

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Yersinia enterocolitica* E *Salmonella* spp.
NO ABATE DE SUÍNOS**

Rachel Zoccal Saba
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Yersinia enterocolitica* E *Salmonella* spp.
NO ABATE DE ABATE DE SUÍNOS**

Rachel Zoccal Saba

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RACHEL ZOCCAL SABA - nascida em Mirassol, São Paulo, em 30 de julho de 1981, é formada em Medicina Veterinária no ano de 2003, pelo Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP. Inscrita no Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo sob o número 18.397. Em março de 2004, ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária na área de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP. Concluiu o curso de Mestrado em agosto de 2006 com a dissertação intitulada “Influência da pressão e temperatura da água de lavagem na população microbiana da superfície de carcaças bovinas”. Em setembro do mesmo ano foi contratada pela empresa JBS Friboi para integrar a equipe Friboi Quality Farms e implantar programas de bem-estar animal nas unidades de abate de bovinos. Ingressou no curso de Doutorado pela mesma Universidade como bolsista da CAPES em março de 2007.

À Julia, minha filha amada,
pelos momentos de ausência
*“Somente entendemos o amor dos pais pelos filhos
quando os temos”* (autor desconhecido)

Aos meus queridos pais Rafael Saba Neto e
Celia E. Zoccal Saba por todo apoio,

Ao Alex, que faz a minha vida mais feliz
e mais completa

AGRADECIMENTOS

À DEUS, acima de tudo. A Quem agradeço diariamente por todas as bênçãos de minha vida;

Ao Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior pelos ensinamentos, compreensão e pelo apoio prestado durante todas as intercorrências vividas nessa travessia de 6 anos. A quem admiro e sou imensamente grata;

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Lemos, do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária, pelo auxílio prestado com a parte de biologia molecular;

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, Prof. Ângelo Berchieri Júnior, Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro e Profa. Dra. Angela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho pelas contribuições e correções;

À Lila e ao Diba pelo ajuda e pelo carinho durante todos esses anos de convívio;

À todos os demais professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos que me acompanharam e auxiliaram durante as coletas no frigorífico: Jaime (estagiário), Natália, Dani, Bruna, Letícia (Selvagem) e Carlos. Muito obrigada a todos vocês;

À querida amiga Juliana Rossi, que foi fundamental para a execução da parte molecular deste trabalho. Finais de semana, dia ou noite, sempre disposta a me ajudar, com boa vontade, generosidade e dedicação;

Especialmente à Bruna, tenho um sentimento de gratidão que não consigo explicar por palavras. Felizes daqueles que a encontraram ou ainda irão encontrar pelo caminho da vida. Uma pessoa especial e abençoada por Deus. Um sopro de alegria por onde passa. Muito obrigada por tudo e saiba que você é muito querida;

À todos os colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva;

À todos os funcionários do frigorífico que permitiram a coleta das amostras;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa e

À todos que, embora não nomeados, contribuíram de alguma maneira na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	iii
Lista de Figuras.....	v
Lista de Quadros.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	5
3.1.1 Histórico e caracterização.....	5
3.1.2 Importância e ocorrência.....	8
3.1.3 Marcadores de patogenicidade.....	11
3.1.4 Surtos.....	13
3.2 <i>Salmonella</i> spp.....	14
3.2.1 Histórico e caracterização.....	14
3.2.2 Importância e ocorrência.....	16
3.2.3 Surtos	23
3.3 Suscetibilidade de <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Salmonella</i> spp. a antimicrobianos.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Caracterização da indústria e das amostras estudadas.....	27
4.2 Pesquisa de <i>Yersinia enterocolitica</i> pelo método ISO 10273.....	30
4.2.1 Enriquecimento seletivo.....	31
4.2.2 Plaqueamento e identificação.....	31
4.2.3 Seleção das colônias para identificação.....	32
4.2.4 Identificação presuntivo.....	32

4.2.5 Confirmação bioquímica da espécie <i>Yersinia enterocolitica</i> e testes presuntivos de patogenicidade.....	33
4.2.6 Controle positivo.....	33
4.3 Pesquisa de <i>Yersinia enterocolitica</i> pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
4.3.1 Enriquecimento Seletivo.....	35
4.3.2 Extração do DNA genômico por fervura	35
4.3.3 Amplificação.....	36
4.4 Pesquisa de bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	37
4.4.1 Pré-enriquecimento.....	37
4.4.2 Enriquecimento seletivo.....	37
4.4.3 Plaqueamento seletivo.....	37
4.4.4 Identificação presuntiva.....	37
4.4.5 Confirmação sorológica.....	37
4.4.6 Sorotipagem.....	38
4.5 Testes de sensibilidade a antimicrobianos.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÕES.....	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
8 REFERÊNCIAS.....	60

Lista de Tabelas

Tabela	Página
1 Número e porcentagem de amostras de língua, tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos e de suabes de carcaça e de reto de suínos abatidos e de superfície de lâminas de faca utilizadas na inspeção, positivas para <i>Yersinia enterocolitica</i> por meio da técnica microbiológica convencional de isolamento.....	40
2 Número e porcentagem de amostras de língua, tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos e de suabes de carcaça e de reto de suínos abatidos e de superfície de lâminas de faca utilizadas na inspeção, positivas para <i>Yersinia enterocolitica</i> por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	45
3 Número e porcentagem de amostras de língua, tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos e de suabes de carcaça e de reto de suínos abatidos e de superfície de lâminas de faca utilizadas na inspeção, positivas para <i>Salmonella</i> spp. por meio da técnica microbiológica convencional de isolamento.....	48
4 Número e porcentagem de resistência e sensibilidade a 13 antimicrobianos apresentados pelos isolados de <i>Yersinia enterocolitica</i> em amostras colhidas em matadouro-frigorífico de suínos.....	51

5	Perfil de resistência a antimicrobianos de <i>Yersinia enterocolitica</i> isoladas de amostras colhidas em matadouro-frigorífico de suínos.....	53
6	Número e porcentagem de resistência e sensibilidade a 17 antimicrobianos apresentados pelos isolados de <i>Salmonella</i> Anatum em amostras colhidas em matadouro-frigorífico de suínos.....	54
7	Perfil de resistência a antimicrobianos de <i>Salmonella</i> Anatum isoladas de amostras colhidas em matadouro-frigorífico de suínos.....	55

Lista de Figuras

Figura	Página
1 Pontos em que foram coletadas as amostras de carcaças de suínos por suabe.....	29
2 Produto da PCR em gel de eletroforese de amostras de suínos coletadas em abatedouro. A amplificação de um fragmento de DNA de 330 pares de base a partir do oligonucleotídeo iniciador <i>16SrRNA</i> , específico para a espécie <i>Y. enterocolitica</i> caracteriza as amostras positivas.....	46

Lista de Quadros

Quadro	Página
1 Fluxograma de abate de suínos no matadouro-frigorífico onde as amostras foram coletadas.....	28
2 Diagrama da técnica microbiológica convencional para a pesquisa de <i>Yersinia enterocolitica</i> pelo método ISO 10273.....	30
3 Interpretação dos testes bioquímicos e de patogenicidade para <i>Yersinia enterocolitica</i>	34

OCORRÊNCIA DE *Yersinia enterocolitica* E *Salmonella* spp. NO ABATE DE SUÍNOS

RESUMO – Tendo em vista a importância da *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp. como agentes zoonóticos e a carne suína a veiculação, realizou-se o presente estudo objetivando determinar a ocorrência desses agentes na linha de abate de suínos. Para tal, foram analisadas 175 amostras compostas de línguas (L), tonsilas (T), linfonodos submandibulares (LS), linfonodos mesentéricos (LM), carcaças (SC), conteúdo retal (SR) de suínos e de facas (SF) utilizadas pela inspeção. Para a pesquisa de *Salmonella* spp. utilizou-se a técnica convencional de isolamento e para a de *Yersinia enterocolitica*, além desta técnica foi empregada a da reação em cadeia da polimerase, com um par de primer específico para a determinação da espécie e outro para a detecção do gene *ail*. *Yersinia enterocolitica* foi isolada em 8% das amostras por meio de técnica convencional em L, T, LS, LM e em SF e foi detectada em 4,6% por PCR em L, LM, SC, SR e SF. *Salmonella* Anatum foi isolada apenas em amostras de língua, correspondendo a 1,2% do total de amostras. O antibiograma revelou 100% dos isolados de *Y. enterocolitica* resistentes à ampicilina, amoxicilina+clavulanato, cefalotina e imipenem, em menor porcentagem à cefuroxima (92,9%), ceftazidima (85,7%), sulfametoxazol+trimetropim (78,6%), ciprofloxacina (78,6%), amicacina (71,4%) e também gentamicina (71,4%). Todos os isolados de *Salmonella* Anatum foram resistentes ao meropenem, à oxitetraciclina e à eritromicina. Os resultados destacam a região da cabeça do suíno, especialmente língua, tonsilas e linfonodos, como potenciais disseminadores, principalmente de *Yersinia enterocolitica*, aos humanos. Além da adoção de práticas de higiene durante as operações de abate, algumas adaptações nos procedimentos de inspeção poderiam contribuir para minimizar o risco de disseminação desses patógenos. Os resultados obtidos no presente estudo trazem importante contribuição para a saúde pública.

Palavras-chave: segurança alimentar, carcaça, *Salmonella*, abate suínos, PCR, suínos.

OCCURRENCE OF *Yersinia enterocolitica* AND *Salmonella* spp. ON PORK SLAUGHTER

ABSTRACT – Considering the importance of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* spp. as zoonotic pathogens and to the pork their vehiculation, the purpose of the present study was to asses the occurrence of these pathogens on pork slaughter chain. At the swine abattoir, a hundred seventy five samples of tongues (TG), tonsils (TS), submandibular lymph nodes (SL), mesenteric lymph nodes (ML), carcasses (CS) rectal content (RS) and inspection knives (IK) were collected. Traditional isolation method was used to investigate *Salmonella* spp. and for *Yersinia enterocolitica* investigation, besides this method was also used a polymerase chain reaction (PCR) method, with specific primer for specie detection and another for *ail* gene detection. By traditional method, *Yersinia enterocolitica* was isolated in 8% of the samples in TG, TS, SL, ML and IK and by PCR was detected in 4.6% in TG, ML, CS, RS and IK. *Salmonella* Anatum was isolated from tongues only, in 1.2% of total samples. The antibiogram showed 100% of *Yersinia enterocolitica* strains resistant to ampicillin, amoxicillin + clavulanate, cephalothin and imipenem, cefuroxime in lower percentage (92.9%), ceftazidime (85.7%), sulfamethoxazole + trimethoprim (78.6%), ciprofloxacin (78.6%), amikacin (71.4%) and gentamicin (71.4%). All *Salmonella* Anatum strains were resistant to meropenem, oxytetracycline and erythromycin. The results showed the head region, especially the tongue, tonsils and lymph nodes might represent contamination risks for *Yersinia enterocolitica*. Besides the hygienic practices during slaughter process, changes in inspection procedures could reduce the risk of spread these pathogens. The results of this study represent an important contribution for public health.

Keywords: food safety, carcass, *Salmonella*, pork slaughter, PCR, swines.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos pode causar diversas doenças de origem alimentar, gerando prejuízos econômicos individuais e coletivos, com medicamentos e até hospitalizações. As indústrias perdem com “recalls” e com a redução da vida de prateleira dos produtos contaminados, além da perda da confiabilidade dos consumidores na marca e da criação de barreiras comerciais.

Yersinia enterocolitica é um agente zoonótico comumente associado à gastroenterite bacteriana aguda e sua veiculação a alimentos produzidos com carne suína ou a alimentos contaminados por fezes de suínos portadores de *Y. enterocolitica* patogênica.

O procedimento de abate dos animais inclui etapas que possibilitam a contaminação das carcaças por bactérias patogênicas, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., entre outras.

As principais etapas do abate que possuem risco de contaminação por *Y. enterocolitica* são: a retirada dos intestinos, a excisão da língua, faringe e particularmente as tonsilas e procedimentos de inspeção *post-mortem* que envolvem a incisão do linfonodo mandibular, assim como a desossa da cabeça.

Ao contrário da maioria das bactérias enteropatogênicas, *Y. enterocolitica* tem capacidade de se multiplicar em alimentos refrigerados, o que representa uma especial importância para a segurança alimentar.

Assim como *Yersinia* sp. patogênica, as salmonelas também são bactérias patogênicas envolvidas em surtos de doenças de origem alimentar, sendo, inclusive, as maiores causadoras deste tipo de doença em todo o mundo.

Por serem, também, bactérias de origem intestinal, as salmonelas podem ser encontradas em carcaças de animais recém-abatidos contaminadas por material fecal, inclusive de suínos.

Embora as salmonelas possam causar a doença nos suínos, na maioria dos casos, os animais infectados não apresentam qualquer sinal clínico da doença, tornando-se um risco potencial nos abatedouros.

A importância destas bactérias em carne suína ou em produtos obtidos a partir da carne suína se dá pelo elevado consumo deste tipo de alimento em todo o mundo.

Tendo em vista o exposto e considerando: a importância da suinocultura na economia brasileira, já que o país ocupa o quarto lugar dentre os produtores mundiais, com a perspectiva de melhorar esta posição em um futuro próximo; o fato de a carne suína ser a proteína de origem animal mais consumida no mundo, com crescente aumento inclusive no Brasil; que a União Européia (UE) é um dos maiores mercados para a carne suína brasileira e que grande parte dos demais países importadores dessa carne seguem medidas sanitárias semelhantes às empregadas pela UE; que o suíno é tido como um animal de açougue possivelmente portador de *Yersinia enterocolitica* patogênica, especialmente no seu sistema digestório; que a carne suína é tida como importante veículo de transmissão de *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp. em todo o mundo; a falta de informações acerca da ocorrência de *Yersinia enterocolitica* na linha de abate suíno, especialmente em nosso meio; as escassas informações sobre a presença de *Salmonella* spp. na linha de abate suíno; o papel das fases do abate e dos procedimentos de inspeção, particularmente a incisão de linfonodos e órgãos, sobre a disseminação da *Yersinia* sp. no ambiente de abate e possibilidades de contaminação cruzada, idealizou-se o presente estudo.

2 OBJETIVOS

- **Geral**

- o Verificar a ocorrência de *Yersinia enterocolitica* na linha de abate de suínos por meio de técnica microbiológica convencional e de reação em cadeia da polimerase (PCR) e *Salmonella* spp. por meio de técnica microbiológica convencional.

- **Específicos**

- o Isolar *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp. em carcaças suínas, línguas, tonsilas, linfonodos submandibulares e

mesentéricos e em conteúdo intestinal, imediatamente após o abate;

- o Verificar a possível contaminação, por *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp., em facas utilizadas nos procedimentos de inspeção;
- o Avaliar a suscetibilidade dos isolados de *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp. por meio de técnica microbiológica convencional frente a antimicrobianos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A carne suína é a proteína de origem animal mais consumida no mundo, com uma média de 15,9 kg por pessoa ao ano, em comparação com a de aves, com um consumo médio de 12,6 kg por pessoa e a de bovinos, 9,4 kg por pessoa. Em alguns países da Europa o consumo de carne suína aproxima-se dos 70 kg por pessoa ao ano, enquanto no Brasil o consumo médio é de 12,5 kg por pessoa ao ano (SILVEIRA & CANAL, 2007).

De acordo com dados do IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o Brasil possui um rebanho de mais de 35 milhões de suínos (AGENCIA BRASIL, 2008). Quarto maior produtor de carne suína do mundo, as exportações foram de 530 mil toneladas em 2008 e de 606 mil toneladas em 2007 (ABIEPCS, 2009). De janeiro a julho de 2010, foram exportadas 270 mil toneladas de carne suína, com principal destino a Rússia, principal importadora da carne suína brasileira destinada ao mercado externo, seguida por Hong Kong, Ucrânia e Argentina, além de outros mercados importadores (ABIEPCS, 2010).

Segundo as perspectivas da FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – de 2000 a 2030 o mundo terá que aumentar a produção de carne em 20% para atender a crescente demanda mundial (AGENCIA BRASIL, 2008).

De acordo com estudos feitos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), haverá uma expressiva mudança de posição do Brasil no mercado mundial. A relação entre as vendas externas brasileiras e o comércio mundial mostra que, em 2018/2019, as exportações de carne bovina

representarão 60,6% do comércio mundial, as de carne de frango, 89,7%, e as de carne suína, 21%. Os principais mercados serão a China, Hong Kong e Egito (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2008).

A carne suína é composta quimicamente por 75% de água, 22,8% de proteína, 1,2% de gordura, 1,0% de minerais e um conteúdo energético de 112 Kcal/100g. Também é uma excelente fonte de vitaminas hidrossolúveis do grupo B, como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6) e cobalamina (B12), além de zinco, potássio, ferro e magnésio. As vitaminas lipossolúveis A e D encontram-se em quantidades importantes somente nas vísceras, principalmente no fígado (ROÇA, 2008).

A epidemiologia das doenças de origem alimentar vem sofrendo mudanças ao longo dos anos. De acordo com TAUXE (1997), do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), vários microrganismos patogênicos, incluindo *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp. e *Yersinia enterocolitica*, tem como reservatório animais de açougue saudáveis, a partir dos quais se espalham para uma variedade crescente de alimentos. Estes patógenos causam milhões de casos esporádicos de doenças e complicações crônicas, assim como surtos cada vez maiores.

Segundo BONARDI et al. (2003), *Salmonella* spp. e *Y. enterocolitica* são importantes agentes causadores de doenças de origem alimentar e já foram muitas vezes isoladas de carne suína fresca e de produtos elaborados a partir de carne suína.

A presença destes microrganismos patogênicos na carne fresca se deve principalmente aos procedimentos de abate, que não incluem uma etapa que assegure a total eliminação de bactérias da carcaça (APHA, 2001).

O abate de suínos é um procedimento com várias oportunidades para a contaminação da carcaça por *Y. enterocolitica*, e não há nenhuma etapa que elimine totalmente os perigos (BORCH et al., 1996). *Y. enterocolitica* é um importante patógeno humano enteroinvasivo com distribuição global. O aumento no número de casos isolados de yersiniose nas duas últimas décadas a apontam como um potencial patógeno humano emergente (WANNET et al., 2001).

Durante o processo de abate do suíno pode-se relacionar as fontes de contaminação com o próprio animal, como fezes e faringe e também com o

ambiente do abatedouro. Bactérias zoonóticas como *Salmonella* spp. e *Y. enterocolitica* são disseminadas pela superfície das carcaças principalmente pelo animal portador durante a etapa de evisceração e, desta maneira, as boas práticas de higiene e a limpeza dos equipamentos no abatedouro podem ter uma profunda influência no nível de contaminação das carcaças (BONARDI et al., 2003).

3.1 *Yersinia enterocolitica*

3.1.1 Histórico e caracterização

Y. enterocolitica foi incluída na família *Enterobacteriaceae* em 1972 pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana. O nome *Yersinia* foi dado em homenagem ao bacteriologista francês A. J. Yersin, que a isolou pela primeira vez em 1894 (FALCÃO, 1976).

Nos Estados Unidos em 1934, McIver & Pike a descreveram com o nome de *Flavobacterium pseudomallei*, um cocobacilo isolado de abscesso facial de um trabalhador rural de 53 anos. Em 1939, no Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque, Schleifstein e Coleman voltaram a estudar esta bactéria, que foi isolada de pacientes que apresentaram principalmente enterocolite, mas que se diferenciava bioquimicamente daquela bactéria conhecida e em 1943 propuseram o nome de *Bacterium enterocoliticum*. Posteriormente, baseado em reações bioquímicas, descobriu-se que a bactéria isolada naquela ocasião corresponde ao sorogrupo O:8 de *Y. enterocolitica*, ou seja, microrganismos classificados anteriormente como *Bacterium enterocolitum* não identificado ou *Pasteurella pseudotuberculosis* atípica, foram posteriormente classificados como *Y. enterocolitica* (FALCÃO, 1976; BOTTONE, 1999).

Com exceção de alguns casos esporádicos, somente após 30 anos esta bactéria voltou a ser reportada, em 1968, quando uma professora de 40 anos desenvolveu bacteremia, meningite, panoftalmite com consequente perda da visão devido a *Y. enterocolitica* O:8 (BOTTONE, 1999).

Na década de 60 numerosas infecções humanas por *Y. enterocolitica* apareceram em alguns países europeus como França, Bélgica, Holanda, Alemanha e Suíça e posteriormente na Suécia, Finlândia, Hungria, entre

outros. Nos anos seguintes, foi identificada fora da Europa, como nos Estados Unidos em 1965, no Canadá e África do Sul em 1966, no Brasil em 1969, no Japão em 1972, no Irã em 1976, entre outros (MOLLARET, 1995).

No Brasil, este primeiro isolamento de *Y. enterocolitica* citado, não foi em humanos, mas em saguis de um zoológico em São Paulo. Somente em 1976 este microrganismo foi associado a doença em humanos, quando foi isolada de um paciente com pseudoapendicite em Araraquara, São Paulo (FALCÃO et al., 2008).

No período compreendido entre 1960 e 1965, criações de chinchilas em fazendas da Alemanha e Dinamarca foram dizimadas por um grande surto. Concomitantemente, na França, Suíça e Inglaterra, ocorreram infecções em coelhos. Posteriormente, dados epidemiológicos mostraram que a infecção ocorria em roedores, na maioria das vezes, na forma subclínica e em suínos e bovinos na forma clínica, sendo os suínos considerados o principal reservatório dessa bactéria (MOLLARET, 1995; McNALLY et al., 2004; NOWAK et al., 2006; TEODORO et al., 2004; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; JOURDAN et al., 2009).

Y. enterocolitica e “*Y. enterocolitica*-like” constituem um grupo bastante heterogêneo de bactérias que incluem patógenos bem estabelecidos e uma gama de estirpes ambientais que são ubíquas em ecossistema terrestre e aquático. São heterogêneas em relação a propriedades fenotípicas, genotípicas e ecológicas. Cepas de microrganismos “*Y. enterocolitica*-like” são classificadas em sete espécies separadas: *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rodhdei*, *Y. mollaretii* e *Y. bercovieri*. Nenhuma destas espécies já foi associada a doenças em seres humanos ou em animais, com exceção de alguns casos atípicos. Todas as cepas capazes de causar a doença, yersiniose, pertencem a *Y. enterocolitica*, entretanto nem todas as cepas são patogênicas (Mollaret et al., 1979, citado por KAPPERUD, 1991).

As cepas de *Y. enterocolitica* são tradicionalmente classificadas por um sistema de tipagem baseado na combinação de testes bioquímicos e sorológicos que possibilita a diferenciação em diversos bio-sorotipos (ALEKSIC & BOCKEMÜHL, 1999).

Segundo KAPPERUD (1991) e FALCÃO & FALCÃO (2006) *Y. enterocolitica* é classificada em 76 sorogrupos ou sorotipos, baseados no

antígeno O. Entretanto, as cepas associadas com doenças em seres humanos ou em animais pertencem a somente poucos sorogrupos. Destes, o O:3, O:5,27, O:8 e O:9 são os mais importantes agentes causais de enfermidades em humanos.

Existe uma correlação entre áreas geográficas e a ocorrência de alguns sorogrupos específicos. Na Europa, o sorotipo mais frequentemente isolado de yersiniose em humanos é o O:3 seguido pelo O:9. No Japão também há uma alta incidência de O:3, nos Estados Unidos, O:3 e O:9 e no Canadá, os sorogrupos mais frequentemente isolados são o O:8 seguido pelo O:5,27 (KAPPERUD, 1991). No Brasil, o sorotipo O:3 é encontrado com maior freqüência em casos clínicos humanos, geralmente associado ao biotipo 4 (FALCÃO & FALCÃO, 2006).

Suínos saudáveis podem ser portadores de cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas para os humanos, em particular cepas de O:3/biotipo 4 e O:9/biotipo 2. Cepas de O:3 tem sido frequentemente isoladas na superfície de carcaças de suínos, o que provavelmente seja resultado da disseminação dos microrganismos via fezes, conteúdo intestinal ou contaminação da cavidade oral durante os procedimentos de abate e evisceração (NESBAKKEN et al., 2003).

Segundo BOTTONE (1999) a patogenicidade das cepas está relacionada a algumas características fenotípicas evidenciadas pelos testes de pirazinamidase, hidrólise de esculina, fermentação de salicina, dependência do cálcio entre outros.

Y. enterocolitica é um bastonete Gram-negativo, anaeróbia facultativa, não-esporulada, oxidase-negativa e geralmente urease e nitrato redutase positiva e também fermenta a glicose com pouca ou nenhuma produção de gás (SILVA et al., 1997). Tem a capacidade de se multiplicar em temperaturas variando entre 0 a 44°C, sendo a ótima entre 25 a 28°C. Haja vista que o resfriamento de alimentos é um dos meios mais utilizados para a preservação de produtos perecíveis, a capacidade desta bactéria de se multiplicar a temperatura de 4°C a torna uma ameaça para a saúde pública, uma vez que pode se multiplicar até mesmo em carne embalada a vácuo mantida sob refrigeração (KAPPERUD, 1991, WANNET et al., 2001). Resiste bem ao

congelamento, podendo sobreviver por longos períodos em alimentos mantidos congelados (SCHIEMANN, 1989; BOCKEMÜHL & WONG, 2003).

3.1.2 Importância e ocorrência

Após a salmonelose e a campylobacteriose, a yersiniose humana é a doença entérica mais comum em vários países europeus (EFSA, 2006).

Em levantamento realizado por McNALLY et al. (2004) entre os anos de 1991-2000 na Grã-Bretanha obtiveram uma incidência de *Y. enterocolitica* de 26,1%, 10,7% e 6,3% em fezes de suínos, ovinos e bovinos, respectivamente, em amostras colhidas em matadouro-frigorífico. Além destes resultados, também concluíram que neste mesmo período a maioria dos casos de yersiniose no país foram causados pelo biotipo 3 sorotipo O:9, encontrada somente nas amostras de fezes dos suínos analisados.

ORTIZ-MARTÍNEZ et al. (2010), em estudo conduzido durante 6 anos para pesquisa do gênero *Yersinia* sp. em suínos, observaram que a maior prevalência em países europeus é da espécie *Y. enterocolitica*, sendo a mais alta (93%) em suínos da Espanha e a mais baixa (32%) da Itália.

Segundo SAMADI et al. (1982) a baixa incidência de infecções humanas por *Yersinia* sp. em países muçulmanos pode estar relacionada ao restrito consumo de carne suína e pode reforçar o fato deste alimento ser importante via de transmissão de *Y. enterocolitica*.

Desde 1990, quando ANDERSEN & SAUNDERS (1990) afirmaram que a transmissão direta de *Yersinia* sp. de suínos para humanos ainda não tinha sido reportada, até os dias atuais, nenhum caso deste tipo de transmissão foi constatada.

McNALLY et al. (2004) e BONARDI et al. (2007) citam que a carne suína e os produtos obtidos a partir desta carne mal cozidos são as mais importantes vias de transmissão de *Y. enterocolitica* para seres humanos. Uma vez que o suíno é o principal reservatório desta bactéria, o consumo de língua e de tonsilas é considerado um fator de risco, pelo tropismo da bactéria por estas regiões (WANNET et al., 2001).

Utilizando técnica microbiológica convencional, com enriquecimento em caldo seletivo ITC (irgasan-ticarcilina-cloreto de potássio) e isolamento em ágar

SSDC (SS-desoxicolato de cálcio), BOER & NOUWS (1991) detectaram *Y. enterocolitica* patogênica em 42% das amostras de tonsilas, 20% das amostras de língua, 17% de suabe retal, 1% em carne fresca suína e em nenhuma amostra de carcaça suína.

BONARDI et al. (2003) isolaram a bactéria em 14,7% das amostras de tonsilas, em 4,0% das amostras de conteúdo intestinal e em nenhuma amostra de carcaça de suínos. Do total de isolados de *Y. enterocolitica*, 82,1% pertenciam ao biotipo 4 sorotipo O:3. Em amostras de tonsilas, JOHANNESSEN et al. (2000) obtiveram 15,2% de positividade para *Y. enterocolitica* O:3 em suínos de 5 abatedouros.

SIMONOVA et al. (2008) obtiveram maior frequência de isolamento em tonsilas (7,5%) e conteúdo retal (7,4%) e em menor frequência em língua (5,1%), superfície de pele (2,8%) e superfície de pele próxima ao reto (1,0%), sendo 88% dos isolados pertencentes ao sorotipo O:3.

NESBAKKEN et al. (2003) também citam a presença desta bactéria na cavidade oral, em particular língua e tonsilas, intestino e fezes de suínos. SHIOZAWA et al. (1991) isolou estirpes patogênicas em 85% de suabes orais de suínos recém-abatidos e saudáveis e em 63,3% de superfície de carcaças frescas. Os autores atribuem os resultados, provavelmente pela disseminação do microrganismo via fezes, conteúdos intestinais ou contaminação pela cavidade oral durante o abate (NESBAKKEN et al., 2003).

Pelo fato de que *Y. enterocolitica* coloniza a cavidade oral, língua e intestinos de suínos, se houver rompimento de vísceras e extravasamento de conteúdo intestinal durante a evisceração pode resultar em contaminação da carcaça (JOURDAN et al., 2009). De acordo com MILLER et al. (1997) o período de descanso dos animais no abatedouro inferior a 4 horas pode estar relacionado com uma maior incidência de contaminação das carcaças por enterobactérias, justamente por predispor a ruptura de vísceras na linha de abate.

Os procedimentos de inspeção *post mortem* também podem representar risco de contaminação cruzada, principalmente pela incisão do linfonodo submandibular e mesentérico, assim como a incisão acidental de estômago, íleo e ceco. Estes procedimentos podem resultar em transporte da bactéria

destas regiões citadas para outras partes da carcaça por facas e mãos dos funcionários da inspeção (NESBAKKEN et al., 2003).

De acordo com o regulamento da Comissão Europeia, a incisão dos linfonodos submaxilares é um procedimento compulsório em suínos, pela possibilidade da transferência de patógenos para a carcaça (EUROPEAN COMMISSION, 1995).

Diversos estudos indicam o suíno como a principal fonte de infecção de *Y. enterocolitica* patogênica para humanos, considerando a incidência de isolamento desta bactéria em abatedouros (MOLLARET, 1995; BORCH et al., 1996; WANNET et al., 2001; BONARDI et al., 2003; NESBAKKEN et al., 2003; McNALLY et al., 2004; NOWAK et al., 2006; TEODORO et al., 2004; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; SIMONOVA et al., 2008; JOURDAN et al., 2009). Entretanto, nos últimos anos, autores ressaltaram a importância de práticas de manejo relacionadas às fases de cria, recria ou engorda, as quais poderiam contribuir para a disseminação e infecção do suíno por *Y. enterocolitica*, uma vez que os animais que carregam o patógeno são clinicamente saudáveis e não apresentam qualquer sintomatologia (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2000; BHADURI et al., 2005).

De acordo com NOWAK et al. (2006) e GURTLER et al. (2005) a prevalência desta bactéria em suínos é variável entre fazendas e tipos de manejo adotados e não há muitos dados relacionados ao sistema de criação que poderiam contribuir para uma menor prevalência de animais portadores *Y. enterocolitica* e consequentemente, menor prevalência de carcaças contaminadas por essa bactéria.

LAUKKANEN et al. (2009) obtiveram a partir de amostras de suabe retal, positividade de 37% de *Y. enterocolitica* em fazendas de criação de suínos e, ainda, associaram uma maior prevalência de *Y. enterocolitica* patogênica à alta densidade de animais por baia, que facilitaria a disseminação da bactéria, por contato direto ou ambiental, como bebedouros automáticos com bico ou alimentos contaminados, além da presença de cama de palha. No abatedouro, a partir de amostras destes mesmos animais, o local de maior índice de isolamento de *Y. enterocolitica* foi obtido nas tonsilas.

3.1.3 Marcadores de patogenicidade

Os mecanismos de patogenicidade da *Y. enterocolitica* são complexos e envolvem vários fatores, sendo que já foram identificados vários marcadores de patogenicidade no genoma desta bactéria (LEAL et al., 1997).

De acordo com Robins-Browne (2001) citado por FALCÃO & FALCÃO (2006) para que a bactéria possa ocasionar a doença, necessita de um conjunto de fatores de virulência que são codificados tanto por genes plasmidiais como por genes cromossomais.

A sequência de eventos após a ingestão de *Y. enterocolitica* patogênica começa com a aderência e invasão das células epiteliais intestinais, preferencialmente do íleo. Para que ocorram estas primeiras etapas de infecção são necessários pelo menos dois fatores cromossômicos, chamados *ail* (*attachment invasion locus*), que codifica a proteína Ail responsável pela adesão no local de invasão e o *inv* (*chromosomal invasin gene*), que codifica uma proteína denominada invasina (Inv), responsável pela invasão propriamente dita. O gene *inv* está presente tanto em cepas virulentas como em cepas não virulentas de *Y. enterocolitica*, enquanto o gene *ail* é encontrado apenas em sorotipos patogênicos de *Y. enterocolitica* (WANNET et al., 2001).

A metodologia para a detecção de isolados de *Y. enterocolitica* patogênica e identificação da espécie baseada, respectivamente, nos genes cromossômicos *ail* e *16S rRNA* foi descrita por WANNET et al. (2001). A utilização de dois pares de oligonucleotídeos iniciadores ou também conhecidos como “primers” (par A1-A2 e par Y1-Y2) um produto de PCR de tamanhos 425 pb e 330 pb, respectivamente, permite detectar em poucas horas a presença de *Y. enterocolitica* patogênica.

Por outro lado, alguns estudos prévios discutem a possibilidade de pequenas diferenças na composição de aminoácidos do *locus ail* entre sorotipos americanos e não-americanos, o que poderia interferir no anelamento do “primer” (HARNETT et al.; 1996; GOVERDE, 1999).

Pela utilização da técnica de PCR em tempo real, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2007) detectaram o gene *ail* em 88% das amostras de tonsilas de 200 suínos analisados e em 7 amostras de carne suína fresca de 100 amostradas. Com os mesmos “primers” NAKAJIMA et al. (1992) já tinham obtido sucesso na detecção de *Yersinia enterocolitica* patogênica.

Na Estônia, Letônia e Rússia a prevalência do gene *ail* identificado a partir de tonsilas de suínos foi de 89%, 64% e 34%, respectivamente e na Rússia, 81% das amostras positivas para o gene *ail* também foram positivas para o gene *virF* (MARTÍNEZ et al., 2009).

Estudos de genética molecular demonstraram a importância do plasmídeo pYV, essencial a virulência das cepas, sendo, portanto, avirulentas as cepas que não tem esse plasmídeo. Com cerca de 70 kilobases, o pYV codifica várias proteínas, como a invasina YadA e outras denominadas Yosps (*Yersinia outer proteins*) que conferem à bactéria capacidade de resistir a resposta imune primária do hospedeiro (LEAL et al., 1997).

Segundo MILLER & FALKOW (1988) tanto a expressão do gene cromossômico como do gene plasmidial são necessárias para a patogenicidade da bactéria. Entretanto, há uma dificuldade em manter o plasmídeo durante a cultura em laboratório, o que pode aumentar as chances em se obter resultado falso-negativo. É o que pode ocorrer com os testes padronizados de detecção de *Y. enterocolitica* patogênica direcionados para sequências localizadas no gene *pYV*. Como citado anteriormente, por ser um plasmídeo, o *pYV* não é um marcador ideal para a detecção de cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* (AARTS et al., 2001).

O *virF*, outro gene de patogenicidade, tem um papel importante como regulador de transcrição de outros genes plasmidiais, assim como o papel de genes de patogenicidade cromossômicos que mediam a invasão celular e codifica a produção de uma toxina termoestável (FALCÃO & FALCÃO, 2006).

Em estudo realizado por Carniel et al. (1989) citado por LEAL et al. (1997) foi observado que cepas patogênicas de *Yersinia* sp., na ausência de ferro, sintetizavam proteínas de alto peso molecular, como a HMWP2, codificada pelo gene cromossômico *irp2*, presente apenas nas cepas patogênicas. Dessa forma, este gene é considerado um marcador de alta patogenicidade.

3.1.4 Surto

Devido a mudanças na maneira em que os alimentos são produzidos e distribuídos, um novo tipo de surto tem se evidenciado. O tradicional cenário de

ocorrência de doença de origem alimentar geralmente ocorre após um evento social, como casamento, reuniões familiares, entre outros, envolvendo um surto agudo e local, com altas doses do inóculo. Apesar de ainda ocorrer este tipo, surtos difusos e espalhados envolvendo vários países, estados e nações são identificados mais frequentemente e envolvem um cenário completamente diferente, resultado de uma contaminação em baixo nível de um alimento comercial amplamente distribuído (TAUXE, 1997).

Geralmente, a yersiniose está associada com gastroenterite, embora possa ocorrer manifestações clínicas mais severas, principalmente em crianças, como peritonite, ileíte e pseudoapendicite (WANNET et al., 2001).

Segundo McNALLY et al. (2004) e HOWARD et al. (2006) várias doenças podem ser causadas pela *Y. enterocolítica* em humanos, desde uma diarreia moderada até severas complicações, como a linfadenite mesentérica. Devido ao tropismo por tecidos linfóides e disseminação da bactéria via corrente circulatória pode ocorrer infecção generalizada, meningite, endocardite e aneurisma (WANNET et al., 2001). Apesar de raro, pode levar a óbito pacientes imunossuprimidos (McNALLY et al., 2004).

Segundo BOTTONE (1999) é comum ocorrer artropatias em pacientes como sequela da infecção. Assim como FALCÃO & FALCÃO (2006), que também citam a artrite, eritema nodoso e glomerulonefrite como sequelas imunológicas da infecção por *Y. enterocolítica*. PARDO et al. (2007) relatam um caso de linfadenite mesentérica em uma criança de 3 anos ocasionado por *Y. enterocolítica*, no Uruguai.

Segundo GRAHEK-OGDEN et al. (2007), na Noruega, a yersiniose é a terceira causa mais comum de enterite aguda, depois da campilobacteriose e da salmonelose. Por outro lado, nos Estados Unidos, segundo dados da CDC (Centers for Disease Control and Prevention), dos 7.390 surtos de doenças de origem alimentar notificados entre os anos de 1990 e 1999, 5 (<0,1%) foram causados pela *Yersinia* sp. De acordo com RAJIC (2000), no Canadá são notificados de 600 a 700 casos de yersiniose todos os anos.

Na Inglaterra, em levantamento realizado por McNALLY et al. (2004), aproximadamente 300 casos de yersiniose são reportados todos os anos pelo Communicable Disease Surveillance Center. Por outro lado, na Europa, a incidência de yersiniose é relativamente maior, podendo ser equiparada à

incidência de salmonelose em alguns países, como a Holanda, Bélgica e Alemanha.

De acordo com JONES et al. (2004) os surtos de doenças envolvendo *Yersinia* sp. são atribuídos, principalmente, à água contaminada, leite, broto de feijão e a outros alimentos contaminados por material fecal de suínos .

Em fevereiro de 2006, na Noruega, 11 pessoas foram infectadas por *Yersinia enterocolitica* O:9, sendo que todos adquiriram a infecção de forma doméstica, pelo consumo do mesmo alimento, um tipo de prato preparado com a carne de cabeça do suíno (GRAHEK-OGDEN et al., 2007).

No Estado do Tennessee, Estados Unidos, foram identificadas 12 crianças menores de um ano infectadas por *Yersinia* sp., de novembro de 2002 a janeiro de 2003, pelo consumo de um prato típico natalino preparado com os intestinos de suínos. Dos pacientes infectados, foi isolada somente a cepa O:3 (JONES et al., 2004).

Também nos Estados Unidos, ACKERS et al. (2000) descreveram um surto de yersiniose envolvendo dez pacientes com idade média de 9 anos. O consumo de leite pasteurizado foi associado com a doença, apesar de nenhuma deficiência no procedimento ou no equipamento de pasteurização ter sido detectado. Neste caso, acredita-se que a contaminação ocorreu durante o enxágue das garrafas, antes do leite pasteurizado ser engarrafado, por água contaminada com fezes de suínos, da qual isolou-se a bactéria, *Y. enterocolitica*.

3.2 *Salmonella* spp.

3.2.1 Histórico e caracterização

Em 1885, o cientista veterinário Daniel E. Salmon descobriu a primeira cepa de *Salmonella* spp. Desde então, esta bactéria tem sido isolada do trato intestinal de vertebrados, inclusive suínos e humanos (MORROW & FUNK, 2001).

De acordo com o International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2000), a *Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, sendo caracterizadas como bactérias Gram-negativas,

anaeróbias facultativas, na forma de bastonetes. As formas móveis possuem flagelos peritríquios.

O pH ótimo para multiplicação de *Salmonella* spp. varia entre 6,5 e 7,5, sendo que valores superiores a 9,5 e inferiores à 4,5 são bactericidas. Geralmente é inibida na presença de 3 a 4% de sal, sendo que a sua tolerância aumenta proporcionalmente à elevação de temperatura. A temperatura mínima em que ainda consegue se multiplicar, ainda que lentamente, é de apenas 5°C, podendo chegar a temperatura máxima de 45°C (D'AOUST et al., 2001).

A dose infectante de *Salmonella* spp. é de aproximadamente 10^6 (UFC/g ou mL) podendo variar de acordo com a virulência do sorotipo, a sensibilidade do indivíduo e o alimento veiculado (ADAMS & MOSS, 1995). De acordo com FORSYTHE (2002) a dose infectante pode variar de 20 até 10^6 células.

O Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa sobre *Salmonella* spp. da Organização Mundial da Saúde (Instituto Pasteur, Paris) relata que o gênero apresenta duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, que incluem atualmente 2.519 e 22 sorotipos, respectivamente (WHO, 2009a).

Devido à dificuldade de se classificar *Salmonella* spp. somente pelos antígenos de superfície que apresentam, outras formas de classificação tem sido propostas e empregadas. As mais importantes são a biotipagem, baseada em reações bioquímicas, a fagotipagem, baseada na sensibilidade a bacteriófagos específicos, e o perfil plasmidial, no qual o microrganismo é classificado de acordo com os plasmídios (segmentos de ácido desoxirribonucléico extracromossômico) que apresentam (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A causa mais comum de salmonelose ocorre pela ingestão de alimento contaminado pelo agente, preparado e armazenado de maneira inadequada, contribuindo para a multiplicação de *Salmonella* spp. e para o aumento da dose ingerida (MORROW & FUNK, 2001).

Os sintomas da infecção por salmonelas geralmente aparecem entre 12 a 72 horas após a infecção e incluem febre, dor abdominal, diarreia, náusea e, algumas vezes, vômito, podendo perdurar por até 7 dias. Em alguns casos, há necessidade de antibioticoterapia em função da severidade dos sintomas (WHO, 2009a). A severidade da doença em humanos depende da cepa, da

dose infectante e, principalmente, do nível de imunidade (MORROW & FUNK, 2001).

Embora seja raro, pode ocorrer artrite séptica devido à infecção por *Salmonella* spp. Em um hospital dos Estados Unidos, KOBAYASHI et al. (2009) descreveram um caso de detecção bilateral de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis no líquido sinovial do joelho de uma paciente com artrite séptica, que usualmente é causada por espécies de *Staphylococcus*.

Na criação de suínos, onde atinge principalmente animais jovens, *Salmonella* spp. pode sobreviver no ambiente por várias semanas e, mesmo em pequena quantidade, representa um risco de infecção para suínos, tanto no sistema de produção orgânico, como convencional (JENSEN et al., 2006). Uma grande variedade de sorotipos de *Salmonella* pode infectar os suínos, mas a doença clínica é freqüentemente causada pelos sorotipos Choleraesuis e Typhimurium (OLIVEIRA & CARVALHO, 2003).

A infecção subclínica é comum em suínos e carreadores assintomáticos constituem um importante fator de risco de contaminação da cadeia produtiva e contribuem para a manutenção do agente nos rebanhos (BERENDS et al., 1997; SCHWARTZ, 1999). O patógeno é excretado de forma intermitente, especialmente quando estes animais são submetidos a situações de estresse (OLIVEIRA & CARVALHO, 2003).

3.2.2 Importância e ocorrência

O gênero bacteriano *Salmonella* é o maior causador de doenças de origem alimentar em todo o mundo. A transmissão para humanos se dá pelo consumo de alimentos de origem animal, principalmente carnes, ovos e leite (WHO, 2009a).

De acordo com o Centers for Disease Control (CDC) as salmonelas são os agentes mais comuns de infecção bacteriana nos Estados Unidos. Em 2004, dos casos de doenças de origem alimentar registrados, 42% foram causados por *Salmonella* spp., 37% por *Campylobacter* sp., 15% por *Shigella* sp., 2,6% por *E. coli* O157:H7 e 3,4% por outras, como *Yersinia* sp., *Listeria* sp. e *Vibrio* sp. (USDA, 2009).

Na Europa, infecções em humanos por *Salmonella enterica* são frequentemente associada ao consumo de carne suína (FOSSE et al., 2008).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 80.000 casos de salmonelose são registrados e cerca de 580 pessoas vêm a óbito. Entretanto, devido ao fato de alguns casos não serem severos e, desta forma, não serem diagnosticados e nem relatados, estima-se que o número de infecções por salmonelas possa ser até vinte vezes maior (MEAD et al., 1999).

Segundo dados do Economic Research Service (ERS), do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, há uma estimativa de que o custo anual gasto com salmonelose de origem alimentar em humanos seja de US\$2,3 bilhões, e que, destes surtos, de 6 a 9% estejam associados ao consumo de carne suína e seus derivados (FRENZEN et al., 1999).

A carne suína, dentre outros alimentos, tem se destacado como importante veículo de transmissão de *Salmonella* spp. e tal fato tem preocupado a todos que se dedicam à produção suína (OLIVEIRA e CARVALHO, 2003).

Segundo estudos realizados por RODRIGUEZ et al. (2006), avaliando a distribuição da *Salmonella* spp. em propriedades destinadas à produção de gado de corte, gado leiteiro, frango de corte e suínos, o patógeno foi isolado numa frequência três vezes maior em granjas de suínos do que na produção de frango de corte e fazenda de gado leiteiro. Além disso, a variedade de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados das amostras coletadas nas fazendas de suínos foi maior quando comparada com as demais produções. Isto sugere que as granjas de suínos podem ser os maiores reservatórios de *Salmonella* spp. quando comparadas aos demais tipos de produção e que a carne suína pode ser uma fonte importante de salmonelose.

Apesar dos esforços para controlar patógenos em abatedouros e em indústrias que processam a carne de suínos, número significativo de carcaças e produtos feitos com carne suína ainda são contaminadas por microrganismos patogênicos. De acordo com FRENZEN et al. (1999) 9% de todas carcaças suínas produzidas nos Estados Unidos estão contaminadas por *Salmonella* spp.

As etapas de abate representam potencial risco de disseminação do agente para o ambiente do abatedouro e várias oportunidades de contaminação cruzada para as carcaças.

Após a sangria do animal, a etapa seguinte de escaldagem, realizada com água a uma temperatura de aproximadamente 62°C, pode resultar em diminuição do número de bactérias presente na pele do animal, uma vez que geralmente a pele não é retirada da carcaça. Todavia, se esta temperatura permanecer abaixo do recomendado ou se a quantidade de matéria orgânica for suficientemente alta para proteger a bactéria contra o aquecimento, o risco de sobrevivência do patógeno aumenta, transformando a escaldagem num ponto crítico devido à possibilidade de contaminação cruzada (SIMONSEN et al., 1987).

Na depilação, fase onde as cerdas são retiradas através de dedos rotatórios, pode ocorrer compressão do ânus pela ação mecânica dos dedos com consequente liberação das fezes, contaminando o equipamento (BORCH et al., 1996). O chamuscamento reduz a contaminação da superfície da carcaça, no entanto nas partes mais profundas da pele, como na base do orifício auricular ou nos folículos pilosos, o microrganismo pode sobreviver (MORGAN et al., 1987).

Embora a depilação e a escaldagem sejam consideradas etapas importantes pela possibilidade de disseminação de conteúdo fecal sobre a superfície da carcaça, a evisceração é considerada a principal etapa para a contaminação da mesma, pelo fato de possibilitar a ruptura do trato intestinal e extravasamento de conteúdo fecal. Portanto, a remoção cuidadosa do trato gastrointestinal no momento da evisceração é fator crucial para evitar a disseminação do agente (BORCH et al., 1996; DICKSON et al., 2008).

De acordo com BERENDS et al. (1997) um processo de evisceração realizado de forma inadequada pode ser responsável por até 90% do total de carcaças contaminadas por enterobactérias durante o abate.

A oclusão do reto, a fim de evitar o extravasamento de conteúdo fecal, comprovadamente pode prevenir, em média, 75% das contaminações da carcaça por *Salmonella* spp. (BERENDS et al., 1997).

O reto pode ser deslocado manualmente ou mecanicamente. A técnica usada determinará a extensão da contaminação da carcaça com material fecal. A utilização de sacos plásticos envolvendo o reto previne a disseminação de algumas bactérias patogênicas presentes nas fezes para as carcaças e,

consequentemente para os cortes, sendo extremamente importante para a produção higiênica da carne suína (BORCH et al., 1996).

Devido à necessidade de seu isolamento microbiológico, não é possível detectar carcaças contaminadas por salmonelas pela inspeção veterinária no abatedouro. Entretanto, carcaças visivelmente sujas por conteúdo intestinal podem estar contaminadas por *Salmonella* spp. (SWANENBURG et al., 2001b).

Vários estudos já demonstraram que um número substancial de suínos são portadores de *Salmonella* spp. assim que chegam ao abatedouro. E que, também, o trato intestinal e linfonodos associados estão frequentemente contaminados, representando uma fonte da bactéria, que pode se espalhar pelo abatedouro, contaminando as carcaças, o ambiente, equipamentos e utensílios (DICKSON et al., 2008).

Segundo CASTAGNA et al. (2004) a presença de suínos portadores de *Salmonella* spp. podem ser responsáveis pela contaminação de carcaças durante o processamento. Ressaltam ainda que, em diversos estudos, *Salmonella* spp. foi isolada a partir de tonsilas e linfonodos submandibulares, produtos que não chegam até o consumidor, mas permanecem na carcaça após o abate e, juntamente com músculos da região da cabeça, são empregados na fabricação de embutidos e carne mecanicamente separada. Caso estejam contaminados, esses ingredientes podem ser diretamente responsáveis pela presença de salmonelas nesses produtos finais.

As fezes são particularmente importantes em relação à contaminação das carcaças. Dentro de um grupo de suínos abatidos existe uma correlação entre a proporção de animais portadores de salmonelas nas suas fezes e a quantidade de carcaças contaminadas no final da linha de abate (BERENDS et al., 1997).

BAPTISTA & NIELSEN (2010) também atribuem a porcentagem de carcaças contaminadas por *Salmonella* spp. ao número de suínos portadores que entram no abatedouro. A partir da coleta de 20.196 amostras de soro e de carcaças dos mesmos animais, concluíram que a presença de ao menos um animal soropositivo para *Salmonella* spp. em um mesmo lote contribui de modo significativo para a contaminação de outras carcaças pela bactéria, pela possibilidade de contaminação cruzada por fezes.

Da mesma maneira, segundo BOTTELDOOM et al. (2004) a contaminação de carcaças de suínos por *Salmonella* spp. pode resultar da presença da bactéria no intestino do próprio animal, como também do contato com outras carcaças ou superfícies contaminadas no abatedouro.

Ao contrário dos procedimentos relacionados ao abate, já se sabe que as gotículas provenientes da condensação do teto na sala de desossa, o fornecimento de ar e pessoas que carregam salmonelas não constituem importantes fontes de contaminação de *Salmonella* spp. em cortes cárneos de suínos. O resfriamento permanente do ar e a correta limpeza e sanitização das salas de desossa previne e/ou elimina a possibilidade de contaminação (BERENDS et al., 1997).

Entretanto, ao entrar uma carcaça contaminada por *Salmonella* spp. na sala de desossa, o número de superfícies contaminadas aumenta rapidamente, principalmente daquelas áreas que entram em contato com as carcaças. Uma vez contaminada, as superfícies podem transferir salmonelas para dezenas a centenas de cortes cárneos primários por contaminação cruzada antes de serem limpas e sanitizadas novamente (BERENDS et al., 1997). De acordo com os autores, 70% das carcaças contaminadas são dos próprios animais portadores, e as demais 30% são de contaminação cruzada.

A carga microbiológica do produto final, principalmente de cortes de carne fresca, pode estar diretamente relacionada com a carga microbiana da matéria-prima, ou seja, das carcaças. Segundo BERAN (1996) a prevalência de cortes de carne suína contaminados por salmonelas após a desossa é determinada pelo número de carcaças contaminadas por *Salmonella* spp. que entram na linha de desossa.

Em quatro abatedouros comerciais de suínos na Irlanda, PRENDERGAST et al. (2008) isolaram *Salmonella* spp. de 24 das 720 amostras (3,3%) de carne e de 7 das 56 amostras (12,5%) de suabe de superfície de contato da carne na sala de desossa. Embora a prevalência seja baixa, somente o fato de se ter isolado a bactéria demonstra o potencial de contaminação cruzada entre equipamentos e a carne.

LIMA et al. (2004) utilizaram 120 esfregaços de superfície de carcaças suínas após o escaldamento/depilação, antes da evisceração, após evisceração e serragem da carcaça e após 24 horas de refrigeração para a

pesquisa de *Salmonella* spp., a qual foi encontrada com uma frequência média de isolamento em 11,7% das carcaças.

Em estudo realizado por BESSA et al. (2001), no sul do Brasil, a prevalência de suínos portadores de *Salmonella* spp. em linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal, durante o abate, foi de 55,6%.

Com uma prevalência menor que no sul, no estado do Mato Grosso, SILVA et al. (2009) observaram que 16,6% das amostras de linfonodos mesentéricos e tonsilas de suínos foram positivas para *Salmonella* spp., sendo identificados 14 sorovares, entre os quais, *S. Derby* (16%), *S. Typhimurium* (14%), *S. London* (12%) e *S. Give* (12%) foram os mais frequentes.

Na Itália, BONARDI et al. (2003) pesquisando *Salmonella* spp. e *Y. enterocolitica* em abatedouros de suínos encontraram uma prevalência de 36,7% em conteúdo intestinal, 5,3% em tonsilas e de 6,0% em carcaças.

SWANENBURG et al. (2001a) isolaram *Salmonella* spp. em 47% de 1114 amostras de suínos durante o abate. A maior prevalência foi observada no conteúdo retal (25,6%) enquanto a menor foi observada nas carcaças (1,4%). Nas amostras de tonsilas a prevalência foi de 19,6%, enquanto que no fígado, língua e linfonodos mesentéricos a prevalência foi de 9,3%. No mesmo estudo, as maiores prevalências de *Salmonella* spp. no ambiente do abatedouro foram na água de lavagem da sala de abate (61%) e na serra de carcaças (33%).

MEYER (2010), pesquisado amostras de cortes cárneos de suínos, carcaças, rins, fígado, coração e língua, obteve maior prevalência de *Salmonella* spp. em amostras de língua de suínos, em uma porcentagem de 5,0%.

CHEN et al. (2006) isolaram a partir de carcaças de suínos 20 sorotipos de *Salmonella* spp. na Tailândia. Entre os mais frequentes, os sorotipos *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. Typhimurium* e *S. Schwarzengrund* corresponderam a 76% do total de isolados.

Na Bélgica, KORSACK et al. (2003) pesquisaram *Salmonella* spp. a partir de 152 amostras de carcaças por suabe e observaram uma prevalência de 11,2%, com uma frequência maior de *S. Typhimurium* e a partir de 171 amostras de conteúdo intestinal a prevalência foi de 32,2%, com uma maior frequência de *S. Brandenburg*.

No Canadá, em amostras de conteúdo cecal de suínos, MAINAR-JAIME et al. (2008) detectaram 12,5% de positividade para *Salmonella* spp. e LETELLIER et al. (2009) obtiveram 14% de carcaças contaminadas pela mesma bactéria.

De acordo com TESSMANN et al. (2008) na região sul do Brasil são comuns feiras-livres que comercializam gêneros alimentícios de origem vegetal e animal. Em levantamento realizado em cortes de carne suína a fim de verificar a prevalência de *Salmonella* spp., 80% das amostras colhidas em feiras estavam contaminadas.

Em uma porcentagem de isolamento semelhante, na Tailândia, VINDIGNI et al. (2007) isolaram *Salmonella* spp. em 84% das amostras de carne suína comercializada em feiras-livres, 82% das amostras de carne bovina, 62% das amostras de carne de frango e 14% em ovos. Entre os 42 sorotipos encontrados, o de maior prevalência foi *S. Anatum*, seguido por *S. Corvallis*, *S. Derby* e *S. Rissen*.

Em abatedouro do Estado de São Paulo, MATSUBARA (2005) obteve 5,4% de positividade em carcaças de suínos, dos seguintes sorotipos: *S. Typhimurium*, *S. Livingstone*, *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. Infantis*, entre outros.

Com objetivo de estabelecer uma relação entre o isolamento de *Salmonella* spp. em linfonodos sub-ilíacos e a prevalência de suínos portadores de *Salmonella* spp., WANG et al. (2010) não obtiveram resultados de modo significativo. A baixa taxa de incidência da bactéria em linfonodos sub-ilíacos (0,06%) não correspondeu a taxa de isolamento em fezes dos mesmos animais (3,4%), sendo os sorotipos *S. Derby*, *S. Anatum* e *S. Typhimurium* os mais predominantes.

No oeste do Paraná, SPOLAORE (2007) obteve resultados positivos para *Salmonella* spp. em amostras de linfonodos mesentéricos de suínos, em uma porcentagem de 17,33%, como também em 5% das amostras de facas e em 28,33% das bandejas de evisceração. Entre os sorotipos encontrados, os mais predominantes foram o *S. Typhimurium*, *S. Derby* e *S. Bredeney*, além do sorotipo *S. Anatum*, em menor frequência.

CHEN et al. (2006) obtiveram 150 isolados de *Salmonella* spp. em carcaças de suínos durante levantamento realizado nos anos de 2000 a 2003

em Taiwan. Os sorotipos *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. Typhimurium* e *S. Schwarzengrund* foram os mais frequentes.

3.2.3 Surtos

Nas últimas décadas vários autores relataram a ocorrência de surtos de origem alimentar envolvendo salmonelas e carne suína em diversos países. De acordo com JONES et al. (2004), de 1995 a 2002, um alimento feito a partir de carne suína, geralmente servido em restaurantes mexicanos, foi considerado como uma das mais frequentes vias de transmissão em surtos de doenças de origem alimentar em Chicago, Estados Unidos. Dos 90 surtos deste tipo de doença, 6% foram relacionadas a este alimento, com 108 doentes e 6 hospitalizações. Em todos estes surtos registrados, a *Salmonella* spp. foi o principal agente etiológico.

Na Itália, LUZZI et al. (2007) descreveram a ocorrência de um surto de gastroenterite por *Salmonella* Typhimurium envolvendo 26 casos, com idade média de 7,5 anos e o consumo de salame típico italiano, feito com carne suína.

Na Dinamarca, o maior surto de salmonelose ocorreu em 2008, com 1054 casos registrados, com idade média de 15 anos e com uma porcentagem de hospitalizações de 15 a 20% dos casos. Embora a investigação microbiológica dos alimentos não tenha fornecido uma indicação clara da via de transmissão específica, a principal hipótese é que diferentes produtos de suínos tenham sido os veículos do surto (ETHELBERG et al., 2008).

Na Suíça, SCHIMID et al. (2008) atribuíram o aumento do número de casos de salmonelose a alimentos contaminados por fezes de suínos. Entre os vários alimentos relacionados aos casos, foi identificada alta prevalência de *S. Typhimurium* e o mesmo sorotipo foi encontrado, também em alta prevalência, em amostras de conteúdo intestinal de suínos.

Segundo BRUUN et al. (2009) o nível endêmico de salmonelose nos três países nórdicos, Noruega, Suécia e Finlândia é baixo, sendo que a maioria das infecções são adquiridas durante viagens internacionais e, entre os casos domésticos, o sorovar *S. Typhimurium* é o mais comum. Nos meses de novembro a dezembro de 2008, foram registrados 37 casos de salmonelose na

Dinamarca, 10 casos na Noruega e 4 casos na Suécia. Após a investigação nesses países, o rastreamento indicou que o responsável pelos surtos foram produtos de suínos provenientes da Noruega.

Como forma de reduzir a prevalência de salmonelose de origem alimentar de modo efetivo, ALBAN & STARK (2005) sugerem implementação de melhorias em toda cadeia produtiva de suínos, desde a fazenda onde são criados até a mesa do consumidor.

3.3 Suscetibilidade de *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp. a antimicrobianos

Um problema cada vez mais evidente de saúde pública é a emergência de microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos (KHAN et al., 2007).

A determinação do perfil de sensibilidade e resistência a antimicrobianos entre os isolados de alimentos em determinada região é importante não somente para determinar um marcador epidemiológico, mas também para orientar procedimentos terapêuticos em medicina humana e veterinária (BAÚ et al., 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana, veterinária e na agricultura tem contribuído para o aumento de resistência entre os microrganismos (WHO, 2009b).

Segundo WEGENER (2003) o uso rotineiro de antimicrobianos na produção tem sido implicado como importante fator de pressão seletiva para emergência e disseminação de cepas resistentes. Ainda deve-se considerar a probabilidade de ocorrência de resistência cruzada a antimicrobianos de mesma classe. Em sistemas de produção intensiva de suínos, antimicrobianos são rotineiramente usados como medida profilática para prevenir a disseminação de agentes infecciosos bem como promotores de crescimento nos rebanhos (GEBREYES et al., 2006).

No Brasil, pela possibilidade da ocorrência de resistência, alguns antimicrobianos tiveram seu uso proibido como promotores de crescimento, como o cloranfenicol e a tetraciclina, proibidos desde 1998 (BRASIL, 1998; BRASIL, 2003).

Nos últimos anos, a resistência a antimicrobianos tem aumentado significativamente, sendo cada vez mais frequente sua ocorrência entre os patógenos de origem alimentar. *Campylobacter* e *Salmonella* são dois exemplos de microrganismos que vêm se apresentando cada vez mais resistentes, particularmente a quinolonas e cefalosporinas de terceira geração (ANGULO et al., 2004).

Algumas cepas de salmonelas são classificadas como resistentes a multidrogas, como a *Salmonella enteritica* sorovar Typhimurium que se tornou um problema global durante a década de 90. A maioria dos isolados pertencentes a este sorovar exibia padrões únicos de resistência, sendo extremamente resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina, com genes de resistência cromossômicos (WITTE, 2004).

SIMONOVA et al. (2008) testaram a sensibilidade de *Y. enterocolitica* isolada de tonsilas, conteúdo retal, língua e superfície da pele de suínos frente a seis princípios ativos: tetraciclina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, eritromicina, ciprofloxacina e gentamicina. Os isolados se mostraram mais sensíveis ao ácido nalidíxico, gentamicina, cloranfenicol e ciprofloxacina e apresentaram maior resistência a eritromicina e tetraciclina. KWAGA & IVERSEN (1992) obtiveram 100% de isolados *Y. enterocolitica* sensíveis a ciprofloxacina.

A partir de 386 isolados de *Y. enterocolitica* de pacientes humanos, carne e fezes de suínos, BAUMGARTNER et al. (2007) testaram a suscetibilidade a 16 antimicrobianos. Todos foram sensíveis à ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina, kanamicina, neomicina e polimixina e resistentes à ampicilina, cefalotina e a associação de amoxicilina+ácido clavulânico.

CASTAGNA et al. (2001) avaliaram a resistência frente a diversos antimicrobianos de salmonelas isoladas de 99 amostras de linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal de suínos abatidos. Como resultado, foi observada resistência para sulfonamida (83,9%), tetraciclina (37,4%), cotrimoxazol (25,2%), ampicilina (20,2%), cloranfenicol (16,1%), estreptomicina (14,1%), ácido nalidíxico (10,1%), tobramicina (6,1%), neomicina (4,0%), amicacina (3,0%), cefaclor (3,0%), gentamicina (2,0%), ciprofloxacina (1,0%).

Todas as amostras mostraram sensibilidade à amoxicilina/ácido clavulânico e 24 amostras foram resistentes a quatro ou mais antimicrobianos.

Em avaliação da suscetibilidade frente a 14 antibióticos por *S. Infantis* e *S. Typhimurium* isoladas de cortes de carne suína comercializados em feiras-livres no Rio Grande do Sul, TESSMAN et al. (2008), observaram que 39,1% dos isolados apresentaram-se multirresistentes a três ou mais antibióticos.

MÜRMANN et al. (2009), avaliando a sensibilidade a antimicrobianos de salmonelas isoladas de linguiça frescal suína comercializada também no Rio Grande do Sul, verificaram resistência de 85,9% dos isolados a mais de um antibiótico.

Na Tailândia, CHEN et al. (2006) obtiveram 100% de sensibilidade de isolados de *Salmonella* spp. à ceftriaxona e mais de 60% dos isolados resistentes a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico e sulfametoxazol.

CHEN et al. (2004) obtiveram 17 e 23% de resistência a ciprofloxacina e enrofloxacin, os quais foram eficazes contra *Salmonella* Derby e *Salmonella* Anatum. Já os outros antimicrobianos testados, cefalotina, gentamicina e trimetoprim apresentaram menor eficácia contra *Salmonella* Anatum, assim como MATSUBARA (2005) que também observou resistência de *S. Anatum* a cefalotina.

Avaliando o perfil de resistência de cepas de *Salmonella* isoladas de diversas fases da cadeia produtiva de suínos, BERSOT (2005) detectou 93,7% das cepas resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 62,9% resistentes a mais de uma substância testada.

GEBREYES et al. (2006) encontraram maior percentual de resistência à tetraciclina (80%) seguida pela estreptomicina (43,4%) para as cepas testadas. Já FARRINGTON et al. (2001), avaliando o perfil de resistência de cepas de *Salmonella* em suínos em idade de abate, constataram que 100% das cepas foram resistentes a um ou mais antibióticos, sendo que 48,8% delas foram consideradas multirresistentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da indústria e das amostras estudadas

A indústria onde o trabalho foi desenvolvido situa-se no interior do Estado de São Paulo, sendo caracterizada, por suas dependências e instalações, como um matadouro-frigorífico, segundo estabelece o parágrafo I do artigo 9, da lei 7.705 de 1992 da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. Desta forma, ela é submetida a um controle higiênico-sanitário, através do Serviço de Inspeção Estadual (SISP), possuindo instalações para o abate de, aproximadamente, 100 animais ao dia e refrigeração das carcaças.

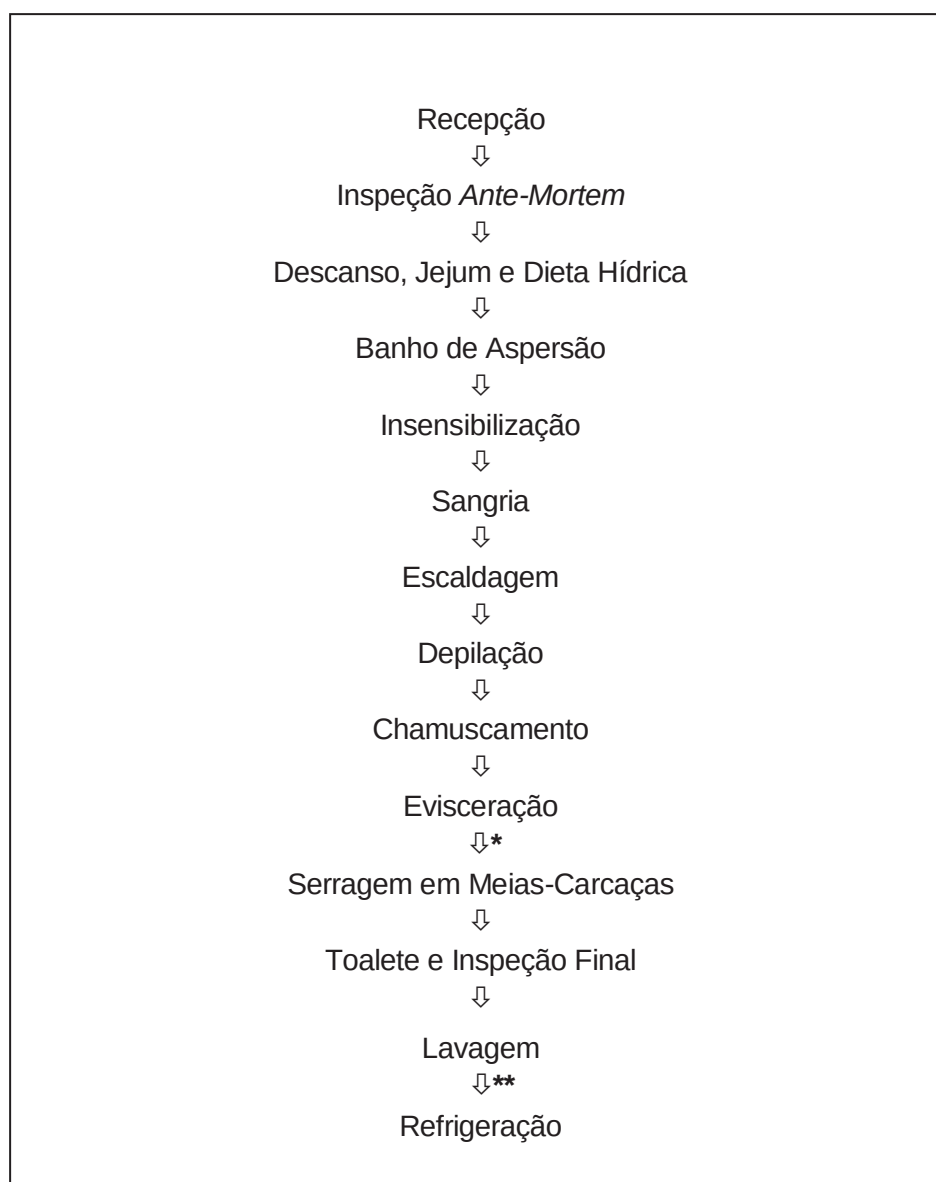
Durante a rotina de abate, ilustrada pelo fluxograma do Quadro 1, foram colhidas amostras de:

- Língua - Para a colheita dessas amostras retirou-se, assepticamente, um fragmento de cada língua, com o auxílio de tesoura previamente desinfetada com álcool 70%, o qual foi acondicionado em saco plástico esterilizado e identificado com etiqueta externa.
- Tonsilas e linfonodos submandibulares – As tonsilas e os linfonodos submandibulares foram retirados íntegros, sem qualquer incisão, os quais também foram acondicionados em sacos plásticos individuais e identificados com etiqueta.
- Linfonodos mesentéricos – Foram retirados íntegros e, após serem separados do mesentério com auxílio de tesoura, foram acondicionados em sacos plásticos esterilizados.
- Reto – Com o auxílio de um suabe esterilizado, coletou-se a amostra na mesa utilizada para a inspeção do conjunto gastrointestinal e acondicionou-se em tubo de ensaio esterilizado contendo água peptonada 0,1%.
- Carcaças – Para a colheita das amostras de carcaça, foram utilizados quatro suabes, um suabe para cada um dos quatro pontos estabelecidos (NESBAKKEN et al., 2003) sendo eles: pernil, lombo, peito e papada, conforme ilustrado na Figura 1. Em cada um dos pontos utilizou-se um molde de 100 cm² (10 x 10 cm) de área, previamente esterilizado, para demarcar a área a ser amostrada. Cada um dos quatro suabes foi esfregado por, aproximadamente, 20 segundos no ponto estabelecido e então acondicionados em um mesmo tubo de ensaio esterilizado contendo

água peptonada 0,1%. Cada amostra de suabe de carcaça correspondeu a uma área de 400cm².

- Facas – As facas utilizadas na incisão de linfonodos foram amostradas por meio de suabe durante as operações da inspeção higiênico-sanitária. Cada amostra de suabe foi acondicionada em tubo de ensaio esterilizado contendo água peptonada 0,1%.

Quadro 1. Fluxograma de abate de suínos no matadouro-frigorífico onde as amostras foram coletadas



* Coleta de amostras de língua, tonsilas, linfonodos mesentéricos e reto

** Coleta de amostras de linfonodos submandibulares, carcaças e facas

As amostras foram colhidas de modo totalmente individual, tomando o cuidado para que não houvesse contato entre elas, mesmo sendo proveniente de um mesmo animal. A amostragem foi realizada em 25 animais, em 6 dias de abate diferentes, em um intervalo de tempo de 8 meses. Foram colhidas um total de 175 amostras correspondente aos 7 pontos de colheita: língua, tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos, reto, carcaça e feca.

Após a colheita de cada amostra, as mesmas foram imediatamente colocadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, e em seguida transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, “Câmpus” de Jaboticabal, UNESP, onde as análises foram processadas em, no máximo, 2 horas.

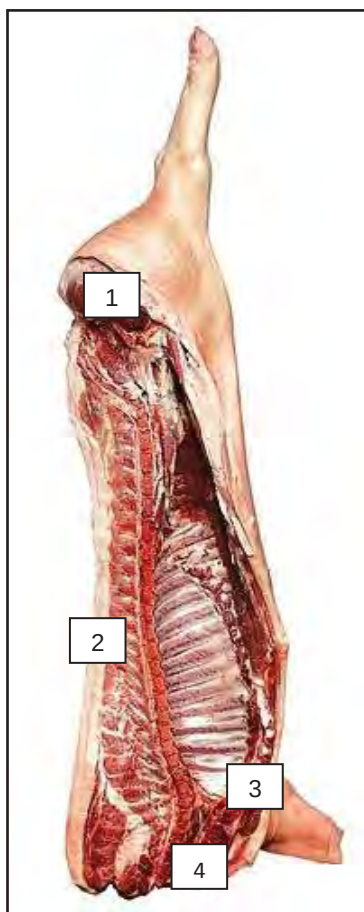
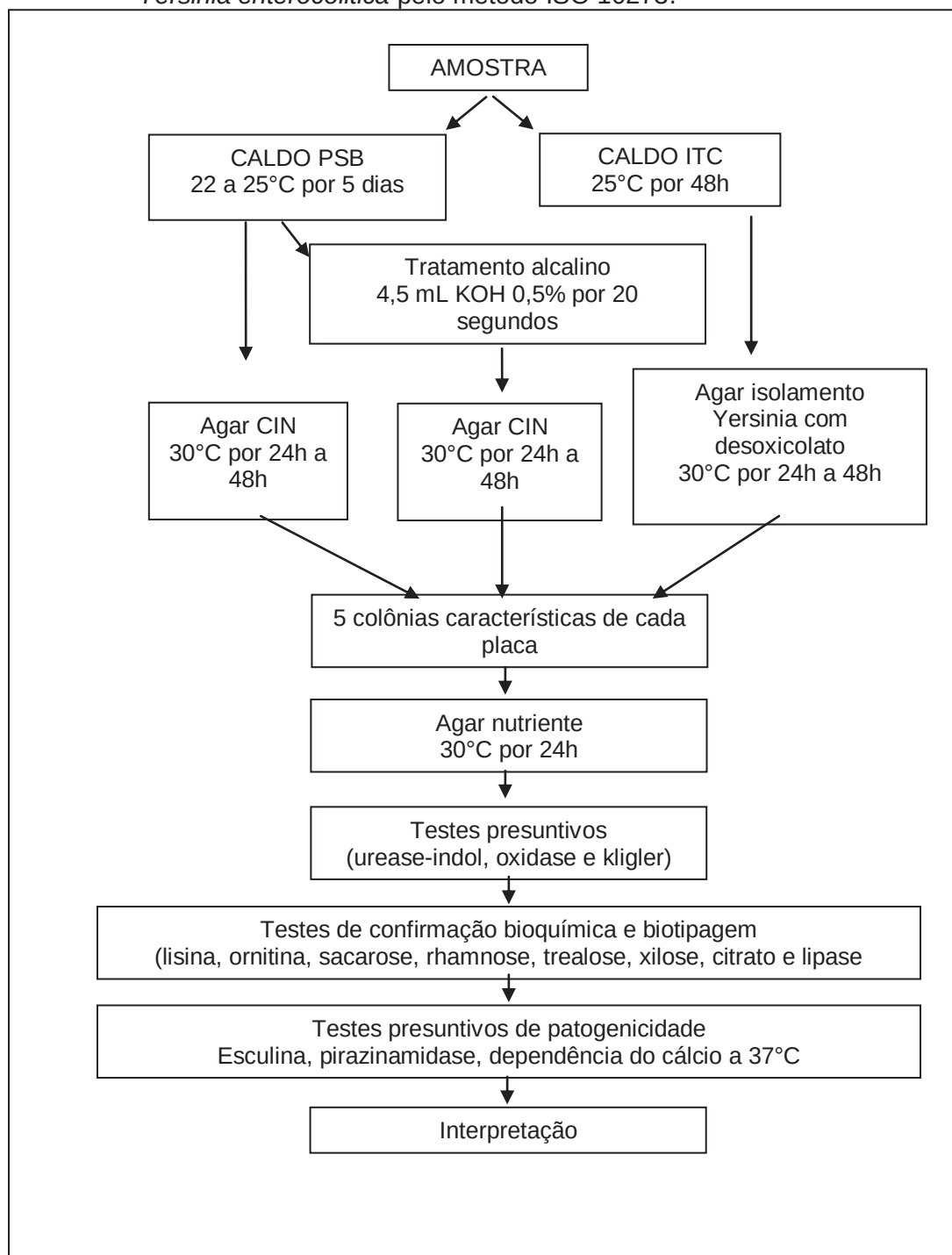


Figura 1. Pontos em que foram coletadas as amostras de carcaças de suínos por suabe

4.2 Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* pelo método ISO 10273 (ISO, 2003)

Para a pesquisa de *Y. enterocolitica* foi utilizada a metodologia preconizada pela International Organization for Standardization (2003), por meio do método ISO 10273 (Quadro 2).

Quadro 2. Diagrama da técnica microbiológica convencional para a pesquisa de *Yersinia enterocolitica* pelo método ISO 10273.



4.2.1 Enriquecimento seletivo

Para o enriquecimento seletivo foram utilizados dois meios de cultura:

- Caldo peptona-sorbitol-bile (PSB)
- Caldo irgasan-ticarclina-cloreto de potássio (ITC)

Na fase de enriquecimento seletivo utilizando o caldo PSB foi preparada uma suspensão inicial de 25g de cada uma das amostras de língua, tonsilas, linfonodos submandibulares e mesentéricos, em 225 mL de caldo, em frascos esterilizados. Dessa forma, cada suspensão correspondeu a uma diluição de 1/10. Os suabes de reto, de carcaças e de facas foram colocados em frascos contendo 200 mL do caldo. Após homogeneização dos conjuntos realizou-se a incubação em temperatura entre 22 e 25°C, por cinco dias.

Com a utilização do caldo ITC, foram preparadas suspensões utilizando-se 5g de cada amostra e 495 mL do caldo, correspondendo a uma suspensão 1/100, conforme recomenda a técnica ISO 10273. Os suabes foram colocados em frascos contendo 400 mL do caldo. Após homogeneização os conjuntos foram incubados a 25°C por 48 horas.

4.2.2 Plaqueamento e identificação

As culturas em caldo PSB foram inicialmente inoculadas, através de alça de níquel-cromo, na superfície de placas contendo ágar cefsulodin-irgasan-novobiocina (CIN). Em seguida as placas foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas.

As culturas em PSB foram ainda testadas quanto à resistência ao hidróxido de potássio a 0,5% e, para tal, 0,5 mL de cada uma delas foram acrescentados a 4,5 mL da solução. Após 20 segundos de contato, inoculou-se cada uma das culturas em ágar CIN conforme já descrito.

As colônias sugestivas de *Yersinia* sp. no ágar CIN revelaram-se como sendo pequenas ($\leq 1,0$ mm), lisas, com centro vermelho e bordas translúcidas. Com raios de luz incidindo em ângulo oblíquo revelam-se como finamente granuladas.

As culturas no caldo ITC foram inoculadas em placas com ágar Isolamento *Yersinia* acrescido de desoxicolato de sódio e cloreto de cálcio e incubadas por 24 a 48 horas a 30°C. Colônias sugestivas apresentavam

diâmetro pequeno ($\leq 1,0$ mm) e coloração cinza; com luz em ângulo oblíquo se apresentavam com leve granulação.

4.2.3 Seleção das colônias para identificação

Para a confirmação, foram selecionadas de cada placa de cada um dos meios cinco colônias consideradas características ou suspeitas. As colônias selecionadas foram inoculadas em tubos com ágar nutriente, de maneira a permitir o crescimento de colônias bem isoladas.

Os tubos foram incubados a 30°C por 24 horas e examinadas para verificação da pureza das culturas.

Foram utilizadas as culturas puras para a identificação presuntiva, confirmações bioquímicas da espécie e testes de patogenicidade.

4.2.4 Identificação presuntiva

As culturas foram submetidas às provas da:

- oxidase: realizando-se esfregaços das culturas, através da utilização de alça de platina, em fitas para determinação de oxidase¹, adquiridas prontas para uso. Foram consideradas positivas as culturas cujos esfregaços tornaram-se róseos em alguns segundos e negativas quando não houve alteração de cor.
- urease e produção de indol: através da inoculação em meio urease/indol. Após incubação (30°C/24 horas) urease positiva era verificada pela coloração rósea violeta ou rósea avermelhada e a produção de indol foi verificada após a adição de reativo de Kovac's.
- fermentação e produção de gás a partir da glicose e utilização da lactose, pela inoculação das culturas em ágar de Kligler com ferro.

As culturas consideradas como pertencentes a gênero *Yersinia* apresentaram-se positivas nas provas da urease e fermentação da glicose e negativas nas provas da produção de gás a partir da glicose, fermentação da

¹Probac do Brasil - Produtos Bacteriológicos Ltda.

lactose, produção de H₂S e oxidase. Na prova do indol o resultado poderia ser tanto positivo quanto negativo, sendo necessário para a diferenciação da espécie.

4.2.5 Confirmação bioquímica da espécie *Yersinia enterocolitica* e testes presuntivos de patogenicidade

As culturas caracterizadas como do gênero *Yersinia* foram submetidas às provas da descarboxilação da lisina e ornitina, da fermentação de sacarose, rhamnose, trealose e xilose, da utilização do citrato de sódio e da produção da Tween esterase.

Para a verificação presuntiva da patogenicidade foram realizados os testes da fermentação da esculina, detecção de pyrazinamidase e dependência do cálcio a 37°C.

As cepas de *Y. enterocolitica* presuntivamente patogênicas evidenciam as reações apresentadas no Quadro 3.

4.2.6 Controle positivo

O controle positivo consistiu de uma cepa de *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 fornecida pelo Instituto Oswaldo Cruz. As células bacterianas liofilizadas foram incubadas a 30°C por 24 horas em caldo de infusão cérebro e coração (BHI), semeadas posteriormente em ágar triptona de soja (TSA) e incubadas por mais 24 horas a 30°C.

Quadro 3. Interpretação dos testes bioquímicos e de patogenicidade para *Yersinia enterocolitica*.

TESTE	REAÇÃO
Determinação da espécie	
Urease	+
Indol	-/+ ^a
Glicose	+
Formação de gás a partir da glicose	-
Lactose	-
Sulfito de hidrogênio	-
Oxidase	-
Lisina descarboxilase	-
Ornitina descarboxilase	+
Sacarose	+
Trealose	+/- ^b
Rhamnose	+/- ^b
Xilose	+/- ^b
Citrato	-
Tween-esterase	+/-
Determinação da patogenicidade	
Esculina	-
Pirazinamidase	-
Dependência de cálcio a 37°C ^c	+
^a Biovar 1 e alguns sorovares do biovar 2 são positivos no indol. Biovares 3, 4, 5 e alguns sorovares do biovar 3 são negativos no indol. ^b Depende do biovar da <i>Yersinia enterocolitica</i> ^c A característica de patogenicidade é codificada por um plasmídio de virulência	

Fonte: ISO (2003)

4.3 Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.3.1 Enriquecimento Seletivo

Para a fase de enriquecimento seletivo e posterior extração de DNA, foi utilizado o mesmo cultivo em caldo irgasan-ticarcilina-cloreto de potássio (ITC) utilizado no isolamento convencional (item 4.2.1).

As suspensões foram preparadas utilizando-se 5g de cada amostra em 495 ml do caldo, correspondendo a uma suspensão 1/100, conforme recomenda a técnica ISO 10273. Os suabes foram colocados em frascos contendo 400 mL de caldo ITC. Após homogeneização os conjuntos foram incubados a 25°C por 48 horas.

4.3.2 Extração do DNA genômico por fervura

O DNA genômico das células bacterianas foi obtido conforme o protocolo descrito por LETOWSKI et al. (2005).

Os precipitados bacterianos foram obtidos a partir das culturas incubadas por 48 horas no caldo de enriquecimento seletivo ITC. Após a homogeneização do caldo, foi transferido 1,5 mL de cada amostra para tubos *ependorf* esterilizados, os quais foram centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente. Após desprezar o líquido sobrenadante, repetiu-se a etapa anterior e o sedimento celular foi ressuspenso em 400 µL de água milli-Q autoclavada. Após serem homogeneizadas no vórtex, as amostras foram fervidas por 15 minutos e resfriadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente.

Após a centrifugação, transferiu-se 200 µL do sobrenadante para outro tubo *ependorf* de 0,5 mL esterilizado e armazenou-se em freezer a -20°C.

4.3.3 Amplificação

Para a fase de amplificação de *Y. enterocolitica* foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos descritos por WANNET et al. (2001) e UYEDA et al. (2003)

- *16S rRNA I* (5'-AAT ACC GCA TAA CGT CTT CG-3') e *16S rRNA II* (5'-CTT CTT CTG CGA GTA ACG TC-3'), com 330 pb, indicadores da espécie;

- *ail I* (5'-TTA ATG TGT ACG CTG GGA GTG-3') e *ail II* (5'-GGA GTA TTC ATA TGA AGC GTC-3'), com 425 pb, indicadores de cepas patogênicas de *Y. enterocolitica*.

Para cada mistura de reação para a PCR, foi adicionado 15,5µL de água, 0,5 µL de 2 mM de mistura dNTP, 1 U (0,2 µL de tampão PCR 10 X, 1,5 µL de 50 mM de tampão de cloreto de magnésio e 20 pmol (2,5 µL) do par de oligonucleotídeos (*16SrRNA* ou *ail*).

As reações de amplificação dos primers *16S rRNA I* e *II* foram realizadas em aparelho termociclador, onde foi utilizado o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação de 2 minutos a 94°C e 30 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 94°C por 30 segundos seguido do ciclo de pareamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C por 5 minutos. Ao fim do programa foi adicionado um passo para a manutenção da amostra a 10°C até a retirada dos tubos do termociclador.

As reações de amplificação dos primers *ail I* e *II* foram realizadas em um termociclador programado para 25 ciclos, iniciando por um ciclo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguido de um ciclo de pareamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 3 minutos e uma etapa de alongamento final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-borato e voltagem constante de 100V, seguido de coloração com brometo de etídio e visualização em transiluminador de UV.

4.4 Pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* (APHA, 2001)

4.4.1 Pré-enriquecimento

Para o pré-enriquecimento 25 gramas das amostras de língua, tonsilas, linfonodos submandibulares e ileocecais foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada a 0,1% e os suabes de reto, de carcaças e de facas em 200 mL do mesmo diluente. Os conjuntos permaneceram em repouso por 6 horas à temperatura ambiente e, em seguida, foram incubados a 37°C por 18 horas.

4.4.2 Enriquecimento seletivo

Nesta fase, duas alíquotas de 2,0 mL cada da cultura de pré-enriquecimento foram inoculadas, respectivamente, em 20 mL de caldo selenito cistina e em 20 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, adicionados de 0,2 mL de solução de novobiocina a 0,4%, resultando em uma concentração de 40 microgramas do princípio ativo por mililitro do meio. Em seguida, os caldos seletivos foram incubados a 37°C por 24 horas.

4.4.3 Plaqueamento seletivo

Com auxílio de alça de níquel-cromo, cada cultura em caldo de enriquecimento foi semeada pela técnica de esgotamento, em ágar verde-brilhante e ágar de MacConkey, seguido de incubação a 37°C por 24 horas.

4.4.4 Identificação presuntiva

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram tomadas, com auxílio de agulha de níquel-cromo, previamente flambada, de cada uma das placas semeadas, 3 a 5 colônias com características sugestivas do gênero *Salmonella* e inoculadas em tubos contendo meio TSI e meio para realização da prova da descarboxilação da lisina.

4.4.5 Confirmação sorológica

Para a confirmação sorológica do gênero *Salmonella* foram realizados testes sorológicos com soros polivalentes anti-salmonela somáticos e flagelares. Para tal, cultivos que na identificação presuntiva apresentaram reações condizentes com o gênero foram transferidos, com alça de níquel cromo, para lâminas de vidro contendo gotas de solução fisiológica. Após

homogeneização de cada cultura, foi acrescentada uma gota de soro anti-salmonela polivalente somático-O, seguido de movimentação da lâmina e leitura. Ocorrendo aglutinação na mistura, considerou-se positiva. O mesmo procedimento foi realizado para o teste com o soro polivalente flagelar-H. Foram considerados como do gênero *Salmonella* os cultivos que apresentaram positividade em ambas provas, sempre acompanhadas por culturas padrões positivas e negativas.

4.4.6 Sorotipagem

As cepas de *Salmonella* spp. isoladas foram semeadas em ágar gelose e incubadas a 37°C por 24 horas. Após, foram embaladas e enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo para tipagem.

4.5 Testes de sensibilidade a antimicrobianos

Os testes de sensibilidade a antimicrobianos foram realizados com os isolados obtidos das duas bactérias pesquisadas, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp., conforme metodologia descrita por BAUER et al. (1966) e NCCLS (2003).

Para a realização desses testes as culturas foram repicadas em tubos contendo 5 mL de caldo tripticase soja e incubadas a 37°C por 18 a 20 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas de forma asséptica em tubos contendo 4 mL de solução salina esterilizada, até a obtenção de turvação idêntica à da solução padrão de cloreto de bário, preparada pela adição de 0,5 mL de uma solução 0,048 M de cloreto de bário a 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1% (v/v).

A seguir, as culturas diluídas foram semeadas, com auxílio de suabes esterilizados, em placas com ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário à secagem da superfície do meio, foram colocados os

polidiscos² contendo os antimicrobianos. Realizou-se a leitura após 18 a 24 horas de incubação a 37°C, através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados.

Para os isolados de *Yersinia enterocolitica* foram utilizados polidiscos contendo os seguintes princípios ativos: amicacina (30 µg), amoxilina+clavulanato (20µg+10µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefepime (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefuroxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem(10 µg), sulfametoxazol+trimetropim (23,75µg+1,25µg) e para os isolados de *Salmonella* spp. além dos antimicrobianos citados, ainda foram utilizados polidiscos contendo cloranfenicol (30 µg), oxitetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg) e tetraciclina (30 µg)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se o número e a porcentagem de amostras positivas para *Y. enterocolitica* em relação à amostragem total, assim como a distribuição dos pontos amostrais em que se isolou a bactéria e a porcentagem de amostras positivas em relação a cada coleta, pela utilização de técnica microbiológica convencional, segundo o protocolo da ISO (2003).

Em cada uma das coletas os animais utilizados para a amostragem foram numerados de 1 a até 5, de acordo com a quantidade de amostras coletadas no dia. Na primeira coleta foram amostrados três animais, na segunda a quinta coleta, foram amostrados cinco animais em cada e na sexta coleta, dois animais.

Do total de 175 amostras coletadas durante o experimento, isolou-se *Y. enterocolitica* a partir de 14 amostras (8%) provenientes de tonsilas, línguas, linfonodos submandibulares e mesentéricos e também de facas.

Analisando por ponto amostral, entre os sete pontos coletados (tonsilas, língua, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos, reto, carcaça e

² Laborclin – Produtos para Laboratórios – Ltda. – Polidiscos LB-6.

faca) o de maior frequência de *Y. enterocolitica* foi o de tonsilas, do qual isolou-se a bactéria em cinco amostras, seguido por língua (4), linfonodos submandibulares e facas (2) e linfonodos mesentéricos (1).

Considerando que foram analisadas 25 amostras de cada um dos sete pontos, *Y. enterocolitica* foi isolada em 20% das amostras de tonsilas, em 16% das amostras de língua, em 8% das amostras de linfonodos submandibulares e de facas e em 4% das amostras de linfonodos mesentéricos.

Tabela 1. Número e porcentagem de amostras de língua, tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos e de suabes de carcaça e de reto de suínos abatidos e de superfície de lâminas de faca utilizadas na inspeção, positivas para *Yersinia enterocolitica* por meio da técnica microbiológica convencional de isolamento.

Coleta	n ¹	L*	T	LS	LM	SC	SR	SF	n+ ²	%n+ ³	%n+ ⁴
Número do animal positivo											
1 ^a	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ^a	35	3	-	-	-	-	-	-	1	7,1	2,9
3 ^a	35	1,2	1,2,5	5	3	-	-	2	8	57,1	22,9
4 ^a	35	1	3,5	5	-	-	-	-	4	28,6	11,4
5 ^a	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 ^a	14	-	-	-	-	-	-	1	1	7,1	7,1
Total	175	4	5	2	1	-	-	2	14	8	-

¹n – número de amostras

²n+ – número de amostras positivas

³%n+ – porcentagem de amostras positivas

⁴%n^c+ – porcentagem de amostras positivas na coleta

*L – língua

T – tonsilas

LS – linfonodo submandibular

LM – linfonodo mesentérico

SC – suabe de carcaça

SR – suabe de reto

SF – suabe de faca

Em relação ao número de amostras positivas (14), as tonsilas corresponderam a 35,7% (5/14) deste total, as línguas 28,6% (4/14), as

amostras de linfonodos submandibulares e de facas 14,3% (2/14) e as amostras de linfonodos mesentéricos 7,1% (1/14).

A maior frequência de isolamento em tonsilas já era esperada, considerando resultados de estudos de FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2000), NESBAKKEN et al. (2003) e LAUKKANEN et al. (2009). Segundo esses autores, a prevalência de *Y. enterocolitica* em tonsilas é 10 vezes maior do que em conteúdo gastrintestinal, indicando que são fontes mais significativas para a contaminação de carcaças e vísceras do que as fezes em abatedouros.

Da mesma maneira, JOHANNESSEN et al. (2000) afirmam que entre 150 a 180 dias de idade, as tonsilas dos suínos são fontes muito mais importantes de *Y. enterocolitica* patogênica para humanos do que conteúdo intestinal, uma vez que a ocorrência da bactéria nas fezes é reduzida no momento do abate.

Em comparação aos resultados apresentados, BONARDI et al. (2003) obtiveram uma menor frequência de isolamento de *Y. enterocolitica* em tonsilas (14,7%) e também não a encontraram em carcaças.

Resultados semelhantes foram obtidos por BOER & NOUWS (1991), que não detectaram *Y. enterocolitica* em amostras de carcaças e a maior frequência de isolamento ocorreu em amostras de tonsilas seguida por amostras de língua. Em uma porcentagem superior, detectaram a bactéria em 42% das tonsilas, em 20% das amostras de língua e em 17% das amostras de conteúdo retal.

GÜRTLER et al. (2005) também obtiveram uma frequência de isolamento de *Y. enterocolitica* maior que no presente estudo, 38,4% de tonsilas positivas, 0,3% de superfície de carcaça e frequência semelhante ao presente estudo em linfonodos mesentéricos, 3,8%. Em porcentagem de isolamento superior, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2000), na Alemanha, obtiveram 60% de positividade em tonsilas.

Embora não tenha sido detectada *Y. enterocolitica* em nenhuma das 25 amostras de carcaça por meio da técnica microbiológica convencional, não se deve descartar a possibilidade de contaminação cruzada durante os procedimentos que apresentam elevado risco de disseminação da bactéria para outras partes da carcaça, como a evisceração, retirada da faringe e

cabeça, serragem das carcaças e inspeção de língua, linfonodos mesentéricos e submandibulares (EUROPEAN COMMISSION, 1995; MULLER et al., 1997; NESBAKKEN et al., 2003; BONARDI et al., 2003; JOURDAN et al., 2009).

Considerando a característica psicrotrófica da *Y. enterocolitica* e que todas as etapas posteriores ao abate serão realizadas sob refrigeração e/ou congelamento, a baixa temperatura pode ser um fator seletivo, que inibe a multiplicação da maioria das enterobactérias, mas pode favorecer a multiplicação de *Y. enterocolitica* em detrimento das demais que possam estar presentes.

Na primeira e na quinta coleta, *Y. enterocolitica* não foi isolada nas amostras testadas. Na segunda coleta, a bactéria foi identificada apenas na amostra de língua de um animal, correspondendo a 7,1% do total de amostras positivas ou 2,9% das amostras coletas neste dia.

A maior positividade foi obtida na terceira coleta, com a identificação de oito amostras, correspondendo a 57,1% do total de amostras positivas (14) ou 22,9% das amostras coletadas no dia (35). Da mesma maneira, o maior número de animais positivos foi obtido na terceira coleta; de cinco animais coletados, em quatro deles (1,2,3 e 5) foi isolada *Y. enterocolitica* em pelo menos um dos sete pontos coletados, conforme especificado a seguir.

No animal 1, isolou-se a bactéria em amostras de língua e de tonsilas, no animal 2 isolou-se em amostras de língua, tonsilas e faca usada na inspeção, no 3, somente em amostra de linfonodos mesentéricos e no animal 5, em tonsilas e em linfonodos submandibulares.

Pela análise dos diferentes resultados obtidos durante as seis coletas e considerando que o suíno clinicamente saudável carrega e elimina *Yersinia enterocolitica* tanto para o ambiente de criação como para o ambiente do abatedouro, observa-se uma maior frequência de isolamento por lotes, ou seja, em apenas um dia de coleta, foram obtidas oito amostras positivas ou 57,1% do total de amostras positivas, ou ainda, dos cinco animais amostrados neste dia a bactéria foi isolada em quatro deles. Neste sentido, pode-se considerar a possibilidade de que este lote de animais abatidos no dia da terceira coleta, provavelmente seria de animais portadores de *Y. enterocolitica*, que se infectaram em alguma etapa anterior ao abate.

A confirmação da presença da bactéria em criações de suínos, também pode ser realizada pela titulação de anticorpos específicos para *Y. enterocolitica*, sendo, dessa maneira, utilizada como uma ferramenta para melhoria de práticas de manejo objetivando a eliminação do patógeno (NOWAK et al., 2006; GURTLE et al., 2005).

JOHANNESSEN et al. (2000) obtiveram 15,2% de positividade para *Y. enterocolitica* O:3 em suínos de cinco abatedouros. Esses mesmos autores ressaltam a importância de se minimizar o contato entre animais de lotes infectados de não-infectados.

Analisando criações de suínos livres de *Y. enterocolitica* desde 1996, NESBAKKEN et al. (2009) destacam a importância da implantação de práticas de manejo que visem a eliminação deste agente zoonótico das criações como um importante passo para a redução de yersiniose humana.

Como forma de incentivar produtores a implantarem um programa sanitário que vise a produção de suínos livres de *Y. enterocolitica*, NESBAKKEN et al. (2003) sugerem que seja pago pela indústria um pequeno diferencial aos lotes de animais livres de *Y. enterocolitica*, justamente pelo destino da carcaça desses animais. Estes mesmos autores sugerem que as carcaças provenientes de animais livres de *Y. enterocolitica* sejam utilizadas para a produção de cortes de carne suína *in natura* e as carcaças de animais portadores sejam destinadas a produtos termicamente tratados, como, por exemplo, embutidos cozidos. Este procedimento seria uma forma de reduzir ao máximo o risco da bactéria chegar até a casa do consumidor final, onde, de acordo com GRAHEK-OGDEN et al. (2007) ocorre a maioria das infecções por consumo de carne mal cozida ou por contaminação cruzada com outros alimentos durante a manipulação.

Ainda na Tabela 1, observa-se que na terceira coleta a bactéria foi isolada a partir de um mesmo animal (de número 2) em língua, tonsilas e na lâmina de faca que foi utilizada para a sua inspeção e na sexta coleta, apenas na lâmina de faca, ou seja, a bactéria não foi detectada em nenhum outro ponto do mesmo animal (de número 1). Analisando esses resultados, deve-se considerar a faca utilizada pela inspeção um importante fômite para a disseminação de *Y. enterocolitica* para a carcaça do próprio animal carreador

como para outras carcaças, de animais não portadores, por contaminação cruzada.

De acordo com BORCH et al. (1996), para reduzir a disseminação de *Y. enterocolitica* deve-se priorizar medidas de controle e identificação de pontos críticos de controle considerando todas as etapas do abate, mas principalmente, remoção dos intestinos, excisão da língua, faringe e tonsilas, procedimentos de inspeção *post mortem* e desossa da cabeça.

NESBAKKEN et al. (2003) afirmam que a incisão de regiões contaminadas por *Y. enterocolitica*, como linfonodos submandibulares e mesentéricos, a incisão accidental de estômago, íleo e ceco, assim como a simples contaminação por manipulação da região dos rins representam risco de contaminação cruzada de *Y. enterocolitica* para outras partes da carcaça. No presente estudo observou-se que em algumas das regiões de risco citadas acima foram isoladas a bactéria, como em linfonodos submandibulares e mesentéricos, representando, assim, possibilidade de contaminação para carcaças pelo próprio procedimento de inspeção

Segundo NSCFS (2007) a maneira mais efetiva de se limitar a contaminação cruzada dessa área para as demais seria a prévia retirada da cabeça, tão logo quanto possível, em uma linha separada. Além do mais, sugere que a incisão do linfonodo submaxilar seja evitado, afim de reduzir a possibilidade de disseminação da bactéria.

Na Tabela 2 encontra-se o resultado do número e da porcentagem de amostras positivas para *Y. enterocolitica* em relação à amostragem total, assim como a distribuição dos pontos amostrais em que a bactéria foi isolada divididos por coleta e animal por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.

Observa-se que, das 175 amostras analisadas, foram obtidos resultados positivos para *Y. enterocolitica* em 4,6% (8/175) da amostragem total, pela evidência da amplificação de um fragmento de DNA a partir da utilização de um oligonucleotídeo iniciador específico para a espécie *Y. enterocolitica* (Figura 2).

Analizando por ponto amostral, entre os sete pontos coletados (L, T, LS, LM, SC, SR E SF) o de maior frequência de produtos da PCR foi observada em amostras de língua, carcaça e de faca, com dois produtos de cada um desses pontos, seguidos por linfonodos mesentéricos e de reto, com um produto de

cada ponto. A partir de amostras de tonsilas e de linfonodos submandibulares não foram obtidos produtos da PCR em nenhuma das coletas.

Tabela 2. Número e porcentagem de amostras de língua, tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos e de suabes de carcaça e de reto de suínos abatidos e de superfície de lâminas de faca utilizadas na inspeção, positivas para *Yersinia enterocolitica* por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

coleta	n ¹	L*	T	LS	LM	SC	SR	SF	n+ ²	%n+ ³	%n+ ^{c4}
número do animal positivo											
1 ^a	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ^a	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 ^a	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 ^a	35	5	-	-	-	3	-	3,4	4	2,3	11,4
5 ^a	35	5	-	-	2	-	5	-	3	1,7	8,6
6 ^a	14	-	-	-	-	1	-	-	1	0,6	7,1
Total	175	2	-	-	1	2	1	2	8	4,6	-

¹n – número de amostras

²n+ – número de amostras positivas

³%n+ – porcentagem de amostras positivas

⁴%n+/coleta – porcentagem de amostras positivas na coleta

*L – língua

T – tonsilas

LS – linfonodo submandibular

LM – linfonodo mesentérico

SC – suabe de carcaça

SR – suabe de reto

SF – suabe de faca

Considerando que foram coletadas 25 amostras para cada um dos sete pontos amostrais, *Yersinia enterocolitica* foi detectada em 8% (2/25) das línguas, carcaças e facas e em 4% (1/25) de linfonodos mesentéricos e reto.

Em relação ao número total de amostras positivas (8), língua, carcaça e faca corresponderam, cada uma, por 25% (2/8) deste total e as amostras de linfonodos mesentéricos e de reto por 12,5% (1/8), cada uma.

Em maior frequência, TEODORO et al. (2004) detectaram *Y. enterocolitica* em 43% das tonsilas e em 40% das carcaças de suínos analisadas.

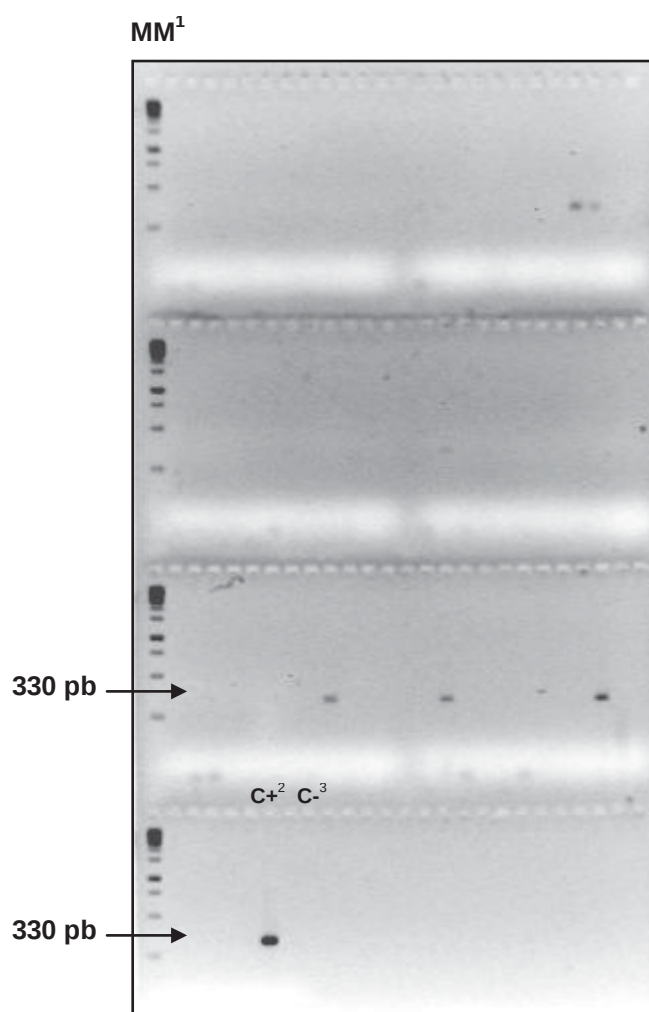


Figura 2 - Produto da PCR em gel de eletroforese de amostras de suínos coletadas em abatedouro. A amplificação de um fragmento de DNA de 330 pares de base a partir do oligonucleotídeo iniciador *16SrRNA*, específico para a espécie *Y. enterocolitica* caracteriza as amostras positivas

¹MM – marcador molecular de 1 kb

²C+ – controle positivo (cepa *Yersinia enterocolitica* ATTCC 9610)

³C- – controle negativo (água)

Não foram identificadas amostras positivas na primeira, segunda e terceira coletas. O maior número de amostras positivas foi obtido na quarta coleta, com a identificação da bactéria na carcaça e na amostra de faca do animal 3, também na faca utilizada no animal 4 e na língua do animal 5.

Na quarta coleta, a bactéria foi identificada na carcaça do animal 3, nas facas utilizadas na inspeção dos animais 3 e 4 e também na língua do animal 5. Na sexta coleta, somente a amostra de carcaça do animal 1 foi positiva, não sendo identificada em nenhum outro ponto amostral deste animal.

Pela avaliação do total de animais positivos por ponto amostral utilizando a técnica microbiológica convencional, o ponto de maior frequência de isolamento de *Y. enterocolitica* foram as tonsilas (Tabela 1), já pela técnica de PCR (Tabela 2), os pontos de maior frequência foram os suabes de língua, carcaças e faca.

A partir do segundo par de oligonucleotídeo iniciador, específico para o gene *ail*, não foi obtido produto da PCR em nenhuma das amostras testadas. Também foi observado que não houve evidência da amplificação do fragmento de DNA a partir da cepa de referência ATCC 9610, fornecida pelo Instituto Oswaldo Cruz.

Embora o gene cromossômico *ail* esteja presente somente em cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas (MILLER et al., 1989) e tenha sido detectado em estudos anteriores, como por exemplo, o de FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2007) que encontraram em 88% de carne suína fresca, o de TEODORO (2004) em 10% de tonsilas de suínos e o de BADHURI et al. (2005) em 13,10% das amostras de fezes de suínos, outros genes cromossômicos ou plasmidiais podem estar presentes.

Segundo SULAKVELIDZE (2001) várias espécies de *Yersinia* sp. consideradas não patogênicas justamente por não apresentarem os marcadores clássicos de virulência, entre os quais o *ail*, já foram isoladas a partir de humanos doentes, aumentando o questionamento sobre os fatores relacionados a virulência. Da mesma maneira, de acordo com ZHENG et al. (2008) nem todas *Y. enterocolitica* patogênicas necessariamente carregam todos os genes cromossômicos e/ou plasmidiais tradicionais de patogenicidade. Há possibilidade de que marcadores ainda desconhecidos interajam entre si e desempenhem um importante papel na patogenia da doença.

Os mesmos autores, a partir de 2.600 isolados de *Y. enterocolitica* de pacientes clínicos com diarreia, observaram uma taxa de positividade para genes de patogenicidade de 100% para o gene *inv*, 94% para o gene *ail*, 93%

para o gene *ystA*, 7,5% para o gene *ystB*, 5% para *ystC*, 89% para *yadA* e 82% para o gene *virF*.

A partir de 16 isolados de *Y. enterocolitica* de suínos, LEAL et al. (1997) detectaram a presença do gene *ail* em 14 deles, do gene *irp2* em 1 e do gene *psaA* em nenhum.

Apesar que não ter-se obtido isolados de *Y. enterocolitica* positivos para o gene *ail*, não se pode afirmar que sejam isolados de *Y. enterocolitica* não patogênicos.

Na Tabela 3 estão inseridos os resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. realizada nas mesmas amostras em que se pesquisou *Y. enterocolitica*.

Tabela 3. Número e porcentagem de amostras de língua, tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos e de suabes de carcaça e de reto de suínos abatidos e de superfície de lâminas de faca utilizadas na inspeção, positivas para *Salmonella* spp. por meio da técnica microbiológica convencional de isolamento.

Coleta	n ¹	L*	T	LS	LM	SC	SR	SF	n+ ²	%n+ ³	%n+ ^{c4}
Número do animal positivo											
1 ^a	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ^a	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 ^a	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 ^a	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 ^a	35	1	-	-	-	-	-	-	1	0,6	2,9
6 ^a	14	1	-	-	-	-	-	-	1	0,6	7,1
Total	175	2	-	-	-	-	-	-	2	1,2	-

¹ n – número de amostras

² n+ – número de amostras positivas

³ %n+ – porcentagem de amostras positivas

⁴ %n+^c – porcentagem de amostras positivas na coleta

*L – língua

T – tonsilas

LS – linfonodo submandibular

LM – linfonodo mesentérico

SC – suabe de carcaça

SR – suabe de reto

SF – suabe de faca

Nas quatro primeiras coletas, não foi isolada *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras. Na quinta coleta, de cinco animais amostrados na oportunidade, foi identificada a bactéria na língua de um animal, correspondendo a 20% das amostras de língua desta coleta e na sexta, de dois animais amostrados, a bactéria foi identificada também na língua de um destes, correspondendo a 50% do total desta coleta.

De acordo com os resultados da sorotipagem, o mesmo sorotipo foi obtido nos dois isolados, *Salmonella* Anatum. Assim como no presente estudo, outros autores também identificaram, entre diversos outros estudos, o mesmo sorotipo S. Anatum. MATSUBARA (2005) e CHEN et al. (2006) em carcaças de suínos, VINDIGNI et al. (2007), na Tailândia, em carne suína proveniente de feiras-livres, WANG et al. (2010) em conteúdo intestinal e SPOLAORE (2007), no oeste do Paraná, em facas utilizadas em abatedouros de suínos sob inspeção federal.

Das 175 amostras coletadas a partir de 25 animais abatidos, isolou-se *Salmonella* spp. em 2 animais, ambos em amostra de língua. Em relação à amostragem total, a prevalência de *Salmonella* spp. em amostras de línguas foi de 1,14% (2/175) e em relação ao número de amostras de animais ou ao número de amostras de línguas, foi obtida uma prevalência de 8% (2/25). Se comparado somente ao número de amostras de línguas, estudos encontraram resultados semelhantes ao obtido.

Na Alemanha, MEYER (2010) detectou uma prevalência de 5,0% de amostras de língua de suínos positivas para *Salmonella* spp. e na Holanda, SWANENBURG et al. (2001a) obtiveram resultado positivos em 9,3% das amostras.

O isolamento de *Salmonella* spp. em língua sugere que esta seja uma via de contaminação cruzada para outras regiões da carcaça durante o abate, podendo além disso ser uma fonte de doença de origem alimentar se não for manipulada e cozida adequadamente.

Segundo LÁZARO et al. (1997) existe uma grande variação nas prevalências de *Salmonella* spp. detectadas em linfonodos mesentéricos de suínos no momento do abate, o que pode estar relacionado a possíveis diferenças nos índices de portadores dos lotes devido ao tipo de exploração e fatores regionais, bem como a diferença nas metodologias utilizadas nos

diferentes estudos. A presença de *Salmonella* spp. em linfonodos mesentéricos é importante pelo fato de que estas estruturas representam barreiras imunológicas que previnem a migração deste microrganismo do intestino para outros locais .

Apesar de não ter sido isolada *Salmonella* spp. em nenhuma amostra de linfonodos mesentéricos, estudos prévios descrevem a presença da bactéria nessas estruturas.

BESSA et al. (2004) determinaram a prevalência de *Salmonella* spp. de 17,6% em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos no Rio Grande do Sul, BERSOT (2005), no oeste do Estado do Paraná encontrou 20% de positividade, CASTAGNA et al. (2004) isolaram *Salmonella* spp. em 61% das amostras e SWANENBURG et al. (2001a), na Holanda, detectaram 9,3% de positividade de *Salmonella* em linfonodos mesentéricos de suínos.

Segundo BAHNSON et al. (2005) a prevalência do agente em linfonodos mesentéricos pode ser considerada importante ferramenta preditiva da incidência em amostras fecais, afirmação que vem de acordo com os resultados obtidos, tanto para as amostras de linfonodos mesentéricos como para as amostras de reto, uma vez que não foi isolada *Salmonella* spp. em nenhuma dessas amostras citadas.

Embora a bactéria não tenha sido detectada nas amostras de conteúdo intestinal, a mesma já foi isolada em diferentes porcentagens. Resultados positivos para *Salmonella* spp. em amostras de conteúdo intestinal de suínos foram observados por LAUKANNEN et al. (2009) em uma prevalência de 37%, BESSA et al. (2001) com 55,6% de amostras positivas, além de BONARDI et al. (2003) com uma prevalência de 36,7% e também SWANENBURG et al. (2001) com 25,6% de amostras positivas.

Apesar de não ter sido isolada *Salmonella* spp. em amostras de tonsilas ou de linfonodos submandibulares, deve-se considerar estudos prévios que indicam a possibilidade da presença da bactéria em questão nessas estruturas, representando risco para o consumidor final. Segundo CASTAGNA et al (2004) as tonsilas e linfonodos submandibulares não são produtos comercializados diretamente ao consumidor, entretanto, permanecem na carcaça após o abate e, juntamente com músculos da região da cabeça, são empregados na fabricação de embutidos e carne mecanicamente separada. Caso estejam

contaminados, esses ingredientes podem ser diretamente responsáveis pela presença de *Salmonella* spp. em produtos finais.

Segundo BERENDS et al. (1997), SWANENBURG (2001a), SWANENBURG (2001b), ALBAN & STARK (2005) e MEYER (2010), enquanto houver animais portadores de *Salmonella* spp. haverá o risco de contaminação de carcaças. Muito embora o suíno seja o principal carreador de *Salmonella* spp. para o ambiente de abate e para as carcaças, o fator determinante para a obtenção de carcaças livres de contaminação é a higiene com que as operações de abate são conduzidas (BOTTELDOORN et al., 2003), uma vez que representam potencial risco de disseminação do agente para o ambiente do abatedouro e várias oportunidades de contaminação cruzada para as carcaças.

Na Tabela 4 estão apresentados os padrões de resistência e sensibilidade dos isolados de *Yersinia enterocolitica* frente aos antimicrobianos testados.

Tabela 4. Número e porcentagem de resistência e sensibilidade a 13 antimicrobianos apresentados pelos isolados de *Yersinia enterocolitica* em amostras colhidas em matadouro-frigorífico de suínos.

Antimicrobiano	µg/disco	Amostras			
		Resistentes		Sensíveis	
		Nº	(%)	Nº	(%)
Amicacina	30	10	71,4	4	28,6
Amoxicilina +	20	14	100	0	0
Clavulanato	10				
Ampicilina	10	14	100	0	0
Cefalotina	30	14	100	0	0
Cefepime	30	0	0	14	100
Cefoxitina	30	1	7,2	13	92,8
Ceftazidima	30	12	85,7	2	14,3
Cefuroxima	30	13	92,9	1	7,1
Ciprofloxacina	5	11	78,6	3	21,4
Gentamicina	10	10	71,4	4	28,6
Imipenem	10	14	100	0	0
Meropenem	10	0	0	14	100
Sulfametoxazol+	23,75	11	78,6	3	21,4
Trimetoprim	1,25				

Todos os isolados de *Yersinia enterocolitica* apresentaram resistência à associação de amoxicilina+clavulanato, ampicilina, cefalotina e imipenem, 13 (92,9%) isolados foram resistentes à cefuroxima, 12 (85,7%) isolados à ceftazidima, 11 (78,6%) isolados à ciprofloxacina e à associação de sulfametoxazol+trimetopim e 10 (71,4%) isolados à amicacina e gentamicina. Apenas 1 isolado apresentou resistência à cefoxitima e nenhum isolado se mostrou resistente ao cefepime e ao meropenem, eleitos os princípios ativos de maior eficácia para os isolados.

Y. enterocolitica é resistente aos princípios ativos igrasan, cefsulodin, ticarcilina e novobiocina (ISO, 2003) os quais foram utilizados como agentes seletivos para o isolamento e/ou enriquecimento dessa bactéria, não sendo, portanto, utilizados para determinação do perfil de resistência e sensibilidade

Do total de 14 amostras testadas, 11 (78,6%) foram resistentes à ciprofloxacina, um agente antimicrobiano de grande importância terapêutica e amplamente utilizado. Diferentemente dos resultados obtidos, SIMONOVA et al. (2008) obtiveram as maiores porcentagens de sensibilidade de *Y. enterocolitica* isoladas de tonsilas, conteúdo retal, línguas e superfície da pele de suínos à gentamicina e à ciprofloxacina, assim como KWAGA et al. (1992), JIMÉNEZ-VALERA et al. (1998), BAUMGARTNER et al. (2007) e OKWORI et al. (2009), os quais observaram elevada sensibilidade de isolados de *Y. enterocolitica* a ciprofloxacina.

Da mesma maneira, em determinação de resistência realizada a partir de 58 isolados de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 de pacientes clínicos, foi observada que todos foram sensíveis a ciprofloxacina (NSCFS, 2007).

Semelhante ao resultado apresentado para resistência dos isolados à ampicilina (100%), LEAL et al. (1997) analisaram o perfil de 16 isolados de *Y. enterocolitica* de suínos, sendo a maioria deles resistentes à ampicilina. Foram ainda, suscetíveis ao sulfazotrim e à cefoxitina e apresentaram perfis de sensibilidade para cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, gentamicina e ácido nalidíxico.

Segundo NSCFS (2007) a sensibilidade reduzida de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 a ampicilina é considerada um fator de resistência intrínseco, incorporado ao material genético da bactéria.

Resistência dos isolados à cefalotina (100%) também foi obtida por DALLAL et al. (2010), com 98% de *Y. enterocolitica* resistentes. Em menor porcentagem do que os resultados apresentados no presente estudo, os isolados mostraram-se resistentes à ampicilina (52%).

Segundo STOLK-ENGELAAR (1995) o tratamento de crianças com sulfametoxazol+trimetoprim pode prevenir algumas complicações da infecção por *Y. enterocolitica*, como pseudoapendicite, adenite mesentérica entre outras, entretanto, neste estudo, a sensibilidade dos isolados frente a associação de sulfametoxazol+trimetoprim se mostrou reduzida, apenas 3 dos 14 isolados (21,4%) foram sensíveis a este princípio ativo.

Na Tabela 5 estão o número e a porcentagem dos isolados em relação à quantidade de antimicrobianos aos quais foram resistentes.

Tabela 5. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Yersinia enterocolitica* isoladas de amostras colhidas em matadouro-frigorífico de suínos

Antimicrobiano Nº	Testados	Nº de Isolados resistentes (%)
≤5	14	0 (0)
6	14	1(7,1)
7	14	0 (0)
8	14	2 (14,3)
9	14	9 (64,3)
10	14	2 (14,3)

Pode-se observar que os isolados apresentaram resistência a, pelo menos, seis princípios ativos, revelando, assim, um caráter de multirresistência. Observa-se que 1 (7,1%) isolado mostrou-se resistente a seis princípios ativos, 2 (14,3%) isolados a oito e a dez princípios. A maior porcentagem dos isolados (64,3%) foi resistente a nove princípios ativos. Nenhum isolado desenvolveu resistência a cinco e a sete princípios ativos.

DALLAL et al. (2010) obtiveram uma porcentagem de 23% de isolados resistentes a mais de 3 princípios ativos, porcentagem inferior se comparado aos resultados apresentados, onde nenhum dos 14 isolados testados foi resistente a 5 princípios ativos ou menos.

Na Tabela 6 estão apresentados os padrões de resistência e sensibilidade dos isolados de *Salmonella* Anatum.

Tabela 6. Número e porcentagem de resistência e sensibilidade a 17 antimicrobianos apresentados pelos isolados de *Salmonella* Anatum em amostras colhidas em matadouro-frigorífico de suínos.

Antimicrobiano	µg/disco	Amostras			
		Resistentes		Sensíveis	
		Nº	(%)	Nº	(%)
Amicacina	30	0	0	2	100
Amoxicilina +	20	0	0	2	100
Clavulanato	10				
Ampicilina	10	0	0	2	100
Cefalotina	30	0	0	2	100
Cefepime	30	0	0	2	100
Cefoxitina	30	0	0	2	100
Ceftazidima	30	0	0	2	100
Cefuroxima	30	0	0	2	100
Ciprofloxacina	5	0	0	2	100
Gentamicina	10	0	0	2	100
Imipenem	10	1	50	1	50
Meropenem	10	2	100	0	0
Sulfametoxazol+	23,75	0	0	2	100
Trimetoprim	1,25				
Cloranfenicol	30	0	0	2	100
Oxitetraciclina	30	2	100	0	0
Eritromicina	15	2	100	0	0
Tetraciclina	30	0	0	2	100

Todos os isolados pertencentes ao sorovar *S. Anatum* foram resistentes aos antimicrobianos meropenem, oxitetraciclina e eritromicina. Do total de 2 cultivos isolados, 1 apresentou resistência ao ipinemem.

Não foram encontrados isolados resistentes à amicacina, amoxilina+clavulatanato, ampicilina, cefalotina, cefepime, cefoxitina, ceftazidima, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametazol+trimetoprim, cloranfenicol e tetraciclina

Diferentemente dos resultados apresentados por MATSUBARA (2005), que obtiveram isolados de *Salmonella* Anatum em carcaças de suínos no Estado de São Paulo, resistentes à cefalotina, no presente estudo, os isolados

mostraram-se sensíveis à cefalotina. CHEN et al. (2004) observaram eficácia reduzida de cefalotina, gentamicina e trimetoprim a *Salmonella* Anatum, além de 17 e 23% de resistência a ciprofloxacina e enrofloxacin.

Por outro lado, CHEN et al. (2006) obtiveram alta sensibilidade de *Salmonella* Anatum isoladas a partir de amostras de carcaças de suínos a cefalotina.

CASTAGNA et al. (2001), em *Salmonella* spp. isoladas a partir de amostras de linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal de suínos observaram resistência para sulfonamida (83,9%), tetraciclina (37,4%), ampicilina (20,2%), cloranfenicol (16,1%), amicacina (3,0%), gentamicina (2,0%) e ciprofloxacina (1,0%).

GEBREYES et al. (2006) encontraram maior percentual de resistência à tetraciclina (80%) seguida pela estreptomicina (43,4%) para os isolados de *Salmonella* spp. testados.

A Tabela 7 mostra o número e a porcentagem dos isolados em relação à quantidade de antimicrobianos aos quais foram resistentes.

Entre os 2 isolados de *Salmonella* Anatum, todos apresentaram-se resistentes a 3 antimicrobianos e 1 (50%) isolado foi resistente a 4 antimicrobianos testados, evidenciando um caráter de multirresistência.

Tabela 7. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* Anatum isoladas de amostras colhidas em matadouro-frigorífico de suínos

Antimicrobiano	Nº de Isolados	
	Nº Testados	resistentes (%)
≤2	2	0 (0)
3	2	2 (100)
4	2	1 (50)

MURMAN et al. (2008) em pesquisa de *Salmonella* spp. em linguiça fresca suína encontrou resistência de 85,9% dos isolados a mais de um antibiótico e TESSMAN et al. (2008), no Rio Grande do Sul, observaram que

39,1% dos isolados de *Salmonella* spp. a partir de cortes de carne suína apresentaram-se multirresistentes a três ou mais antibióticos.

Avaliando o perfil de resistência de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de diversas fases da cadeia produtiva de suínos, BERSOT (2005), detectou 93,7% das cepas resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 62,9% resistentes a mais de uma substância testada.

Já FARRINGTON et al. (2001), avaliando o perfil de resistência de cepas de *Salmonella* spp. em suínos em idade de abate, constataram que 100% das cepas foram resistentes a um ou mais antibióticos, sendo que 48,8% delas foram consideradas multirresistentes.

De acordo com CARRAMINANA et al. (2004), a origem do isolado também pode influenciar sua suscetibilidade aos antimicrobianos. A utilização de alguns antimicrobianos no tratamento, profilaxia ou como promotor de crescimento podem ser fatores que aumentam a resistência dos isolados.

No presente estudo, as informações fornecidas do perfil de resistência e sensibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos testados pode ser de grande valia para a saúde pública. Considerando que a maioria dos estudos que fornecem informações, principalmente sobre *Y. enterocolitica*, e que foram utilizados nesta revisão foram conduzidos em outros países ou, até mesmo, em outro continente, se faz relevante os resultados aqui obtidos.

6 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, é possível concluir que:

- o *Yersinia enterocolitica* foi detectada na linha de abate de suínos por meio de técnica microbiológica convencional e também por meio de técnica de reação em cadeia da polimerase. A maior prevalência foi evidenciada em amostras de tonsilas pela técnica convencional e em amostras de línguas, carcaças e de facas pela técnica de PCR.
- o Pela técnica convencional não foi isolada *Y. enterocolitica* em linfonodos mesentéricos e em amostras de reto e por PCR, em amostras de tonsilas e de linfonodos submandibulares.
- o A detecção de *Y. enterocolitica* em faca, a ressalta como importante fômite para a disseminação do agente para a carcaça do próprio animal portador, como também para outras carcaças, sendo, portanto, fundamental que a cada animal, a faca seja esterilizada.
- o *Salmonella* Anatum foi isolada apenas em amostra de língua de dois animais em dias diferentes de coleta, não sendo, portanto, provenientes do mesmo lote de animais abatidos.
- o Considerando a detecção de *Y. enterocolitica* em línguas, tonsilas, linfonodos submandibulares, entre outros pontos amostrais, e *Salmonella* Anatum em língua, pode-se concluir que a cabeça do suíno deve ser considerada uma região de risco para a disseminação desses agentes.
- o O teste de suscetibilidade antimicrobiana revelou perfil de multirresistência dos isolados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A interação do elevado consumo de carne suína e derivados da carne suína pela população mundial, juntamente com concomitante identificação de

Y. enterocolitica e/ou *Salmonella* spp. em carnes e produtos suínos, assim como em materiais clínicos de pacientes acometidos por yersiniose e/ou salmonelose justifica a importância da prevenção da contaminação de carcaças por esses patógenos no matadouro-frigorífico como forma de contribuir para a saúde pública.

A impossibilidade de identificar suínos portadores de *Y. enterocolitica* ou *Salmonella* spp. durante os procedimentos de inspeção, sejam eles *ante mortem* ou *post mortem*, ressalta a importância de conduzir os procedimentos de abate e a inspeção de forma a prevenir a contaminação cruzada das regiões de maior risco de estarem colonizadas por esses patógenos para outras regiões da carcaça, seja por facas, por equipamentos ou pelas mãos dos funcionários.

Os resultados obtidos tanto para *Y. enterocolitica*, quanto para *Salmonella* spp. destacam a região da cabeça do suíno, especialmente língua, tonsilas e linfonodos, como potenciais disseminadores, principalmente de *Yersinia enterocolitica*. Além da adoção de práticas de higiene durante as operações de abate, algumas adaptações nos procedimentos de inspeção poderiam contribuir para minimizar o risco de contaminação cruzada por esses patógenos.

No presente estudo, a identificação de *Y. enterocolitica* em regiões de risco, representa possibilidade de contaminação para carcaças pelo próprio procedimento de inspeção. A prévia retirada da cabeça, inspecionando-a em uma linha separadamente da carcaça, poderia reduzir o risco de disseminação do agente para carcaças, facas e para equipamentos.

A adoção de medidas de controle e identificação de pontos críticos de controle voltados principalmente para a remoção dos intestinos, excisão da língua, faringe e tonsilas, para os procedimentos de inspeção *post mortem* e desossa da cabeça devem ser considerados importantes fatores para a presença da bactéria em produtos finais de suínos.

Apesar da evidente diferença dos resultados obtidos no presente estudo entre os dois métodos de detecção de *Y. enterocolitica*, nenhum dos dois resultados pode ser descartado. A imensa variedade de protocolos existentes para a detecção de uma mesma bactéria pode indicar que ainda não foi desenvolvido nenhum método realmente sensível o suficiente a ponto de se

tornar o padrão metodológico. Há necessidade de se desenvolver meios de cultura e técnicas baseadas no DNA padronizadas, com melhor sensibilidade para a detecção de *Y. enterocolitica* em amostras clínicas, ambientais e de alimentos.

Cabe ainda, considerar o relacionamento direto da presença destes patógenos em matadouro-frigorífico ao sistema de criação, uma vez que suíno é o próprio carreador tanto de *Y. enterocolitica* como de *Salmonella* Anatum, ressaltando a necessidade do desenvolvimento de práticas de manejo que visem criações livres desses patógenos e, ainda, contribuir para o desenvolvimento de estratégias de manejo de risco.

A identificação de isolados multirresistentes a mais de 5 antimicrobianos testados, pode não ser surpresa para os isolados de *Salmonella* spp., que ao longo dos anos conseguiu incorporar ao seu genótipo resistência a diversos princípios ativos. Entretanto, o perfil de multirresistência a 9 princípios ativos, demonstrados pelos isolados de *Y. enterocolitica*, revela a existência de um problema para a saúde pública. Mais relevante ainda, quando os pacientes em questão são crianças, as mais suscetíveis a infecção por *Y. enterocolitica*, como observado na revisão deste estudo.

8 REFERÊNCIAS³

AARTS, H.J.M.; JOOSTEN, R.G.; HEINKENS, M.H.C.; STEGEMAN, H.; VAN HOEK, A.H.A.M. Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. **Journal of Microbiology Methods**, Ames, v.47, n.2, p.209-217, 2001.

ABIPECS. **Exportações brasileiras de carne suína.** Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-externo/exportacoes/anuais/jan-jun-2010_jan-jun-2009.pdf>. Acesso em: 15 de agosto de 2010 às 22:45h.

ABIPECS. **Setor de carne suína cresce em janeiro após crise em 2008.** 2009. Disponível em: < <http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em: 25 de junho de 2009 às 15:40h.

ACKERS M.L., SCHOENFELD S., MARKMAN J., SMITH M.G., NICHOLSON M.A., DEWITT W., CAMERON D.N., GRIFFIN P.M., SLUTSKER L. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. **Journal of Infection Diseases**, Chicago, v.181, n.5, p.1834-7, 2000.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos.** Zaragoza: Acribia S.A., 1995. 464p.

AGÊNCIA BRASIL. Disponível em: <<http://www.suino.com.br/MercadoNoticia.aspx?codigoNot=82IXZwhHy8s=>>> Acesso em: 27 de novembro de 2008 às 13:15h.

ALBAN, L.; STÄRK, K.D.C. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? **Preventive Veterinary Medicine**, Ames, v. 68, n.1, p.63-79, 2005. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.01.001

ALEKSIC, S. & BOCKEMÜHL, J. *Yersinia* and other Enterobacteriaceae. In Manual of Clinical Microbiology, 7th ed., p.483–496. Edited by K. V. Forrest, J. H. Jorgensen, & P. R. Murray. Washington, DC: **American Society for Microbiology**. 1999.

ANDERSEN, J.K.; SAUNDERS, N.A. Epidemiological typing of *Yersinia enterocolitica* by analysis of restriction fragment length polymorphisms with a cloned ribosomal RNA gene. **Journal of Medical Microbiology**, Spencers Wood, v.32, p.179-187, 1990.

ANGULO, F.J., NUNNERY, J.A., BAIR, H.D. Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. **Scientific and Technical Review - International Office of Epizootics**, Atlanta, v. 23, n. 2, p.01-08, 2004. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborne/publications/23_anguloPaloma.pdf>. Acesso em: 21 setembro 2010.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, 2001.

BAHNSON, P.B.; KIM, J.; WEIGEL, R.M.; MILLER, G.Y.; TROUTT, H.F. Associations between on-farm and slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight pigs. **Journal Food Protection**, Ames, v.68, n.2, p.246-250, 2005.

BAPTISTA, F.M.; DAHL, J.; NIELSEN, L.R. Factors influencing *Salmonella* carcass prevalence in Danish pig abattoirs. **Preventive Veterinary Medicine**, Ames, v.95, n.3-4, p.231-238, 2010. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.04.007

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**, Santa Maria, v. 31, n.2, p. 303-307, 2001.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, p. 493-496, 1966.

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**, Amsterdam, v.5, p. 110-114, 2007.

BERAN, G.W., Report on *Salmonella* studies of the food safety consortium. Proceedings of the First International Symposium on the Ecology of *Salmonella* in Pork Production. **National Animal Disease Center**, Ames, Iowa, USA, March 11-13, p.50-56, 1996.

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

BERSOT, L.S. **Disseminação de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo. 2005. 90p.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalence of *Salmonella* sp. in slaughtered pigs in Rio Grande do Sul. In: PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4., 2001, Leipzig. *Anais...* Leipzig: University of Leipzig, 2001. p.189-191.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, p.80-84, 2004.

BHADURI, S.; WESLEY, I.V.; BUSH, E.J. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in pigs in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n.11, v.71, p.7117-7121, 2005. doi:10.1128/AEM.71.11.7117-7121.2005

BOCKEMÜHL, J. & WONG, J.D. *Yersinia*. In: Murray PC. Et. Al. (eds.). Manual of clinical microbiology. 8th.ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. P.672-83

BOER, E.; NOWS, J.F.M. Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, p.375-378, 1991.

BONARDI, S.; PARIS, A.; BACCI, C.; D'INCAU, M.; FERRONI, L.; BRINDANI, F. Detection and characterization of *Yersinia enterocolitica* from pigs and cattle. **Veterinary Research Communications**, Oxford, v.1, p.347-50, 2007.

BONARDI, S.; BRINDANI, F.; PIZZIN, G.; LUCIDI, L.; D'INCAU, M.; LIEBANA, E.; MORABITO, S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.85, p.101– 110, 2003.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.30, n.1-2, p. 9-25, 1996.

BOTTELDOORN, N.; HERMAN, L.; RIJPENS, N.; HEYNDRICKX, M. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinton, v. 70, p.5305–5314, 2004.

BOTTELDOORN, N., HEYNDRICKX, M., RIJPENS, N., GRIJSPEERDT, K. AND HERMAN, L. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.95, p.891–903, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02042.x

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Portaria no. 193 de 12/05/1998 - Aprovar o Regulamento Técnico para o licenciamento e a renovação de licença de antimicrobianos de uso veterinário, anexo, elaborado pela Secretaria de Defesa Agropecuária. Publicado no DOU de 13/05/1998, Brasília, DF, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa no. 9 de 27/06/2003 – O Ministro de Estado da Agricultura...RESOLVE: Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Publicado no DOU DE 30/06/2003, seção 1, p.4.

BRUUN, T.; SORENSEN, G.; FORSHELL, L.P.; JENSEN, T.; NYGARD, K.; KAPPERUD, G.; LINDSTEDT, B.A.; BERGLUND, T.; WINGSTRAND, A.; PETERSEN, R.F.; MÜLLER, L.; KJELSO, C.; IVARSSON, S.; HJERTQVIST, M.; LÖFDAHL, S.; ETHELBERG, S. An outbreak of *Salmonella typhimurium* infections in Denmark, Norway and Sweden. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 14, n.10, 2009.

CARRAMINANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTIN, I.; HERRERA; HIGH, A. Prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, Ames, v.104, n.1-2, p.133-139, 2004.

CASTAGNA, S.M.F.; BESSA, M.C.; CARVALHO, D.A.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* sp. isolated from slaughtered pigs in the state of Rio Grande do Sul – Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, UFRGS, v.29, n.1, p.44-49, 2001.

CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARTZ, P.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Presença de *Salmonella* sp. no trato gastrintestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.3, p.300-306, 2004.

CHEN, S.; ZHAO, S.; WHITE, D.G.; SCHROEDER, C.M.; LU, R.; YANG, H.; MCDERMOTT, P.F.; AYERS, S.; MENG, J. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.1, p.1-7, 2004.

CHEN, T.; WANG, YU-CHIH, W.; YI-TSENG, C.; CHIA-HUEI, Y.; KUANG-SHENG, Y. Serotype occurrence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates recovered from pork carcasses in Taiwan (2000 through 2003). **Journal of Food Protection**, Ames, v.69, n.3, p.674-8, 2006.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella* Species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers. **ASM Press**, p.141-178, 2001.

DALLAL, M.M.S.; DOYLE, M.P.; DABIRI, M.R.H; SANAEI, M.; MODARRESI, S.; BAKHTIARI, R.; HARIFIY, K.; TAREMI, M.; ZALI, M.R.; SHARIFI-YAZDI, M.K. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. **Food Control**, Guilford, v.21, n.4, p.388-392, 2010. doi:10.1016/j.foodcont.2009.06.001

DICKSON, J.S.; HURD, H.S.; ROSTAGNO, M.H. *Salmonella* in the Pork Production Chain. **National Pork Board/American Meat Science Association Fact**, Iowa, EUA. 2008.

EFSA. European Food Safety Agency. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. **The EFSA Journal** **94**. 2006.

ETHELBERG, S.; WINGSTRAND, A; JENSEN, T.; SORENSEN, G.; MÜLLER, L.; LISBY, M.; NIELSEN, E.M.; MOLBAK, K. Large outbreaks of *Salmonella typhimurium* infection in Denmark in 2008. **Eurosurveillance**, Stockholm, v.13, n.44, 2008.

EUROPEAN COMMISSION. Council Directive 64/433/EEC on Health Condition for the Production and Marketing of fresh meat. Brussels, Belgium, 34p. 1995.

FALCÃO, D.P. **Estudos sobre as espécies *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis***. [Tese] Araraquara: Faculdade de Farmácia e Odontologia, UNESP, 1976.

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

FALCÃO, J.P.; CORRÊA, E.F.; MARTINS, C.H.G.; FALCÃO, D.P. Panoramic view of the occurrence of *Yersinia* species other than *Y. pestis* in Brazil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.29, n.1, p.01-16. 2008.

FARRINGTON, L.A., HARVEY, R.B., BUCKLEY, S.A., DROLESKEY, R.E., NISBET, D.J., INSKIP, P.D. Prevalence of antimicrobial resistance in salmonellae isolated from market-age swine. **Journal Food Protection**, Ames, v.64, n.10, p.1496-1502, 2001.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Artmed Editora, 2002, p. 65.

FOSSE, J.; SEEGER, H.; MAGRAS, C. Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied pig slaughtering in Europe. **Veterinary Research**, Les Ulis, n.39, p.1-16, 2008.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Ed. Atheneu, p. 33-81, 1996.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; BJÖRKROTH, J.; HIELM, S.; KORKEALA, H. Prevalence and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils from different slaughterhouses. **Food Microbiology**, London, v.17, n.1 p.93-101, 2000.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; HARTMANN, B., SCHEU, P.; STOLLE, A. Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Meat using Real-Time PCR **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.2, n.2, p.202-208, 2007.

FRENZEN, P.D.; BUZBY,J.C.; ROBERTS,T. An updated estimate of the economic costs of human illness due to foodborne *Salmonella* in the United States. In: **Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Washington,DC, p.215-218, 1999.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; MORROW, M. Comparison of prevalence, antimicrobial resistance and occurrence of multidrug – resistant *Salmonella* in antimicrobial – free and conventional pig production. **Journal of Food Protection**, Ames, v.69, n.4, p.743-748, 2006.

GOVERDE, R.L.J. *Yersinia enterocolitica*: genes involved in cold-adaptation. Ph.D. thesis. University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands. 1999.

GRAHEK-OGDEN, D.; SCHIMMER, B.; CUDJOE, K.S.; NYGÅRD, K.; KAPPERUD, G. Outbreak of *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:9 Infection and Processed Pork, Norway. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.13, n.5, 2007.

GÜRTLER, M.; ALTER, T.; KASIMIR, S.; LINNEBUR, M.; FEHLHABER, K. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. **Journal of Food Protection**, Ames, v.68, p. 850–4, 2005.

HARNETT, N.; LIN, Y.P.; KRISHNAN, C. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase chain reaction. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, n.117, p.59–67, 1996.

HOWARD, S. L.; GAUNT, M. W.; HINDS, J.; WITNEY, A.A.; STABLER, R.; WREN, B.W. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, Washington, n. 188, v.10, p.3645–3653, 2006. doi: 10.1128/JB.188.10.3645-3653.2006.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. Microorganismos de los alimentos: su significado y métodos de enumeración. Zaragoza: Acribia, 2000. 439p.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **ISO 10273**. 2003.

JENSEN, A.N.; DALSGAARD, A.; STOCKMARR, A.; NIELSEN, E.M.; BAGGESEN, D.L. Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, p.1833–1842, 2006.

JIMENEZ-VALERA M.; GONZALEZ TC, MORENO E, RUIZ-BRAVO. A comparison of ceftriaxone, amikacin and ciprofloxacin in treatment of experimental *Y. enterocolitica* O:9 infection in mice. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v.11, n.42, p. 3009-3011, 1998.

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**, Amsterdam, v.54, n.1-2, p.75-80, 2000.

JONES, R.C; GERBER, S.I.; FERNANDEZ, J.R.; PATCH, F.; KING, P.; DIAZ. P.S. Emergence of pork carnitas as a cause of foodborne disease outbreaks in chicago. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v.1, n.2, p. 120-124, 2004.

JOURDAN, A.; MARICHAL, M.D.; BYL, L.; WESLEY, I. Detection of *Yersinia* Species in Pig Tonsils by a 5' Nuclease Fluorogenic (TaqMan) Polymerase Chain Reaction Assay Specific for the 16S rRNA Gene. **Food Safety**, Ames. Disponível em: <<http://www.ipic.iastate.edu/reports/01swinereports/asl-1791.pdf>>. Acesso em: 24 de junho de 2009.

KAPPERUD, G. *Yersinia enterocolitica* in Food Hygiene. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, n.1, p. 53-65, 1991.

KHAN, A.A.; MELVIN, C.D.; DAGDAG, E.B. Identification and molecular characterization of *Salmonella* spp. from unpasteurized orange juices and identification of new serotype *Salmonella* strain *S. enterica* serovar Tempe. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 5, p. 539-543, 2007.

KOBAYASHI, H.; HALLA, G.S.; TUOHYA, M.J.; KNOTHEB, U.; PROCOPA, G.W.; BAUERAB, T.W. Bilateral periprosthetic joint infection caused by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, and identification of *Salmonella* sp using molecular techniques. **International Journal of Infectious Diseases**, Amsterdam, v.13, n.6, p.e463-e466, 2009.

KORSAK, N.; JACOB, B.; GROVEN, B.; ETIENNE, G.; CHINA, B.; GHAFIR, Y.; DAUBE, G. *Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production system. **Journal of Food Protection**, Ames, v.66, n.7, p. 1126-1133, 2003.

KWAGA, J.K.P; IVERSEN, J.O Laboratory investigation of virulence among strains of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from pigs and pork products. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v.38, p.92-97, 1992.

LAUKKANEN, R. MARTÍNEZ, P.P.; SIEKKINEN, K.; RANTA, J.; MAIJALA, R.; KORKEALA, H. Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4=O:3 originates from pigs infected on farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v.6, n.6, 2009. DOI: 10.1089=fpd.2009.0265

LÁZARO, N.S.; TIBANA, A.; HOFER, E. *Salmonella* spp. in healthy swine and in abattoir environments in Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.9, p.1029-1033, 1997.

LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* 0:3 isoladas de suínos no Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.17, p.19-24, 1997.

LETELLIER, A.; BEAUCHAMP, G.; GUEVREMONT, E.; D'ALLAIRE, S.; HURNIK, D.; QUESSY, S. Risk factors at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. **Journal of Food Protection**, Ames, v.72, p.2326–2331, 2009.

LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of cry1 gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains by use of DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.9, p.5391-5398. 2005.

LIMA, E.S.C.; PINTO, P.S.S.; SANTOS, J.L. Isolation of *Salmonella* sp. And *Staphylococcus aureus* at swine slaughtering as subsidy for HACCP, the Hazard Analysis and Critical Control Point system. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, n.4, p.185-190, 2004.

LUZZI, I.; GALETTA, P.; MASSARI, M.; RIZZO, C.; DIONISI, A.M.; FILETICI, E.; CAWTHORNE A.; TOZZI, A.; ARGENTIERI, M.; BILEI, S.; BUSANI, L.; GNESIVO, C.; PENDENZA, A.; PICCOLI, A.; NAPOLI, P.; LOFFREDO, L.; TRINITO, M.O.; SANTARELLI, E.; CIOFI degli ATTI, M.L. An Easter outbreak of *Salmonella Typhimurium* DT 104A associated with traditional pork salami in Italy. **Eurosurveillance**, Stockholm, v.12, n.4, p.11-12, 2007.

MAINAR-JAIME, R.C.; ATASHPARVAR, N.; CHIRINO-TREJO, M.; RAHN, K. Survey on *Salmonella* prevalence in slaughter pigs from Saskatchewan. **Canadian Veterinary Journal**, Bethesda, v.49, p.793–796, 2008.

MARTÍNEZ, P.O.; FREDRIKSSON-AHOMAA, P.O.; SOKOLOVA, Y.; ROASTO, M.; BERZINS, A.; KORKEALA, H. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v.6, n.6, p. 719-724, 2009. doi:10.1089/fpd.2008.0251

MATSUBARA, E. N. **Condição higiênico-sanitária de meias-carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos**. São Paulo. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005. 154p.

McNALLY, A.; CHEASTY, T.; FEARNLEY, C.; DALZIEL, R.W.; PAIBA, G.A.; MANNING, G.; NEWELL, D.G. Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999–2000. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.39, p.103–108, 2004.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.5, n.5, p.607-625, 1999.

MEYER, C. *Salmonella* in Raw Meat and By-Products from Pork and Beef. **Journal of Food Protection**, Ames, 2010. Disponível em: <<http://www.faqs.org/periodicals/201010/2155586121.html>>. Acesso em 20 de nov. de 2010.

MILLER, M.F.; CARR, M.A.; BAWCOM, D.B.; RAMSEY, C.B.; THOMPSON, L.D. Microbiology of pork carcasses from pigs with differing origins and feed withdraw times. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.3, p.242-245, 1997.

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

MILLER, V.L. & FALKOW, S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.56, p.1242-1248. 1988.

MOLLARET, H.H. Fifteen centuries of Yersiniosis. **Contributions to Microbiology and Immunology**, Basel, v.13, p.1-4, 1995.

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**, Cambridge, v.98, p.323-330, 1987.

MORROW, W.E.M. & FUNK, J. ***Salmonella* as a Foodborne Pathogen in Pork**, 2001. Disponível em: <<http://mark.asci.ncsu.edu/Publications/factsheets/816s.htm>> Acesso em: 30 de nov. 2008. 22:40.

MÜRMANN, L.; SANTOS, M.C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, Amsterdam, v.20, n.3, p.191-195, 2009.

NAKAJIMA, H.; INOUE, M.; MORI, T.; ITOH, K.; ARAKAWA, E.; WATANABE, H. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.9, p. 2484-2486, 1992.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5.ed. Wayne, 2003 (Approved Standards, M7-A5, v.20, n.2).

NESBAKKEN T, IVERSEN T, ECKNER K, LIUM B. Testing of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig herds based on the natural dynamic of infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.99–104, 2009.

NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HOIDAL, H.K.; ROTTERUD, O-J. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.80, n.3, p.231-240, 2003.

NOWAK, B.; MUEFFLING, T.V.; CASPARI, K.; HARTUNG, J. Validation of a method for the detection of virulent *Yersinia enterocolitica* and their distribution in slaughter pigs from conventional and alternative housing systems. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.117, n.2-4, p.219-28. 2006.

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 Disponível em: <<http://www.cdc.gov/EID/content/13/12/pdfs/1860.pdf>>. Acesso em 20 julho de 2009.

OKWORI, E. J.; AGINA, S. E.; A. O. OLABODE, A. A. OCHAPA, A. A. TURAY & L. H. LOMBIN. Profiles Of *Yersinia enterocolitica* Isolated From Apparently Healthy Pigs In Jos, Nigeria . **The Internet Journal of Microbiology**, Sugar Land, v.6, n.1, 2009.

OLIVEIRA, C.J.B.; CARVALHO, L.F.O.S. Infecções por *Salmonella* em suínos: panorama e perspectivas. **Suinocultura Industrial**, São Paulo, n.3, p.35-39, 2003.

ORTIZ-MARTÍNEZ, P. **Prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in pigs from different European countries and contamination in the pork production chain.** Department of Food Hygiene and Environmental Health Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki Finland. Academic dissertation. 2010. Disponível em: <<http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/63107/prevalen.pdf?sequence=1>>. Acesso em 14 outubro de 2010.

PARDO, L.; MOTA, M.I.; GIACHETTO, G.; PARADA, M.; PÍREZ, C.; VARELA, G. Adenitis mesentérica por *Yersinia enterocolítica*. **Revista Médica del Uruguay**, Montevideo, v.23, p. 265-268, 2007.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO. Brasil pode avançar no comércio de carne suína para a China. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=27368>> Acesso em: 02 dez.2008. 12:20.

PRENDERGAST DM, DUGGAN SJ, FANNING S, CORMICAN M, GONZALES-BARRON U, BUTLER F, DUFFY G. Prevalence and nunmers of *Salmonella* spp and Enterobacteriaceae on pork cuts in abattoirs in the Republic of Ireland. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.105, n.4, p.1209-19. 2008.

RAJIC, A. Does *Yersinia enterocolitica* from pork deserve more attention as a food safety problem? **Issue of Animal Health Forum**. 2000. Disponível em:<http://www.nal.usda.gov/fsrio/topics/tpy_enterocolitica.htm>. Acesso em 28 março 2010.

ROÇA, R.O. **Composição Química da Carne**. Disponível em: <<http://pucrs.campus2.br/~thompson/TPOA-Carne/Roca102.pdf>> Acesso em: 29 nov. 2008. 22:50.

RODRIGUEZ, A.; PANGLOLI, P.; RICHARDS, H.A.; MOUNT, J.R.; DRAUGHON, F.A. Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. **Journal of Food Protection**, Ames, v.69, n.11, p.2576-2580, 2006.

SAMADI, A.R.; WACHSMUTH, K.; HUQ, M.I.; MAHIBUB, M.; AGBONLAHOR, D.E. An Attempt to Detect *Yersinia enterocolitica* Infection in Dacca, Bangladesh. **Tropical and Geographical Medicine**, v.34, p.151-154, 1982.

SCHIEMAN, D.A. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: M.P. Doyle (Ed.) **Foodborne Bacterial Pathogens**, Marcel. 1989.

SCHMID, H.; HÄCHLER, H.; STEPHAN, R.; BAUMGARTNER, A.; BOUBAKER, K. Outbreak of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Switzerland. Implications for production and control of meat preparations. **Eurosurveillance**, Stockholm, v.13, n.44, 2008.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis. In: STRAW, B.E., et al. **Diseases of Swine**. 8th Ed. Ames:Iowa State University Press, p. 536-552, 1999.

SHIOZAWA, K.; NISHINA, T.; MIWA, Y.; MORI, T.; AKAHANE, S.; ITO, K. Colonization in the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*. **Contributions to Microbiology and Immunology**, Basel, v.12, p.63-67, 1991.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. Sd., Varela, p.125-131, 1997.

SILVEIRA, P. & CANAL, M.B. **Tecnologia: Carne suína “made in Brasil” tem a melhor qualidade e baixo custo de produção**. 2007. Disponível em:< <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=10802>> Acesso em: 27 de novembro de 2008 às 22:40h.

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

SIMONSEN, B.; BRYAN, F.L.; CHRISTIAN, J.H.B.; ROBERTS, T.A.; TOMPKIN, R.B.; SILLIKER, J.H. PREVENTION and control of foodborne salmonellosis through application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.4, p. 227-247, 1987.

SPOLAORE, A.J.G. **Prevalência de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos na região oeste do Paraná e potencial de disseminação em bandejas, facas e luvas de manipuladores durante a inspeção post-mortem.** Curitiba 2007. 48f. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

STOLK-ANGELAAR, V.M.M. *Yersinia enterocolitica* infection in children The **Pediatric Infectious Diseases Journal**, Baltimore v.14, n.9, 1995.

SULAKVELIDZE A. *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y.pseudotuberculosis*. and *Yersinia pestis*: the ignored species. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, p. 497-513, 2000.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A.; KEUZENKAMP, D.A.; VAN KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n.3, p. 243-254, 2001a.

SWANENBURG, M.; VAN DER WOLF, P. J.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; VAN KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.70, p.231-242, 2001b.

TAUXE, R.V. Emerging Foodborne Diseases: an evolving public health challenge. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.3, n.4, 1997.

TEODORO, V.A.M.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; MORAES, M.P.; PINTO, M.S. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.1, p.9-14, 2006.

TESSMAN, C.; ZOCHE, F.; LIMA, A.S.; BASSANI, M.; LOPES, G.V.; SILVA, W.P. Ocorrência e perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp. isolada em cortes de carne suína comercializados em feiras-livres de pelotas (RS). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Porto Alegre, v. 26, n. 2, p. 307-313, 2008.

USDA. *Salmonella* Questions and Answers. Disponível em:
<http://199.140.94.5/Fact_Sheets/Salmonella_Questions_&_Answers/index.asp
> Acesso em: 24 de junho de 2009 às 10:10h.

UYEDA, J.; HARMON, K.; WESLEY, I. A PCR ELISA method for the detection of *Yersinia enterocolitica*. 2003. Disponível em: <<http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereposts/asl-1419.pdf>>. Acesso em : 23 setembro de 2008.

VINDIGNI, S. M.; SRIJAN, A.; WONGSTITWILAIROONG, B.; MARCUS, R.; MEEK, J.; RILEY, P.L.; MASON, C. Prevalence of foodborne microorganisms in retail foods in Thailand. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v.4, n.2, 2007.

WANG, B.; WESLEY, I.V.; MCKEAN, J.D. O'CONNOR, A.M. Sub-Iliac lymph nodes at slaughter lack ability to predict *Salmonella enterica* prevalence for swine farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v.7, n.7, 2010. DOI: 10.1089=fpd.2009.0459

WANNET, W.J.B.; REESSINK, M.; BRUNINGS, H.A, MAAS, H.M.E. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.12, p.4483-4486, 2001.

WEGENER, H. C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current Opinion on Microbiology**, v.6, p.439-445, 2003.

WHOa. Health topics: *Salmonella*. 2009. Disponível em:<<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 22 de junho de 2009 às 16:30h.

WHO. World Health Organization. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. 2009. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_CSR_APH_2000.4.pdf>. Acesso em: 15 de outubro de 2010 às 15:20h.

WITTE, W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v.4, n.3, p.187-191. 2004.

ZHENG, H.; SUN, Y.; MAO, Z.; JIANG, B. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. **Immunology and Medical Microbiology**, v.53, n.3, p.368-374, 2008.