

PESQUISA DE *Yersinia enterocolitica* EM LINGÜIÇAS FRESCAS DE PORCO EM PORTO ALEGRE, RS

INVESTIGATION OF *Yersinia enterocolitica* IN FRESH PORK SAUSAGES IN PORTO ALEGRE, RS, BRAZIL

Maria do Céu Borralho e Albuquerque¹ Marisa Cardoso²

- NOTA -

RESUMO

Foram analisadas 96 amostras de lingüiça fresca preparadas unicamente com carne suína adquiridas no comércio de Porto Alegre, com o objetivo de determinar a presença de *Yersinia enterocolitica*. A metodologia empregada baseou-se na incubação em salina fosfatada tamponada a 4°C como enriquecimento e isolamento em ágar seletivo para *yersinias* (ágar cefsulodina-irgasan-novobiocina). Em nenhuma das amostras de lingüiça analisadas no presente estudo, foi encontrada a *Y. enterocolitica*. A mesma metodologia foi testada em ensaios de recuperação de *Y. enterocolitica* de amostras de lingüiça contaminadas artificialmente com diferentes inóculos da bactéria. O método apresentou boa sensibilidade, mas baixa reprodutibilidade nos ensaios de recuperação, onde apenas inóculos de $6,3 \times 10^4$ UFC/mℓ puderam ser sempre recuperados. A partir destes resultados, conclui-se que novas etapas de enriquecimento e seleção devem ser adicionadas à metodologia testada para garantir uma maior reprodutibilidade, principalmente em níveis de contaminação mais baixos.

Palavras-chave: lingüiça, suíno, *Yersinia enterocolitica*.

SUMMARY

In this study 96 samples of fresh sausage containing only pork and sold in Porto Alegre were investigated for the presence of *Yersinia enterocolitica*. Each sample was incubated in phosphate buffer saline at 4°C for cold-enrichment and plated onto *yersinia* selective agar (cefsulodin-irgasan-novobiocin agar). *Y. enterocolitica* could not be isolated from any of the sausage samples used in this study. Furthermore, the effectiveness of the method was tested by recovering of *Y. enterocolitica* from fresh pork sausage that were artificially contaminated with different levels of inoculum. The method showed a good

sensitivity but a low reproductibility in the recovery assays. Only samples containing at least $6,3 \times 10^4$ CFU/mℓ resulted in good recovery patterns. Other enrichment and selective steps must be added to the method to provide a better *yersinia* isolation from low contaminated pork sausage.

Key words: sausage, pork, *Yersinia enterocolitica*.

INTRODUÇÃO

A *Y. enterocolitica* é um microrganismo patogênico que tem sua presença associada a alimentos e água contaminados. A capacidade deste microrganismo de multiplicação a temperaturas de refrigeração (4-7°C) faz com que sua presença em alimentos represente risco potencial para a saúde pública. (BHADURI *et al.*, 1995). A manifestação clínica da infecção é distinta nas diferentes faixas etárias, predominando a enterocolite com diarreia (MURRAY *et al.*, 1994). Segundo JAY (1992), os sorotipos de *Y. enterocolitica* que se apresentam mais freqüentemente nas infecções humanas são: O:3, O:5,27, O:8 e O:9.

MOLLARET (1971) sugeriu o suíno como principal reservatório das cepas patogênicas para o homem. Posteriormente, TSUBOKURA *et al.* (1973), examinando o conteúdo cecal de 299 suínos aparentemente sadios em um matadouro no Japão, isolaram 13 cepas de *Y. enterocolitica*, pertencentes

¹ Biólogo, MSc., Laboratório Central da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Secretaria de Saúde e do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. Rua Domingos Crescêncio, 132, 90650-090 Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: ceu@pro.via-RS.com.br. Autor para correspondência.

² Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

aos grupos O:3, O:5, O:10 e O:12. A correlação entre a ocorrência de yersiniose e o consumo de carne e embutidos de suíno mal cozidos pôde ser estatisticamente assegurada por OSTROFF *et al.* (1994), em estudo comparativo entre um grupo de pacientes doentes e um grupo controle.

No Brasil, existem relatos de isolamento da *Y. enterocolitica* de amostras de alimentos diversos, coletados, principalmente, no centro do país. A prevalência encontrada varia bastante nos diferentes alimentos e metodologias empregadas, alcançando em alguns estudos índices acima de 40% (EIROA *et al.*, 1984,1986; TIBANA *et al.*, 1987; LANDGRAF & FALCÃO, 1987; FALCÃO, 1991; TASSINARI *et al.*, 1994). A inexistência de dados sobre a ocorrência da *Y. enterocolitica* em nosso estado, e com o objetivo de testar metodologia recomendada que fosse simples e economicamente viável para implantação nos laboratórios da rede pública de saúde, motivaram o presente estudo.

Durante o período de maio de 1996 à fevereiro de 1997, foram coletadas em casas comerciais de Porto Alegre 96 amostras de lingüiça fresca, contendo unicamente carne suína, fabricadas industrialmente e apresentando registro do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura. As amostras adquiridas pesavam aproximadamente 100g e foram obtidas dentro do procedimento normal de pesagem utilizado pelo vendedor em cada estabelecimento. As amostras (25g) foram pesadas assepticamente em sacos plásticos estéreis para Stomacher e homogeneizadas por 2min com 225mℓ de solução salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7,6. Os homogeneizados foram incubados a 4°C por até 21 dias com o objetivo de promover um pré-enriquecimento e conseqüente recuperação de células lesadas (SCHIEMANN, 1982). A partir do meio de enriquecimento foram semeadas alíquotas em ágar CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocina Ágar, Difco) nos dias 7,14 e 21 do enriquecimento. Após incubação a 32°C por até 48h, as colônias típicas foram selecionadas e repicadas em ágar KIA (Klieger Iron Agar, Difco) e LIA (Lisine Iron Agar, Difco) e, posteriormente, submetidas a testes bioquímicos complementares de identificação.

Das amostras analisadas foram selecionadas entre uma e oito colônias suspeitas (pequena, redonda, com centro vermelho e halo esbranquiçado) no ágar CIN de cada um dos repiques realizados a partir do enriquecimento a 4°C. Foram isoladas no total 865 colônias. Destas, 60 apresentaram reações compatíveis com *Y. enterocolitica* no meio de KIA e LIA, mas não foram confirmadas nas provas bioquímicas

complementares, indicando a ausência de *Y. enterocolitica* nas 96 amostras analisadas. O ágar CIN utilizado no presente estudo demonstrou ser bastante seletivo frente à microbiota interferente, mas ainda assim não se mostrou capaz de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* e *Aeromonas hydrophila*. Também foi possível observar que em todas as amostras de lingüiça analisadas houve predominância de colônias atípicas, que, uma vez submetidas aos testes confirmatórios, acabaram por ser identificadas como não sendo *Y. enterocolitica*. Isto indica que o meio é adequado para o reconhecimento da bactéria, apresentando boa especificidade.

Paralelamente, foram realizados ensaios para determinação do limite de recuperação da *Y. enterocolitica* em relação à microbiota interferente natural da amostra. Para tanto, foi feita a contaminação de diferentes porções de uma mesma amostra de lingüiça, negativa para este microrganismo, com quantidades conhecidas e crescentes de *Y. enterocolitica* (INCQS 00098/ATCC 9610), que após foram processadas, utilizando a metodologia escolhida. Foram realizadas 5 repetições para cada inóculo testado ($6,3 \times 10^1$ até $6,3 \times 10^4$ UFC/mℓ), obedecendo aos mesmos procedimentos de pesagem e enriquecimento descritos. Após o período de incubação a 4°C por até 21 dias, foram semeadas alíquotas no ágar CIN e seguidas as etapas de identificação anteriormente citadas.

A amostra padrão de *Y. enterocolitica* pôde ser recuperada em inóculos que variaram de $6,3 \times 10^1$ até $6,3 \times 10^4$ UFC/mℓ, sendo apenas este último recuperado em 4 das 5 repetições realizadas (tabela 1). Estes dados indicam que o enriquecimento a frio em salina fosfatada tamponada apresenta uma boa sensibilidade, mas não reprodutibilidade. Da mesma forma, o efeito do tempo de permanência das amostras a 4 °C mostrou resultados contraditórios, não sendo possível observar um aumento da taxa de recuperação de bactérias através do enriquecimento a frio. Apenas inóculos de $6,3 \times 10^4$ mantiveram-se estáveis ao longo dos 21 dias de permanência a 4°C. Sendo assim, apesar da metodologia empregada ter um custo acessível para a implantação nos laboratórios de diagnóstico, é necessário adicionar novas etapas de enriquecimento ou seleção que garantam, principalmente, uma maior reprodutibilidade do método em níveis de contaminação mais baixos.

Tabela 1 - Isolamento de *Y. enterocolitica* nos cinco ensaios de recuperação em amostras de lingüiça contaminadas artificialmente e submetidas a enriquecimento a 4°C por até 21 dias.

Inóculo (UFC/ml)	Dias de incubação a 4°C		
	7	14	21
6,3 x 10 ⁴	4*/5	4/5	4/5
6,3 x 10 ³	3/5	1/5	2/5
6,3 x 10 ²	0/5	2/5	1/5
6,2 x 10 ¹	1/5	2/5	0/5

*Número de repetições do ensaio em que houve a recuperação da *Y. enterocolitica*.

UFC - Unidade Formadora de Colônia.

Estudos futuros devem ser conduzidos para testar outras metodologias em pesquisa de *Y. enterocolitica* em embutidos de carne de suíno, tanto contaminada artificialmente, como em produtos oferecidos para o consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHADURI, S., BUCHANAN, R.L., PHILLIPS, J. Expanded response surface model for predicting the effects of temperatures, pH, sodium chloride contents and sodium nitrite concentrations on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. **Jour Appl Bacteriol**, v. 79, p. 163-170, 1995.
- EIROA, M.N., CULLEN, B.T., FALCÃO, D.P. *et al.* *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia atípica* em leite cru e pasteurizado. **Col ITAL**, v. 14, p. 27-37, 1984.
- EIROA, M.N., FALCÃO, D.P., CULLEN, B.T. *et al.* Pesquisa de *Yersinia* spp. Em lingüiças frescas comercializadas na região de Campinas. **Bol ITAL**, v. 23, n. 21 p. 271-283, 1986.
- FALCÃO, D.P. Occurrence of *Yersinia* spp. in foods in Brazil. **Internat Jour of Food Microb**, v. 14, p. 179-182, 1991.
- JAY, J. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992. 804 pp.
- LANDGRAF, M., FALCÃO, D.P. Isolamento de *Yersinia* spp. em alimentos diversos. **Rev Microbiol**, v. 18, n.1, p. 93-97, 1987.
- MOLLARET, H.H. Linfection humaine a *Yersinia enterocolitica* en 1970, a la lumière de 642 cas récent. **Path Biol**, v. 19, n. 3-4, p. 189-205, 1971.
- MURRAY, P., KOBAYASHI, G., PFALLER, M. *et al.* **Medical Microbiology**. EUA: Mosby-Year Book, 1994. 775 p.
- OSTROFF, S.M., KAPPERUD, G., HUTWAGNER, L.C. *et al.* Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infections in Norway: a prospective case-control study. **Epidemiol Infect**, v. 112, n. 1, p. 133-141, 1994.
- SCHIEMANN, D.A. Development of a two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food. **Appl and Environ Microb**, v. 43, n.1, p. 14-27, 1982.
- TASSINARI, A.R., FRANCO, B.D., LANDGRAF, M. Incidence of *Yersinia* spp. in food in São Paulo, Brazil. **Int J Food Microbiol**, p. 21, n. 3, p. 263-270, 1994.
- TIBANA, A., WARNKEN, M., NUNES, M. *et al.* Occurrence of *Yersinia* species in raw and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Int Jour Food Microbiol**, v. 21, p. 263-270, 1987.
- TSUBOKURA, M., OTSUKI, K., ITAGAKI, K. Studies on *Yersinia enterocolitica*. **Jap Jour Vet Sci**, v. 35, p. 419-424, 1973.