

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Fontes de contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Yersinia*
enterocolítica no fluxograma de abate de suínos**

Lauren Machado Moreira

Pelotas, 2017

Lauren Machado Moreira

**Fontes de contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Yersinia*
enterocolítica no fluxograma de abate de suínos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof^o. Dr. Cláudio Dias Timm

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Helenice Gonzalez de Lima

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M835f Moreira, Lauren Machado

Fontes de contaminação de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate de suínos. / Lauren Machado Moreira ; Claudio Dias Timm, orientador ; Helenice Gonzalez de Lima, coorientadora. — Pelotas, 2017.

58 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Bactérias patogênicas. 2. Fluxograma de abate. 3. Microbiologia de alimentos. 4. Saúde pública. 5. Suínos. I. Timm, Claudio Dias, orient. II. Lima, Helenice Gonzalez de, coorient. III. Título.

CDD : 636.4

Lauren Machado Moreira

Fontes de contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate de suínos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:23/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Claudio Dias Timm (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dra. Natacha Deboni Cereser
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal

Prof^a. Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Everton Fagonde da Silva
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

À minha família, sempre. Simplesmente por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização de bolsa de estudos durante o período do experimento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Dias Timm, pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação e por se fazer sempre presente.

À minha coorientadora, Prof. Dra. Helenice Gonzalez de Lima, por se mostrar sempre solícita.

Às estagiárias, Celina e Thaís, por toda a ajuda, disponibilidade, responsabilidade e paciência em aprender com quem, muitas vezes, também estava aprendendo.

Às colegas de pós-graduação, pela amizade, companheirismo e incentivo de sempre.

Às funcionárias do LIPOA, pela ajuda dada sempre que foi preciso.

Aos demais professores do LIPOA, por toda a ajuda oferecida e prestada.

À granja e ao frigorífico por abrirem suas portas, permitindo que este experimento fosse realizado.

Obrigada a todos!

Resumo

MOREIRA, Lauren Machado. **Fontes de contaminação de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate de suínos.** 2017. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Staphylococcus coagulase positiva e *Yersinia enterocolitica* são importantes patógenos relacionados a casos de intoxicações e infecções alimentares associadas ao consumo de carne suína, respectivamente. O objetivo deste estudo foi rastrear *Staphylococcus coagulase positiva* e *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate de suínos e identificar suas fontes de contaminação. Para a pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva*, foram acompanhados quatro suínos de 10 diferentes lotes enviados ao abate. Foram coletadas amostras das pocilgas de espera antes da chegada dos animais e, durante o abate, amostras de fezes diretamente do reto após a insensibilização, da superfície da carcaça após a depiladeira, após a evisceração e antes da entrada na câmara fria, dos linfonodos mesentéricos, da língua e da papada. Para a pesquisa de *Yersinia enterocolitica*, foram acompanhados 60 animais de 15 baias de uma granja no Rio Grande do Sul. Foram coletadas amostras de fezes do chão das baias na granja e diretamente do reto imediatamente após o abate, da carcaça após a depiladeira, após a evisceração e antes da entrada na câmara fria. Também foram coletadas amostras da papada de cada animal. Amostras de água do tanque de escaldagem foram coletadas antes de iniciar o abate e após a passagem dos animais. Os isolados foram obtidos através de análises microbiológicas e identificados por PCR. A similaridade das cepas foi comparada através de rep-PCR. *Staphylococcus coagulase positiva* foi isolado de 40% das pocilgas de espera. Os linfonodos foram o ponto de maior isolamento (19%), seguidos da entrada da câmara fria (17,8%), do reto (16,1%), após a evisceração (16,1%), papada (12,5%), após a depiladeira (8,9%) e língua (8,9%). Através dos resultados pode-se concluir que as pocilgas de espera são importantes fontes de contaminação de SCP para os suínos, que uma vez contaminados, podem disseminar o micro-organismo no fluxograma de abate, através das fezes, linfonodos mesentéricos e cavidade oral. Este é o primeiro estudo no Brasil que demonstra serem as pocilgas de espera importantes fontes de contaminação de SCP para suínos enviados ao abate. *Yersinia enterocolitica* foi isolada de três baias na granja de origem (20%) e de 20 amostras (6,67%) obtidas no fluxograma, sendo a papada o ponto de maior isolamento (30%), seguida da carcaça após a depiladeira (25%), na entrada na câmara fria, (20%), após a evisceração (15%) e reto (10%). Nenhum isolado foi obtido a partir da água de escaldagem. Após a rep-PCR observou-se que os suínos contaminados na granja podem carrear o micro-organismo para outros

pontos do fluxograma de abate. No entanto, as fontes de contaminação que se encontram no próprio frigorífico são mais frequentes e diversas. A papada e a carcaça na entrada da câmara fria são os pontos mais críticos. As medidas de boas práticas adotadas na higienização das pocilgas de espera no pré-abate, bem como as adotadas durante o fluxograma de abate, se ineficientes, podem permitir a persistência de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Yersinia enterocolitica* no produto final, respectivamente, constituindo um risco à saúde pública.

Palavras-chave: abatedouro-frigorífico; bactérias patogênicas; contaminação cruzada; pocilga de espera; suinocultura

Abstract

MOREIRA, Lauren Machado. **Sources of contamination of coagulase-positive *Staphylococcus* and *Yersinia enterocolitica* in pork slaughtering flowchart.** 2017. 58f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Staphylococcus coagulase positive and *Yersinia enterocolitica* are important pathogens related to cases of foodborne illness associated with pork consumption, respectively. The aim of this study was to track coagulase-positive *Staphylococcus* and *Yersinia enterocolitica* in pig slaughtering flowchart and identify their sources of contamination. For the search of coagulase-positive *Staphylococcus*, four pigs from 10 different lots were monitored during slaughter. Samples were collected from the holding pens before the arrival of the animals. Surface samples were collected after dehairing, after evisceration, before the cold chamber, in addition to stool samples in the rectum animals immediately after stunning, mesenteric lymph nodes, tongues and jowls. For the search of *Yersinia enterocolitica*, 60 pigs of 15 bays of a pig farm in Rio Grande do Sul. Stool samples were collected directly from the rectum. Surface samples were collected after dehairing, after evisceration, before the cold chamber and jowls. Samples from the scalding tank water before and after the passage of animals were collected too. The isolates were obtained through microbiological analysis and PCR. The similarity of the strains was compared through rep-PCR. Coagulase-positive *Staphylococcus* was isolated from 40% of the holding pens. Lymph nodes were further isolation point (19%), followed by cold chamber (17.8%), rectum (16.1%) after evisceration (16.1%), jowls (12.5%), after dehairing (8.9%) and tongue (8.9%). From the results, it can be concluded that the holding pens are important sources of SCP contamination for swine, which once contaminated, can disseminate the microorganism in the slaughter flowchart through the feces, mesenteric lymph nodes and oral cavity. This is the first study in Brazil that shows that the holding pens are important sources of SCP contamination for pigs sent to slaughter. *Yersinia enterocolitica* was isolated from three bays in the pig farm (20%) and from 20 samples (6.67%) obtained in the flowchart. The jowl was the point of greatest isolation (30%), followed by after dehairing (25%), the cold chamber (20%), after evisceration (15%) and rectum (10%). No isolates were obtained from the scalding tank water. After the rep-PCR it was observed that contaminated pigs on the farm can carry the microorganism to other points in the slaughter flowchart. However, the sources of contamination are in the slaughterhouse. The jowls and the carcass at the entrance to the cold chamber are the most critical points. The measures of good practices adopted in the hygiene of the pre-slaughter holding pens, as well as those adopted during the slaughter flow chart, if inefficient, may allow the persistence of coagulase positive *Staphylococcus* and *Yersinia enterocolitica* in the final product, respectively, constituting a risk to public health.

Keywords: cross contamination; holding pen; pathogenic bacteria; pig farming; slaughterhouse

Lista de Tabelas

Tabela 1	Presença de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva no fluxograma de abate de suínos	27
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>Y. enterocolitica</i>	39
Tabela 3	Presença de <i>Yersinia enterocolitica</i> na granja e no fluxograma de abate de suínos	40

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABIEPCS	Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
pH	Potencial Hidrogeniônico
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
USDA	United States Department of Agriculture

Lista de Símbolos

%	Percentual
°C	Grau Celsius

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Artigos.....	19
2.1 Artigo 1.....	19
2.2 Artigo 2.....	34
3 Considerações Finais.....	46
Referências.....	47

1 Introdução

A carne suína é a proteína animal mais produzida e consumida no mundo, seguida da carne de frango e carne bovina (USDA, 2016). De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016), no ano de 2015, o Brasil foi o 4º maior produtor e exportador mundial de carne suína, chegando à marca de 3.643 mil toneladas e 555 mil toneladas, respectivamente.

Neste mesmo ano, o Rio Grande do Sul foi o segundo estado com maior produção de carne suína (20,69%), precedido apenas por Santa Catarina (27,40%). Do total de carne suína produzida pelo país, 15,2% foi destinado ao mercado externo e 84,8% ao mercado interno. Apesar de a carne suína ser apenas a terceira proteína animal mais consumida no Brasil, no período de 2004 a 2014 houve um acréscimo de 3,2 kg/hab no consumo *per capita* deste alimento, chegando a 15,1 kg/hab (ABPA, 2016).

A carne suína é constituída de 75% de água, 22,8% de proteína, 1,2% de gordura e 1,0% de minerais, além de ser uma excelente fonte de vitaminas hidrossolúveis do grupo B, como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6) e cobalamina (B12), bem como zinco, potássio, ferro e magnésio (ROÇA, 2008). No entanto, devido ao seu alto teor de umidade e nutrientes, a carne suína e seus derivados acabam tornando-se um importante veículo de transmissão de bactérias patogênicas, podendo causar DTA (PARDI et al., 2006).

As DTA são causadas pela ingestão de micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas através de alimentos e água contaminados e geralmente cursam com náusea, vômito, dores abdominais e diarreia, podendo agravar-se para septicemias e até morte, principalmente em pacientes imunodeprimidos (BRASIL, 2001). *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Yersinia enterocolitica* são importantes patógenos relacionados a casos de intoxicações e toxi-infecções alimentares, respectivamente (FORSYTHE, 2013; GERMANO e GERMANO, 2015).

Staphylococcus spp. são micro-organismos ubíquos, que podem estar presentes na água, solo, trato respiratório, pele e transitoriamente no trato gastrointestinal do homem e de outros animais, incluindo os suínos (JAY, 2000).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Staphylococcaceae*, são cocos Gram-positivos com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm, que podem estar dispostos aos pares, em cadeias curtas ou agrupados de forma semelhante a cachos de uva e são, em sua maioria, aeróbios facultativos (QUINN, 2005; SCHLEIFER e BELL, 2010; GERMANO e GERMANO, 2015).

Este gênero é formado por 50 espécies e 27 subespécies (EUZÉBY, 2015), caracterizadas como coagulase negativa ou coagulase positiva, de acordo com a capacidade de produzir a enzima coagulase e converter o fibrinogênio em fibrina, evitando a ação fagocitária no local de infecção (QUINN, 2011; HENNEKINNE, DE BUYSER e DRAGACCI, 2012). São capazes de se multiplicar em temperaturas entre 7 e 48°C, com crescimento ótimo entre 30 e 37°C, e produzir enterotoxinas termorresistentes entre 10 e 48°C, com temperatura ótima para produção entre 40 e 45°C (FRANCO e LANGRAF, 2005).

A produção da enzima coagulase está estritamente relacionada com a produção de enterotoxinas, por isso a importância da pesquisa de SCP em alimentos (JAY, 2000; QUINN, 2005). Dentre as espécies coagulase positiva, *S. aureus* é a mais frequentemente associada a surtos de intoxicação alimentar, devido a capacidade de várias cepas produzirem enterotoxinas (OMOE et al., 2005), seguida de *S. intermedius* e *S. hyicus*, também produtores de enterotoxinas, em menor proporção (BECKER et al., 2001).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes às ações proteolíticas de enzimas presentes no sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão (FRANCO e LANGRAF, 2005). São produzidas e liberadas no alimento durante a multiplicação de *Staphylococcus* spp., e uma vez pré-formadas não são eliminadas durante o processamento térmico dos alimentos devido à presença de proteínas compactadas e não hidratadas em sua estrutura molecular (CARMO et al., 2002). As enterotoxinas associadas a casos de intoxicações alimentares são dos tipos A, B, C, D, E, H, I (KONEMAN et al., 2010) e J a U (HENNEKINNE et al., 2010).

Algumas enterotoxinas possuem atividade superantigênica provocando uma grande produção de citocinas, que podem causar choque séptico. Esses superantígenos são capazes de recrutar cerca de 20 a 30% das células do tipo T,

enquanto os antígenos convencionais normalmente estimulam cerca de 0,001% de células T (FRASER e PROFT, 2008).

A intoxicação estafilocócica ocorre quando há a ingestão do alimento contaminado com uma ou mais enterotoxinas (FRANCO e LANGRAF, 2005). A ingestão de 100 ng a 1 µg de toxina é suficiente para produzir a doença em indivíduos susceptíveis (BERGDOLL, 1990). No homem, a enfermidade é caracterizada clinicamente por náuseas, vômito e dores abdominais, com ou sem diarreia, e tem início súbito, geralmente de duas a oito horas após a ingestão do alimento contaminado. Normalmente é autolimitante, com resolução dos sinais clínicos em 24 a 48 horas após o início dos sintomas. Todavia, pode tornar-se severa, exigindo hospitalização quando acomete crianças, idosos e pessoas portadoras de doenças imunossupressoras (TRANTER, 1990; BALABAN, 2000; MURRAY, 2005).

Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2015), *S. aureus* foi o segundo maior agente patogênico causador de surtos de DTA no Brasil, entre os anos de 2000 a 2015. No estado de Minas Gerais, foram registrados 72 surtos de intoxicação alimentar e destes, 27 foram causados por *Staphylococcus* coagulase positiva, envolvendo 1.019 pessoas (DIAS, 2012). Em Porto Alegre, no período de 2003 a 2011, *Staphylococcus aureus* foi responsável por 24 dos 173 surtos notificados, sendo o 3º agente etiológico mais envolvido, correspondendo a 14% dos surtos (NASCIMENTO, 2013).

Ainda durante o período de 2000 a 2015, 2,1% dos surtos notificados estavam relacionados com o consumo de carne suína e seus derivados (BRASIL, 2015). Segundo Rivas, Viscaíno e Herrera, (2002), durante o abate há procedimentos, como o chamuscamento e a lavagem das carcaças, que podem reduzir a carga microbiana, no entanto, não há nenhuma operação capaz de eliminá-la completamente. Masson et al. (2012) relataram a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em 12% (58/458) de amostras colhidas em um abatedouro de suínos no estado de São Paulo. Perlin et al. (2015) avaliaram a presença de *S. aureus* em 31 linguças de carne suína comercializadas no Paraná, das quais 22,58% apresentaram contagens deste micro-organismo acima dos limites permitidos pela legislação brasileira. Lima et al. (2004) avaliaram a contaminação superficial de carcaças suínas em um abatedouro frigorífico de Minas Gerais, das quais 11,7% (14/120) estavam contaminadas com *S. aureus*.

SCP tem sido isolado em granjas de terminação, demonstrando o próprio suíno como possível origem da contaminação no fluxograma de abate (KHANNA et al., 2008). Todavia, a contaminação de carcaças suínas durante o abate tem sido mais frequentemente associada à manipulação destes produtos por humanos portadores assintomáticos e consequente contaminação cruzada (PODPECAN, PENGGOV e VADNJA, 2007). Além disso, manipuladores contaminados podem vir a contaminar também superfícies de utensílios e equipamentos (SCHRAFT et al., 1992) e ao ser introduzido no processamento de abate, SCP pode permanecer na planta frigorífica através de biofilmes formados na superfície dos mesmos (SHALE, et al., 2005).

Além de SCP, os suínos também podem ser portadores de *Y. enterocolitica* que geralmente coloniza o trato gastrointestinal, especialmente tonsilas, linfonodos e intestino destes animais (BHADURI, WESLEY e BUSH, 2005; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007).

Y. enterocolitica pertence à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, que pode crescer em temperaturas que variam entre 0 e 44°C, sendo a ótima entre 25 e 28°C. Apresenta-se imóvel a 37°C e móvel a 25°C através de flagelos peritríquios (HOLT et al., 1994). É anaeróbia facultativa, não esporulada, oxidase negativa e fermenta a glicose com pouca ou nenhuma produção de gás (SILVA e JUNQUEIRA, 1997). Devido à capacidade de se multiplicar a 4°C, pode manter-se viável em alimentos mesmo refrigerados, como carne e derivados (LEAL, LEAL e ALMEIDA, 1997). Essa bactéria está amplamente distribuída pelo ambiente, como água, solo e pode colonizar os animais domésticos (GALINDO et al., 2011).

Y. enterocolitica é classificada em seis biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4 e 5), dos quais cinco são considerados patogênicos (1B, 2, 3, 4 e 5), e 50 sorotipos, diferenciados de acordo com a variação antigênica do lipopolissacarídeo da parede celular (BARI et al, 2011). As cepas do biotipo 1B são altamente patogênicas enquanto os biotipos 2 a 5 tem patogenicidade moderada a baixa. Em contrapartida, o biotipo 1A é considerado não patogênico (BHAGAT e VIRDI, 2011).

A virulência dos biotipos patogênicos envolve diversos genes codificados por um plasmídeo de virulência de 70 kDa, altamente conservado, denominado *pYV*, e outros determinantes cromossômicos (REVELL e MILLER, 2001). A expressão

desses genes é dependente de temperatura. Os genes plasmidiais são expressos a 37°C e os genes cromossômicos a 25°C (ROBINS-BROWNE, 2001).

Para ocorrer a infecção, é necessária a presença de dois fatores cromossômicos: o gene *ail*, envolvido na ligação e invasão das células hospedeiras, e o gene *inv*, relacionado à invasão. O gene *inv* está presente em todas as espécies de *Yersinia*, todavia é funcional apenas em cepas patogênicas (LEAL, LEAL e ALMEIDA, 1997; MILLER et al., 2001; WANNET et al., 2001). Em contrapartida, o gene *ail* é encontrado exclusivamente em cepas patogênicas. Este gene codifica para uma proteína de superfície denominada Ail que confere resistência aos efeitos bactericidas do sistema complemento e adesão e invasão nos bio-sorogrupos capazes de causar a doença (ROBINS-BROWNE, 2001). Desta forma, tem-se utilizado esse gene como alvo para identificação de *Y. enterocolitica* patogênica (LEAL, LEAL e ALMEIDA, 1997; WANNET et al., 2001).

O plasmídeo *pYV* codifica uma proteína de membrana externa, denominada YadA e um conjunto de proteínas chamadas Yops (FREDRIKSSON-AHOMAA, 2007). YadA recobre toda a superfície da bactéria, na forma de fibrilas, induzindo sua adesão ao muco intestinal e a componentes da matriz extracelular como o colágeno, a laminina e a fibronectina (HEISE e DERSH, 2006; DRUMMOND et al., 2012). As Yops são secretadas por um sistema de secreção tipo III, capaz de injetar proteínas bacterianas efetoras diretamente no citoplasma da célula hospedeira. Uma vez no interior da célula hospedeira, essas proteínas interagem com os domínios dessas células, através de fosforilação ou transferência de resíduos, promovendo uma cascata de reações que alteram o citoesqueleto da célula, destruindo-a (CORNELIS, 2002).

Outro fator de virulência de *Y. enterocolitica* é a secreção de uma toxina termoestável, denominada YstA e codificada pelo gene *ystA*, que possui elevada homologia com a enterotoxina termoestável produzida por *Escherichia coli*. Essa enterotoxina é secretada em temperaturas abaixo de 30°C e, desta forma, não é expressa no organismo do hospedeiro. Todavia, apresenta resistência ao pH estomacal e se pré-formada no alimento e ingerida pode causar intoxicação (ROBINS-BROWNE, 2001). Além da YstA, outra enterotoxina é produzida por *Y. enterocolitica*, denominada YstB e codificada pelo gene *ystB*. Assim como YstA, YstB parece estar associada a quadros de diarreia, sendo bastante prevalente em cepas do biotipo 1A (BHAGAT e VIRDI, 2007).

A yersiniose é uma doença gastrointestinal autolimitada, de preocupação global (GALINDO et al., 2011). A sintomatologia varia de acordo com a idade do indivíduo infectado, ocorrendo mais frequentemente em crianças e jovens adultos. Cursa com febre, dor abdominal e diarreia sanguinolenta, podendo agravar-se para linfadenite mesentérica, pseudoapendicite, artrite e eritema nodoso (FREDRIKSSON-AHOMAA e KORKEALA, 2003). No Brasil, embora não haja dados de prevalência de yersiniose, a ocorrência de cepas com os mesmos perfis moleculares em humanos e suínos já foi relatada (RUSAK, 2013).

A carne suína quando consumida crua ou malcozida pode ser um importante veículo de transmissão de *Y. enterocolitica* para humanos. Estima-se que 77,3% de casos de yersiniose estejam associados ao seu consumo (ROSNER et al., 2012; FOSSE et al., 2009). Desta forma, a presença de *Y. enterocolitica* em carcaças suínas parece estar diretamente relacionada com os próprios suínos, pois esta bactéria pode estar presente na faringe, conteúdo estomacal e fezes destes animais (BORCH, NESBAKKEN e CHRISTENSEN, 1996).

Além de *Y. enterocolitica*, o fluxograma de abate de suínos oferece inúmeras possibilidades de contaminação da carcaça com outras bactérias potencialmente patogênicas, como *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo o suíno um dos principais carreadores destas bactérias para dentro de plantas frigoríficas (BORCH NESBAKKEN e CHRISTENSEN, 1996). Além disso, há uma importante relação entre manipuladores, eventuais portadores assintomáticos, e a contaminação e disseminação destas bactérias nos estabelecimentos, o que, além de contaminar a carcaça, pode carrear esses micro-organismos para equipamentos e utensílios, permitindo a permanência destas bactérias no ambiente de abate e a contaminação cruzada. SCP e *Y. enterocolitica* são micro-organismos capazes de se aderir às superfícies sólidas e produzir biofilmes, conferindo proteção às comunidades bacterianas frente à higienização e sanitização (GILBERT et al., 2003; SHALE et al., 2005). Esta capacidade, associada a falhas nos procedimentos higiênico-sanitários, permite que os resíduos aderidos em superfícies e equipamentos transformem-se em potenciais fontes de contaminação (PARIZZI et al., 2004).

Portanto, considerando a hipótese de que os suínos podem albergar SCP e *Y. enterocolitica* antes de chegarem ao abatedouro-frigorífico, disseminando estes micro-organismos no fluxograma de abate de suínos, o objetivo geral deste trabalho foi determinar fontes de contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva e

Yersinia enterocolitica no abate de suínos, tendo como focos principais a contaminação na granja de origem e nas pocilgas de espera.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Pocilgas de espera como fonte de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva de suínos destinados ao abate

Lauren Machado Moreira, Alana Borges Tavares, Celina Nunes Ebersol, Thaís
Gonçalves Gonçalves, Natacha Deboni Cereser, Helenice Gonzalez de Lima,
Cláudio Dias Timm

Artigo formatado segundo as normas da UFPel

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar a importância das pocilgas de espera como fontes de contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva para suínos e identificar outras fontes no fluxograma de abate. Foram acompanhados quatro suínos de 10 diferentes lotes enviados ao abate. Previamente ao abate, foram coletadas amostras dos pisos das pocilgas de espera no abatedouro-frigorífico. Durante o abate, foram coletadas amostras de fezes diretamente do reto após a insensibilização, da superfície da carcaça após a depiladeira, após a evisceração e antes da entrada na câmara fria, dos linfonodos mesentéricos, língua e papada. Os isolados foram obtidos através de análises microbiológicas. Para comparar a similaridade entre as cepas, foi realizada rep-PCR. *Staphylococcus* coagulase positiva foi isolado de 40% das pocilgas de espera. Os linfonodos foram o ponto de maior isolamento (19%), seguidos da entrada da câmara fria (17,8%), do reto (16,1%), após a evisceração (16,1%), papada (12,5%), após a depiladeira (8,9%) e língua (8,9%). Através dos resultados pode-se concluir que as pocilgas de espera são importantes fontes de contaminação de SCP para os suínos, que uma vez contaminados, podem disseminar o micro-organismo no fluxograma de abate, através das fezes, linfonodos mesentéricos e cavidade oral. Este é o primeiro estudo no Brasil que demonstra serem as pocilgas de espera importantes fontes de contaminação de SCP para suínos enviados ao abate. As medidas de boas práticas adotadas durante o fluxograma de abate, se ineficientes, podem permitir a persistência destas bactérias no produto final, constituindo um risco à saúde pública.

Palavras-chave: abatedouro-frigorífico; contaminação cruzada; saúde pública, suinocultura

Abstract

The aim of this study was to determine the importance of holding pens as sources of contamination of coagulase-positive *Staphylococcus* to pigs and to identify other sources in the slaughter flowchart. It was followed four pigs from 10 different lots sent to slaughter. Prior to slaughter, samples were collected from the floors of the holding pens in the slaughterhouse. During slaughter, stool samples were collected from the rectum immediately after stunning. Surface carcass were collected after dehairing, after evisceration and in the cold chamber, in addition mesenteric lymph nodes, tongues and jowls. The strains were obtained through microbiological analysis. To compare the similarity between the strains, rep-PCR was performed. Coagulase-positive *Staphylococcus* was isolated from 40% of the holding pens. Lymph nodes were further isolation point (19%), followed by cold chamber (17.8%), rectum (16.1%) after evisceration (16.1%), jowls (12.5%), after dehairing (8.9%) and tongue (8.9%). From the results it can be concluded that the holding pens are important sources of SCP contamination for the swine, which once contaminated, can disseminate the microorganism in the slaughter flowchart through the feces, mesenteric lymph nodes and oral cavity. This is the first study in Brazil that shows that the holding pens are important sources of SCP contamination for pigs sent to slaughter. Measures of good practices during slaughter flowchart, if inefficient, may allow the persistence of these bacteria in the final product, constituting a risk to public health.

Keywords: cross contamination; public health, slaughterhouse, swine breeding

1 Introdução

A carne suína é tida como a principal fonte de proteína a âmbito mundial. Dentre os principais produtores, destacam-se a China, União Europeia, Estados Unidos e em quarto lugar, o Brasil (ABPA, 2016). Para que a suinocultura brasileira se desenvolvesse, produtores e pesquisadores investiram no melhoramento da qualidade da carne suína no país, tornando-a mais magra e nutritiva (ABIPECS, 2013). Como reflexo deste melhoramento houve acréscimo no consumo *per capita* desta proteína dentre os consumidores brasileiros, que no ano de 2015 chegou a 15 kg/hab/ano (ABPA, 2016). Todavia, a carne suína, assim como os demais alimentos com alto valor nutritivo, pode veicular micro-organismos patogênicos causando doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Staphylococcus spp. são patógenos oportunistas comensais de humanos, animais domésticos e de produção e estão envolvidos em diversos casos de infecções, sendo que algumas cepas produtoras de enterotoxinas são responsáveis por intoxicações de origem alimentar (NITZSCHE, 2007; HASAN, 2014). As bactérias deste gênero são divididas em coagulase positiva e negativa devido à sua capacidade em converter o fibrinogênio em fibrina. Dentre as espécies de SCP, *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* destacam-se por produzirem a enzima coagulase e normalmente estarem associados a surtos de DTA (JAY, 2005). Os alimentos envolvidos são aqueles com elevado teor de umidade e alta porcentagem de proteínas (GERMANO e GERMANO 2015). A disseminação desta bactéria nos alimentos pode ocorrer durante o processo de abate, através da contaminação da carcaça e da superfície de contato de equipamentos e utensílios contaminados por animais ou humanos portadores (NITZSCHE, 2007). O isolamento de SCP de produtos suínos tem sido reportado em diversos países (BENEKE et al., 2011; NORMANNO et al., 2015; TANIH et al., 2015), inclusive no Brasil (LIMA et al., 2004; MASSON et al., 2012).

O abate de suínos oferece inúmeras oportunidades de contaminação da carcaça, uma vez que os microrganismos patogênicos podem manter-se nas plantas dos abatedouros e o produto cárneo exige manipulação em diversas etapas do

processo. Desta forma, a identificação das fontes de contaminação dos produtos suínos é fundamental para o controle da sua inocuidade, de forma a não oferecerem perigo à saúde pública, uma vez que estes alimentos atuam como uma importante forma de veiculação de DTA para os seres humanos. Embora os animais permaneçam nas pocilgas de espera durante o período de jejum e dieta hídrica do pré-abate, estas instalações não têm sido estudadas como possível fonte de contaminação para os suínos. Entretanto, esta hipótese é plausível, mas ainda carece de comprovação.

Considerando que os suínos podem albergar *Staphylococcus* coagulase positiva no trato gastrointestinal e a importância dessas bactérias para a saúde pública, o objetivo deste trabalho foi determinar a importância das pocilgas de espera como fontes de contaminação dos suínos e identificar outras fontes no fluxograma de abate.

2 Materiais e métodos

2.1 Coleta das amostras

Suínos de dez lotes encaminhados para um abatedouro-frigorífico legalmente estabelecido, cadastrado e inspecionado pela Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul foram acompanhados durante o abate. No dia anterior à chegada dos animais ao abatedouro, foram coletadas amostras do piso das pocilgas de espera, onde se caminhava em diferentes direções com o uso de propés descartáveis, nos quais foram friccionadas zaragatoas estéreis para coleta de material.

No momento do abate, foram acompanhados quatro animais de cada lote, dos quais foram coletadas amostras de sete diferentes pontos do fluxograma: 1) fezes diretamente do reto, após a insensibilização, através da introdução de zaragatoa estéril; 2) superfície externa da carcaça após a passagem pela depiladeira, através de fricção de zaragatoa estéril em uma área de 100 cm² delimitada por gabarito de aço inoxidável estéril, a 15 cm da linha do dorso, a partir

da quinta costela; 3) superfície interna da carcaça após a abertura da cavidade abdominal, através de zaragatoa estéril em uma área de 100 cm² delimitada por gabarito de aço inoxidável estéril, a 10 cm das articulações das costelas com as vértebras, a partir da quinta costela; 4) superfície externa da meia-carcaça antes da entrada na câmara fria, através de zaragatoa estéril em uma área de 100 cm² delimitada por gabarito de aço inoxidável estéril, a 15 cm da linha do dorso, a partir da quinta costela; 5) superfície da língua, após a desarticulação da cabeça, através de fricção de zaragatoa estéril; 6) superfície interna da papada, através de fricção de zaragatoa estéril; 7) superfície interna dos linfonodos mesentéricos, retirados íntegros e assepticamente incisados longitudinalmente com faca estéril, através de fricção de zaragatoas estéreis em três pontos diferentes da superfície de corte. Imediatamente após a coleta, as amostras foram encaminhadas para análise em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia), acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo.

2.2 Obtenção dos isolados

Para a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva, as zaragatoas contendo as amostras foram semeadas por esgotamento em Ágar Baird-Parker (Acumedia) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, três colônias típicas e três colônias atípicas foram semeadas em BHI e incubadas a 37°C por 24 horas para posterior prova da coagulase, que consistiu na adição de 0,3 mL da cultura a 0,3 mL de plasma de coelho, incubados por seis horas a 37°C. As cepas capazes de coagular o plasma de coelho foram consideradas positivas (BRASIL, 2003).

2.3 Extração do DNA

O DNA dos isolados suspeitos de *Staphylococcus* coagulase positiva foi extraído conforme Sambrook e Russel (2001). O *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em BHI foi ressuscitado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Após, foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -70 °C por

30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 *g* por 20 min, e o sobrenadante descartado. Então, o *pellet* foi lavado com etanol a 70%. Por fim, a eluição foi feita em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

2.4 Perfis moleculares

Para comparação dos perfis moleculares de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada rep-PCR, utilizando o *primer* (GTG)₅ (VERSALOVIC *et al.*, 1994). As condições da rep-PCR foram as seguintes: 2,5 µL de DNA, 2 µL do *primer* (5'-GTGGTGGTGGTGGT-3'), 12,5 µL de Master Mix (Sigma Aldrich, EUA) e 8 µL de água para completar o volume da reação. Para a amplificação foram realizados um ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos subsequentes de 95°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto e 60°C por 5 minutos, e finalmente um ciclo de 60°C por 16 minutos. Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões amplificadas no genoma, os produtos da rep-PCR foram corados com GelRed e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 2%.

Os perfis de bandas foram analisados segundo Tenover *et al.* (1995) e classificados da seguinte forma: indistinguíveis (com todas as bandas iguais), intimamente relacionadas (de duas a três bandas distintas), possivelmente relacionadas (de quatro a seis bandas distintas) e diferentes (a partir de sete bandas distintas).

3 Resultados e discussão

Das dez amostras coletadas nas pocilgas de espera, quatro (40%) estavam contaminadas com SCP. Isso pode ter ocorrido devido a falhas na higienização das pocilgas após a saída de lotes com suínos que albergavam SCP. Uma vez que a legislação brasileira, em vista do bem-estar animal, determina que o piso das pocilgas seja de material antiderrapante (MAPA, 2010), pode haver dificuldade na higienização desta área devido a reentrâncias presentes no concreto, o que permitiria a permanência dos micro-organismos no local (DE BUSSER *et al.*, 2011). Alguns estudos têm relatado a presença de *S. aureus* em suínos de granjas de terminação, demonstrando que estes animais podem estar albergando esta bactéria

no trato gastrointestinal quando enviados ao abate (KHANNA et al., 2008; LINHARES et al., 2015), excretando-a nas pocilgas durante a espera no abatedouro.

Através da rep-PCR, foi possível demonstrar que as pocilgas de espera atuam como importantes fontes de contaminação de SPC para os suínos que serão abatidos. Dos animais que passaram pelas pocilgas de espera quando esta estava contaminada por SPC, pelo menos um suíno apresentou contaminação por uma cepa indistinguível daquela isolada na pocilga de espera. A cepa isolada na língua do animal 1 do lote 1 foi considerada indistinguível da cepa isolada na pocilga de espera. Nos lotes 2 e 3, os isolados obtidos nas pocilgas de espera foram indistinguíveis das cepas isoladas no reto após a insensibilização do animal 1 e dos animais 1 e 3, respectivamente. Já no lote 6, o isolado obtido na pocilga de espera foi indistinguível do isolado obtido nos linfonodos mesentéricos no animal 1. Estes achados demonstram que o período de jejum e dieta hídrica em que os animais permanecem nas pocilgas de espera durante o pré-abate, o qual variou de oito a 12 horas, é suficiente para que os suínos se contaminem com SPC, os micro-organismos se instalem nos linfonodos mesentéricos e os animais passem a excretar estas bactérias nas fezes. No nosso estudo, estas cepas não foram identificadas em outros pontos de coleta de amostras do fluxograma de abate. Entretanto, a persistência da contaminação até os produtos finais é uma possibilidade, uma vez que cepas isoladas de amostras de fezes foram isoladas também de outros pontos do fluxograma, inclusive da carcaça, como discutido a seguir.

Durante o abate, 280 amostras foram coletadas e foram obtidos 56 (20%) isolados de SCP. Os linfonodos foram o ponto de maior isolamento (19,6%), seguidos da superfície da carcaça na entrada na câmara fria (17,8%), do reto após a insensibilização (16,1%), superfície da carcaça após a abertura da cavidade abdominal (16,1%), papada (12,5%), superfície da carcaça após a depiladeira (8,9%) e superfície da língua (8,9%) (Tabela 1).

Tabela 1. Presença de *Staphylococcus* coagulase positiva no fluxograma de abate de suínos

Lotes	Pocilga de espera	Reto ^a	PD	PE	EC	Língua	Papada	Linfonodos
1	+	----	--+-	--+-	--+-	+---	-+--	----
2	+	+---+	----+	++++	++++	--+-	-+--	++++
3	+	++++	+---	--++	+---+	--++	----	----
4	-	----	----	+---	---+	----	----	+---
5	-	+++--	+---	----+	-+++	--+-	+---+	++++
6	+	-+--	----	----	----	----	----	+---
7	-	----	+---	----	-+--	----	-+--	+---
8	-	----	----	----	----	----	----	----
9	-	----	----	----	----	----	----	----
10	-	----	----	----	----	----	----	----

^aNas colunas onde aparecem quatro símbolos (+ ou -), cada um corresponde a um suíno. A ordem dos animais é a mesma em toda a linha. Ausência de *Staphylococcus* coagulase positiva (-); presença de *Staphylococcus* coagulase positiva (+).

PD – Pós-depiladeira

PE – Pós-evisceração

EC – Entrada na câmara fria

Ao serem analisados os isolados das carcaças pela rep-PCR, verificou-se que, no lote 2, o suíno 4 apresentou na superfície da carcaça antes da entrada na câmara fria uma cepa indistinguível de um isolado obtido a partir do reto do animal 1, indicando que houve contaminação cruzada entre os animais e que as medidas adotadas durante o fluxograma que visam à diminuição ou eliminação de bactérias foram falhas, uma vez que o suíno chegou ao final da linha de abate contaminado.

Da mesma forma, ao comparar os padrões de banda dos isolados obtidos do lote 7, foi possível identificar as cepas dos linfonodos mesentéricos do animal 1 e da papada e carcaça antes da entrada na câmara fria do animal 2 como indistinguíveis entre si. Estes achados também demonstram que houve contaminação cruzada, possivelmente através de utensílios ou equipamentos mal higienizados durante as operações entre um animal e outro.

No lote 3, três animais apresentaram cepas indistinguíveis entre si. O animal 1 apresentou um isolado na superfície da carcaça após a depiladeira, o animal 3 na superfície da carcaça após a evisceração e o animal 4 no reto após a insensibilização. Estes resultados são indicativos de que ao excretar SCP nas pocilgas de espera, o próprio animal 4 tenha sido responsável pela contaminação dos animais 1 e 3 e que os procedimentos de manejo higiênico-sanitário do frigorífico foram inadequados, permitindo a persistência da bactéria na linha de abate.

Quanto ao lote 5, a cepa isolada nos linfonodos mesentéricos do animal 4 era indistinguível do isolado obtido na carcaça após a evisceração deste mesmo suíno, sugerindo que o procedimento de evisceração possa não ter sido realizado de forma correta, podendo ter ocorrido o rompimento dos linfonodos que acabaram por contaminar a superfície interna da carcaça. Outro fato a se considerar é o risco de haver a contaminação de outras partes da carcaça no momento da incisão dos linfonodos para inspeção, através de utensílios de corte mal higienizados (MOO et al., 1980).

Os demais isolados foram considerados não idênticos, quando comparados seus padrões de bandas na rep-PCR.

Seis suínos que estavam excretando SCP no momento do abate albergavam cepas distintas daquelas isoladas das pocilgas de espera antes da entrada dos lotes nestas instalações ou passaram pelas pocilgas quando destas não foram obtidos isolados de SCP, indicando que estes animais já vieram contaminados da granja. A presença destas bactérias no reto dos animais demonstra a possibilidade do próprio suíno contaminado na granja de origem ser fonte de contaminação para os manipuladores, os equipamentos e os utensílios utilizados durante as operações, podendo resultar na contaminação cruzada de outras carcaças, conforme já relatado por Molla et al. (2012).

Na etapa após a depiladeira, foram obtidos cinco isolados (8,9%). A etapa de escaldagem, quando realizada adequadamente, além de facilitar a retirada dos pelos, pode contribuir para a diminuição da carga microbiana presente na pele. No entanto, a etapa subsequente de depilação é um ponto crítico para a contaminação da carcaça com bactérias provenientes da boca, narinas e trato gastrointestinal de suínos contaminados (LASSOK e TENHAGGEN, 2013). No nosso estudo, quatro das cepas isoladas nesta etapa apresentaram perfil de bandas distintos de qualquer outro isolado obtido, indicando que a contaminação teve origem dentro da planta do frigorífico.

Na etapa após a abertura da cavidade abdominal, nove isolados (16,1%) foram identificados, dos quais sete tiveram seus padrões de bandas diferentes dos demais, indicando que houve contaminação cruzada. Pode haver uma maior ocorrência de SCP em etapas posteriores ao chamuscamento, como a evisceração, devido à intensa manipulação das carcaças por colaboradores que podem ser portadores assintomáticos deste patógeno (LIMA et al., 2004). Outra possibilidade de contaminação é através do uso de facas e ganchos mal higienizados durante a operação de evisceração entre um animal portador e outro. No frigorífico acompanhado, a oclusão do reto é realizada apenas com o uso de lacre de nylon, o que poder ter contribuído para a contaminação do manipulador ou de utensílios utilizados no momento da evisceração, considerando a possibilidade de ter havido derramamento de material fecal no momento da colocação do lacre. Alguns estudos demonstram que a utilização de saco plástico na oclusão do reto é a melhor forma de evitar contaminação com bactérias patogênicas durante a evisceração (NESBAKKEN et al., 1994; LAUKANNEN et al., 2010).

Foram obtidos cinco isolados (8,9%) da língua e sete (12,5%) da papada. Estes resultados revestem-se de importância, pois estes cortes são utilizados como matéria-prima na elaboração de embutidos e outros subprodutos, os quais têm sido objeto de isolamento de SPC por outros autores (O'BRIEN et al., 2012; PERLIN et al., 2015), bem como têm sido implicados em casos de DTA no Rio Grande do Sul (WELKER et al., 2010).

Os linfonodos atuam como barreira primária às infecções, podendo os suínos ser portadores assintomáticos de SCP (GUERRA FILHO et al., 2014) quando enviados ao abate, chegando ao abatedouro já contaminados desde a granja. No entanto, a presença desta bactéria em tecidos linfóides de suínos tem sido pouco

estudada. Em nosso estudo, os linfonodos foram o ponto com maior percentual de isolados, sendo 11 (18,96%) identificados como SCP, dos quais sete foram considerados diferentes das demais cepas isoladas.

Antes da entrada da carcaça na câmara fria, foram obtidos dez (17,85%) isolados, dos quais sete foram diferentes das cepas isoladas nos outros pontos, indicando que possivelmente a contaminação destas carcaças se deu após o uso de utensílios contaminados ou após a manipulação das carcaças por colaboradores portadores. A presença de SCP neste ponto é um fato importante a ser considerado, pois esta é a última etapa do abate onde medidas de controle pode ser adotadas antes da destinação do produto ao mercado. Estes resultados demonstram que as boas práticas adotadas pelo estabelecimento não foram suficientes para eliminar o micro-organismo ao longo do fluxograma de abate.

4 Conclusão

As pocilgas de espera em abatedouros-frigoríficos são importantes fontes de contaminação de *Staphylococcus coagulase positiva* em suínos enviados ao abate. Os próprios animais que chegam ao abatedouro já portadores de SCP também constituem potenciais fontes de contaminação através das fezes, dos linfonodos mesentéricos e da cavidade oral.

Os linfonodos foram o ponto de maior isolamento de SCP nos suínos, seguido da entrada na câmara fria, que acaba sendo um ponto crítico, pois esta é a última etapa do fluxograma antes do produto ser destinado ao consumidor.

Referências

ABIPECS. Relatório Anual, 2013. **Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína**. Disponível em <<http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>>. Acesso em: 30 dez. 2016.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual de 2015**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf> Acesso em: 26 out. 2016.

BENEKE, B.; KLEES, S.; STÜHRENBERG, B.; FETSCH, A.; KRAUSHAAR, B.; TENHAGEN, B. A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a

fresh meat pork production chain. **Journal of food protection**, v. 74, n. 1, p. 126-129, 2011.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. 2003. Acesso em 25 out. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 22 out. 2016

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

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5. ed. Barueri, 2015, 1077p.

GUERRA FILHO, J. B. P.; VEIGA, S. J.; POSSEBON, F. S.; SUDANO, M. J.; GALVÃO, J. A.; YAMATOOGI, R. S.; PINTO, J. P. D. A. N. Prevalência e Sorotipagem de *Salmonella* em Linfonodos e Fezes de Suínos. **Blucher Food Science Proceedings**, v.1, n., p. 337-338, 2014.

HASAN, A. A., HASSAWI, D. S., AL-DAGHISTANI, H. I., HAWARI, A. D. Molecular and Biochemical Identification of Coagulase Positive *Staphylococcus* Species Isolated from Human and Animal Sources in Jordan. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, Vol.47, n.1, v.1, p.1491-1504, 2014.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 712p.

KHANNA, T., FRIENDSHIP, R., DEWEY, C., & WEESE, J. S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary microbiology**, v. 128, n.3, p. 298-303, 2008.

LASSOK, B.; TENHAGEN, B. A. From pig to pork: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the pork production chain. **Journal of food protection**, v. 76, n. 6, p. 1095-1108, 2013.

LAUKKANEN, R.; RANTA, J.; DONG, X.; HAKKINEN, M.; MARTÍNEZ, P. O.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. Reduction of enteropathogenic *Yersinia* in the pig slaughterhouse by using bagging of the rectum. *Journal of food protection*, v. 73, n. 12, p. 2161-2168, 2010.

LIMA, E.D.S.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, J.L.D.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; ALMDEIDA, L. P.; PINTO, M. S.; DIAS, F.S. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle-APPCC1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 185-190, 2004.

LINHARES, L. L.; SREEVATSAN, S.; MUNOZ-ZANZI, C. A.; TORREMORELL, M.; DAVIES, P. R. The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 27, n. 1, p. 55-60, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Abate Humanitário de Suínos**. 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Abate%20H_%20de%20Suinos%20-%20WSPA%20Brasil.pdf> Acesso em: 06 Jan. 2016.

MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G. S.; OLIVEIRA, L. F.; CARVALHO, S. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.1, p.1-14, 2012.

MOLLA, B.; BYRNE, M.; ABLEY, M.; MATHEWS, J.; JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P.; GEBREYES, W. A. Epidemiology and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of porcine origin. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3687-3693, 2012.

MOO, D.; O'BOYLE, D.; MATHERS, W; FROST, A. J. The isolation of *Salmonella* from jejunal and caecal lymph nodes of slaughtered animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 4, p. 181-183, 1980.

NESBAKKEN, T.; NERBRINK, E.; RØTTERUD, O. J.; & BORCH, E. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter. **International journal of food microbiology**, v. 23, n. 2, p. 197-208, 1994.

NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary microbiology**, v. 120, n. 3, p. 292-299, 2007.

NORMANNO, G.; DAMBROSIO, A.; LORUSSO, V.; SAMOILIS, G.; DI TARANTO, P.; PARISI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy. **Food microbiology**, v. 51, p. 51-56, 2015.

O'BRIEN, A. M.; HANSON, B. M.; FARINA, S. A.; WU, J. Y.; SIMMERING, J. E.; WARDYN, S. E.; SMITH, T. C. MRSA in conventional and alternative retail pork products. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30092, 2012.

PERLIN, G.O.; PEREIRA, L. F.; FERREIRA, B.P.M.; MARTINS, L. A. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. em embutidos cárneos registrados em serviço de inspeção municipal – sim em 2012 de três municípios do estado do Paraná. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.1, p. 43-49, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

TANIH, N. F.; SEKWADI, E.; NDIP, R. N.; BESSONG, P. O. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in Abattoirs in Vhembe District, South Africa. *The Scientific World Journal*, v. 2015, 2015.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

VERSALOVIC. J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.

WELKER, C. A. D., BOTH, J. M. C., LONGARAY, S. M., HAAS, S., SOEIRO, M. L. T., & RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, 2010.

2.2 Artigo 2

Contaminação de suínos por *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate e sua relação com a granja

Lauren Machado Moreira, Alana Borges Tavares, Celina Nunes Ebersol, Thaís Gonçalves Gonçalves, Helenice Gonzalez de Lima, Cláudio Dias Timm

Submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

1 **Contaminação de suínos por *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate e**
2 **sua relação com a granja**

3 Contamination of pigs by *Yersinia enterocolitica* in the slaughter flowchart and its
4 relation to the farm

5 **Resumo**

6 O objetivo deste estudo foi verificar a importância da contaminação dos suínos por
7 *Yersinia enterocolitica* na granja para a contaminação no fluxograma de abate.
8 Sessenta suínos foram acompanhados. Foram coletadas amostras de fezes na
9 granja de origem dos animais e durante o abate, diretamente do reto, após a
10 insensibilização. Também foram coletadas amostras da carcaça após a passagem
11 na depiladeira, após a evisceração, antes da entrada na câmara fria, da papada e da
12 água do tanque de escaldagem antes de iniciar o abate e após a passagem dos
13 animais. Os isolados foram obtidos através de análises microbiológicas, identificados
14 por PCR e comparados através de rep-PCR. *Yersinia enterocolitica* foi isolada de
15 três baias na granja de origem (20%) e de 20 amostras (6,67%) obtidas no
16 fluxograma. Após a rep-PCR, observou-se que os suínos contaminados na granja
17 podem carrear o micro-organismo para diferentes pontos do fluxograma de abate.
18 No entanto, as fontes de contaminação que se encontram no próprio frigorífico são
19 mais frequentes e diversas. A papada e a carcaça na entrada da câmara fria são os
20 pontos mais críticos. As medidas de boas práticas adotadas durante o fluxograma de
21 abate, se ineficientes, podem permitir a persistência destas bactérias no produto
22 final.

23 Palavras-chave: abatedouro-frigorífico, saúde pública; suinocultura; *Yersinia*
24 *enterocolitica*

25
26 **Abstract**

27 The objective of this study was to verify the importance of the contamination of the
28 pigs by *Yersinia enterocolitica* in the farm for the contamination in the slaughter
29 flowchart. Sixty pigs were followed. Stool samples were collected from animals on the
30 farm of origin and during the slaughter, from the rectum after desensitization.
31 Samples from the carcass after dehairing, after evisceration, before the cold
32 chamber, the jowls and the water of the scald tank before beginning the slaughter
33 and after the passage of the animals were collected too. The isolates were obtained

34 through microbiological analyzes, identified by PCR and compared through rep-PCR.
35 *Yersinia enterocolitica* was isolated from three bays in the farm (20%) and from 20
36 samples (6.67%) obtained in the flowchart. After rep-PCR, it was observed that
37 contaminated pigs on the farm can carry the microorganism to different points in the
38 slaughter flowchart. However, the sources of contamination that are in own
39 slaughterhouse are more frequent and diverse. The jowls and carcass before
40 entrance in the cold chamber are the most critical points. Measures of good practices
41 adopted during slaughter flow, if ineffective, may allow the persistence of bacteria in
42 the final product.

43 Keywords: public health; slaughterhouse; swine breeding, *Yersinia enterocolitica*

44

45 **Introdução**

46 A carne suína é mundialmente apontada como uma das mais importantes
47 fontes de proteína animal. O Brasil destaca-se como o quarto maior produtor de
48 carne suína no mundo, atrás de China, União Europeia e Estados Unidos (ABPA,
49 2016). Nos últimos anos a suinocultura brasileira vem desenvolvendo-se
50 aceleradamente. Fato esse atribuído ao investimento de pesquisadores e produtores
51 no melhoramento da qualidade deste produto, tornando-o mais nutritivo e mais
52 magro (ABIPECS, 2013). Reflexo disso é o aumento no consumo *per capita* de
53 carne suína pelos brasileiros, que chegou a 15 kg/hab/ano em 2015 (ABPA, 2016).
54 No entanto, a carne suína e seus derivados, devido aos seus altos percentuais de
55 proteínas, vitaminas e minerais, constituem um ambiente propício para o
56 desenvolvimento bacteriano, inclusive de bactérias patogênicas, tornando-se um
57 veículo de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

58 *Yersinia enterocolitica* é um patógeno de alta prevalência em toxi-infecções
59 alimentares em humanos (Drummond *et al.*, 2012). *Y. enterocolitica* é um patógeno
60 gastrointestinal que provoca enterite aguda com febre e diarreia, principalmente em
61 crianças. Casos de eritema nodoso, artrite, linfadenite mesentérica e
62 pseudoapendicite também têm sido associados a esta bactéria (Fredriksson-
63 Ahomma, 2010).

64 Os mecanismos de patogenicidade de *Y. enterocolitica* são complexos e
65 envolvem inúmeros fatores. A presença de um plasmídeo de virulência, denominado
66 *pYV* é essencial e, para que haja a infecção, são necessários, pelo menos, dois
67 fatores cromossômicos chamados *ail*, encontrado apenas em cepas patogênicas, e

68 *inv*, presente tanto em cepas patogênicas quanto não patogênicas (Wannet *et al*,
69 2001).

70 Esta bactéria é encontrada no intestino de diferentes espécies animais, tanto
71 em indivíduos sadios quanto doentes. Os suínos são importantes reservatórios de *Y.*
72 *enterocolitica* patogênica e destacam-se como portadores crônicos dos sorotipos
73 mais comumente implicados na infecção humana, albergando-a na cavidade oral,
74 língua, tonsilas e linfonodos e excretando-a nas fezes (Nesbakken *et al.*, 2003;
75 Germano e Germano, 2015). Estima-se que 77,3% dos casos de yersiniose humana
76 sejam devidos ao consumo de carne suína crua ou malcozida contaminada (Fosse
77 *et al.*, 2009; Rosner *et al.*, 2012). Borch *et al.*, (1996) destacam que *Y. enterocolitica*
78 é também uma das bactérias inseridas na linha do abate pelo próprio suíno. Além
79 disso, algumas cepas possuem a capacidade de se aderir às superfícies sólidas,
80 produzindo biofilmes. Esta capacidade, associada a falhas nos procedimentos
81 higiênico-sanitários, permite que os resíduos aderidos em superfícies e
82 equipamentos transformem-se em potenciais fontes de contaminação (Parizzi *et al.*,
83 2004).

84 A presença de *Y. enterocolitica* nos produtos de origem suína deve ser
85 pesquisada, visto que estes alimentos têm sido reportados como uma importante
86 forma de veiculação de DTA para humanos (Bolton *et al.*, 2013; Bonardi *et al.*, 2013;
87 Van Damme *et al.*, 2013; Blagojevic e Antic, 2014; Laukkanen *et al.*, 2014), inclusive
88 no Brasil (Paixão *et al.*, 2013; Saba *et al.*, 2013). Desta forma, considerando que
89 suínos prontos para abate podem albergar *Y. enterocolitica* na granja, o objetivo
90 deste trabalho foi verificar a importância da contaminação dos suínos por *Y.*
91 *enterocolitica* na granja para a contaminação no fluxograma de abate.

92

93 **Materiais e métodos**

94 Durante o estudo, 60 suínos de 15 baias de uma granja de ciclo completo,
95 localizada no sul do Rio Grande do Sul, foram selecionados aleatoriamente,
96 identificados e acompanhados durante o abate em um matadouro-frigorífico
97 legalmente estabelecido, cadastrado e inspecionado pela Divisão de Inspeção
98 Sanitária de Produtos de Origem Animal da Secretaria da Agricultura, Pecuária e
99 Irrigação do Rio Grande do Sul, onde em cada coleta foram amostrados quatro
100 suínos de cada baia. Duas semanas antes do carregamento dos animais para o
101 abate, foram coletadas amostras de fezes para pesquisa de *Y. enterocolitica* no

102 interior das baías, com o uso de propés descartáveis, onde se caminhava em
103 diferentes direções. O material contido nos propés foi coletado com zaragatoas
104 estéreis, totalizando três amostras por baía. Imediatamente após a coleta, as
105 amostras foram encaminhadas para análise em meio de transporte Cary Blair
106 (Himedia, Índia) em caixa isotérmica com gelo.

107 Ao longo do fluxograma de abate, quatro animais de cada baía foram
108 acompanhados, dos quais foram coletados os seguintes pontos: 1) Coleta de fezes
109 após a insensibilização, através da introdução de zaragatoa estéril no reto; 2) Após a
110 depiladeira, através de fricção de uma zaragatoa estéril em uma área de 100 cm²
111 delimitada por gabarito de aço inoxidável estéril na superfície externa da carcaça, a
112 15 cm da linha do dorso, a partir da 5^a costela; 3) Após a abertura da cavidade
113 abdominal, através da fricção de zaragatoa estéril em uma área de 100 cm²
114 delimitada por gabarito de aço inoxidável estéril na superfície interna da carcaça, a
115 10 cm das articulações das costelas com as vértebras, a partir da 5^a costela; 4)
116 Imediatamente antes da carcaça entrar na câmara fria, através da fricção de uma
117 zaragatoa estéril na superfície externa da carcaça em uma área de 100 cm²
118 delimitada por gabarito de aço inoxidável estéril, a 15 cm da linha do dorso e a partir
119 da 5^a costela; 5) Amostra da papada, através da fricção de uma zaragatoa estéril na
120 superfície interna da papada.

121 Também foram coletadas amostras da água do tanque de escaldagem, em
122 frascos de vidros estéreis em volume aproximado de 50 mL, antes de iniciar o abate
123 e após a passagem dos animais.

124 Para o isolamento de *Y. enterocolitica* as zaragatoas com as amostras foram
125 semeadas por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, Michigan,
126 USA). Após incubação a 37°C por 24 horas, três colônias lactose negativas foram
127 semeadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia), incubadas
128 novamente a 37°C por 24 horas e misturadas a 20% de glicerol para manutenção de
129 estoque a -70°C.

130 O DNA dos isolados suspeitos de *Y. enterocolitica* foi extraído de acordo com
131 o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). O *pellet* obtido por centrifugação
132 de 1 mL de cultura em BHI foi ressuspendido em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl
133 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Após, foram adicionados
134 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio, seguido de
135 homogeneização por 1 min e centrifugação a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi

136 coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a
 137 -70 °C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, e o
 138 sobrenadante descartado. Então, o *pellet* foi lavado com etanol a 70%. Por fim, a
 139 eluição foi feita em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH
 140 7,4). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

141 Para identificação de *Y. enterocolitica*, foi realizada duplex - PCR conforme
 142 Wannet *et al.* (2001). Cada 25 µL da mistura de reação continha os *primers*
 143 específicos para os genes *ail* e *rRNA 16S* (Tab. 1) nas concentrações de 160 nM e
 144 80 nM, respectivamente; 200 µM de cada nucleotídeo; 0,5 U de *Taq* DNA
 145 polimerase; 1x de tampão; 2 µL (20 ng) de DNA.

Tabela 1. *Primers* utilizados na identificação de *Y. enterocolitica*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' a 3')	Gene alvo	Tamanho da amplificação (pb)	Referência
A1	TTAATGTGTACGCTGGGAGTG	<i>Ail</i>	425	Wannet <i>et al.</i> (2001)
A2	GGAGTATTCATATGAAGCGTC			
Y1	AATACCGCATAACGTCTTCG	16S	330	Neubauer <i>et al.</i> (2000)
Y2	CTTCTTCTGCGAGTAACGTC			

146 A amplificação foi realizada a 94°C durante 5 min, seguido por 36 ciclos de
 147 94°C durante 45 s, 62°C por 45 s e 72 °C por 45 s. A extensão final foi realizada a
 148 72°C durante 7 min. Os produtos de PCR, foram corados com GelRed e visualizados
 149 em gel de agarose 1,5%.

150 A comparação dos perfis moleculares de *Y. enterocolitica* foi realizada através
 151 de rep-PCR, utilizando o *primer* (GTG)₅ (Versalovic *et al.*, 1994). As condições da
 152 rep-PCR foram as seguintes: 2,5 µL de DNA, 2 µL do *primer* (5'-
 153 GTGGTGGTGGTGGTG-3'), 12,5 µL de Master Mix (Sigma Aldrich, EUA) e 8 µL de
 154 água para completar o volume da reação. Para a amplificação foi realizado um ciclo
 155 de 94°C por 5min, 30 ciclos subsequentes de 95°C por 30s, 45°C por 1min e 60°C
 156 por 5min, e finalmente um ciclo de 60°C por 16 min. Para a visualização dos padrões
 157 de banda das diferentes regiões amplificadas no genoma, os produtos da rep-PCR
 158 foram corados com GelRed e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 2%.

159

160 **Resultados e discussão**

161 Das 345 amostras coletadas em nosso estudo, *Y. enterocolitica* foi isolada de
 162 três (20%) das quinze baías analisadas e de 20 (6,67%) das 300 amostras obtidas
 163 durante o fluxograma de abate (Tab. 2).

Tabela 2. Presença de *Yersinia enterocolitica* na granja e no fluxograma de abate de suínos

Lotes	Granja	Água Inicial	Reto ^a	PD	PE	EC	Papada	Água Final
1	-	-	----	----	----	----	----	-
2	+	-	----	++--	-+--	---+	--+-	-
3	-	-	----	----	----	+---	----	-
4	-	-	+---	----	----	----	----	-
5	-	-	----	+---	----	---+	-+++	-
6	-	-	----	--+-	--+-	----	+---	-
7	-	-	----	----	----	----	----	-
8	-	-	----	----	----	----	----	-
9	-	-	----	----	----	----	----	-
10	-	-	----	----	----	----	----	-
11	-	-	----	----	----	----	----	-
12	+	-	---+	--+-	-+--	---+	++++	-
13	-	-	----	----	----	----	----	-
14	+	-	----	----	----	----	----	-
15	-	-	----	----	----	----	----	-

^aNas colunas onde aparecem quatro símbolos (+ ou -), cada um corresponde a um suíno. A ordem dos animais é a mesma em toda a linha. Ausência de *Y. enterocolitica* (-); presença de *Y. enterocolitica* (+).

PD – Pós-depiladeira

PE – Pós-evisceração

EC – Entrada da câmara fria

164 No lote 12, a cepa isolada da baia em que este lote se encontrava na granja
165 apresentou padrão de bandas indistinguível do isolado obtido do reto do animal 4
166 após a insensibilização, indicando que este suíno veio da granja contaminado. Já o
167 animal 2, apresentou um isolado obtido da superfície da carcaça após a evisceração
168 indistinguível da cepa isolada na granja. Este resultado sugere que provavelmente
169 este suíno fosse portador de *Y. enterocolitica* e que os procedimentos de
170 evisceração não foram adequados, vindo a contaminar a superfície interna da
171 carcaça. Os isolados obtidos das amostras coletadas no fluxograma de abate dos
172 animais do lote 2 não apresentaram padrão de bandas similares aqueles obtidos do
173 isolado oriundo das amostras de fezes coletadas na baia em que o lote se
174 encontrava na granja, o que indica que sua origem se deveu a outras fontes de
175 contaminação durante o processamento. Por outro lado, nenhum dos animais do lote

176 14, de cujas fezes foi isolada *Y. enterocolitica* na granja, apresentou o micro-
177 organismo nas fezes no momento do abate, sugerindo que a contaminação das
178 fezes na baia seja oriunda de outros animais do mesmo lote. Nas amostras do reto,
179 dois animais estavam contaminados com *Y. enterocolitica*, um oriundo de baia
180 positiva e um de baia negativa. Nota-se que nem todos os animais provenientes de
181 baias contaminadas com *Y. enterocolitica* apresentaram esta bactéria no reto,
182 demonstrando que estes animais poderiam não estar contaminados ou não estar
183 excretando o micro-organismo no momento da coleta. Por outro lado, um animal
184 contaminado com *Y. enterocolitica* era oriundo de uma baia negativa. É possível que
185 no momento da coleta nas baias não se tenha conseguido isolar *Y. enterocolitica*
186 das fezes, apesar das amostras serem o mais representativas possível, ou que o
187 suíno não estivesse excretando a bactéria, mesmo estando contaminado, e no
188 momento do abate, devido ao estresse ao qual foi submetido durante o transporte
189 e/ou jejum, passasse a excretá-la. O pequeno número de isolados obtidos das fezes
190 coletadas do reto dos animais (2/20) em relação aos isolados obtidos em outros
191 pontos do fluxograma de abate (18/20) indicam que, apesar da contaminação no
192 abatedouro-frigorífico a partir dos animais portadores ser uma possibilidade, as
193 fontes de contaminação mais frequentes encontram-se no próprio estabelecimento.
194 De acordo com Parizzi *et al.* (2004), algumas cepas de *Y. enterocolitica* são capazes
195 de produzir biofilmes. Esta capacidade, associada a falhas nos procedimentos
196 higiênico-sanitários, permite que os resíduos aderidos em superfícies e
197 equipamentos transformem-se em potenciais fontes de contaminação.
198 Adicionalmente, a diversidade de padrões de bandas obtidos com a rep-PCR sugere
199 uma grande variedade de fontes de contaminação, o que dificulta a sua
200 identificação.

201 Foram obtidos cinco isolados (25%) da superfície da carcaça após a
202 passagem na depiladeira. A etapa de escaldagem, realizada imediatamente antes
203 da depilação, além de facilitar a retirada dos pelos, pode contribuir para a diminuição
204 da carga microbiana presente na pele (Lassok e Tenhaggen, 2013). De acordo com
205 Bolton (2013), temperaturas entre 57 e 62°C são suficientes para inativar *Y.*
206 *enterocolitica* no tanque de escaldagem. A legislação brasileira estabelece que a
207 escaldagem dos suínos seja feita com água a uma temperatura de 62° a 72° C, por
208 dois a sete minutos (MAPA, 1995). Nenhuma as amostras de água do tanque de
209 escaldagem analisadas estava contaminada com *Y. enterocolitica*. No entanto, a

210 etapa de depilação é considerada um ponto crítico, uma vez que pode haver a
211 contaminação da carcaça através de secreções da cavidade oral ou do trato
212 gastrointestinal excretadas por animais portadores. Se, no abate, os suínos
213 estiverem excretando o micro-organismo, é possível que no momento de rolagem do
214 suíno para a retirada dos pelos haja o extravasamento de material fecal e
215 contaminação superficial da carcaça (Borch *et al.*, 1996). Entretanto, nenhuma cepa
216 isolada no reto dos animais apresentou similaridade com as cepas isoladas nas
217 superfícies das carcaças após esta etapa, sugerindo que possivelmente houve
218 contaminação cruzada com cepas oriundas de outros lotes de suínos que
219 persistiram nos equipamentos devido a condições de manejo higiênico-sanitário
220 ineficientes ou durante a toailete da depilação, realizada manualmente, através de
221 manipuladores contaminados.

222 Das amostras da superfície da carcaça após a evisceração, *Y. enterocolitica*
223 foi isolada de três (15%). No frigorífico acompanhado, a oclusão do reto era
224 realizada com lacre de nylon. No entanto, o uso de saco plástico envolvendo o reto
225 tem sido sugerido como um método mais eficaz durante esta etapa, visto que, se o
226 lacre não for bem fechado, pode haver contaminação da carcaça com conteúdo
227 fecal. Laukannen *et al.* (2010) registraram uma diferença de 10% para 0,8% de
228 contaminação da carcaça nesta etapa em dois frigoríficos diferentes, quando
229 comparados o uso somente de lacre e o uso de saco plástico na oclusão do reto,
230 respectivamente. É possível também que tenha havido contaminação das carcaças
231 através do uso de utensílios de corte mal higienizados. Outra possibilidade é a
232 contaminação cruzada através de manipuladores portadores assintomáticos da
233 bactéria. Quando analisados pela rep-PCR, pode-se perceber que no lote 2, o
234 isolado do animal 2 obtido nesta etapa foi indistinguível da cepa isolada na
235 superfície da carcaça após a depiladeira, indicando que as operações foram
236 ineficazes em eliminar o micro-organismo neste caso.

237 A papada foi o local onde se obteve o maior número de isolados,
238 correspondendo a 30% (6/20) das amostras positivas para *Y. enterocolitica* obtidas
239 no fluxograma de abate. *Y. enterocolitica* é comumente encontrada na cavidade oral
240 dos suínos, principalmente nos linfonodos submandibulares, tonsilas, língua e
241 faringe, o que pode explicar esse maior isolamento na papada, região próxima aos
242 locais supracitados (Nesbakken *et al.*, 2003; Paixão *et al.*, 2013). Uma outra
243 possibilidade de contaminação seria uma falha de procedimento durante a inspeção

244 dos linfonodos submandibulares, podendo levar à disseminação da bactéria através
245 dos utensílios utilizados ou das mãos dos agentes de inspeção.

246 A partir da superfície da carcaça antes da entrada na câmara fria foram
247 obtidos 20% (4/20) dos isolamentos de *Y. enterocolitica* das amostras coletadas
248 durante o fluxograma de abate. Através da rep-PCR, foi possível observar que a
249 cepa isolada da superfície da carcaça do animal 4 do lote 12 era indistinguível dos
250 isolados obtidos do reto do mesmo animal e da amostra de fezes da baia em que o
251 lote se encontrava na granja, que apresentaram o mesmo padrão de bandas,
252 conforme comentado anteriormente. Estes resultados demonstram que a
253 contaminação na granja pode permanecer durante todo o processamento de abate,
254 persistindo no produto final. Também deixam claro que as medidas de boas práticas
255 adotadas no abatedouro-frigorífico não foram eficazes na eliminação do micro-
256 organismo. A presença de *Y. enterocolitica* nesta etapa do processo revela-se
257 importante, uma vez que este micro-organismo é psicrotrófico, multiplicando-se em
258 temperaturas abaixo de 4°C e permanecendo viável nos alimentos mesmo após
259 longos períodos de refrigeração (Laukannen *et al.*, 2014).

260

261 **Conclusões**

262 *Y. enterocolitica* presente no trato gastrointestinal de suínos na granja pode não
263 ser eliminada ao longo de todo o fluxograma de abate e permanecer na carcaça
264 destinada à câmara fria. Entretanto, as fontes de contaminação mais frequentes
265 encontram-se no próprio estabelecimento de abate, sendo a papada e a entrada da
266 câmara fria os pontos mais críticos de controle.

267 A maioria das cepas de *Y. enterocolitica* obtidas em diferentes pontos no
268 fluxograma apresentaram distintos padrões de banda na rep-PCR, indicando não
269 terem uma origem recente comum, o que significa que as fontes de contaminação
270 no estabelecimento são bastante diversas.

271

272 **Agradecimentos**

273 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
274 pelo financiamento da pesquisa.

275

276 **Referências**

- 277 ABIPÉCS. Relatório Anual, 2013. Associação Brasileira da Indústria Produtora e
278 Exportadora de Carne Suína. Disponível em
279 <<http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>>. Acesso em: 30 dez. 2016.
- 280 ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual de 2015.
281 Disponível em: <[http://abpa-](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)
282 [br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)
283 [anual_2016_portugues_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)> Acesso em: 26 out. 2016.
- 284 BLAGOJEVIC, B.; ANTIC, D. Assessment of potential contribution of official meat
285 inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef
286 and pork carcasses. *Food Control*, v. 36, n. 1, p. 174-182, 2014.
- 287 BOLTON, D. J.; IVORY, C.; MCDOWELL, D. A small study of *Yersinia enterocolitica*
288 in pigs from birth to carcass and characterization of porcine and human strains. *Food*
289 *Control*, v. 33, n. 2, p. 521-524, 2013.
- 290 BONARDI, S.; BASSI, L.; BRINDANI, F. et al. Prevalence, characterization and
291 antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs
292 at slaughter in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 163, n. 2, p. 248-257, 2013.
- 293 BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine
294 slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 30, n.1, p. 9-
295 25, 1996.
- 296 DRUMMOND, N.; MURPHY, B. P.; RINGWOOD, T. et al. *Yersinia enterocolitica*: a
297 brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges,
298 and the pork production chain. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 9, n.3, p.179-189, 2012.
- 299 FOSSE, J.; SEEGERS, H.; MAGRAS, C. Foodborne zoonoses due to meat: a
300 quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering
301 in Europe. *Vet. Res.*, v.39, p.1-16, 2009.
- 302 FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. *Yersinia*
303 *enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, p. 164–180. In: Pathogens And
304 Toxins In Foods: Challenges And Interventions. ASM Press, Washington, DC.2010.
- 305 GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos.
306 5. ed. Barueri, 2015, 1077p.
- 307 LASSOK, B.; TENHAGEN, B. A. From pig to pork: methicillin-resistant
308 *Staphylococcus aureus* in the pork production chain. *J. Food Prot.*, v. 76, n. 6, p.
309 1095-1108, 2013.

- 310 LAUKANNEN, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; MAIJALA, R. et al. High
311 prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig cheeks. *Food Microbiol.*, v. 43,
312 p. 50-52, 2014.
- 313 LAUKANNEN, R.; RANTA, J.; DONG, X. et al. Reduction of enteropathogenic
314 *Yersinia* in the pig slaughterhouse by using bagging of the rectum. *J. Food Prot.*, v.
315 73, n. 12, p. 2161-2168, 2010.
- 316 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 711, de 1º de
317 novembro de 1995. Aprova as normas técnicas de instalações e equipamentos para
318 abate e industrialização de suínos. Diário Oficial da União, Brasília, DF: 3 nov. 1995.
- 319 NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HOIDAL, H.K. et al. Occurrence of *Yersinia*
320 *enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat
321 inspection, slaughtering, and dressing procedures. *Int. J. Food Microbiol.*, v.80,
322 p.231-240, 2003.
- 323 PAIXÃO, R.; MORENO, L. Z.; SENA DE GOBBI, D. D. et al. Characterization of
324 *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and
325 markets. *The Scientific World Journal*, v. 2013, ID 769097, 2013.
- 326 PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J. D.; SILVA, C. A. D. S. et al. Bacterial adherence
327 to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count
328 method. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.
- 329 ROSNER, B.M.; STARK, K.; HÖHLE, M. et al. Risk factors for sporadic *Yersinia*
330 *enterocolitica* infections. *Epidemiol. Infect.*, v.140, p.1738-1747, 2012.
- 331 SABA, R.Z.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; KAMIMURA, B.A. et al. Isolation of *Yersinia*
332 *enterocolitica* in slaughtered swine. *Ars Vet.*, v. 29, n. 4, 2013.
- 333 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York:
334 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 335 VAN DAMME, I.; BERKVEN, D.; BOTTELDOORN, N. et al. Evaluation of the ISO
336 10273: 2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*
337 from pig carcasses and minced meat. *Food Microbiol.*, v. 36, n. 2, p. 170-175, 2013.
- 338 VERSALOVIC. J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J. et al. Genomic fingerprinting of
339 bacteria with repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods Mol.*
340 *Cell. Biol.*, v. 5, p. 25–40, 1994.
- 341 WANNET, W.J.B.; REESSINK, M.; BRUNINGS, H.A. et al. Detection of pathogenic
342 *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive Duplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*,
343 v. 39, n. 12, p. 4483–4486, 2001.

3 Considerações Finais

Através do nosso estudo, observou-se que as pocilgas de espera são importantes fontes de contaminação de SCP para os suínos enviados ao abate. Uma vez contaminados, os animais podem carrear o micro-organismo para o ambiente de abate através de fezes, linfonodos mesentéricos e cavidade oral. Este é o primeiro trabalho realizado no Brasil, que sem tem conhecimento, relatando a importância das pocilgas de espera como fontes de contaminação para os suínos destinados ao abate.

A origem da contaminação por *Y. enterocolitica* em suínos pode ocorrer na granja. No entanto, a contaminação se dá principalmente no abatedouro-frigorífico. Através da comparação dos padrões de banda, observou-se que as fontes de contaminação no ambiente de abate são diversas, uma vez que as cepas encontradas foram distintas. A água no tanque de escaldagem não constitui um risco de contaminação de *Y. enterocolitica*, se bem observadas as medidas de controle durante a operação.

As medidas de boas práticas adotadas no pré-abate e durante o fluxograma de abate, se ineficientes, podem permitir a persistência destas bactérias no produto final, constituindo um risco à saúde pública.

Referências

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Relatório Anual 2015**. Disponível em:

<http://www.abiec.com.br/img/up/ABIEC_FolderPerfil_PT.pdf> Acesso em: 22 dez. 2016.

ABIPECS. Relatório Anual, 2013. **Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína**. Disponível em

<<http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>>. Acesso em: 30 dez. 2016.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual de 2015**.

Disponível em: <[http://abpa-](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)

[br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)> Acesso em: 26 out. 2016.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**. v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000.

BARI, L.; HOSSAIN, M.A.; ISSHIKI, K.; UKUKU, D. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. **Journal of Pathogens**. v. 2011, 2011.

BECKER, K.; KELLER, B.; von EIFF, C.; BRUCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, , v. 67, n. 12, p. 5551-5557, 2001.

BENEKE, B.; KLEES, S.; STÜHRENBERG, B.; FETSCH, A.; KRAUSHAAR, B.; TENHAGEN, B. A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a fresh meat pork production chain. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 1, p. 126-129, 2011.

BERGDOLL, M. S. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Staphylococcus aureus*. **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v. 74, n. 4, p. 706-710, 1990.

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology - **Bergey's Taxonomic Outlines**, Volume 3. Disponível em: <<http://www.bergeys.org/outlines.html>> Acessado em: 25 out. 2016.

BERGEY'S. **Manual of Determinative Bacteriology**. M.D. WILLIAMS & S.T. WILKINS, 9 ed., Baltimore, 1994, 787p.

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

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

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

BLAGOJEVIC, B.; ANTIC, D. Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 174-182, 2014.

BOLTON, D. J.; IVORY, C.; MCDOWELL, D. A small study of *Yersinia enterocolitica* in pigs from birth to carcass and characterization of porcine and human strains. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 521-524, 2013.

BOLTON, D. J.; PEARCE, R. A.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A.; & HARRINGTON, D. Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 5, p. 893-902, 2002.

BONARDI, S.; BASSI, L.; BRINDANI, F.; D'INCAU, M.; BARCO, L.; CARRA, E.; PONGOLINI, S. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 248-257, 2013.

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

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

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. 2003. Acesso em 25 out. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 22 out. 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **RDC nº 12**, de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>> Acesso em: 22 out. 2016.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Chesse and raw milk in Brasil. **Food Microbiology**, v.19, p.9-14, 2002.

CORNELIS G.R. The *Yersinia* YSC-Yop “type III” weaponry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 10, p. 742-754, 2002.

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

DIAS, R.S. Surtos de intoxicação alimentar por linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* ocorridos em diferentes municípios mineiros. **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v.2, n.4, 2012.

DRUMMOND, N.; MURPHY, B. P.; RINGWOOD, T.; PRENTICE, M. B.; BUCKLEY, J. F.; FANNING, S. *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n.3, p.179-189, 2012.

EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*. v.14, n.12, p. 231, 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4634/full>> Acesso em: 30 dez. 2016.

EUZÉBY, J. P. M. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)**. [Internet]. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/allnamessz.html>> Acesso em: 25 out. 2016

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.607p.

FOSSE, J.; SEEGERS, H.; MAGRAS, C. Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. **Veterinary Research**, v.39, p.1-16, 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu: São Paulo, 2005, 182p.

FRASER, J. D.; PROFT, T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. **Immunological Reviews**, v. 225, n. 1, p. 226-243, 2008.

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

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: **Foodborne Diseases**. Humana Press, 2007. p. 79-113.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, p. 164–180. In: **Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions**. ASM Press, Washington, DC.2010.

GALINDO, C. L.; ROSENZWEIG, J.A.; KIRTLEY, M.L.; CHOPRA, A.K. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. **Journal of Pathogens**, 2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5. ed. Barueri, 2015, 1077p.

GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 51, n.4, p. 245-248, 2003.

GUERRA FILHO, J. B. P.; VEIGA, S. J.; POSSEBON, F. S.; SUDANO, M. J.; GALVÃO, J. A.; YAMATOGLI, R. S.; PINTO, J. P. D. A. N. Prevalência e Sorotipagem de *Salmonella* em Linfonodos e Fezes de Suínos. **Blucher Food Science Proceedings**, v.1, n., p. 337-338, 2014.

HASAN, A. A., HASSAWI, D. S., AL-DAGHISTANI, H. I., HAWARI, A. D. Molecular and Biochemical Identification of Coagulase Positive *Staphylococcus* Species Isolated from Human and Animal Sources in Jordan. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, Vol.47, n.1, v.1, p.1491-1504, 2014.

HEISE, T.; DERSCH, P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 9, p. 3375-3380, 2006.

HENNEKINNE, J. A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A. L.; DRAGACCI, S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2106-2116, 2010.

HENNEKINNE, J.; DE BUYSER, M.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

HOLT, J. G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P. H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS S.T.; **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th.ed. Baltimore: Willians and Wilkins; 1994. p.189.

JAY, J. M. Modern food microbiology. **An Aspen Publication**, 2000.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 712p.

KHANNA, T., FRIENDSHIP, R., DEWEY, C., & WEESE, J. S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary microbiology**, v. 128, n.3, p. 298-303, 2008.

KONEMAN, E.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5ª Edição, Jr Rio de Janeiro: Medsi, 2010.

LASSOK, B.; TENHAGEN, B. A. From pig to pork: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the pork production chain. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 6, p. 1095-1108, 2013.

LAUKANNEN, R.; HAKKINEN, M.; LUNDÉN, J.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; JOHANSSON, T.; KORKEALA, H. Evaluation of isolation methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig intestinal content. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 956-964, 2010.

LAUKANNEN, R.; RANTA, J.; DONG, X.; HAKKINEN, M.; MARTÍNEZ, P. O.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. Reduction of enteropathogenic *Yersinia* in the pig slaughterhouse by using bagging of the rectum. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 12, p. 2161-2168, 2010.

LAUKANNEN-NINIOS, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; MAIJALA, R., & KORKEALA, H. High prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig cheeks. **Food microbiology**, v. 43, p. 50-52, 2014.

LE LOIR, Y. F.; BARON A. N.; GAUTIER, M. *S. aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-73, 2003.

LEAL, T.C.A; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Ausência de *Yersinia enterocolitica* em alimentos e reservatórios animais, em áreas do Estado do Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, 1997.

LIMA, E.D.S.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, J.L.D.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; ALMDEIDA, L. P.; PINTO, M. S.; DIAS, F.S. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle-APPCC1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 185-190, 2004.

LINDBLAD, M.; LINDMARK, H.; LAMBERTZ, S. T.; LINDQVIST, R. Microbiological baseline study of swine carcasses at Swedish slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p. 1790-1797, 2007.

LINHARES, L. L.; SREEVATSAN, S.; MUNOZ-ZANZI, C. A.; TORREMORELL, M.; DAVIES, P. R. The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 1, p. 55-60, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Abate Humanitário de Suínos**. 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Abate%20H_%20de%20Suinos%20-%20WSPA%20Brasil.pdf> Acesso em: 06 Jan. 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 711, de 01 de novembro de 1995. Dispõe sobre as Normas técnicas de instalações e equipamentos para abate industrialização de suínos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil 1995; 03 nov.

MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G. S.; OLIVEIRA, L. F.; CARVALHO, S. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.1, p.1-14, 2012.

MILLER V.L.; BEER K.B.; HEUSIPP G.; YOUNG B.M.; WACHTEL M.R. Identification of regions of *ail* required for the invasion and serum resistance phenotypes. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1053-1062, 2001.

MOLLA, B.; BYRNE, M.; ABLEY, M.; MATHEWS, J.; JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P.; GEBREYES, W. A. Epidemiology and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of porcine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3687-3693, 2012.

MOO, D.; O'BOYLE, D.; MATHERS, W.; FROST, A. J. The isolation of *Salmonella* from jejunal and caecal lymph nodes of slaughtered animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 4, p. 181-183, 1980.

MORROW, W.E.M; DAVIES, P. R.; SEE, T.; EISEMANN, J.; ZERING, K.; KIHSTROM, S.; KARLI, K. The prevalence of *Salmonella* spp. in feces on farm and in ceca at slaughter. In: PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne. **Anais... Melbourne: IPVS**, 2000. p.207.

MURRAY, R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **International Medicine Journal**. 2005, 2, S106–S119.

NASCIMENTO, C. B. D. **Surtos de toxinfecção alimentar notificados e investigados no município de Porto Alegre no período de 2003 a 2011**. 2013. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/72697>> Acesso em: 06 dez. 2016

NESBAKKEN, T. Enumeration of *Yersinia enterocolitica* O: 3 from the porcine oral cavity, and its occurrence on cut surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 287-293, 1988.

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**, v.80, p.231-240, 2003.

NESBAKKEN, T.; NERBRINK, E.; RØTTERUD, O. J.; & BORCH, E. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 197-208, 1994.

NESKOVIC, A. **Characterization of coagulase positive staphylococci from pig carcasses from Swedish slaughterhouses**. 2008. Disponível em: <<http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A132205&dswid=510>> Acesso em: 30 dez. 2016.

NEUBAUER, H.; HENSEL, A.; ALEKSIC, S.; MEYER, H. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p.58-62, 2000.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa. EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 292-299, 2007.

NORMANNO, G.; DAMBROSIO, A.; LORUSSO, V.; SAMOILIS, G.; DI TARANTO, P.; PARISI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy. **Food Microbiology**, v. 51, p. 51-56, 2015.

O'BRIEN, A. M.; HANSON, B. M.; FARINA, S. A.; WU, J. Y.; SIMMERING, J. E.; WARDYN, S. E.; SMITH, T. C. MRSA in conventional and alternative retail pork products. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30092, 2012.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 2, p. 191-198, 2005.

PAIXÃO, R.; MORENO, L. Z.; SENA DE GOBBI, D. D.; RAIMUNDO, D. C.; HOFER, E.; MATTÉ, M. H.; MORENO, A. M. Characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and markets. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da carne**. 2. ed. Goiânia, 2001. 623p.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J. D.; SILVA, C. A. D. S.; SOARES, N. D. F. F.; SILVA, E. A. M. D. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PERLIN, G.O.; PEREIRA, L. F.; FERREIRA, B.P.M.; MARTINS, L. A. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. em embutidos cárneos registrados em serviço de inspeção municipal – sim em 2012 de três municípios do estado do Paraná. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.1, p. 43-49, 2015.

PODPECAN, B.; PENGOV, A.; VADNJAL, S. "The source of contamination of ground meat for production of meat products with bacteria *Staphylococcus aureus*," **Slovenian Veterinary Research**, vol. 44, pp. 24–30, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Ed. Artmed: Porto Alegre, 2005, 512p. Disponível em: < https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=TEXf61XCiP4C&oi=fnd&pg=PA10&dq=QUINN,+P.+J.+et+al.+Microbiologia+Veterin%C3%A1ria+e+doen%C3%A7as+infecciosas&ots=IOHBMKw-z7&sig=b74yD6hNxdLqEsrskrQ_VPcO_vc&redir_esc=y#v=onepage&q=QUINN%2C

%20P.%20J.%20et%20al.%20Microbiologia%20Veterin%C3%A1ria%20e%20doen%C3%A7as%20infecciosas&f=false> Acesso em: 18 Nov. 2016

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K., CARTER, M.E.; DONELLY, W.J.; LEONARD, F.C.; **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2 ed. Iowa: Wiley-blackwell. 2011, 1231p.

REVELL, P. A.; MILLER, V. L. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 2, p. 159-164, 2001.

RIVAS, T.; VIZCAÍNO, J. A.; HERRERA, F. J. Microbial contamination of carcasses and equipment from an Iberian pig slaughterhouse. **Journal of Food Protection**®, v. 63, n. 12, p. 1670-1675, 2000.

ROBINS-BROWNE, R.M. *Yersinia enterocolitica* In: DOYLE, P.M.; BEUCHAT, L.R. MOTIVILLE, T.J. (Eds). **Food Microbiology**. ASM Press, Boca Raton, p.215-245, 2001.

ROÇA, R.O. **Composição Química da Carne**. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca102.pdf>> Acesso em: 17 Nov. 2016.

ROSENVOLD, K., & ANDERSEN, H. J. Factors of significance for pork quality—a review. **Meat Science**, v. 64, n. 3, p. 219-237, 2003.

ROSNER, B.M.; STARK, K.; HÖHLE, M.; WERBER, D. Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections. **Epidemiology and Infection**, v.140, p.1738-1747, 2012.

RUSAK, L.A. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Yersinia enterocolitica* isoladas de diferentes origens no Brasil**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

SABA, R.Z.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; KAMIMURA, B.A.; LAVEZZO, L.F.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Isolation of *Yersinia enterocolitica* in slaughtered swine. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 4, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHLEIFER, K.; BELL, J. A. Family VII I. Staphylococcaceae fam. nov. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition**, v. 3, p. 392. Disponível em: <<http://www.springer.com/br/book/9780387950419>> Acesso em: 18 Nov. 2016

SCHRAFT, H.; KLEINLEIN, N.; UNTERMANN, F. Contamination of pigs hindquarters with *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 1-2, p.191-194,1992.

SHALE, K., LUES, J. F. R., VENTER, P., BUYS, E. M. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 433-438, 2005.

SILVA, N., JUNQUEIRA, S. **Manual de métodos de análise microbiológicos em alimentos** Sd. Varela p.125-131, 1997.

TANIH, N. F.; SEKWADI, E.; NDIP, R. N.; BESSONG, P. O. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in Abattoirs in Vhembe District, South Africa. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

THIBODEAU, V.; FROST; E. H.; CHENIER, S.; QUESSY, S. Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally-inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 96, 1999.

TRANter, H.S. Foodborne staphylococcal illness. **Lancet** 1990, 336, 1044–1046.

USDA. United States Department of Agriculture. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acesso em: 26 de dez de 2016.

VAN DAMME, I.; BERKVENs, D.; BOTTELDOORN, N.; DIERICK, K.; WITS, J.; Pochet, B.; DE ZUTTER, L. Evaluation of the ISO 10273: 2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 170-175, 2013.

VAN DAMME, I.; BERKVENs, D.; VANANTWERPEN, G.; BARÉ, J.; HOUF, K.; WAUTERS, G.; DE ZUTTER, L. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with enteropathogenic *Yersinia* spp.: Distribution, quantification and identification of risk factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 33-40, 2015.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.

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**. v. 39, n. 12, p. 4483–4486, 2001.

WELKER, C. A. D., BOTH, J. M. C., LONGARAY, S. M., HAAS, S., SOEIRO, M. L. T., & RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, 2010.

WHEATLEY, P.; GIOTIS, E. S.; MCKEVITT, A.I. Effects of slaughtering operations on carcass contamination in an Irish pork production plant. **Irish Veterinary Journal**, v.67, n.1, 2014.