

PAULA WILDEMANN

**PESQUISA DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PATOGÊNICA
EM TONSILAS DE SUÍNOS AO ABATE EM SANTA CATARINA**

**LAGES, SC
2016**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

PAULA WILDEMANN

**PESQUISA DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PATOGÊNICA
EM TONSILAS DE SUÍNOS AO ABATE EM SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Eliana Knackfuss Vaz

**LAGES, SC
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Wildemann, Paula
Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* patogênica
em tonsilas de suínos ao abate em Santa Catarina /
Paula Wildemann. Lages - 2016.
69 p.

Orientadora: Eliana Knackfuss Vaz
Co-orientador: Ubirajara Maciel da Costa
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2016.

1. Genes de virulência. 2. Infecção alimentar. 3.
PCR convencional. 4. PCR quantitativa em tempo
real. 5. Zoonose. I. Knackfuss Vaz, Eliana . II.
Maciel da Costa, Ubirajara . III. Universidade do
Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal. IV. Título.

PAULA WILDEMANN

**PESQUISA DE YERSINIA ENTEROCOLITICA PATOGÊNICA
EM TONSILAS DE SUÍNOS AO ABATE EM SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador(a) : E.U.g
Professora Dr^a. Eliana Knackfuss Vaz
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro: Sandra
Professora Dr^a. Sandra Maria Ferraz
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro: Alvaro Menin
Professor Dr Álvaro Menin
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

À fonte criativa de todo o universo (Deus) pela maravilhosa oportunidade de experienciar esta vida repleta de aprendizado.

Agradeço imensamente aos meus pais pelo amor, apoio, educação e compreensão. Agradeço pelos cuidados e conselhos que, mesmo à distância, fizeram toda a diferença.

Ao meu noivo, Felipe Gava, que esteve presente em mais esta etapa da minha vida. Obrigada pelo apoio, carinho e amor, por ser este maravilhoso companheiro que és e por me fazer muito feliz.

Agradeço à minha cunhada Danielle Gava, por ter me auxiliado muito na concretização deste trabalho, pelas ideias sugeridas, pela paciência e pelo tempo dispensado. Não tenho palavras para descrever como esta pessoa querida foi importante nessa hora e com certeza estará presente em muitos outros momentos da minha vida.

Ao Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal – CEDIMA e a todos seus integrantes, em especial à Sandra Ferraz, Ubirajara Costa, Fernanda Melo, Ricardo Sfaciotte, Matheus Schineider, Claudia Duarte, Marta Leitzke e Thais Nihues pela amizade e pela alegria que compartilhamos. Agradeço especialmente também à professora Eliana K. Vaz, pela orientação e carinho, não somente nesta fase, mas durante outras etapas da minha formação e de todo o tempo que fiz parte da equipe do CEDIMA.

À UDESC CAV e seus colaboradores por permitirem mais este desenvolvimento profissional, à CAPES pelo apoio financeiro e à Professora Juliana Falcão, da Universidade de São Paulo por gentilmente ceder o controle positivo utilizado neste trabalho.

Pacto com a Felicidade

De hoje em diante, todos os dias ao acordar direi: “Eu hoje
vou ser feliz!” Vou agradecer ao sol pelo seu calor e
luminosidade, sentirei que estou vivendo, respirando. A
natureza me oferece toda a sua beleza e seus recursos
gratuitamente. Não preciso comprar o canto dos pássaros,
nem o murmúrio das ondas do mar. Sentirei a beleza das
árvoreas, das flores. Vou sorrir mais, sempre que puder. Vou
cultivar mais amizades e neutralizar as inimizades. Não vou
julgar os atos dos meus semelhantes ou companheiros. Vou
aprimorar os meus. Lembrarei de ligar para alguém para dizer
que estou com saudades! Reservarei minutos de silêncio para
ter a oportunidade de ouvir. Não vou lamentar nem amargar
as injustiças. Pensarei no que posso fazer para diminuir seus
efeitos. Terei sempre em mente que, os minutos e as horas
não voltam mais. Vou vivê-los com intensidade focalizando o
presente. Não vou sofrer por antecipação prevendo futuros
incertos. Nem com atraso, lembrando de coisas sobre as quais
não tenho mais ação. Não vou pensar no que não tenho e no
que gostaria de ter, mas em como posso ser feliz com o que
possuo. E o maior bem que posso é a própria vida. Vou me
lembra de ler uma poesia e de ouvir uma canção. Vou
dedicá-las a alguém. Vou fazer algo que faça alguém feliz
sem esperar nada em troca, apenas pelo prazer do sorriso.
Vou lembrar que em algum lugar existe alguém que me quer
bem. Vou dedicar uns minutos de pensamento para os que já
se foram. Para que saibam que serão sempre uma doce
lembança até que venhamos a nos encontrar outra vez. Vou
levar alegria a quem esteja precisando. E, quando a noite
chegar, vou olhar para o céu, para as estrelas e para o luar...
Agradecer aos anjos e a Deus, porque, hoje eu fui feliz!

Tahyane Fire

RESUMO

Yersinia enterocolitica é uma bactéria Gram-negativa emergente que possui potencial zoonótico e está associada a quadros de infecção alimentar em humanos. Os suínos são considerados o principal reservatório de *Y. enterocolitica*, abrigando-a principalmente nas tonsilas. Tendo em vista a carne suína como uma das mais consumidas no mundo e a importância deste agente zoonótico, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Y. enterocolitica* patogênica em tonsila de suínos no momento do abate no estado de Santa Catarina. Para isto, foi utilizada uma PCR convencional multiplex que detecta a presença de genes de virulência (*ail*, *yadA* e *virF*) e comparou-se esta técnica com a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), somente para o gene *ail*. Foram coletadas aleatoriamente tonsilas de 400 suínos provenientes de quatro frigoríficos com inspeção federal em diferentes regiões do estado. Foi realizado o sequenciamento do DNA dos genes amplificados das amostras positivas na cPCR e posteriormente foi feita a análise filogenética. Apenas uma amostra foi positiva para os três genes pesquisados na PCR convencional, os quais foram confirmados por sequenciamento. A análise das sequências parciais dos três genes de virulência identificou três mudanças de aminoácidos exclusivas, sendo uma no gene *virF* e duas no gene *yadA*. Na qPCR esta amostra apresentou 11.058.398 moléculas/ μ L. Ao comparar as duas técnicas, a qPCR foi 100 vezes mais sensível que a PCR convencional. Isso demonstra uma baixa ocorrência de *Y. enterocolitica* patogênica em suínos sadios ao abate em frigoríficos com inspeção federal em Santa Catarina.

Palavras-chave: Genes de virulência. Infecção alimentar. PCR convencional. PCR quantitativa em tempo real. Zoonose. Yersiniose.

ABSTRACT

Yersinina enterocolitica is a Gram-negative bacteria with zoonotic potential. It is associated with the occurrence of enteric diseases in humans. Pigs are considered the main source of *Y. enterocolitica* and the bacteria is mainly found in the pig's palatine tonsils. The objective of this study was to evaluate the occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica* in palatine tonsils of healthy pigs from Santa Catarina, during the slaughter process. In order to achieve this goal, a multiplex PCR technique was performed so as to detect the presence of virulence genes (ail, yadA and virF). This technique was compared to quantitative real time PCR (qPCR), only for the ail gene. Palatine tonsils were randomly collected from 400 pigs from four federally inspected slaughterhouses of the state of Santa Catarina. One positive sample was found for the three studied virulence genes, which were confirmed by DNA sequencing. The analysis of partial sequences of the three virulence genes identified three unique amino acid changes, one in the virF gene and two in YadA gene. This sample had 11.058.398 molecules/ μ L detected by qPCR. By comparing the two techniques, qPCR was 100 times more sensitive than standard PCR. This result shows low occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica* in healthy pigs from federally inspected slaughterhouses in Santa Catarina.

Keywords: Virulence genes, food infection, convencional PCR, quantitative real time PCR, zoonosis, yersiniosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Curva de Melting da qPCR SYBR Green.....	53
Figura 2- Amplificação das amostras de tonsilas testadas para detecção do gene <i>ail</i> em <i>Y. enterocolitica</i> patogênica.....	55
Figura 3- Arvore filogenética de sequências de nucleotídeos do gene <i>ail</i> de <i>Y. enterocolitica</i> usando o método Neighbor-Joining.....	57
Figura 4- Arvore filogenética de sequências de nucleotídeos do gene <i>virF</i> de <i>Y. enterocolitica</i> usando o método Neighbor-Joining.....	58
Figura 5- Arvore filogenética de sequências de nucleotídeos do gene <i>yadA</i> de <i>Y. enterocolitica</i> usando o método Neighbor-Joining.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Iniciadores utilizados para a reação de cPCR multiplex e qPCR para a detecção de <i>Y. enterocolitica</i> patogênica.....	47
Tabela 2 -Variabilidade intra e inter-ensaio da qPCR para detecção do gene <i>ail</i> em <i>Y. enterocolitica</i> patogênica.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ail*:** Gene de invasão e adesão
cAMP: Adenosina monofosfato cíclico
CAV: Centro de Ciências Agroveterinárias
CEDIMA: Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
cPCR: Reação em Cadeia da Polimerase convencional
Cq Value: Ciclo de quantificação
dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
DTA: Doenças transmitidas por alimentos
EUA: Estados Unidos da América
g: Gramas
***inv*:** Gene cromossomal de invasão
kb: Kilobase (Quilobase)
mL: Mililitro
 mM: Milimolar
Nº: Número
NCTC: *National of Culture Type Collection*
ng: Nanograma
pb: Pares de base
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pH: Potencial hidrogeniônico
pYV: Plasmídeo de virulência de *Yersinia*
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real
TBE: Tris Borato EDTA
U: Unidade internacional
UDESC: Universidade do Estado de Santa Catarina
UFC: Unidades formadoras de colônias
UV: Ultravioleta
V: Volts
***virF*:** Gene regulador da virulência
X: Vezes
YadA: Adesina A de *Yersinia*

Yops: Proteínas externas de Yersinia

Y. enterocolitica: *Yersinia enterocolitica*

ystA: Gene da toxina ystA

ystB: Gene da toxina ystB

µL: Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	GÊNERO <i>YERSINIA</i>	22
2.2	<i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	22
2.2.1	Características gerais do micro-organismo.....	22
2.2.2	Patogênese e marcadores de virulência.....	24
2.3	SUÍNOS COMO PORTADORES DE <i>Y.</i> <i>ENTEROCOLITICA</i>	27
2.4	<i>Y. ENTEROCOLITICA</i> COMO PERIGO MICROBIOLÓGICO NA SAÚDE PÚBLICA.....	29
2.5	A INFECÇÃO CLÍNICA EM HUMANOS.....	31
2.6	MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>Y.</i> <i>ENTEROCOLITICA</i>	33
2		
	REFERÊNCIAS.....	35
3	PESQUISA <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> PATOGÊNICA EM TONSILAS DE SUÍNOS AO ABATE EM SANTA CATARINA.....	4 Erro! Indicador não definido.
RESUMO.....	44	
2		
	ABSTRACT.....	43
3.1	INTRODUÇÃO.....	44
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.2.1	Coleta de amostras.....	46
3.2.2	Extração de DNA.....	46

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) multiplex.....	47
3.2.3.1 <i>Condições e otimização da cPCR.....</i>	47
3.2.3.2 <i>Especificidade e sensibilidade da cPCR.....</i>	48
3.2.4 Sequenciamento e análise filogenética.....	49
3.2.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	49
3.2.5.1 <i>Condições e otimização da qPCR.....</i>	49
3.2.5.2 <i>Especificidade e sensibilidade da qPCR.....</i>	51
3.2.6 Comparação da sensibilidade da cPCR e qPCR para o gene <i>ail</i>	51
3.3 RESULTADOS.....	51
 3.3.1 Reação da polimerase em cadeia convencional (cPCR) multiplex.....	51
3.3.1.1 <i>Otimização da cPCR multiplex.....</i>	51
3.3.1.2 <i>Especificidade e sensibilidade da cPCR.....</i>	52
 3.3.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	52
3.3.2.1 <i>Otimização da qPCR.....</i>	52
3.3.2.2 <i>Especificidade e sensibilidade da qPCR.....</i>	53
3.3.2.3 <i>Comparação da sensibilidade da cPCR e qPCR.....</i>	54
 3.3.3 Amostra de Tonsila.....	55
 3.3.4 Sequenciamento e análise filogenética.....	56
3.4 DISCUSSÃO.....	59
3.5 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO	69

1 INTRODUÇÃO

Yersinia enterocolitica é uma bactéria Gram negativa que está associada a doença entérica em humanos e animais, a qual possui grande relevância na saúde pública. Esta espécie bacteriana é altamente heterogênea e pode ser dividida em vários biosorotipos, dos quais alguns apresentam elevada patogenicidade para humanos. As manifestações clínicas mais comuns desta doença incluem enterite, enterocolite, diarreia grave, febre, náuseas, linfadenite mesentérica e pseudoappendicite (Falcão; Falcão, 2006).

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) ocasionadas por *Y. enterocolitica* é um problema emergente de saúde pública, que preocupa as indústrias de alimentos e consumidores, especialmente na Europa devido a seus altos níveis de ocorrência, onde é a terceira doença entérica bacteriana mais comum (Fredriksson-Ahomaa; Stolle; Korkeala, 2006).

Esta doença de potencial zoonótico está veiculada especialmente a alimentos produzidos a base de carne suína, visto que esta espécie é portadora assintomática da bactéria em tonsilas e trato intestinal. Dessa forma, no momento do abate, pode haver a contaminação da carcaça e consequentemente, do seu produto final, a partir destes tecidos infectados. Por isso, suínos são considerados fonte importante de infecção para humanos, apresentando uma íntima associação à doença de origem alimentar (Van Damme et al., 2013; Schaake et al., 2013).

Algumas etapas do abate, como a desossa da cabeça, remoção da língua, faringe e particularmente das tonsilas, bem como procedimentos de inspeção *post-mortem*, podem possibilitar a contaminação da carcaça com a bactéria (Van Damme et al., 2015). A capacidade de sobrevivência e multiplicação da bactéria por longos períodos em alimentos refrigerados justifica a preocupação relacionada a este agente,

bem como sustenta a necessidade de detecção deste patógeno em alimentos de origem animal, visando a segurança alimentar.

O método de detecção tradicional de *Y. enterocolitica* baseia-se na cultura do micro-organismo. Este é trabalhoso e demorado, podendo levar até quatro semanas para a obtenção dos resultados (Fredriksson-Ahomaa; Stolle; Korkeala, 2006). A maioria dos isolados recuperados a partir de amostras alimentares e ambientais não são patogênicos. Existem dificuldades associadas ao isolamento de *Y. enterocolitica* patogênica devido ao elevado número de bactérias pertencentes à microbiota natural, as quais podem inibir o crescimento desta bactéria (Fredriksson-Ahomaa e Korkeala, 2006). No entanto, usando a técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase), *Y. enterocolitica* patogênica tem sido frequentemente detectado a partir de carne suína (Fredriksson-Ahomaa; Stolle; Korkeala, 2006).

O Brasil não possui dados oficiais sobre a ocorrência de *Y. enterocolitica*, e apenas casos esporádicos têm sido relatados (Rusak, et al., 2014). Isso justifica a falta de informação disponível sobre a ocorrência deste patógeno na linha de abate de suínos no Brasil, sobretudo em Santa Catarina, bem como a respeito da capacidade do agente detectado em causar doença em humanos.

Tendo em vista a relevância da *Y. enterocolitica* como agente zoonótico e a carne suína como veículo de transmissão, este estudo objetivou avaliar a ocorrência de *Y. enterocolitica* patogênica em tonsila de suínos ao abate no estado de Santa Catarina utilizando e comparando a técnica de PCR convencional e de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para detecção de genes de virulência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO YERSINIA

O gênero *Yersinia* foi nomeado em 1944 por Van Loghen em homenagem ao bacteriologista francês Alexandre Yersin, o qual fez o primeiro isolamento do agente da peste negra em 1894 (Jay; Martin; Golden, 2005). Este gênero pertence à família Enterobacteriaceae e é composto por onze espécies, das quais três são comprovadamente patogênicas para humanos e animais: *Y. pseudotuberculosis*, causadora de septicemia e linfadenite mesentérica, *Y. pestis*, agente etiológico da peste negra, doença frequentemente fatal quando não tratada e *Yersinia enterocolitica*, causadora principalmente de síndrome gastrointestinal, caracterizada por sintomas intestinais de intensidade moderada, podendo causar linfadenite mesentérica e enterocolite (Jay; Martin; Golden, 2005; Robins-Browne, 2001; Wagner, 2007).

As outras espécies, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. albovæ*, são consideradas não patogênicas ou ambientais, pois não possuem os marcadores clássicos de virulência (Wagner, 2007).

2.2 YERSINIA ENTEROCOLITICA

2.2.1 Características gerais do micro-organismo

Dentre as espécies do gênero, a *Y. enterocolitica* é a principal bactéria causadora de doença em humanos e animais, sendo também a espécie de maior interesse em microbiologia de alimentos. Ela está amplamente distribuída no ambiente terrestre, águas de lagos, nascentes e rios, locais estes que são fontes do micro-organismo para animais de sangue quente. Mesmo sendo facilmente encontrada no ambiente, a bactéria é

mais adaptada ao organismo dos animais. Além disso, a *Y. enterocolitica* se encontra com maior frequência associada a doença em humanos do que as outras espécies pertencentes ao seu gênero (Jay; Martin; Golden, 2005). Infecções clínicas no homem ocorrem, sobretudo, pela ingestão de água e alimentos contaminados por essa bactéria (Bottone, 1999).

A *Y. enterocolitica* é uma enterobactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, móvel devido à presença de flagelos, não produtora de esporos, negativa para a prova da oxidase, produtora de urease, fermentadora de glicose e pode produzir gás. A temperatura ótima de crescimento é de 25 a 37°C, porém tem a capacidade de crescerem ampla faixa de temperatura (-2 a 42°C) e sobreviver por longo período em condições de frio e umidade, o que a caracteriza como um micro-organismo psicotrófico. O limite superior de crescimento para algumas linhagens é de 40°C e nem todas crescem abaixo de 4°C. A bactéria resiste bem ao congelamento e é inativada por um a três minutos a 60°C (Jay; Martin; Golden, 2005; Quinn et al., 2005).

A classificação da espécie é baseada em características fenotípicas referentes à morfologia e fisiologia, bem como em características genotípicas e informações filogenéticas (Lambertz; Danielsson-Tham, 2005). A espécie *Y. enterocolitica* é altamente heterogênea, cujas cepas podem ser subdivididas em biotipos (com base nas características bioquímicas) e sorotipos (com base nas características sorológicas somáticas e flagelares) (Silva et al., 2010). Rotineiramente somente os抗ígenos somáticos são caracterizados, pois os抗ígenos flagelares não possuem importância prática para o propósito de diagnóstico em laboratórios de rotina (Falcão; Falcão, 2006).

De acordo com suas características antigênicas, a espécie pode apresentar mais de 60 sorotipos, o que possibilita a diferenciação de linhagens desta espécie (Lambertz; Danielsson-Tham, 2005). Entretanto, as cepas associadas com

doenças em humanos ou em animais pertencem a somente poucos sorogrupo. Os sorotipos mais comuns em infecções humanas são O:3, O:5,27, O:8 e O:9 (Jay; Martin; Golden, 2005; Falcão; Falcão, 2006).

Y. enterocolitica se subdivide em seis biótipos: 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5. Os membros do biotipo 1A são isolados principalmente do ambiente e não são considerados patogênicos, enquanto a maioria das cepas pertencentes aos biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5 são patogênicos para humanos e/ou animais. Cepas de *Y. enterocolitica* pertencentes ao biotipo 1B são mais virulentos do que os outros biotipos. O grupo menos patogênico compreende os biotipos 2, 3, 4 e 5 (Lambertz; Danielsson-Tham, 2005; Falcão; Falcão, 2006). O biotipo 4 é isolado com maior frequência de material clínico humano (Robins-Browne, 2001).

Existe uma correlação entre áreas geográficas e a ocorrência de alguns sorogrupo específicos. Na Europa, o sorotipo mais frequentemente isolado em casos de yersiniose em humanos é o O:3 seguido pelo O:9. No Japão também há uma alta incidência de O:3, nos Estados Unidos, O:3 e O:9 e no Canadá de O:8 seguido pelo O:5,27 (Kapperud, 1991). No Brasil, o sorotipo O:3 é encontrado com maior frequência em casos clínicos humanos, geralmente associado ao biotipo 4. Linhagens pertencentes ao biotipo 1A dos sorogrupo O:5, O:6,30, O:7,8, O:10, O:18 e O:49 estão mundialmente distribuídas (Falcão & Falcão, 2006).

2.2.2 Patogênese e marcadores de virulência

Os mecanismos de patogenicidade são complexos e para que a bactéria seja capaz de causar a doença faz-se necessário um conjunto de fatores de virulência. Yersínias patogênicas possuem fatores de virulência codificados por genes presentes no cromossomo e em plasmídeos, muitos dos quais são requeridos à sobrevivência e multiplicação da

bactéria em células fagocíticas (Quinn et al., 2005; Falcão; Falcão, 2006).

Sorotipos patogênicos são invasivos e iniciam a infecção ligando-se fortemente à mucosa intestinal, o que é frequentemente seguido por transmigração através da camada epitelial, resultando na colonização dos tecidos linfóides subjacentes, onde podem formar microabscessos (Jay; Martin; Golden, 2005). Subsequentemente, a bactéria pode se difundir através da linfa e/ou sangue para os linfonodos mesentéricos e locais extra-intestinais, tais como o fígado e baço (Robins-Browne et al., 2001; Schaake et al., 2013).

Após se difundir, a bactéria induz uma resposta inflamatória nos tecidos infectados. O íleo distal e em particular o tecido linfóide intestinal são os alvos principais da infecção, embora regiões intestinais adjacentes sejam também envolvidas com frequência (Falcão; Falcão, 2006). Danos às células epiteliais resultam em má absorção e perda de fluido caracterizada por diarreia. A bactéria produz uma enterotoxina termoestável, porém seu papel na gênese da diarreia não é claro (Robins-Browne, 1997).

A sequência de eventos após a ingestão de *Y. enterocolitica* patogênica começa com a aderência e invasão das células epiteliais intestinais, preferencialmente do íleo. Para que ocorram estas primeiras etapas de infecção são necessários pelo menos dois fatores cromossômicos, chamados *ail* (*attachment invasion locus*), que codifica a proteína *ail*, a qual é essencial para a adesão da bactéria no local de invasão e o *inv* (*chromosomal invasin gene*), que codifica uma proteína denominada invasina, responsável pela invasão epitelial propriamente dita. Além disso, a proteína *ail* medeia adicionalmente a resistência ao efeito bactericida do sistema complemento (Robins-Browne et al., 2001). O gene *inv* está presente tanto em cepas virulentas como em cepas não virulentas de *Y. enterocolitica*, enquanto o gene *ail* é encontrado apenas em sorotipos patogênicos (Wannet et al.,

2001). Desta forma, a detecção do gene *ail* pode diferenciar entre os isolados *Y. enterocolitica* patogênicos e não-patogênicos (Bonardi et al., 2013; Fredriksson-Ahomaa; Stolle; Stephan, 2007).

Cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas para humanos possuem um plasmídeo de virulência de aproximadamente 70kb, denominado pYV (plasmídeo de virulência de *Yersinia*), o qual é importante para virulência da bactéria. Este plasmídeo contém genes que codificam três sistemas de secreção e uma variedade de proteínas, como a adesina *yadA* e proteínas externas de *Yersinia* (yops) (Falcão; Falcão, 2006).

As proteínas yops permitem a sobrevivência e multiplicação do patógeno em tecidos linfóides do hospedeiro, através da inibição da fagocitose, do *burst* oxidativo e da produção de citocinas pró-inflamatórias e nas células epiteliais causam citotoxicidade (Cornelis, 2002; Jay; Martin; Golden, 2005; Lambertz; Danielsson-Tham, 2005; Viboud; Bliska, 2005; Van Damme et al., 2013). As yops representam o fator de virulência mais significativo para *Y. enterocolitica*, visto que a maioria dos mecanismos de patogenicidade importantes para a bactéria se devem à produção destas proteínas (Leal; Leal; Almeida, 1997; Jay; Martin; Golden, 2005).

A *yadA* é a mais importante adesina produzida por *Y. enterocolitica*. Esta permite a adesão da bactéria ao muco intestinal, colágeno, laminina e fibronectina, o que possibilita a internalização celular da bactéria por endocitose. Além disto, inibe a resposta imune inata do hospedeiro, conferindo resistência à ação do sistema complemento e, consequentemente, inibindo a fagocitose (White et al., 2002). A sobrevivência dentro de macrófagos possui um papel importante na disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro (Robins-Browne et al., 2001). Como o pYV é portador do gene para a produção de *yadA*, este pode ser pesquisado para detectar a presença do plasmídeo (Blais;

Phillippe, 1995; Lambertz; Danielsson-Tham, 2005; Bonardi et al., 2013).

O gene plasmidial *virF* é um gene regulador e ativador de transcrição de vários genes. Este gene codifica uma proteína denominada virF, a qual é a principal proteína envolvida no controle dos genes responsáveis pela síntese e secreção de yops (Falcão; Falcão, 2006; Bonardi et al., 2013).

Y. enterocolitica é capaz de produzir uma toxina termoestável, codificada pelo gene cromossomal *ystA*, que estimula a guanilato ciclase e a resposta da adenosina monofosfato cíclico (cAMP) no intestino. Esta toxina resiste por 20 minutos a 100°C. Embora linhagens patogênicas produzam esta toxina, esta parece não ser crítica para a virulência (Jay; Martin; Golden, 2005). Segundo Schiemann (1988), a toxina é produzida em temperaturas inferiores a 30°C, portanto pode não ser expressa *in vivo*, mas uma vez que é resistente ao pH ácido do estômago, pode causar intoxicação alimentar quando produzida em alimentos e ingerida pré-formada. No entanto, resultados recentes sugerem que esta toxina também pode ser expressa a 37°C em meio com alta osmolaridade e pH similares ao do lúmen intestinal (Robins-Browne et al., 2001). O gene *ystA* é restrito às sorovariiedades patogênicas de *Y. enterocolitica*. Além de *ystA*, foi caracterizada uma outra enterotoxina denominada *ystB*, codificada pelo gene denominado *ystB*, a qual possivelmente também está envolvida com o quadro de diarreia (Robins-Browne et al., 2001; Falcão; Falcão, 2006).

2.3 SUÍNOS COMO PORTADORES DE *Y. ENTEROCOLITICA*

Y. enterocolitica pode colonizar uma ampla variedade de animais domésticos, como ovinos, bovinos, caprinos e aves, bem como animais selvagens, como javalis e roedores silvestres. Entretanto, os suínos são os principais carreadores e

fontes de *Y. enterocolitica*, assumindo assim um importante papel na transmissão da doença para humanos (Silva et al., 2010; Novoslavskij et al., 2013).

O suíno é a espécie mais utilizada na produção de alimentos de origem animal que abriga regularmente o agente patogênico, atuando assim, como principal reservatório para *Y. enterocolitica* (Lambertz; Danielsson-Tham, 2005; Funk et al., 2013; Schaake et al., 2013). Estudos de prevalência de diferentes espécies de *Yersinia* sp. em suínos mostrou um elevado índice de *Y. enterocolitica* em países europeus, sendo a mais alta em suínos da Espanha (93%) e a mais baixa da Itália (32%) (Ortiz-Martinez et al., 2010).

Estes animais podem carrear o patógeno por longos períodos de tempo na orofaringe (principalmente tonsilas e língua), linfonodos e no trato intestinal, sem apresentar quaisquer sinais clínicos, como cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas para humanos, em particular cepas de O:3/biotipo 4 e O:9/biotipo 2. Cepas de O:3 tem sido frequentemente isoladas na superfície de carcaças de suínos, o que provavelmente seja resultado da disseminação dos microrganismos via fezes, conteúdo intestinal ou contaminação da cavidade oral durante os procedimentos de abate e evisceração (Nesbakken et al., 2003). Por isso, suínos são considerados fonte importante de infecção para humanos, apresentando uma íntima associação à doença de origem alimentar (Van Damme et al., 2013; Schaake et al., 2013).

Tonsilas de suínos são o melhor local para detecção de cepas de *Y. enterocolitica* potencialmente patogênicas para humanos e são consideradas mais importantes do que outras amostras, como fezes, como contaminantes da carcaça no frigorífico (Fredriksson-Ahomaa; Stolle; Stephan, 2007; Bonardi et al., 2013). De acordo com Nesbakken et al. (2009) e Laukkanen et al. (2009), a prevalência de *Y. enterocolitica* em tonsilas é significativamente maior do que em conteúdo gastrintestinal de suínos, indicando que são as principais fontes

de contaminação de carcaças e vísceras quando comparado às fezes em abatedouros.

2.4 Y. ENTEROCOLITICA COMO PERIGO MICROBIOLÓGICO NA SAÚDE PÚBLICA

Y. enterocolitica é um patógeno de origem alimentar, sendo encontrado em uma grande variedade de alimentos. Este micro-organismo já foi isolado de tortas, carne embalada a vácuo, frutos do mar, vegetais, ovos e derivados, leite e outros produtos lácteos, produtos à base de carne bovina, ovina e suína. De todas as fontes, produtos à base de carne suína demonstram ser a principal fonte de linhagens patogênicas para humanos, com uma estimativa de 77,3% da fonte de todos os casos de yersiniose (Fosse; Seegers; Magras, 2008; Jay; Martin; Golden, 2005; Silva et al., 2010). A carne suína e os produtos obtidos a partir desta carne mal cozidos são as mais importantes vias de transmissão de *Y. enterocolitica* para humanos. O consumo de língua e de tonsilas é considerado um fator de risco, pelo tropismo da bactéria por estas regiões (Bonardi et al., 2007; Wannet et al., 2001).

As DTAs produzidas por esta bactéria são classificadas pela *International Comission on Microbiological Specifications for Foods* no grupo de risco II, que inclui as doenças “de sério perigo, não representando ameaça de morte e normalmente não deixando sequelas, mas incapacitando por períodos moderados” (ICMSF, 2002). A bactéria é considerada um patógeno emergente que está se disseminando em todo o mundo, sendo mais comum no norte da Europa, Escandinávia e Japão. Na Europa é considerada a terceira zoonose de origem alimentar mais notificada (EFSA, 2013).

Entre 1996 e 2007, foram reportados 1.335 casos de infecções por *Y. enterocolitica*, 3,5 casos por 1000 habitantes, no *Foodborne Diseases Active Surveillance Network*. Este levantamento incluiu casos confirmados por laboratórios de 10

estados norte-americanos, demonstrando ser esta bactéria uma importante causa de DTAs (Long et al., 2010). É estimado que 116.716 pessoas sejam infectadas anualmente por *Y. enterocolitica* nos EUA (Scallan et al., 2011). Em países em desenvolvimento, é rara a existência de vigilância epidemiológica de casos de yersiniose, já que muitas vezes o diagnóstico não revela o causador da gastroenterite. No Brasil, não há dados registrados na literatura (Silva et al., 2010).

De acordo com Bonardi et al. (2003), *Y. enterocolitica* é um agente importante como causador de doenças de origem alimentar e já foi isolado de carne suína fresca e de produtos elaborados a partir de carne suína. A presença deste micro-organismo nos alimentos deve-se principalmente a contaminação nos procedimentos de abate, no qual não se assegura a total eliminação da bactéria da carcaça (Apha, 2001). Cortes realizados nos linfonodos e a concomitante manipulação dos órgãos durante o abate podem levar a disseminação da bactéria na carcaça (Silva et al., 2010; Nesbakken et al., 2003). É importante ressaltar a característica psicotrófica deste patógeno, visto que o resfriamento de alimentos é um dos meios mais utilizados para a conservação de alimentos, incluindo produtos de origem animal. A capacidade de sobrevivência e multiplicação da bactéria em baixas temperaturas a torna uma séria ameaça à segurança alimentar, uma vez que pode se multiplicar até mesmo em carne embalada à vácuo mantida sobre refrigeração (Wannet et al., 2001). Segundo Saba (2011), a baixa temperatura pode ser um fator seletivo, capaz de inibir a multiplicação da maioria das enterobactérias e favorecer a multiplicação de *Y. enterocolitica* em detrimento das demais que possam estar presentes nos produtos refrigerados.

2.5 A INFECÇÃO CLÍNICA EM HUMANOS

A infecção causada por *Y. enterocolitica* tem como principal quadro clínico a gastroenterite, a qual é caracterizada por diarreia aguda e febre, dor abdominal aguda e vômito. Além disso, a doença já foi associada a quadros de pseudoappendicite, ileite terminal, peritonite, abscessos de colo e pescoço, fígado e baço. Em casos raros pode evoluir para septicemia. Uma grande variedade de complicações imunológicas pode ocorrer após uma infecção aguda, incluindo a artrite reativa, eritema nodoso, glomerulonefrite e tireoidite (Wannet, 2001).

A incidência da doença é maior em crianças, jovens, idosos, indivíduos debilitados e imunossuprimidos (Jay; Martin; Golden, 2005; Silva et al., 2010; Schaaake et al., 2013). Em crianças menores de cinco anos, os sintomas são predominantemente de enterocolite (diarreia com fezes sanguinolentas, febre, dor abdominal e vômitos) (Ehara et al., 2000). Em lactentes a doença pode durar de três a 28 dias (Lee et al., 1990). Em crianças com mais de cinco anos e adultos jovens, o quadro clínico se apresenta como pseudoappendicite, a qual inclui sintomas como febre, dor abdominal e sensibilidade do quadrante inferior direito (Robins-Browne, 1997). Adultos geralmente apresentam dor abdominal inespecífica e diarreia (Wannet, 2001).

O agente já foi isolado de urina, sangue, fluido cerebrospinal e olhos de indivíduos infectados, além de fezes de vítimas de gastroenterite (Jay; Martin; Golden, 2005). A transmissão se dá pela via fecal-oral, através de água e alimentos contaminados, ou por contato com indivíduos ou animais infectados. O período de incubação geralmente é de três a sete dias (Silva et al., 2010). A dose infectante não é perfeitamente conhecida, mas provavelmente se apresente acima de 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) (Falcão; Falcão, 2006).

No Brasil, a maioria das infecções por *Y. enterocolitica* apresenta-se na forma de diarreia, embora outras manifestações clínicas tenham sido descritas, quase sempre associadas à diarreia, como anemia falciforme, pneumonia, adenopatia, manifestações cutâneas e artrite, mas em frequência muito baixa (Falcão; Falcão, 2006).

2.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Y. ENTEROCOLITICA*

O isolamento de *Y. enterocolitica* patogênica a partir de amostras naturalmente contaminadas é difícil e normalmente requer enriquecimento, visto que o número do agente viável pode ser baixo e seu crescimento é mais lento quando comparado ao de outros micro-organismos. Além disso, muitas espécies de *Yersinia* sp. não-patogênicas e outras bactérias estão presentes nas tonsilas, e tais bactérias agem como micro-organismos competidores, o que dificulta o isolamento do patógeno em estudo (Van Damme et al., 2013).

O isolamento requer meios seletivos que forneçam nutrientes suficientes e inibam o crescimento da microbiota contaminante. Os métodos tradicionais de isolamento e identificação de *Y. enterocolitica* são baseados na natureza psicotrófica do agente, explorando também outras características, como a resistência a concentrações relativamente altas de sais biliares e resistência a certas drogas, como a cefsulodina, a novobiocina e o irlgasan (Silva et al., 2010). Tais métodos, principalmente aqueles realizados em baixas temperaturas, requerem longo período de incubação para a detecção e identificação, podendo levar de cinco a 15 dias ou mais, o que torna inviável para o controle de qualidade alimentar (Lambertz; Danielsson-Tham, 2005).

Atualmente, como recurso adicional para a detecção desta bactéria, testes de PCR têm sido padronizados. Na maioria dos casos, esses testes detectam genes de

patogenicidade localizados no cromossomo bacteriano *yst* ou *ail* (Aarts et al., 2001). Outros testes são direcionados para sequências localizadas no plasmídeo pYV. No entanto, a pesquisa somente do plasmídio de virulência pode ser pouco confiável quando pesquisado em bactérias cultivadas em meios bacteriológicos, pois pode ocorrer a perda do plasmídio durante o cultivo, o que pode levar a resultados falso-negativos (Aarts et al., 2001; Wannet et al., 2001). De qualquer forma, a utilização da técnica de PCR é uma excelente alternativa, visto que pode reduzir o processo de análise para um a dois dias. Além de ser rápida, sensível e específica, pode ser usada para diferenciar facilmente cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas de cepas não patogênicas através da pesquisa de genes de virulência (Lambertz; Danielsson-Tham, 2005). Segundo Wannet et al. (2001), a análise por PCR ainda dispensa os passos de biopatigem e sorotipagem.

Em diferentes estudos o método microbiológico convencional foi menos sensível que a PCR (Johannessen; Kapperud; Kreuse, 2000; Teodoro et al., 2006). Além disso, ao comparar as duas técnicas no que se refere aos custos dos reagentes utilizados em cada reação, verificou-se que a PCR é mais barata do que a análise microbiológica convencional (Teodoro et al., 2006).

Existem alguns métodos de PCR em tempo real publicados para detecção de *Y. enterocolitica* em amostras clínicas, alimentos e amostras provenientes de animais e ambientais, sendo o gene *ail* comumente o mais utilizado como alvo de pesquisa para a detecção de *Y. enterocolitica* patogênica (Fredriksson-Ahomaa et al., 2007, Mäde et al., 2008; Lambertz, et al., 2008; Wang et al., 2014). Os ensaios de PCR em tempo real podem proporcionar uma maior especificidade e sensibilidade, são menos laboriosos e requerem menos tempo para determinar o resultado final que PCRs convencionais (Lambertz et al., 2008).

Segundo Wannet et al. (2001), a detecção de *Y. enterocolitica* através da PCR deve ser analisada com cuidado devido ao fato de a técnica ser muito sensível e identificar a presença de DNA bacteriano, mesmo sem a viabilidade da bactéria. Por outro lado, a detecção pelo método convencional pode subestimar sua presença, caso a bactéria se encontre lesada, dificultando seu isolamento, levando a resultados falso-negativos.

REFERÊNCIAS

- AARTS, H.J.M. et al. Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. **Journal of Microbiological Methods**, v.47, n.2, p.209-217, 2001.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, 2001.
- BLAIS, B.W.; PHILLIPPE, L.M. Comparative analysis of yadA and ail Polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*. **Food Control**, v.6, n.4, p.211 – 214, 1995.
- BONARDI, S. et al. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.163, n.2-3, p.248–257, 2013.
- BONARDI, S. et al. Detection and characterization of *Yersinia enterocolitica* from pigs and cattle. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.1, p.347-50, 2007.
- BONARDI, S. et al. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, n.1-2, p.101–110, 2003.
- BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. **Microbes and Infection**, v.1, n.4, p.323-333, 1999.

CORNELIS, G.R. The Yersinia YSC-Yop “type III” weaponry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.3, n.10, p.742-752, 2002.

DE BOER, E. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. **Contributions to Microbiology and Immunology**, v.13, p.71-3, 1995.

EFSA (European Food Safety Agency) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **European Food Safety Authority Journal**, v.11, n.4, p.3129, 2013.

EHARA, A. et al. Age-dependent expression of abdominal symptoms in patients with *Yersinia enterocolitica* infection. **Pediatrics International**, v.42, n.4, p.364-6, 2000.

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

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, n.1, p.1-16, 2008.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. et al. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in meat using real-time PCR. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v.2, n.2, p.202-208, 2007.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; KORKEALA, H. Molecular Epidemiology of *Yersinia enterocolitica*

infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.47, n.3, p.315-29, 2006.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.3, p.207 – 212, 2003.

FUNK, J.A. et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in antimicrobial-free and conventional antimicrobial use swine production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.6, p.514-519, 2013.

ICMSF (2002). Microrganisms in Foods 7. **Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.

JAY, J.; M.; MARTIN, J.L.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. New York, NY: Springer Science, 2005.

JOHANNESSEN, G.S.; KAPPERUD, G.; KREUSE, H. Ocurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Norwegian pork products determined by PCR method and tradicional culturing method. **International Journal of Food Microbiology**, v.54, n.1-2, p.75-80, 2000.

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

LAMBERTZ, S. T. et al. Real-Time PCR Method for Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.19, p.6060-6067, 2008.

LAMBERTZ S.T.; DANIELSSON-THAM, M.L.

Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p. 3674–3681, 2005.

LAUKKANEN, R. et al. Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.6, p.681-688, 2009.

LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Marcadores de patogenicidade de *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos no Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.1, p.19-24, 1997.

LEE, L.A. et al. *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. **The New England Journal of Medicine**, v.322, n.14, p.984-987, 1990.

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

MÄDE, D. et al. A real-time PCR for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food combined with an universal internal amplification control system. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.3, n.2, p.142-151, 2008.

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

NESBAKKEN, T. et al. 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, n.3, p.231-240, 2003.

NOVOSLAVSKII, J. et al. Prevalence and genetic diversity of enteropathogenic *Yersinia* spp. in pigs at farms and slaughter in Lithuania. **Research in Veterinary Science**, v.94, n.2, p.209-213, 2013.

ORTIZ-MARTÍNEZ, P. **Prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in pigs from different European countries and contamination in the pork production chain.** 2010.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Helsinki, Finlândia, 107p.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** 1. ed. Porto alegre: Artmed, 512 p., 2005.

ROBINS-BROWNE, R.M. *Yersinia enterocolitica*. In: DOYLE, P. M.; BEUCHAT, L. R.; MOTVILLE, T. J., editors. **Food Microbiology**. Boca Raton: ASM Press; p.215-45, 2001.

ROBINS-BROWNE, R.M. et al. *Yersinia enterocolitica* biotype 1 in South Africa. **South Africa Medical Journal**, v.55, n.26, p.1057-1060, 1979.

RUSAK, L.A. et al. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, n.12, p.1533-1540, 2014.

SABA, R.Z. Ocorrência de *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp. no abate de suínos. 2011. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo. 86p.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.1, p.7-15, 2011.

SCHAAKE, J. et al. Human and animal isolates of *Yersinia enterocolitica* show significant serotype-specific colonization and host-specific immune defense properties. **Infection and Immunity**, v.81, n.11, p.4013–4025, 2013.

SCHIEMANN, D.A. Examination of enterotoxin production at low temperature by *Yersinia enterocolitica* in culture media and foods. **Journal of Food Protection**, v.51, n.7, p.571-573, 1988.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 edição. São Paulo: Livraria Varela, 614p, 2010.

TEODORO, V.A.M. et al. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.9-14, 2006.

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

VAN DAMME, I. et al. Influence of isolation methods on the occurrence of plasmid-carrying *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 in slaughter pig tonsils, faeces and carcass surface swabs. **International Journal of Food Microbiology**, v.164, n.1,p.32-35, 2013.

VIBOUD, G.I.; BLISKA, J.B. Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v.59, p.69–89, 2005.

WAGNER, A. *Yersinia*. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed. American Society for Microbiology: Washington, v.1, cap 44, p.688-697, 2007.

WANG, J.Z. et al. Real-Time TaqMan PCR for *Yersinia enterocolitica* detection based on the *ail* and *foxA* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, n.12, p.4443-4444, 2014.

WANNET, W.J.B. et al. 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.

WHITE, D.G. et al. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection**, v.4, n.4, p.405-412, 2002.

3 PESQUISA DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PATOGÊNICA EM TONSILAS DE SUÍNOS AO ABATE EM SANTA CATARINA

SEARCH OF PATHOGENIC *Yersinia enterocolitica* IN TONSILS OF SLAUGHTERED PIGS IN SANTA CATARINA

RESUMO

Yersinia enterocolitica é uma bactéria Gram-negativa que possui potencial zoonótico e está associada a quadros de infecção alimentar em humanos. Os suínos são considerados o principal reservatório de *Y. enterocolitica*, abrigando-a principalmente nas tonsilas. Tendo em vista a carne suína como uma das mais consumidas no mundo e a importância deste agente zoonótico, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Y. enterocolitica* patogênica em tonsila de suínos no momento do abate no estado de Santa Catarina. Para isto, foi utilizado uma PCR convencional multiplex (cPCR) que detecta a presença de genes de virulência (*ail*, *yadA* e *virF*) e comparou-se esta técnica com a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), somente para o gene *ail*. Foram coletadas aleatoriamente tonsilas de 400 suínos provenientes de quatro frigoríficos com inspeção federal em diferentes regiões do estado. Foi realizado o sequenciamento do DNA dos genes amplificados das amostras positivas na cPCR e posteriormente foi feita a análise filogenética. Uma amostra foi positiva para os três genes pesquisados na PCR convencional, os quais foram confirmados por sequenciamento. A análise das sequências parciais dos três genes de virulência identificou três mudanças de aminoácidos exclusivas, sendo uma no gene *virF* e duas no gene *yadA*. Na qPCR esta amostra apresentou 11.058.398 moléculas/ μ L. Ao comparar as duas técnicas, a qPCR foi 100

vezes mais sensível que a PCR convencional. Isso demonstra uma baixa ocorrência de *Y. enterocolitica* patogênica em suínos ao abate em frigoríficos com inspeção federal em Santa Catarina.

Palavras-chave: Genes de virulência, Infecção alimentar, PCR convencional, PCR quantitativa em tempo real, zoonose, yersiniose.

ABSTRACT

Yersinina enterocolitica is a Gram-negative bacteria with zoonotic potential. It is associated with the occurrence of enteric diseases in humans. Pigs are considered the main source of *Y. enterocolitica* and the bacteria is mainly found in the pig's tonsils. In view of the pork as one of the most consumed meat in the world and the importance of this zoonotic agent, the objective of this study was to evaluate the occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica* in palatine tonsils of healthy pigs from Santa Catarina, during the slaughter process. In order to achieve this goal, a multiplex PCR technique was performed so as to detect the presence of virulence genes (*ail*, *yadA* and *virF*). This technique was compared to quantitative real time PCR (qPCR), only for the *ail* gene. Tonsils were randomly collected from 400 pigs from four federally inspected slaughterhouses of the state of Santa Catarina. DNA sequencing of the amplified gene in cPCR was performed in positive samples, then phylogenetic analysis was made. One positive sample was found for the three studied virulence genes, which were confirmed by DNA sequencing. The analysis of partial sequences of the three virulence genes identified three unique amino acid changes, one in the *virF* gene and two in *YadA* gene. This sample had 11.058.398 molecules/ μ L detected by qPCR. By comparing the two techniques, qPCR was 100 times more sensitive than standard

PCR. This result shows low occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica* in healthy pigs from federally inspected slaughterhouses in Santa Catarina.

Key-words: Virulence genes, food infection, convencional PCR, quantitative real time PCR, zoonosis, yersiniosis.

3.1 INTRODUÇÃO

Yersinia enterocolitica é uma bactéria Gram-negativa que está associada à doença entérica em animais e principalmente em humanos. A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) ocasionadas por este patógeno é um problema emergente de saúde pública. Humanos podem apresentar quadro clínico de enterite, enterocolite, diarreia, febre, náuseas, linfadenite mesentérica, pseudoapendicite e, mais raramente, septicemia (Wannet, 2001; Tadesse et al., 2013).

A bactéria é veiculada principalmente por alimentos a base de carne suína, visto que esta espécie é portadora assintomática deste agente em tonsilas e trato intestinal. No momento do abate do suíno pode haver a contaminação da carcaça e consequentemente, do seu produto final, a partir destes tecidos infectados (Schaake et al., 2013). A capacidade de sobrevivência e multiplicação da bactéria em alimentos refrigerados reforça a preocupação relacionada a este agente, bem como sustenta a necessidade de detecção deste patógeno em alimentos de origem animal.

Os mecanismos de patogenicidade e virulência são complexos e estão associados a fatores de virulência codificados por genes cromossomais e plasmideais (Thorner et al., 2003). Para que ocorram as primeiras etapas de infecção é necessária a presença de um fator cromossômico, chamados *ail* (*attachment invasion locus*), o qual está envolvido à adesão da bactéria no local de invasão no intestino e está presente

somente em cepas patogênicas (Robins-Browne et al., 2001). A presença de um plasmídeo de virulência denominado pYV (plasmídeo de virulência de *Yersinia*) é importante para a virulência da bactéria (Thorner et al., 2003). Este plasmídeo contém genes que codificam proteínas, como a adesina YadA, a qual contribui para a invasão intestinal, e proteínas externas de *Yersinia* (Yops), as quais permitem a sobrevivência e multiplicação da bactéria em macrófagos e tecidos linfóides (Robins-Browne et al., 2001; Lambertz; Danielsson-Tham, 2005). O gene plasmidial *virF* é responsável pela regulação da transcrição de vários genes, como genes responsáveis pela síntese e secreção de yops (Bonardi et al., 2013).

O isolamento de *Y. enterocolitica* patogênica a partir de amostras naturalmente contaminadas é demorado, difícil e normalmente requer enriquecimento, visto que o número do agente viável pode ser baixo e seu crescimento é mais lento quando comparado ao de outros micro-organismos, o que dificulta o controle de qualidade alimentar (Van Damme et al., 2013). A técnica de PCR e PCR em tempo real (qPCR) são uma excelente alternativa para detecção deste agente, visto que podem reduzir o tempo do processo de análise e, além de serem sensíveis e específicas, podem ser usadas para diferenciar facilmente cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas de cepas não patogênicas através da pesquisa de genes de virulência (Lambertz; Danielsson-Tham, 2005; Mäde et al., 2008; Wang et al., 2014).

Na Europa, a yersiniose é considerada a terceira zoonose mais relatada e a ocorrência de *Y. enterocolitica* em suínos é alta (Novoslavskij et al., 2013; Vanantwerpen, et al., 2014). O Brasil não possui dados oficiais sobre a incidência de *Y. enterocolitica*, e somente casos esporádicos têm sido relatados (Rusak et al., 2014). Além disto, há pouca informação disponível sobre a ocorrência e potencial patogênico desta bactéria na linha de abate de suínos no Brasil, sobretudo em Santa Catarina. Desta forma, este estudo

objetivou avaliar a ocorrência de *Y. enterocolitica* patogênica em tonsila de suínos no momento do abate no estado de Santa Catarina, utilizando como indicadores genes de virulência *ail*, *yadA* e *virF*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de amostras

Tonsilas de carcaça de 400 suínos de terminação foram coletadas ao abate, em quatro frigoríficos com inspeção sanitária federal no estado de Santa Catarina, três deles localizados na região Oeste e um na região Sul do estado. As amostras foram coletadas aleatoriamente em dias distintos, e foram armazenadas em sacos estéreis e individuais e mantidas refrigeradas até o momento das análises. No frigorífico A foram coletadas 100 tonsilas provenientes de cinco lotes, no frigorífico B foram coletadas 104 tonsilas de quatro lotes, no frigorífico C foram coletadas 98 tonsilas de um lote e no frigorífico D foram coletadas 98 tonsilas provenientes de cinco lotes, totalizando 15 diferentes lotes.

Os testes laboratoriais foram realizados no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal – CEDIMA, localizado no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UDESC) em Lages-SC; e na Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia-SC.

3.2.2 Extração de DNA

Para extração do DNA, as tonsilas foram fragmentadas, colocadas em sacos estéreis contendo 5mL de água peptonada a 1% (Himedia) e homogeneizadas em equipamento Stomacher por quatro minutos. A extração do DNA foi realizada com o Kit Prep/Preamp (NewGene), conforme recomendações do fabricante.

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) multiplex

3.2.3.1 Condições e otimização da cPCR

A cPCR multiplex foi padronizada utilizando iniciadores já descritos (Tabela 1), para a detecção do gene cromossomal *ail* e dos genes plasmideais *yadA* e *virF* de *Y. enterocolitica* patogênica.

Tabela 1- Iniciadores utilizados para as reações de cPCR multiplex e qPCR para a detecção de *Y. enterocolitica* patogênica.

Gene alvo e direção do iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>ail</i> <i>Foward</i>	TTTTATCAATTGCGCTGTAAAT GTGTACG	454	Lambertz; Danielsson -Tham, 2005.
<i>Reverse</i>	CTATCGAGTTGGAGTATTCAT ATGAAGCG		
<i>yadA</i> <i>Foward</i>	CTTCAGATACTGGTGTGCGCTGT	849*	Thoerner et al., 2003.
<i>Reverse</i>	ATGCCTGACTAGAGCGATATCC		
<i>virF</i> <i>Foward</i>	AAGGTTGTTGAGCATTACAAG ATGG	700	Lambertz; Danielsson -Tham, 2005.
<i>Reverse</i>	TTTGAGTGAAATAAGACTGACT CGAGAACCC		

Fonte: Arquivo pessoal (2015). *Os produtos de PCR provenientes do gene *yadA* podem apresentar fragmentos de 759pb para *Y.*

enterocolitica sorotipo O:8 e 849pb para os demais sorotipos (Thoerner et al., 2003).

Foram testadas quatro temperaturas de anelamento dos iniciadores (57, 58, 59 e 60°C) para os três genes pesquisados. Diferentes concentrações de reagentes foram avaliadas, variando as quantidades de MgCl₂ (1,5 e 3mM), dNTPs (0,2 e 0,4mM), iniciadores (0,2 e 0,4uM) e Taq polimerase (0,75 e 1,25U), totalizando um volume final da reação de 25uL. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%-TBE, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador UV.

Para teste das amostras de tonsilas, a concentração final do DNA das amostras foi medida em espectofotômetro ND-2000 (NanoDrop) e a quantidade adicionada à reação foi padronizada em aproximadamente 60ng/uL.

Para o controle positivo, foram utilizados 60ng de DNA de *Y. enterocolitica*, gentilmente cedido pela Professora Doutora Juliana Falcão, da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Laboratório Nacional de Referência em *Yersinia* outras que *Y. pestis*). A amostra utilizada pertence a linhagem 8081 (NCTC 13174) de *Yersinia enterocolitica*, positiva para os genes *ail*, *yadA* e *virF*.

3.2.3.2 Especificidade e sensibilidade da cPCR

Para avaliar a especificidade da cPCR, DNA de outras bactérias (*Pasteurella multocida*; *Streptococcus suis*; *Haemophilus parasuis*; *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Bordetella bronchiseptica*) foram testados.

Para avaliar a sensibilidade da técnica, foi realizada uma diluição seriada na base 10 do DNA extraído do controle positivo (600ng, 60ng, 6ng, 0,6ng, 0,06ng e 0,006ng).

3.2.4 Sequenciamento e análise filogenética

O sequenciamento do DNA dos genes amplificados na cPCR foi realizado diretamente da amostra original pelo método de Sanger, usando os iniciadores descritos na Tabela 1. Os produtos da PCR foram purificados do gel de agarose utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amplificação com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 60ng de DNA foi utilizado; e purificado em seguida com o kit BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos foram determinadas usando o ABI3130xl Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram analisadas e montadas com o Phred/Phrap/Consed software (<http://www.phrap.org>). As sequências montadas foram comparadas por similaridade com outras sequências conhecidas utilizando o BLAST (Altschul et al., 1997). As análises filogenéticas para cada gene foram realizadas usando o método Neighbor-Joining através do MEGA 6.0 software (Tamura et al., 2007).

3.2.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

3.2.5.1 Condições e otimização da qPCR

A qPCR, utilizando o fluoróforo SYBRGreen, fez uso dos mesmos iniciadores empregados na cPCR, para detecção de *Y. enterocolitica* patogênica através da pesquisa do gene cromossomal *ail* (Tabela 1).

Foram testadas diferentes concentrações dos iniciadores para definir a reação final (50; 100; 150; 200; 250; 300 e 400mM). O mix da reação consistiu ainda de 5µL de iQ SYBR

Green Supermix (Bio-Rad) e 1 μ L de DNA extraído ou do DNA plasmideal, em um volume final da reação de 10 μ L.

O produto amplificado do gene *ail*, obtido a partir da cPCR do controle positivo foi submetido a clonagem utilizando o Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). O produto da ligação foi transformado em *Escherichia coli* DH5 α e, em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmideal utilizado o Kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. O clone positivo contendo a sequência alvo do gene *ail* foi confirmado por sequenciamento utilizando os pares de iniciadores M13 (Invitrogen). O plasmídeo contendo o gene *ail* (*Pail*) foi quantificado em espectofotômetro ND-2000 (NanoDrop) e o número de cópias foi calculado de acordo com Yun et al. (2006). Diluições em base 10 do *Pail*, contendo $4,9 \times 10^9$ até $4,9 \times 10^0$ cópias/uL foram preparadas em alíquotas em água Milli Q e estocadas a -80°C. Cada alíquota foi utilizada uma vez.

Para as amostras de tonsilas que possuíam maiores concentrações de DNA, foi realizado diluição 10 vezes, a fim de evitar possível interferência do DNA da matriz biológica nas reações de qPCR. Controles negativos foram inseridos ao longo da placa, bem como controles positivos (*Pail*) em diluição em base 10.

A detecção foi realizada utilizando o ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies), com as seguintes condições: ativação da PCR a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de amplificação (15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C). Após os ciclos da PCR, a dissociação dos produtos amplificados foi gerada entre 60°C e 95°C com leituras efetuadas a cada 0,1°C a fim de discriminar entre produtos amplificados específicos e não específicos.

3.2.5.2 Especificidade e sensibilidade da qPCR

Para avaliar a especificidade da técnica, reações com o DNA plasmideal (*Pail*) diluído em base 10, DNA de outras bactérias (*Pasteurella multocida*; *Streptococcus suis*; *Haemophilus parasuis*; *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Bordetella bronchiseptica*), além de controles negativos (água Milli Q) foram utilizados.

Para avaliar o limite de detecção do ensaio, diluições seriadas em base 10 do DNA plasmideal (*Pail*), contendo $4,9 \times 10^9$ a $4,9 \times 10^0$ cópias/ μL foram testadas. As mesmas diluições foram testadas em triplicata em três diferentes vezes com o objetivo de avaliar o coeficiente de variação (CV) da técnica. Os CVs inter e intra ensaio para os ciclos de quantificação (Cq) foram calculados utilizando o pacote estatístico SAS (SAS, 2008).

3.2.6 Comparação da sensibilidade da cPCR e qPCR para o gene *ail*

O limite de detecção da qPCR foi comparado com o limite de detecção da cPCR, utilizando diluições seriada na base 10 do DNA plasmideal (*Pail*) contendo $4,9 \times 10^9$ a $4,9 \times 10^0$ cópias/ μL , e submetendo a cada uma das técnicas.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Reação da polimerase em cadeia convencional (cPCR) multiplex

3.3.1.1 Otimização da cPCR multiplex

A solução final utilizada na cPCR foi definida como: 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 0,4uM de cada iniciado r(*forward* e *reverse*), 1x de PCR buffer e 1,25U da enzima Taq polimerase. A temperatura de anelamento dos iniciadores foi 60°C.

Ao realizar a cPCR multiplex do controle positivo, por se tratar de *Y. enterocolitica* sorotipo O:8, o gene *yadA* apresentou fragmento de 759pb e não de 849pb como observado para os demais sorotipos. Desta forma tornou-se difícil separar as bandas dos genes *yadA* e *virF*, devido a proximidade de tamanho dos fragmentos. Assim, sugeriu-se neste caso, realizar a cPCR para o gene *virF* separadamente.

3.3.1.2 Especificidade e sensibilidade da cPCR

A sensibilidade da técnica de cPCR para detecção do gene *ail* foi de 0,6ng/µL e para os genes *yadA* e *virF* foi de 0,06ng/µL. Ao testar para a detecção dos três genes juntos, a sensibilidade ficou em 0,6ng/uL.

Nenhuma amplificação foi observada com os demais DNAs bacterianos.

3.3.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

3.3.2.1 Otimização da qPCR

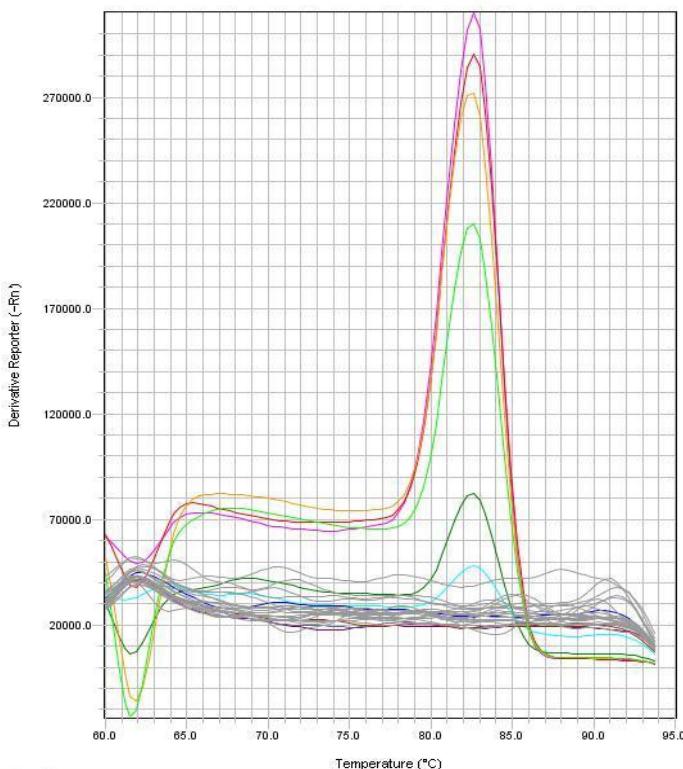
A concentração ideal de iniciadores foi de 250mM cada. As condições das reações foram definidas baseadas na combinação que forneceu a máxima emissão de fluorescência e o menor valor de valor de C_q, na ausência de dímeros ou amplificações inespecíficas.

3.3.2.2 Especificidade e sensibilidade da qPCR

Sinal fluorescente foi obtido com o DNA plasmideal (*Pail*) até a diluição a $4,9 \times 10^4$ cópias/ μL , com uma correlação linear (R^2) de 0,995 e inclinação da reta (*slope*) de -4,017. A curva de dissociação ocorreu com temperatura de 82,6°C (Figura 1). Sinais referentes às demais diluições de DNA plasmideal, bem como outros DNAs bacterianos e controle negativo não foram observados.

Figura 1- Curva de Melting da qPCR SYBR Green.

Melt Curve



Fonte: Arquivo pessoal (2015).

O CV variou de 1,52 a 6,14 para o inter-ensaio e de 1,99 a 4,35 para o intra-ensaio (Tabela 2).

Tabela 2- Variabilidade intra e inter-ensaio da qPCR para detecção do gene *ail* em *Y. enterocolitica* patogênica.

Número de cópias	Cq médio	Intra-ensaio		Inter-ensaio	
		CV	DP	CV	DP
$4,9 \times 10^9$	16,26	4,35	0,70	6,14	3,94
$4,9 \times 10^8$	20,72	1,99	0,41	3,64	9,69
$4,9 \times 10^7$	25,38	2,95	0,74	3,28	6,27
$4,9 \times 10^6$	29,50	2,06	0,60	1,85	12,94
$4,9 \times 10^5$	35,13	2,05	0,72	3,40	17,59
$4,9 \times 10^4$	38,58	2,45	0,94	1,52	17,79
$4,9 \times 10^3$	-	-	-	-	-
$4,9 \times 10^2$	-	-	-	-	-
$4,9 \times 10^1$	-	-	-	-	-
$4,9 \times 10^0$	-	-	-	-	-

Fonte: Arquivo pessoal (2015).

3.3.2.3 Comparação da sensibilidade da cPCR e qPCR

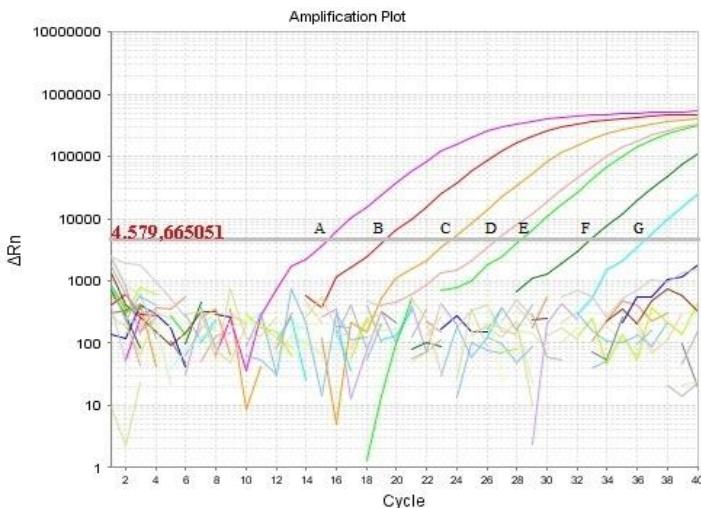
Ao comparar a sensibilidade das duas técnicas, a cPCR foi capaz de detectar até 4900000 cópias/ μ L, enquanto a capacidade de detecção da qPCR foi de até 49000 cópias/ μ L.

3.3.3 Amostras de tonsilas

Das 400 amostras de tonsilas analisadas utilizando a técnica de cPCR multiplex para os genes *ail* e *yadA*, e separadamente para o gene *virF*, apenas uma amostra foi positiva (17T), porém detectando os três genes de virulência. Além disto, a amostra apresentou um fragmento de 849pb para o gene *yadA*, podendo excluir que a mesma não se trata do sorotípo O:8. Esta amostra foi proveniente do frigorífico 1, localizado no oeste de Santa Catarina.

Ao submeter as 400 amostras à qPCR, somente a mesma amostra que já havia sido positiva na cPCR foi positiva. Esta amostra apresentou 11.058.398 cópias/ μ L e Cq de 26,64. As demais amostras testadas foram negativas (Figura 2).

Figura 2- Amplificação das amostras de tonsilas testadas para detecção do gene *ail* em *Y. enterocolitica* patogênica.



Fonte: Arquivo pessoal (2015). A, B, C, E, F e G: Diluição em base 10 do DNA plasmideal (*Pail*), contendo $4,9 \times 10^9$ a $4,9 \times 10^4$ moléculas/ μ L, respectivamente. D: Amostra 17T.

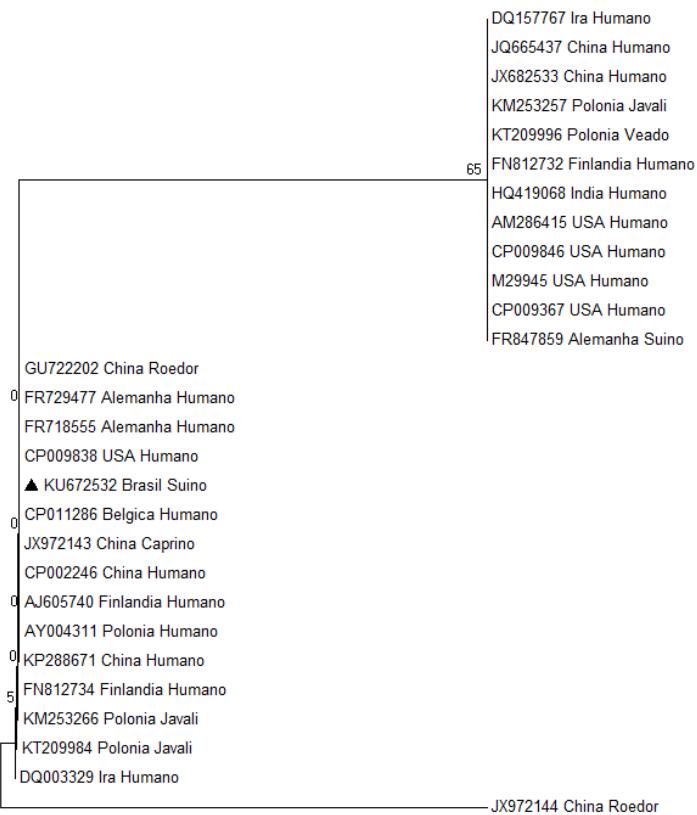
3.3.4 Sequenciamento e análise filogenética

Sequências parciais dos três genes foram obtidas e depositadas no GenBank sob os números de acesso (KU672532, KU672533 e KU711832) para os genes *ail* (453pb), *yadA* (208pb) e *virF* (474pb), respectivamente.

Quando estas sequências foram comparadas com todas as sequências de *Y. enterocolitica* disponíveis no GenBank, foi observada identidade de nucleotídeos variando de 93 a 100% para o gene *ail*, de 99% para o gene *virF* e de 95 a 97% para o gene *yadA*. O gene *ail* (KU672532) não apresentou mudanças de aminoácidos. O gene *virF* (KU711832) apresentou sete mudanças de aminoácidos, porém apenas uma mudança aminoácido foi observada frente a todas as amostras comparadas, mudando os nucleotídeos (T→C) na posição 24991 e 24992, alterando o aminoácido de valina (V) para alanina (A). Por sua vez, o gene *yadA* (KU672533) apresentou nove mudanças de aminoácidos, sendo que três mudanças de aminoácidos foram observadas frente a todas as amostras comparadas. A primeira mudança foi de dois nucleotídeos, (A→C) e (T→C) nas posições 57755 e 57756, alterando o aminoácido de isoleucina (I) para prolina (P). A segunda mudança também foi de dois nucleotídeos, (G→T) e (C→T) nas posições 57758 e 57759, alterando o aminoácido de alanina (A) para leucina (L). A terceira mudança foi um nucleotídeo, (G→C) na posição 57878, alterando o aminoácido de alanina (A) para prolina (P).

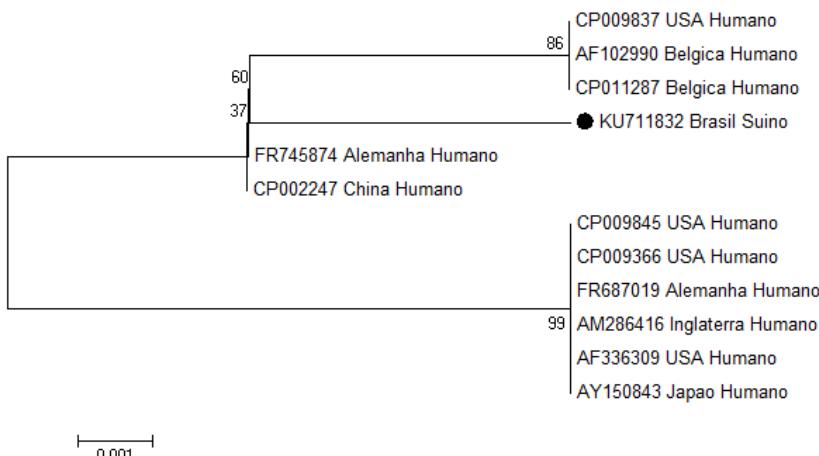
O alinhamento múltiplo para os genes *ail* (Figura 3) e *virF* (Figura 4) mostrou que a amostra aqui sequenciada é semelhante a outras amostras isoladas de humanos e animais em diversos países. Para o gene *yadA* (Figura 5), a amostra aqui sequenciada não clusterizou com nenhuma das 16 amostras de *Y. enterocolitica* disponíveis no GenBank.

Figura 3- Árvore filogenética de sequências de nucleotídeos do gene *ail* de *Y. enterocolitica* usando o método Neighbor-Joining.



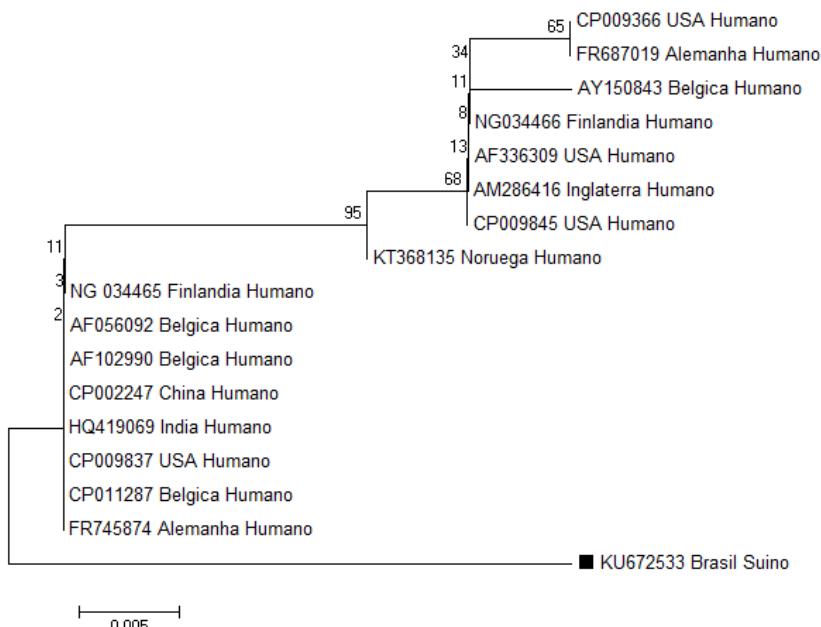
Fonte: Arquivo pessoal (2015). A amostra sequenciada neste trabalho está marcada com um triângulo (▲). A análise envolveu 28 sequências de nucleotídeos e utilizou um teste de bootstrap de 1000 replicatas.

Figura 4- Árvore filogenética de sequências de nucleotídeos do gene *virF* de *Y. enterocolitica* usando o método Neighbor-Joining.



Fonte: Arquivo pessoal (2015). A amostra sequenciada neste trabalho está marcada com um círculo (●). A análise envolveu 12 sequências de nucleotídeos e utilizou um teste de bootstrap de 1000 replicatas.

Figura 5- Árvore filogenética de sequências de nucleotídeos do gene *yadA* de *Y. enterocolitica* usando o método Neighbor-Joining.



Fonte: Arquivo pessoal (2015). A amostra sequenciada neste trabalho está marcada com um quadrado (■). A análise envolveu 17 sequências de nucleotídeos e utilizou um teste de bootstrap de 1000 replicatas.

3.4 DISCUSSÃO

A *Yersinia enterocolitica* não é frequentemente isolada e estudada no Brasil, o que torna difícil estabelecer a relação deste agente como causador de doenças, bem como estimar o impacto da presença da mesma em suínos. Neste estudo, o primeiro relato de ocorrência de *Y. enterocolitica* patogênica em tonsilas de suínos abatidos no estado de Santa Catarina utilizando a técnica de PCR é reportado.

Em países da Europa, a ocorrência deste patógeno em suínos é alta e é considerada como a terceira zoonose de origem alimentar mais notificada (Novoslavskij et al., 2012; Rosner et al., 2012; EFSA, 2013; Vanantwerpen et al., 2014; Van Damme et al., 2015). Nos EUA é estimado que 116.716 pessoas sejam infectadas anualmente por *Y. enterocolitica* (Scallan et al., 2011). Em países em desenvolvimento, é rara a existência de vigilância epidemiológica em casos de yersiniose, e muitas vezes o diagnóstico não revela o causador da gastroenterite (Silva et al., 2010). No Brasil, poucos estudos verificaram a ocorrência desta bactéria em diferentes amostras biológicas. Teodoro et al. (2006) avaliou a presença de *Y. enterocolitica* patogênica em tonsilas de suínos abatidos sem inspeção federal e encontrou uma ocorrência de 10%. Em outro estudo, não foi encontrada a bactéria em linguiças suínas na cidade de Porto Alegre-RS através do isolamento tradicional (Albuquerque; Cardoso, 1999). Demais estudos no Brasil caracterizaram fenotípica e genotípicamente isolados provenientes de diferentes regiões e fontes, como água, lodo, fezes humanas e animais, amostras de alimentos e de diferentes espécies animais, incluindo suínos (Falcão et al., 2004; Falcão et al., 2006; Rusak et al., 2014).

Os mecanismos de patogenicidade de *Y. enterocolitica* são complexos e para que a bactéria seja capaz de causar a doença faz-se necessário a presença de um conjunto de genes de virulência, os quais podem se localizar no DNA cromossomal ou plasmideal da bactéria (Wannet et al., 2001; Falcão; Falcão, 2006). Dentre este genes destacam-se os genes cromossomal *ail* e plasmideais *yadA* e *virF*. Apesar de observada uma baixa ocorrência do agente nas amostras de tonsila de suínos aqui avaliadas, os três genes associados à patogenicidade foram detectados e confirmados por sequenciamento. Falcão et al. (2006) pesquisaram genes de virulência, incluindo *ail* e *virF*, em 106 cepas de *Y. enterocolitica* isoladas de amostras de humanos, animais e

alimentos, como linguiça e carne suína, entre os anos de 1969 e 2000 em diferentes regiões do Brasil. O gene *ail* foi detectado em todas as cepas isoladas a partir de humanos e animais, mas apenas em duas cepas das 35 isoladas a partir de alimentos. O gene *virF* mostrou uma incidência variável, sendo detectado em 94,6% (35 cepas), 61,8% (21 amostras) e 2,9% (1 cepa) de isolados de humanos, animais e alimentos, respectivamente. Tadesse et al. (2013) relataram também a presença de diversos genes de virulência, dentre eles *ail* e *yadA* em fezes e carcaça de suínos ao abate nos anos de 2002 a 2005 nos EUA. Vinte das 172 (11,6%) cepas de *Y. enterocolitica* testadas foram positivas para o gene *yadA*. Destas 20 cepas, todas apresentaram positividade para o gene *ail* e, ao avaliar todas as amostras, 40% apresentaram o gene *ail*. O sequenciamento parcial dos três genes de virulência da amostra aqui detectada, identificou três mudanças de aminoácidos exclusivas, sendo uma no gene *virF* e duas no gene *yadA*. Entretanto, devido a poucas sequências de *Y. enterocolitica*, que apresentem estes genes, disponíveis no GenBank, é difícil desenhar qualquer painel epidemiológico. Além disto, seria interessante avaliar regiões completas destes genes de isolados de suínos para definir esta variabilidade e consequências na população de suínos e humanos como contaminante de produtos cárneos derivados.

A utilização da técnica de cPCR pode ser uma excelente alternativa para detecção de *Y. enterocolitica*, visto que é capaz de reduzir o tempo da análise, quando comparada ao método tradicional, largamente utilizado em alimentos. Além de ser mais rápida, sensível e específica, pode ser usada para diferenciar facilmente cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas de cepas não patogênicas através da pesquisa dos genes de virulência, dispensando os passos de biotipagem e sorotipagem (Lambertz; Danielsson-Tham, 2005; Wannet et al., 2001). Desta forma, a detecção através da PCR diretamente da amostra biológica torna-se interessante tanto para genes

cromossomais como plasmideais. Na maioria dos casos, esses testes detectam genes de virulência localizados no cromossomo bacteriano *yst* ou *ail*, e poucos são direcionados para sequências localizadas no plasmídeo pYV (Aarts et al., 2001). No entanto, a pesquisa somente do plasmídeo de virulência pode ser pouco confiável quando pesquisado em bactérias cultivadas, pois pode ocorrer a perda do plasmídeo durante o cultivo, o que pode levar a resultados falso-negativos (Aarts et al., 2001; Wannet et al., 2001; Thorner et al., 2003).

O uso da cPCR multiplex permite a detecção simultânea de diferentes genes de virulência, reduzindo, assim, o uso de regentes e o tempo dispensado para a análise. Somado a isto, a técnica de qPCR também apresenta vantagens em relação à metodologia tradicional e à cPCR quanto à rapidez, sensibilidade e especificidade (Fredriksson-Ahomaa et al., 2007; Lambertz; Nilsson, 2008). Mesmo apresentando maior sensibilidade, a taxa de detecção de *Y. enterocolitica* patogênica, baseado na detecção do gene *ail* foi baixa em ambos os métodos utilizados neste estudo. Ao comparar a sensibilidade das duas técnicas, a qPCR demonstrou um limite de detecção 100 vezes maior que a cPCR. Mesmo assim, somente uma amostra foi positiva, confirmando a baixa ocorrência do agente patogênico nas amostras estudadas, no estado de Santa Catarina.

A prevalência de *Y. enterocolitica* patogênica em tonsilas de suínos ao abate coletadas entre 2003 e 2005 em diferentes regiões da Inglaterra foi de 44% (Martinez et al., 2010). Bhaduri et al. (2005) encontrou prevalência de 13,3% em amostras de fezes de suínos nos EUA. Na Finlândia, foi encontrada uma prevalência de 47,1% em tonsilas de suínos provenientes de diferentes frigoríficos do país (Virtanen et al., 2011). Na Bélgica, encontrou-se *Y. enterocolitica* em 28,5% das tonsilas de suínos avaliadas (Vanantwerpen, et al., 2014). Em estudo realizado por Teodoro et al. (2006), no qual foi avaliada a presença de *Y. enterocolitica* patogênica em 30

tonsilas de suínos abatidos sem inspeção sanitária utilizando uma técnica de cPCR, foram detectadas três amostras positivas (10%). Fazendo uma análise comparativa com este trabalho, pode-se sugerir que a ocorrência de cepas patogênicas em suínos abatidos sem inspeção sanitária é baixa e em suínos abatidos em frigoríficos com inspeção sanitária federal, a ocorrência é ainda menor. Isso pode indicar um melhor nível sanitário de animais abatidos sob condições de inspeção.

Relatos de maior ocorrência da bactéria em tonsilas de suínos foram reportados e consideraram a presença da bactéria neste tecido como fator de risco para a contaminação da carcaça e, consequentemente, do produto final (Bhaduri et al., 2005; Martinez et al., 2010; Teodoro et al., 2006; Schaake et al., 2013; Virtanen et al., 2011; Vanantwerpen, et al., 2014; Van Damme, et al., 2015). Desta forma, a disponibilidade de técnicas de diagnóstico sensíveis e específicas para a detecção de *Y. enterocolitica* patogênica aqui padronizadas, como qPCR e cPCR multiplex, são de grande valia na avaliação de tonsilas de suínos. Sugere-se que estas técnicas podem ser úteis para a detecção deste agente em outros tecidos de suínos, bem como produtos cárneos. A rápida avaliação dos produtos destinados ao consumidor frente à presença de *Y. enterocolitica* patogênica é de suma importância, a fim de evitar a ocorrência desta infecção alimentar em humanos.

3.5 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram uma baixa ocorrência de *Y. enterocolitica* patogênica no estado de Santa Catarina em tonsilas de suínos ao abate em frigoríficos com inspeção federal.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. B. C.; CARDOSO, M. Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em linguiças frescas de porco em Porto Alegre, RS. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p. 727-729, 1999.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database research programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389–3402, 1997.

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

BHADURI, S. et al. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in pigs in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7117-7121, 2005.

EFSA (European Food Safety Agency); ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, v.11, n.4, p.3129, 2013.

FALCÃO, J. P. et al. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. **Journal Applied Microbiology**, v.96, n.6, p.1230–1236, 2004.

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

FALCÃO, J.P. et al. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p.1539-1548, 2006.

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

LAMBERTZ S. T.; DANIELSSON-THAM M.L. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p.3674–3681, 2005.

LAMBERTZ S. T. et al. Real-Time PCR Method for Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.19, p.6060-6067,2008.

MÄDE, D. et al. A real-time PCR for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food combined with an universal internal amplification control system. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.3, n.2, p.142-151, 2008.

MARTÍNEZ, P. O. et al. Wide variety of bioserotypes of enteropathogenic *Yersinia* in tonsils of English pigs at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p. 64–69, 2010.

NESBAKKEN, T. et al. 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, n.3, p.231-240, 2003.

NOVOSLAVSKIJ A. et al. Prevalence and genetic diversity of enteropathogenic *Yersinia* spp. in pigs at farms and slaughter in Lithuania. **Research in Veterinary Science**, v.94, n.2, p.209-213, 2013.

ROBINS-BROWNE R. M. *Yersinia enterocolitica*. In: DOYLE PM, BEUCHAT LR, MOTVILLE TJ, editors. **Food Microbiology**. Boca Raton: ASM Press; p.215-45, 2001.

ROSNER, B., M. et al. Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections, Germany 2009–2010. **Epidemiology and Infection**, v.140, n.10, p.1738-1747, 2012.

RUSAK, L.A. et al. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, n.12, p.1533-1540, 2014.DOI:10.3855/jidc.4533.

SAS INSTITUTE INC. System for Microsoft Windows, Release 9.2, Cary, NC, USA, 2002-2008. (cd-rom).

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.1,p.7-15, 2011.

SCHAAKE J. et al. Human and animal isolates of *Yersinia enterocolitica* show significant serotype-specific colonization and host-specific immune defense properties. **Infection and Immunity**, v.81, n.11, p.4013–4025, 2013.

SILVA, N. da. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 4 edição. São Paulo: Livraria Varela, 614p, 2010.

TEODORO,V.A.M. et al. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.9-14, 2006.

TADESSE, A.D. et al. *Yersinia enterocolitica* of Porcine Origin: Carriage of Virulence Genes and Genotypic Diversity. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.1, p.80-86, 2013.

THOERNER, P. et al. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1810–1816., 2003.

VANANTWERPEN, G. et al. Within-batch prevalence and quantification of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in tonsils of pigs at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v.169, n.3-4, p.223-227, 2014.

VAN DAMME, I. et al. Influence of isolation methods on the occurrence of plasmid-carrying *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 in slaughter pig tonsils, faeces and carcass surface swabs .**International Journal of Food Microbiology**, v.164,n.1,p.32-35, 2013.

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

VIRTANEN, S.E. et al. Factors relates to the prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on pig farms. **Epidemiology and Infection**, v.139, n.12, p.1919-1927, 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.12, 2725-2729, 2013

YUN, J.J. et al. Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.34, n.12, e85, 2006.

WANG, J.Z. et al. Real-Time TaqMan PCR for *Yersinia enterocolitica* Detection Based on the *ail* and *foxA* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, n.12, p.4443-4444, 2014.

WANNET, W.J.B. et al. 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.

ANEXO

GEL DE AGAROSE 2%

- 2 g de agarose;
- 100 mL de TBE 0,5X
- Misturar e aquecer em microondas até a agarose se dissolver
- Após esfriar, adicionar 5 µL de Brometo de Etídio.

TBE 5 X

- 54 g de Tris base;
- 27,5 g de ácido bórico;
- 20 mL de EDTA 0,5M pH 8,0;
- 900 mL de água ultrapura;
- Agitar com barra magnética até entrar em solução;
- Acrescentar água ultrapura com a quantidade necessária para completar 1 litro;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Estocar em temperatura ambiente.

TBE 0,5 X

- 900 mL de água destilada;
- 100 mL de TBE 5X estéril.