relação a kanamicina e ciprofloxacina os isolados apresentaram susceptibilidade.

Tabela 5. Frequências de isolados de *Y. enterocolitica* obtidos da cadeia produtiva de carne suína com resistência a diferentes antimicrobianos

Classe	Subclasse	Antimicrobiano ¹	n (%)
Aminoglicosídeos		gentamicina	6 (37,5)
		kanamicina	0
		neomicina	16 (100,0)
		streptomicina	16 (100,0)
Ansamícinas		rifampicina	3 (18,8)
Carbapenemas		imipenem	16 (100,0)
Sulfonamidas		sulfametoxazol	16 (100,0)
Glicopeptídeos		vancomicina	16 (100,0)
Nitroimidazóis		nitroimidazol	16 (100,0)
β -lactâmicos	aminopenicilinas	amoxicilina	16 (100,0)
		ampicilina	16 (100,0)
Fenicóis		cloranfenicol	3 (18,8)
		florfenicol	16 (100,0)
Pleuromutilinas		tiamulina	16 (100,0)
Quinolonas	fluoroquinolona	ciprofloxacina	0
	quinolona	ácido nalidíxico	16 (100,0)
Tetraciclínas		tetraciclina	2 (12,5)

¹ Concentrações avaliadas descritas na Tabela 3, conforme CLSI, 2014.

Os resultados de resistência a antimicrobianos obtidos no presente estudo (Tabelas 5) são coerentes com dados similares obtidos em isolados de *Y. enterocolitica*, que são considerados naturalmente resistentes a ampicilina (LEAL et al., 1997; FALCÃO; FALCÃO, 2006b; NSCFs, 2007; CLSI, 2014) e sensíveis a ciprofloxacina, especificamente os isolados do sorotipo O:3 (NCSF, 2007). Outro estudo demonstrou a resistência de *Y. enterocolitica* à eritromicina e tetraciclina, e

sensibilidade a ciprofloxacina, gentamicina, cloranfenicol e ácido nalidíxico, sendo a ciprofloxacina considerado o antimicrobiano mais eficiente contra este patógeno (SIMONOVA et al., 2008). Baumgartner et al. (2007) testaram 386 isolados de *Y. enterocolitica* provenientes de amostras de pacientes humanos, carne e fezes de suínos e encontraram altos níveis de resistência a ampicilina, cefalotina e amoxicilina-clavulanato e sensibilidade a neomicina, ciprofloxacina, gentamicina, canamicina e polimixina. Menos de 10% dos isolados clínicos e de carne suína foram resistentes a estreptomicina, sulfonamidas, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol, enquanto os isolados de fezes foram sensíveis a todos esses agentes antimicrobianos. Os 56 isolados de tonsilas suínas e fezes avaliados por Okwori et al. (2008) apresentaram 100% de susceptibilidade a ciprofloxacina, ofloxacina e gentamicina e foram resistentes a ampicilina e eritromicina.

Considerando os resultados apresentados na Tabela 5, é possível identificar a ocorrência de resistência múltipla a diferentes classes de antimicrobianos pelos isolados de *Y. enterocolitica* avaliados. A Tabela 6 apresenta os três perfis de múltipla resistência a classes de antimicrobianos que os isolados apresentaram. Adicionalmente, todos os isolados de *Y. enterocolitica* apresentaram resultados positivos para os três genes avaliados que conferem características de resistência a múltiplas drogas (*emrD*, *marC* e *yfhD*, Figura 5); entretanto, poucos estudos relacionados a essa característica foram identificados na literatura, sendo restritos a β -lactamases (SHARMA et al., 2006; SINGHAL et al., 2014; LAAKSONEN et al., 2017). A análise do sequenciamento dos produtos das PCR's com os *primers emrD*, *marC* e *yfhD* no programa MEGA7 teve identidade acima de 95% com diversas cepas de *Y. enterocolitica* depositadas no banco de dados do site do NCBI.

Tabela 6. Frequências de isolados de *Y. enterocolitica* obtidos na cadeia produtiva de carne suína com múltiplos padrões de resistência a antimicrobianos

Classes de ATB	Padrão de resistência a antimicrobianos (classes) ¹	n
11	AMI-ANS-CAR-SUL-GLY-NIT-PEN-FEN-PLE-QUI-TET	2
10	AMI-ANS-CAR-SUL-GLY-NIT-PEN-FEN-PLE-QUI	1
9	AMI-CAR-SUL-GLY-NIT-PEN-FEN-PLE-QUI	13

¹ AMI: aminoglicosídeos; ANS: ansamicinas; CAR: carbapenemas; SUL: sulfonamidas; GLY: glicopeptídeos; NIT: nitroimidazóis; PEN: β -lactâmicos; FEN: fenicóis; PLE: pleuromutilinas; QUI: quinolonas; TET: tetraciclina

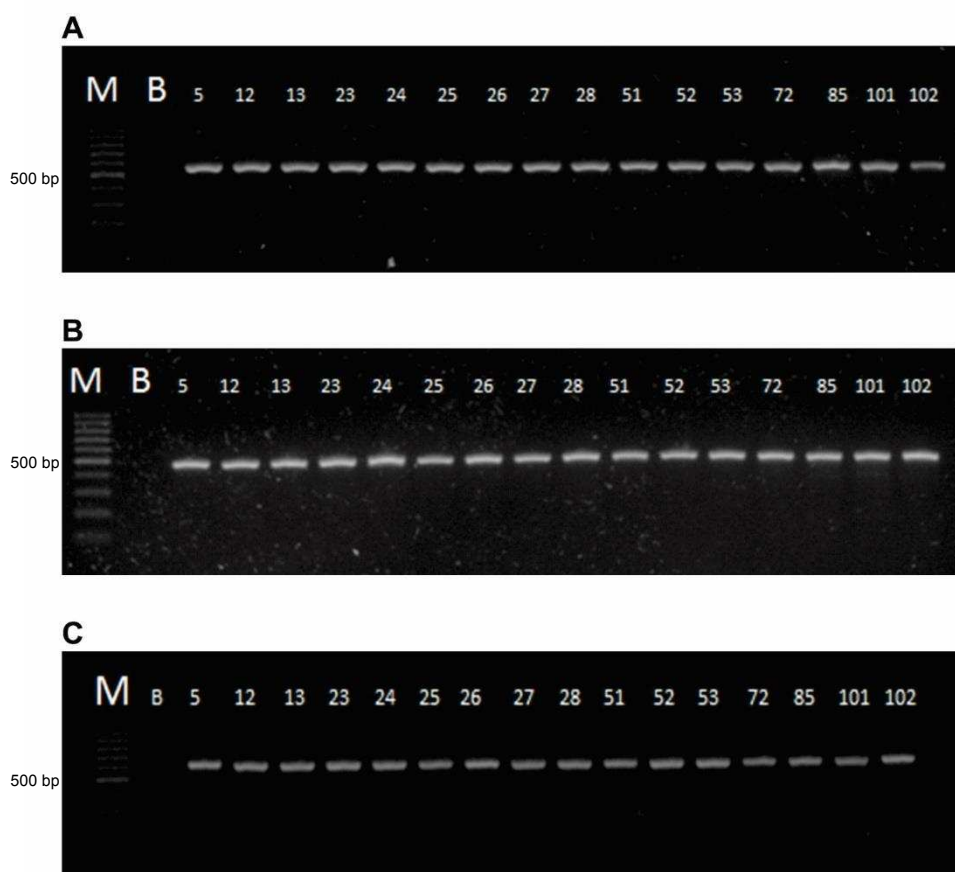


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para identificação de isolados de *Y. enterocolitica*. Em todas as figuras: M: 100 bp DNA ladder, B: branco. Cada número da sequência corresponde ao código do isolado. A: *emrD*, 551 bp, B: *marC*, 460 bp, C: *yfhD*, 632 bp.

Os padrões de resistência a antimicrobianos por *Y. enterocolitica* são considerados sorotipos-específicos (FALCÃO; FALCÃO, 2006b), mas clinicamente é recomendada na literatura, a administração de cefalosporinas de amplo espectro, em combinação com aminoglicosídeos, e isso resulta em cura na maioria dos casos de pacientes com infecções sistêmicas, incluindo septicemia (BOTTONI, 1997). Embora o presente estudo não tenha avaliado profundamente a questão de interação entre drogas e a realização de testes *in vivo*, podemos inferir que a ciprofloxacina (quinolona) também pode ser considerada um agente terapêutico de relevância no tratamento de complicações em pacientes com yersiniose.

A alta frequência de resistência a antimicrobianos (Tabela 5), além da ocorrência de resistência múltipla a diferentes classes de antimicrobianos (Tabela 6), podem estar associadas a ampla utilização dessas substâncias nas diferentes etapas de criação de suínos. Landers et al. (2012) descreveram a utilização dos antimicrobianos nos animais e seus alimentos, e qual é o impacto dessa prática

sobre a saúde humana. A utilização de diversos antimicrobianos em diferentes fases de criação dos animais, incluindo os suínos, determina uma pressão seletiva sobre os micro-organismos naturalmente presentes nesses ambientes, incluindo patógenos (BOECKEL et al., 2015). Há evidências de que o uso de antimicrobianos na produção animal contribui para seleção de patógenos mais resistentes que podem causar doenças nos humanos, pois bactérias isoladas nos animais, no ambiente de criação e processamento, estão presentes também nas infecções clínicas e subclínicas em seres humanos (LANDERS et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi possível isolar *Y. enterocolitica* em carcaças de suínos, linfonodos mesentéricos e tonsilas palatinas, indicando esses pontos como importantes fontes de contaminação pelo patógeno na cadeia produtiva de carne suína. Dessa forma, o suíno pode ser considerado como potencial veiculador de cepas de *Y. enterocolitica*, principalmente por meio das tonsilas palatinas. Apesar de não ter sido isolado *Y. enterocolitica* nas amostras ambientais, a importância de boas práticas nas etapas de criação, abate e processamento devem ser ressaltadas como alternativas para evitar a contaminação cruzada, principalmente na etapas de manipulação da cavidade oral da carcaça. Os isolados desse estudo apresentaram alto grau de identidade genética e alta frequência de genes relacionados a patogenicidade, demonstrando os seus potenciais riscos aos seres humanos.

Adicionalmente, os isolados apresentaram resistência a diferentes antimicrobianos, múltipla resistência a diferentes classes de antimicrobianos e presença de genes de resistência. Todas essas informações podem ser utilizadas como base para conhecimento e adoção de medidas de controle, a fim de melhorar o processo produtivo, garantir a qualidade e inocuidade da carne suína e tratamento da doença.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES e FAPEMIG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. L.; SILVEIRA, P. R. S.; LIMA, G. J. M. M.; et al. Boas práticas de produção de suínos. **Circular Técnica - Embrapa Suínos e Aves**, v. 50, p. 1–60, 2006.

ANDERSEN, J. K. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 193–202, 1988.

BAE, W.; KAYA, K. N.; HANCOCK, D. D.; et al. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 169–174, 2005.

BAUMGARTNER, A.; KÜFFER, M.; SUTER, D.; JEMMI, T.; ROHNER, P. Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from human patients, pigs and retail pork in Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 110–114, 2007.

BHADURI, S.; COTTRELL, B.; PICKARD, A. R. Use of a single procedure for selective enrichment, isolation, and identification of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* of various serotypes from pork samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1657–1660, 1997.

BHAGAT, N. & VIRDI, J. S. Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, n. 2, p. 177–183, 2007.

BHAGAT, N. & VIRDI, J. S. The enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 25–39, 2011.

BOECKEL, T. P. VAN; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 16, p. 1–6, 2015.

BOLTON, D. J.; IVORY, C.; MCDOWELL, D. Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in pork slaughter plant scald tank water. **Meat Science**, v. 95, n. 3, p. 668–671, 2013.

BONARDI, S.; BASSI, L.; BRINDANI, F.; et al. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2–3, p. 248–257, 2013.

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.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRICKX, M.; RIJPENS, N.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. *Salmonella* on pig carcasses : positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95 p. 891–903, 2003.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 257–276, 1997

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an enduring human pathogen. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular 175, de 16 de maio de 2005. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Brasília, 2005a.

BURNENS, A. P.; FREY, A.; NICOLET, J. Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoeal disease. **Epidemiology and Infection**, v. 116, n. 1, p. 27–34, 1996.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2014.

CORNELIS, G. R. The *Yersinia* YSC – YOP —TYPE III Weaponry. **Nature**, v. 3, p. 742–752, 2002.

DAMME, I. VAN; HABIB, I.; ZUTTER, L. DE. *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: Enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 158–161, 2010.

DAMME, I. VAN; BERKVENS, D.; BOTTELDOORN, N.; et al. Evaluation of the ISO 10273:2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 170–175, 2013.

DAMME, I. VAN; BERKVENS, D.; VANANTWERPEN, G.; et al. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with enteropathogenic *Yersinia* spp.: Distribution, quantification and identification of risk factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 33–40, 2015.

DRUMMOND, N.; MURPHY, B. P.; RINGWOOD, T.; PRENTICE, M. B.; BUCKLEY, J. F. *Yersinia enterocolitica* : A brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges and the pork production chain. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 9, n. 3, 2012.

FÀBREGA, A. & VILA, J. *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 1, p. 24–32, 2012.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P.; MALASPINA, A. C.; BROCCHI, M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1539–1548, 2006a.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 9–19, 2006b.

FONDREVEZ, M.; LABBÉ, A.; HOUARDAYER, E.; et al. A simplified method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pig tonsils. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 244–249, 2010.

FONDREVEZ, M. LABBÉ, A., HOUDAYER, C. Genetic characterization of *Yersinia enterocolitica* collected from tonsils of slaughtered pigs. **SafePork**, 2011.

FONDREVEZ, M.; MINVIELLE, B.; LABBÉ, A.; et al. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 56–62, 2014.

FRAZÃO, M. R.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* biotype 2 strains isolated in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 1058–1067, 2015.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food and environmental samples: a metodological problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 220–229, 2003.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 207–212, 2007.

GARZETTI, D.; SUSEN, R.; FRUTH, A.; et al. A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3–4, p. 275–283, 2014.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866–875, 2010.

GRANT, T.; BENNETT-WOOD, V.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1113–1120, 1998.

GUPTA, V.; GULATI, P.; BHAGAT, N.; DHAR, M. S.; VIRDI, J. S. Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 641–650, 2015.

HEUSIPP, G.; YOUNG, G. M.; MILLER, V. L. HreP, an *in vivo*-expressed protease of *Yersinia enterocolitica*, is a new member of the family of subtilisin/kexin-like proteases. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3556–3563, 2001.

HUANG, X.; YOSHINO, K.; NAKAO, H.; TAKEDA, T. Nucleotide sequence of a gene encoding the novel *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin that includes a pro-region-like sequence in its mature toxin molecule. **Microbial Pathogenesis**, v. 22, n. 2, p. 89–97, 1997.

HURST, M. R. H.; BECHER, S. A.; YOUNG, S. D.; NELSON, T. L.; GLARE, T. R. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 844–849, 2011.

IRIARTE, M.; VANOOTEGHEM, J.; DELOR, I.; et al. The *Myf* fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 507–520, 1993.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria*, *Salmonella*, and *Yersinia* species isolates in ducks and geese. **Poultry Science Association**, v. 93, p. 1023–1030, 2014.

JAMALI, H.; ISMAIL, S. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Yersinia* species and *Yersinia enterocolitica* isolated from raw milk in farm bulk tanks. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 798–803, 2015.

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.

KIM, Y. S.; LEE, S. H.; KIM, S. H.; JOO, Y.; BAHK, G. J. Investigation of the experience of foodborne illness and estimation of the incidence of foodborne disease in South Korea. **Food Control**, v. 47, p. 226–230, 2015.

KOT, B. TRAFNY, E.A. The application of PCR to the identification of selected virulence markers of *Yersinia* genus. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.7, p. 27–31, 2004.

LAAKSONEN, S.; OKSANEN, A.; JULMI, J.; et al. Presence of foodborne pathogens, extended-spectrum β -lactamase -producing Enterobacteriaceae, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in slaughtered reindeer in northern Finland and Norway. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 59, n. 1, p. 2, 2017.

LANDERS, T. F. A review of antibiotic use in food animals : perspective, policy and potential. **Public Health Reports**, v. 127, p. 4 - 22, 2012.

LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A . M . P. Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 19–24, 1997.

LIANG, J.; DUAN, R.; XIA, S.; et al. Ecology and geographic distribution of *Yersinia enterocolitica* among livestock and wildlife in China. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 1–2, p. 125–131, 2015.

LUCERO ESTRADA, C. S. M.; VELÁZQUEZ, L. D. C.; ESCUDERO, M. E.; et al. Pulsed field, PCR ribotyping and multiplex PCR analysis of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from meat food in San Luis Argentina. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 21–28, 2011.

MILLER, V. L.; FARMER, J. J.; HILL, W. E.; FALKOW, S. The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 1, p. 121–131, 1989.

NESBAKKEN, T. Chapter 10 - *Yersinia*, p. 187-198. In: GLENN, J.M. & MORRIS, P. (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, 2013.

NSCFS, Norwegian Scientific Committee for Food Safety. A preliminary risk assessment of *Yersinia enterocolitica* in the food chain: some aspects related to human health in Norway. 2007

OKWORI, A.; AGINA, S.; OLABODE, A.; et al. Profiles of *Yersinia enterocolitica* isolated from apparently healthy pigs In Jos, Nigeria, **The Internet Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2008.

PAIXÃO, R.; MORENO, L. Z.; SENA DE GOBBI, D. D.; et al. Characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and markets. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

PETSIOS, S.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 55–72, 2016.

PHAM, J. N.; BELL, S. M.; MARTIN, L.; CARNIEL, E. The β -lactamases and β -lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 951–957, 2000.

PLATT-SAMORAJ, A.; UGORSKI, M.; SZWEDA, W.; et al. Analysis of the presence of *ail*, *ystA* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from aborting sows and aborted fetuses. **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, n. 7, p. 341–346, 2006.

PLATT-SAMORAJ, A.; SYCZYŁO, K.; BANCERZ-KISIEL, A.; et al. *Yersinia enterocolitica* strains isolated from beavers (*Castor fiber*). **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 2, p. 449–451, 2015.

POLJAK, Z.; DEWEY, C. E.; MARTIN, S. W.; et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* shedding and bio-serotype distribution in Ontario finisher pig herds in 2001, 2002, and 2004. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 2–3, p. 110–120, 2010.

PRESTON, M. A.; BROWN, S.; BORCZYK, A. A.; et al. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolated in Canada from 1972 to 1990. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 9, p. 2121–2124, 1994.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59–67, 2006.

RUSAK, L. A.; MOURA FALAVINA DOS REIS, C.; BARBOSA, A. V.; et al. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 12, p. 1533–1540, 2014.

SCHNEEBERGER, M.; BRODARD, I.; OVERESCH, G. Virulence-associated gene pattern of porcine and human *Yersinia enterocolitica* biotype 4 isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 198, p. 70–74, 2015.

SHARMA, S.; MITTAL, S.; MALLIK, S.; VIRDI, J. S. Molecular characterization of β -lactamase genes *blaA* and *blaB* of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. **FEMS Microbiology Letters**, v. 257, n. 2, p. 319–327, 2006.

SCHUBERT, S.; FISCHER, D.; HEESEMANN, J. Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6387–6395, 1999.

SILVA, N. DA; TANIWAKI, M. H.; CHRISTINA, V.; et al. **Examination Methods of Food and Water**. 2013. 456p.

SIMONOVA, J.; BORILOVA, G.; STEINHAUSEROVA, I. V. A. Occurrence of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* in pigs and their antimicrobial resistance. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, p. 39–43, 2008.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; VIRDI, J. S. Molecular analysis of β -lactamase genes to understand their differential expression in strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5270, 2014.

TENNANT, S. M.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 127–137, 2003.

THOERNER, P.; KINGOMBE, C. I. BIN; WASSENAAR, T. M.; et al. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1810–6, 2003.

VILAR, M. J.; VIRTANEN, S.; LAUKKANEN-NINIOS, R.; KORKEALA, H. Bayesian modelling to identify the risk factors for *Yersinia enterocolitica* contamination of pork carcasses and pluck sets in slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 53–57, 2015.

VIRTANEN, S. E.; SALONEN, L. K.; LAUKKANEN, R.; HAKKINEN, M.; KORKEALA, H. Factors related to the prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on pig farms. **Epidemiology and Infection**, v. 139, p. 1–9, 2011.

VONGKAMJAN, K.; WIEDMANN, M. Starting from the bench-prevention and control of foodborne and zoonotic diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 2–3, p. 189–195, 2015.