

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KADIGIA PEGORARO

RASTREAMENTO DA CONTAMINAÇÃO POR *YERSINIA ENTEROCOLITICA* EM
CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS



PALOTINA

2018

KADIGIA PEGORARO

RASTREAMENTO DA CONTAMINAÇÃO POR *YERSINIA ENTEROCOLITICA* EM
CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P376 Pegoraro, Kadigia
Rastreamento da contaminação por *yersinia enterocolitica*
em cadeia produtiva de suínos / Kadigia Pegoraro. – Palotina,
2018
111f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Yersiniose. 2. Resistência a antimicrobianos. 3. Virulência.
4. Variabilidade genética I. Bersot, Luciano dos Santos.
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

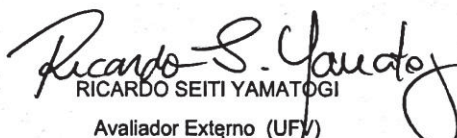
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KADIGIA PEGORARO** intitulada: **Rastreamento da contaminação por *Yersinia enterocolitica* em cadelas produtivas de suínos**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 30 de Julho de 2018.



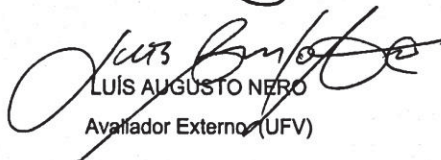
LUCIANO DOS SANTOS BERSOT

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



RICARDO SEITI YAMATOJI

Avaliador Externo (UFV)



LUÍS AUGUSTO NERO

Avaliador Externo (UFV)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me deu ânimo e forças para que eu pudesse concluir mais essa etapa em minha vida, que sem dúvidas foi repleta de desafios, incertezas e medos, mas que de maneira alguma poderia ter sido mais gratificante.

Aos meus pais, Eliseu e Maristela e a minha vó Lourdes, que sempre me apoiaram, incentivaram e com certeza continuarão me ajudando nesta grande e surpreendente caminhada.

Aos meus queridos irmãos, Anderson e Katia, que por muitas vezes foram meus guias, minha base em momentos de amadurecimento e um exemplo do qual recebo ainda grande influência.

Ao meu namorado Kaiton, que acima de tudo é meu melhor amigo, sempre paciente e compreensivo em todos os momentos nos quais estive ausente. Que apesar da distância nunca dexiou de estar presente, me apoiando, incentivando e indicando o caminho mais correto a seguir.

Aos meus sobrinhos Artur, Alicia, Sophia e João Pedro, que são “LUZ” em minha vida e me dão a força diária para levantar e correr atrás dos meus objetivos. Agradeço a todos os meus familiares que com certeza foram muito importantes nos mais variados momentos desta trajetória. Que sempre me incentivaram e apoiaram, me inspiraram e me auxiliaram a traçar metas e objetivos ao meu futuro.

Ao meu orientador Luciano dos Santos Bersot, pelos conhecimentos repassados durante esses três anos e meio que compreenderam a Residência e o Mestrado. Período no qual evolui como profissional e ser humano e com êxito pude atingir grandes metas e objetivos pessoais e profissionais. Obrigada por todos os ensinamentos e pela sua orientação, foram e são fundamentais para o meu crescimento.

A Mallu que foi minha dupla “praticamente perfeita”. Como é bom encontrarmos em nosso caminho pessoas com o coração tão bom, generosas e que nos estimulam a ser cada dia melhor. Meus dias foram mais alegres, mais divertidos

e mais “inteligentes” com sua companhia, sem dúvida sentirei, ou melhor, já sinto, muita falta da nossa convivência diária.

A Cibeli, que junto com a Mallu, entenderam minhas limitações em acordar a uma hora da manhã (tendo ido dormir a meia noite) e foram pacientes (as vezes) com os meus atrasos. Em meio a tantos altos e baixos emocionais, cansaço físico e mental, nossa parceria no “Projeto Suínos” foi um tremendo sucesso.

A Rosana que sempre me ajudou, me socorreu (até quando tentei “boicotar” o “Projeto Suínos” incendiando todos os Falcons do projeto), foi amiga em todos os momentos, ouviu minhas lamentações, me entendeu em dias de estresse e naqueles em que a saudade de casa apertava.

A Carol que foi a estagiária mais dedicada e entusiasmada que já tive. Que me fez sentir importante, que soube ouvir e ensinar também. Que contribuiu como o projeto de maneira substancial durante aqueles intermináveis testes bioquímicos. Obrigada por toda a parceria e amizade.

A todos os colegas do LACOMA, que sempre me ajudaram, inceparam, foram “ombro amigo” e muitas vezes família. Graças ao empenho dessa equipe não “pirei” com todo o trabalho que tivemos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Professor Luís Augusto Nero, pela parceria no planejamento e execução deste projeto, pela disponibilização do laboratório e pelas contribuições nos momentos de dúvida. A Bruna Torres Furtado Martins e ao Professor Ricardo, que me acompanharam e ajudaram em toda a parte prática e intelectual durante as análises moleculares.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG por viabilizar a execução do projeto através do financiamento concedido via chamada conjunta de projetos FAPEMIG/EMBRAPA (CVZ-APQ-03166-13), Edital 11/2013. E à CAPES pelo subsídio da minha bolsa de mestrado.

A todos, meu sincero muito obrigada!

RESUMO

O suíno doméstico pode atuar como reservatório natural de patógenos importantes para a saúde humana, como *Yersinia enterocolitica*, que é um enteropatógeno emergente, causador de yersiniose. *Y. enterocolitica* é carregada pelos suínos principalmente em tecidos linfáticos e fezes até as instalações de abate, quando em condições inadequadas de evisceração e manipulação pode ser disseminada para carcaças e produtos finais. A patogenicidade de *Y. enterocolitica* para humanos é determinada pela expressão de genes plasmídicos e cromossômicos de virulência, eles são responsáveis pela codificação de proteínas que conferem capacidade de adesão, penetração nas células do hospedeiro e combate a resposta imune. Outro aspecto importante é a capacidade que as bactérias têm em adquirir resistência aos antimicrobianos empregados no tratamento de doenças. O monitoramento acerca do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos é fundamental, tendo em vista que o uso excessivo desses agentes na suinocultura, como promotores de crescimento e para a profilaxia em massa, é fator predisponente a resistência, principalmente frente aos antimicrobianos amplamente utilizados na medicina humana. Assim, o presente trabalho teve como objetivo rastrear a contaminação por *Y. enterocolitica* em diferentes etapas da cadeia produtiva de suínos e realizar a caracterização do perfil de virulência e de resistência a antimicrobianos nos isolados obtidos. O trabalho ocorreu em granjas de suínos em terminação e abatedouro-frigorífico localizados no Oeste do Paraná. Amostras de água, ração, superfície do piso de baias da granja e de pocilgas de espera, superfície de carcaças, equipamentos, utensílios, cortes finais *in natura* e amostras de tonsilas palatinas e linfonodos mesentéricos foram coletadas e *Y. enterocolitica* foi pesquisada pela metodologia ISO 10273 modificada. Os isolados foram confirmados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os genes 16s *rRNA* e *inv*. Foram realizadas PCR para sorotipificação e indentificação dos genes de virulência *ail*, *ystB*, *virF*, *myfA*, *ystA*, *ystC*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC*, *ymoA* e *hrep* e de resistência *emrD*, *yfhD* e *marC*. Foi realizada também a caracterização fenotípica do perfil de resistência frente a 19 antimicrobianos pelo teste de disco-difusão. Foram analisados também os perfis de macrorestrição dos isolados e comparados aos perfis de isolados de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 obtidos de suínos no estado de Minas Gerais. Das 800 amostras coletadas, *Y. enterocolitica* foi identificada em apenas uma tonsila palatina, representando uma ocorrência de 0,12%. Foram obtidos três isolados (104, 105 e 106) da amostra positiva, todos do sorotipo O:3 e positivos para os genes *inv*, *ail*, *ystA*, *myfA*, *hrep*, *ymoA*, *sat*, *virF*, *emrD*, *yfhD* e *marC*. Os perfis de macrorestrição dos isolados das duas regiões (Paraná e Minas Gerais) apresentaram alto grau de similaridade, mais de 92%. Isolados com perfis clonais (100% de similaridade) foram identificados nas amostras 104, 106 e 53UFV. Esses resultados indicam baixa variabilidade genética das cepas de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 circulantes entre as duas regiões. Apesar da baixa ocorrência de *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de suínos na região oeste do Paraná identificada neste trabalho, foi verificado que os isolados obtidos apresentaram potencial de multirresistência a antimicrobianos e a presença de importantes fatores de virulência em seu material genético.

Palavras-chave: yersiniose, resistência a antimicrobianos, virulência, ocorrência, variabilidade genética.

ABSTRACT

Domestic swine can be a natural reservoir of important pathogens for human health, such as *Yersinia enterocolitica*, which is an emerging enteropathogen, which causes yersiniosis. Pigs carry *Y. enterocolitica* mainly in their lymphatic tissues and feces to slaughter facilities, under inappropriate evisceration and handling conditions as a result it can be disseminated to carcasses and end products. The pathogenicity of *Y. enterocolitica* to humans is determined by the expression of virulence plasmid and chromosomal genes, that are responsible for the coding of proteins that confer adhesion capacity, penetration into the host cells, at the same time, it combats the immune response. Another important aspect is the ability of bacteria to acquire resistance to antimicrobials used in the treatment of diseases. The excessive use of antimicrobial agents to promote growth in swine breeding can be considered an important factor for the development of resistance, so it is fundamental that the development of resistance is monitored, especially against the antimicrobials most used in human medicine. Thus, the present work aimed to trace the contamination by *Y. enterocolitica* in different stages of the pig production chain and to characterize the profile of virulence and antimicrobial resistance in the isolates obtained. The work was carried out in pig farms and also in slaughterhouses located in the West of Paraná. Samples of water, feed, farm floor surfaces, stand pens, carcass surfaces, equipment, utensils, final cuts in Natura, samples of palatine tonsils and mesenteric lymph nodes were collected. *Y. enterocolitica* was investigated by the modified ISO 10273 methodology. The isolates were confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the *16s rRNA* and *inv*. PCRs were performed for serotyping and identification of the virulent genes *ail*, *ystB*, *virF*, *myfA*, *ystA*, *ystC*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC*, *ymoA* and *hrep* and of resistance *emrD*, *fhD* and *marC*. The phenotypic characterization of the resistance profile against 19 antimicrobials was also performed by the disc-diffusion test. The macrorestriction profiles of the isolates were also analyzed and compared to the profiles of isolates of *Y. enterocolitica* serotype O:3 obtained from pigs in the state of Minas Gerais (UFV). Of the 800 samples collected, *Y. enterocolitica* was identified in only one palatine tonsil, representing an occurrence of 0.12%. From the positive sample, three isolates (104, 105 and 106), all of the O: serotype and positive for the genes *inv*, *ail*, *mystA*, *myfA*, *hrep*, *ymoA*, *sat*, *virF*, *emrD*, *yfhD* and *marC* were obtained. The macrorestriction profiles of the isolates from both regions (Parana and Minas Gerais) showed a high degree of similarity, more than 92%. Isolates of clonal profiles were identified in samples 104, 106 and 53UFV. These results indicate low genetic variability of the circulating serotype O:3 strains of *Y. enterocolitica* between the two regions. Despite the low occurrence of *Y. enterocolitica* in the pig production chain in the western region of Paraná identified in this study, it was verified that the isolates obtained showed multiresistant potential to antimicrobials and the presence of important virulence factors in their genetic material.

Key-words: yersiniosis, antimicrobial resistance, virulence, occurrence, genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO E SOROTIPIFICAÇÃO DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	64
FIGURA 2. PADRÕES DE PFGE APÓS A MACRORRESTRIÇÃO (ENZIMA XBAI) DOS ISOLADOS DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> OBTIDOS DAS AMOSTRAS COLETADAS DE SUÍNOS NO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ, COMPARADOS A OITO ISOLADOS DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> COLETADOS DE SUÍNOS NA REGIÃO DE VIÇOSA, MINAS GERAIS (UFV).	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESPÉCIES DE <i>YERSINIA</i>	35
TABELA 2 - PROVAS BIOQUÍMICAS PARA BIOTIPIFICAÇÃO DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	36
TABELA 3 - AMOSTRAS COLETADAS ENTRE SETEMBRO DE 2016 E FEVEREIRO DE 2017 EM DEZ GRANJAS DE TERMINAÇÃO DE SUÍNOS E EM UM ABATEDOURO-FRIGORÍFICO DE SUÍNOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....	57
TABELA 4 - GENES PESQUISADOS, SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO E SOROTIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	60
TABELA 5 - GENES PESQUISADOS, SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS, REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) UTILIZADAS E TAMANHO ESPERADO DOS PRODUTOS PARA DETERMINAÇÃO DE VIRULÊNCIA E DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	62
TABELA 6 – NÚMERO DE AMOSTRAS COM CRESCIMENTO DE COLÔNIAS TÍPICAS DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> EM ÁGAR CEFSULODIN-IRGASAN-NOVOBIOCIN (CIN) E NÚMERO DE COLÔNIAS ISOLADAS, NÚMERO DE AMOSTRAS E DE ISOLADOS SUGESTIVOS EM TESTES BIOQUÍMICOS E NÚMERO DE AMOSTRAS E DE ISOLADOS CONFIRMADOS POR PCR, OBTIDOS DE AMOSTRAS COLETADAS DE DIFERENTES PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS, ENTRE SET/2016 E FEV/2017, NO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ.	64
TABELA 7 - RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA NOS ISOLADOS DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> OBTIDOS DE UMA AMOSTRA DE TONSILA PALATINA DE SUÍNO.....	69
TABELA 8 - PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE TRÊS ISOLADOS DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> OBTIDOS DE UMA AMOSTRA DE TONSILA PALATINA DE SUÍNOS.....	70

SUMÁRIO

DADOS CURRICULARES DA AUTORA	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA E CONTROLE DE PATÓGENOS EM ALIMENTOS.....	13
2.2 <i>Y. enterocolítica</i> EM ANIMAIS E ALIMENTOS.....	16
2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE <i>Yersinia enterocolítica</i>	18
2.4 <i>Yersinia enterocolítica</i>	21
2.4.1 Histórico e Características da espécie	21
2.4.2 Fatores de Virulência.....	23
2.4.3 Patogênese e manifestações clínicas em humanos.....	27
2.4.4 Susceptibilidade a antimicrobianos.....	30
2.5 DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE <i>Y. enterocolítica</i>	32
2.6 CONTROLE DE <i>Yersinia enterocolítica</i> NA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA.....	38
REFERÊNCIAS.....	41
3 OBJETIVOS	53
3.4 OBJETIVO GERAL	53
3.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4 BAIXA OCORRÊNCIA DE <i>Yersinia enterocolítica</i> PATOGÊNICA NA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS NO OESTE DO PARANÁ.....	54
4.4 INTRODUÇÃO	54
4.5 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.5.2 Área de estudo e coleta de amostras	56
4.5.3 Detecção e isolamento de <i>Y. enterocolítica</i>	58
4.5.4 Extração do DNA.....	58
4.5.5 Identificação molecular	59
4.5.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	60
4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63

4.7	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS.....	72
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICE 1 – INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY: AUTHOR INFORMATION PACK.....	95

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Kadigia Pegoraro, filha de Maristela Teresinha Ruschel Pegoraro e Eliseu Francisco Pegoraro, nascida em 07 de maio de 1990 no município de Xanxerê, estado de Santa Catarina. Médica Veterinária formada no ano de 2015 pela Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO Paraná. Residente em Inspeção de Produtos de Origem Animal no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (2015-2017). Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na linha de pesquisa em Microbiologia aplicada à Produção Animal.

1 INTRODUÇÃO

Os grandes mercados consumidores, principalmente os importadores, vêm se tornando mais exigentes e impondo requisitos de qualidade e inocuidade cada vez mais rigorosos aos alimentos. Tendo em vista o papel do Brasil como grande produtor e exportador de carne suína e o elevado consumo mundial desse alimento, torna-se imprescindível a atenção de todos os envolvidos na cadeia produtiva, incluindo o pessoal técnico das fazendas, das indústrias e dos órgãos governamentais ao atendimento desses requisitos, com objetivo de manter a estabilidade da economia e a oferta de produtos competitivos no mercado, atendendo a demanda do consumidor, gerando renda, emprego e ofertando produtos que não comprometam a saúde pública.

O suíno doméstico pode atuar como reservatório natural de patógenos importantes para a saúde humana, como *Yersinia enterocolitica*. Esse patógeno não causa nenhuma alteração clínica nos animais, porém pode ser carregado por eles até as instalações de abate e, em condições inadequadas de evisceração e manipulação, ser disseminado para as carcaças e para os produtos finais, que serão adquiridos pelo consumidor.

O sistema intensivo de criação dos animais, que atualmente é o mais utilizado para atender a grande demanda pela carne suína, apresenta algumas características importantes com relação a disseminação de patógenos, como o uso de bebedouros e comedouros coletivos, a geração de grandes quantidades de fezes, a alta densidade populacional e o contato direto entre os animais. Esses fatores, além de dificultarem o controle de patógenos, podem favorecer a disseminação desses agentes, principalmente os enteropatógenos, como é o caso de *Y. enterocolitica*.

Y. enterocolitica apresenta características bioquímicas bastante variáveis e por isso pode ser dividida em seis biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4, e 5), que possuem significado clínico e epidemiológico variável. A maioria das cepas patogênicas para humanos pertence aos biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5, enquanto que as pertencentes ao biotipo 1A são consideradas ambientais e não estão comumente relacionadas a doença. A patogenicidade de *Y. enterocolitica* em humanos está associada a expressão de fatores de virulência, determinados pela presença de genes cromossômicos e por um plasmídeo de virulência,

denominado pYV. Além disso, *Y. enterocolitica* tem tropismo pelo tecido linfoide, que é uma característica fundamental para a patogênese que leva a manifestação clínica de yersiniose.

A yersiniose é atualmente uma das doenças de origem alimentar mais notificadas aos órgãos de vigilância na União Europeia. Casos esporádicos também têm sido notificados com maior frequência em outras partes do mundo, conferindo uma característica emergente a essa doença. Ela se apresenta como uma gastroenterite aguda em seres humanos, geralmente autolimitada e restrita ao trato gastrointestinal e aos linfonodos regionais e normalmente não necessita de tratamento específico com antimicrobianos (ATB), salvo nos casos mais graves e em pacientes de risco.

A resistência aos antimicrobianos (AMR) é atualmente um dos problemas de saúde pública mais complexos e urgentes no mundo. O uso desses medicamentos na produção animal intensiva é considerado a principal causa para o desenvolvimento de AMR. Dentre todos os sistemas de produção animal o consumo mais elevado de antimicrobianos ocorre na cadeia produtiva de suínos. Considerando a forte ligação epidemiológica entre *Y. enterocolitica* e a cadeia produtiva de carne suína, o monitoramento acerca do desenvolvimento de AMR é fundamental para direcionar o tratamento da yersiniose em humanos.

No Brasil, não existem dados oficiais de yersiniose em humanos e são poucos os estudos relacionados a epidemiologia de *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de suínos. A determinação da presença desse patógeno e a caracterização adequada dos isolados, quanto ao seu potencial patogênico e de resistência a antimicrobianos, são fundamentais para determinar sua importância epidemiológica no país. Essas informações dão suporte para que sejam traçadas rotas epidemiológicas da contaminação por *Y. enterocolitica*, possibilitando a determinação e adoção de medidas de prevenção e controle específicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA E CONTROLE DE PATÓGENOS EM ALIMENTOS

A carne suína é a fonte de proteína de origem animal mais produzida e consumida no mundo. Na última década a sua produção global apresentou índices consideráveis de crescimento, em média 1,6% ao ano (USDA, 2017). No Brasil a produção também vem apresentando índices elevados de desenvolvimento. Segundo indicadores do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017) o Brasil abateu 10,6 milhões de suínos no segundo trimestre de 2017, obtendo um crescimento de aproximadamente 17,0% quando comparado ao número de suínos abatidos no mesmo período em 2012. Esses resultados fazem com que o Brasil se mantenha na quarta posição entre os países com maior produção e exportação de carne suína no mundo (ABPA, 2017).

No segundo semestre do ano de 2017 a região Sul respondeu por 66,5% do abate nacional de suínos, seguida pelas regiões Sudeste (18,6%), Centro-Oeste (13,7%), Nordeste (1,0%) e Norte (0,1%) (IBGE, 2017). Nesse mesmo período, os principais estados brasileiros produtores de carne suína foram Santa Catarina, responsável por 26,3% da produção nacional, seguido do Paraná (21,5%), Rio Grande do Sul (18,5%) e Minas Gerais (12,2%), sendo que a soma da produção dos quatro estados correspondeu a quase 80,0% da produção nacional (IBGE, 2017; ABPA, 2017).

O sistema intensivo de criação associado aos avanços obtidos em genética, nutrição e sanidade, são os principais responsáveis pelo aumento da produtividade na suinocultura (D'SILVA, 2000; ABCS, 2016). Nos sistemas intensivos de criação dois tipos de produção podem ser desenvolvidos, conhecidos como sistema de ciclo completo e sistema com múltiplos locais (SOUZA et al., 2013). Em ambos, os animais permanecem confinados em todas as fases de criação (D'SILVA, 2000). Entretanto, no sistema de ciclo completo as propriedades detêm todo o processo de produção, desde a recepção do material genético até a entrega dos suínos em idade de abate para os frigoríficos, como ocorre tipicamente em Minas Gerais (SOUZA et al., 2013). Já nos sistemas

de múltiplos locais, existem basicamente duas propriedades envolvidas: a Unidade Produtora de Leitões (UPL) e as Unidades de Terminação. Este último sistema de criação é predominante na região Sul do Brasil (SOUZA et al., 2013).

Apesar dos excelentes resultados em produtividade é importante destacar que o sistema de confinamento apresenta alguns inconvenientes, especialmente relacionados ao comportamento, ao bem-estar animal, à poluição ambiental e à disseminação de patógenos (D'SILVA, 2000). Especificamente em relação a patógenos, o uso de bebedouros e comedouros coletivos, a elevada densidade de fezes nas baias, a alta taxa de lotação e o contato direto entre os animais exercem uma grande influência sobre a disseminação desses agentes (LAUKKANEN et al., 2008; LAUKKANEN et al., 2009).

Compreende-se que na criação intensiva ocorra uma predisposição natural dos suínos em carrear patógenos, que conseqüentemente podem ser disseminados no ambiente de abate e processamento de carne suína, comprometendo a inocuidade do produto final (KAFFERSTEIN, 2003; LAUKKANEN et al., 2008). A preocupação com o controle de tais contaminações é fundamental, devido ao alto consumo mundial de carne suína e ao seu potencial como produto a ser explorado no mercado internacional (BAER et al., 2013).

Estratégias de garantia de qualidade e inocuidade de alimentos já foram desenvolvidos com base em problemas alimentares enfrentados por diversos países, como o modelo desenvolvido pela União Europeia, conhecido pela expressão *from farm to fork* (em tradução direta: da fazenda ao garfo). Com base nessa estratégia, para que ocorra a produção de alimentos inócuos, todas as etapas da cadeia produtiva dos alimentos devem ser monitoradas através das diversas ferramentas atualmente disponíveis. Esse modelo destina-se a garantir que os alimentos sejam rastreáveis à medida que se deslocam da fazenda à mesa do consumidor (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

Sendo assim, é na produção primária que devem ser tomadas as primeiras medidas para minimizar a contaminação pelos possíveis patógenos presentes na cadeia produtiva, formando-se a primeira linha de defesa para prevenir e controlar os perigos de origem biológica, garantindo a produção de matérias-primas de melhor qualidade higienicossanitária (KAFFERSTEIN, 2003; LAUKKANEN et al., 2009).

Entre os patógenos associados à cadeia produtiva de carne suína, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia enterocolitica* são os que mais se destacam (FOSSE et al., 2008). Os suínos podem atuar como reservatórios de alguns desses patógenos, como *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*, ou seja, são capazes de carregá-los sem manifestar sinais clínicos de doença (KICH et al., 2005; LAUKANNEN-NINIOS et al., 2014). Assim, os suínos, atuando como reservatórios, ao serem conduzidos para o abate podem disseminá-los nos ambientes de espera, abate e processamento de carcaças. Uma vez atingida a linha de abate, esses patógenos podem acabar contaminando outras carcaças e os produtos finais sem que a inspeção ante ou pós-morte possa detectar qualquer alteração (LAUKANNEN-NINIOS et al., 2014).

Nos abatedouros e indústrias de produtos de origem animal, diversos programas de monitoramento e controle são adotados para prevenir a contaminação dos produtos finais. Esses programas são regulamentados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), são aplicados pela própria empresa e são fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) e abrangem, principalmente, as Boas Práticas de Fabricação (BPF), os Programas de Autocontrole, os Procedimentos Padronizados de Higiene Operacional (PPHO) e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1997; BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1998; BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017).

Essas ferramentas estabelecem condições e procedimentos higienicossanitários e operacionais sistematizados, que são aplicados ao fluxo de produção. Bem como o controle dos processos produtivos e o monitoramento da conformidade das matérias-primas, ingredientes, insumos e produtos. Além disso, permitem a identificação, avaliação e o controle dos perigos (físicos, químicos e biológicos) significativos para a inocuidade dos alimentos que estão sendo produzidos. Assim, quando implantadas adequadamente e em conjunto, essas ferramentas contribuem para garantir a inocuidade, a identidade, a qualidade e a integridade dos produtos de origem animal (BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017).

Ainda, uma legislação mais específica ao abate e processamento de suínos, a Portaria n°. 711 de 01 de novembro de 1995, também estabelece

exigências relacionadas as instalações, equipamentos e higiene das operações, que devem ser adotadas desde a recepção dos suínos até a etapa de expedição dos produtos finais. Com o objetivo, em comum com as demais, de padronizar técnicas de abate, processamento e higiênicossanitárias, reduzindo a presença dos perigos que podem ser veiculados pela carne suína (BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1995).

No varejo os alimentos destinados ao consumo humano também passam por fiscalização, sob responsabilidade dos órgãos regulamentares da Saúde, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017). Nesses locais a fiscalização avalia os aspectos higiênico-sanitários de armazenamento, conservação e a condição microbiológica dos produtos através de amostragens, tendo como suporte legal a Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, que determina padrões microbiológicos para os alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL. Ministério da Saúde, 2001).

Tendo em vista tais aspectos, uma série de medidas são adotadas ao longo de toda a cadeia produtiva com o objetivo de prevenir a contaminação dos alimentos e preservar a saúde dos consumidores. Dessa forma, a identificação mais precisa das etapas da cadeia produtiva que exercem maior influência sobre a contaminação por *Y. enterocolitica*, pode auxiliar no desenvolvimento de medidas de controle e prevenção específicas para esse patógeno, sendo eficaz para reduzir o risco à saúde pública (LAUKANNEN-NINIOS et al., 2014; VAN DAME et al., 2017).

2.2 *Y. enterocolitica* EM ANIMAIS E ALIMENTOS

Os suínos são considerados os principais reservatórios de *Y. enterocolitica* e, nessa condição, não manifestam sinais clínicos de infecção (LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014). Outros reservatórios incluem uma variedade de animais selvagens (cervos e javalis), animais domésticos (ovinos, bovinos e aves), animais de estimação (cães e gatos) e peixes (BOTTONNE, 1997; WANG et al., 2010; STAMM et al., 2013; SHANMUGAPRIYA et al., 2014; VON ALTROCK et al., 2015; O'GRADY et al., 2016; JOUTSEN et al., 2016; PLATT-SAMORAJ et al., 2017).

A presença de cepas pertencentes a bio-sorotipos patogênicos de *Y. enterocolitica* é verificada principalmente nos suínos em fase de terminação, o que os torna potenciais fontes de contaminação para carcaças e ambiente de abate (POLJAK et al., 2010). Essas cepas são frequentemente isoladas da cavidade oral, tonsilas palatinas, linfonodos submandibulares, intestinos e de fezes (LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014; VAN DAMME, et al., 2015). Mas também já foram identificadas nas superfícies de equipamentos em abatedouros e em utensílios utilizados no abate (LAUKKANEN et al., 2009; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014).

Y. enterocolitica já foi identificada em uma variedade de alimentos, incluindo leite e produtos lácteos, carne crua (bovina, suína e cordeiro), aves, ovos, vegetais, sucos, brotos de feijão, tofu, frutos do mar e cogumelos cozidos (GUPTA et al., 2015). Entretanto, a carne suína atualmente é o alimento que está mais relacionado com infecção por *Y. enterocolitica* em humanos (FOSSE et al., 2008; BANCERZ-KISEL; SZWEDA, 2015; EFSA, 2017).

Os produtos suínos têm sido extensivamente estudados e são identificadas altas taxas de detecção de *Y. enterocolitica* patogênica em miúdos de suínos (67% a 83% das amostras positivas) e carne suína crua e moída (10% a 47%) (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003). Em geral, línguas e bochechas normalmente têm prevalências mais altas do que as carnes oriundas das demais partes da carcaça suína (LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014). Fredriksson-Ahomaa et al. (2012) demonstraram que a carne da bochecha de suínos é a mais contaminada com *Y. enterocolitica* 4 / O:3. *Y. enterocolitica* já foi identificada também em diversos cortes e produtos derivados de carne suína, como lombo, filé, costela e presunto coletados do varejo (LAMBERTZ; DANIELSSON-TAM, 2005).

Em pesquisa conduzida na Alemanha, *Y. enterocolitica* O:3 foi isolada em 1% da carne bovina, 8% de bochechas suínas e 26% de línguas suínas adquiridas no varejo (MESSELHÄUSSER et al., 2011). Já na Finlândia o patógeno foi identificado em 0,6% dos cortes suínos destinados a carne moída e em 23% das carnes de bochechas (LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014). Também já foi demonstrado que *Y. enterocolitica* pode sobreviver e se multiplicar bem na carne de porco crua embalada em atmosfera modificada e mantida em temperatura de refrigeração, mesmo na presença de elevado número de actérias

ácido lácticas, que em tese poderiam atuar inibindo o desenvolvimento do patógeno (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2012).

Na União Europeia acredita-se que 70,0% dos casos de yersiniose estejam relacionados ao consumo da carne suína contaminada (FOSSE et al., 2008). A presença de *Y. enterocolítica* em tonsilas palatinas está fortemente relacionada à contaminação da carcaça de suínos, principalmente na região da cabeça e esterno, devido à divisão entre cabeça e carcaça nas etapas de abate e à incisão de linfonodos craniais e da língua (VAN DAME et al., 2015; VILAR et al., 2015; VAN DAME et al., 2017). As fezes também são apontadas como um importante fator na transmissão de cepas patogênicas de *Y. enterocolítica* para carcaças, devido a manipulação inadequada durante o abate e ruptura de alças intestinais (LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014; VAN DAME et al., 2017).

A transmissão de *Y. enterocolítica* patogênica do ambiente de abatedouro e de utensílios utilizados no abate para as carcaças de suínos também já foi demonstrada, bem como o potencial desse patógeno em formar biofilmes (LAUKKANEN et al., 2009; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014; WANG, et al., 2017). Dessa forma, pode se considerar que a presença de *Y. enterocolítica* em amostras de alimentos, principalmente a carne suína e seus derivados, está sob influência direta das condições higiênicas e de manipulação no processo de abate dos suínos, principalmente nas atividades de evisceração, inspeção e retirada das tonsilas (BONARDI et al., 2013). Cabe destaque também à característica psicrotrófica desse patógeno, que favorece o seu desenvolvimento em alimentos crus e cozidos em condições de refrigeração (DRUMMOND et al., 2012; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2012).

2.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Yersinia enterocolítica*

Y. enterocolítica pode ser considerada um patógeno emergente tendo em vista o aumento no número de casos de yersiniose identificados em diversos países nos últimos anos (RUSAK, 2013; WILDEMANN et al., 2017). Em 2016, a yersiniose foi a terceira zoonose de origem alimentar mais comum na União Europeia e a espécie *Y. enterocolítica* foi a mais relatada (99,1% dos casos confirmados), seguida de *Y. pseudotuberculosis* (0,9% dos casos confirmados) (EFSA, 2017). Nos Estados Unidos é estimado que anualmente ocorram

proximadamente 117 mil casos de yersinose, 640 hospitalizações e 35 óbitos causados por *Y. enterocolitica* (CDC, 2018).

Nos estados membros da União Europeia a prevalência de *Y. enterocolitica* em suínos é elevada, principalmente nos países da região sul (MARTINEZ et al., 2011). Estudos conduzidos nesses países, com amostras coletadas de tonsilas de suínos, mostram prevalências de 93,0% na Espanha, 89,0% na Estônia, 64,0% em Latvia, 44,0% na Inglaterra, 32,0% na Itália, 13,7% na França, 52,0% na Finlândia, 37,0% e 44,0% na Bélgica e 58,0 e 70,0% no sul da Alemanha (tonsilas e fezes) (BUCHER et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009; VAN DAMME et al., 2010; MARTINEZ, et al., 2010; MARTINEZ et al., 2011; FONDREVEZ, et al., 2014). Ainda, a prevalência de *Y. enterocolitica* em tonsilas de suínos na Rússia é de 34,0%, na Suíça é de 88,0% e na China é de 22,0% (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; MARTINEZ et al., 2009; LIANG et al., 2012). Nos Estados Unidos foi demonstrada prevalência de 6,4% e 13,0% em fezes de suínos e de 10% em tonsilas palatinas (BHADURI et al., 2005; WESLEY et al., 2008).

No Brasil, estudos recentes realizados em diferentes estados têm mostrado baixa ocorrência de *Y. enterocolitica*. Saba et al. (2013) observaram uma frequência de isolamento de 8,0% em amostras de tonsilas, línguas, linfonodos submandibulares e mesentéricos e de facas, coletadas em um abatedouro de suínos do estado de São Paulo. Wildemann et al. (2017) relataram baixa ocorrência de *Y. enterocolitica* em amostras de tonsila de suínos na região Oeste de Santa Catarina, uma vez que observaram apenas 0,2% de positividade para *Y. enterocolitica* patogênica nessas amostras. Bem como Bortoli et al. (2017), que ao pesquisarem *Y. enterocolitica* em suínos abatidos no meio Oeste do estado de Santa Catarina obtiveram uma frequência de isolamento do patógeno de 5,9% considerando todos os pontos de coleta (tonsilas, linfonodos submandibulares, linfonodos mesentéricos, linfonodos inguinais e amostra de carne da cabeça) e de 13,0% considerando somente as amostras de tonsilas. Martins et al. (2018) observaram ocorrência de 0,9% de *Y. enterocolitica* patogênica em amostras coletadas de diversos pontos na cadeia produtiva de suínos da região de Viçosa-MG e de 5,0% nas amostras de tonsilas.

As tonsilas palatinas são identificadas como o local de maior isolamento de *Y. enterocolitica* (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; LAUKKANEN-

NINIOS et al., 2014; FONDREVEZ et al., 2014; VAN DAMME, et al., 2015). Porém, fezes, linfonodos mesentéricos e submaxilares também são apontados como importantes fontes de isolamento do patógeno (NESBAKKEN et al., 2003; BHADURI et al., 2005; GÜRTLER et al., 2005; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; LAUKKANEN et al., 2010).

A presença de *Y. enterocolitica* nos tecidos linfáticos e intestinos é a principal fonte de contaminação para as carcaças e produtos finais (LAUKKANEN et al., 2010; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014). Diversos estudos demonstram a alta prevalência de *Y. enterocolitica* patogênica em órgãos como pulmões, corações, línguas, fígados e diafragmas (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001; VON ALTROCK et al., 2010). Além da alta prevalência demonstrada em músculos mastigatórios, carcaças e carne de suínos (LAUKKANEN et al., 2010; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014). Esse cenário se deve principalmente à contaminação cruzada durante as atividades de abate, como a evisceração, por exemplo, quando realizada de maneira inadequada, ou durante a inspeção sanitária, já que essa atividade exige a incisão de linfonodos de cabeça e carcaça (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001; VON ALTROCK et al., 2010; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014; DRUMMOND et al., 2012; BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 1995).

O sorotipo de *Y. enterocolitica* mais prevalente em humanos na Europa, Estados Unidos, China e Brasil é o O:3, seguido de O:9 e O:8 (2006; WESLEY, 2008; WANG et al., 2008; LIANG et al., 2010; GARZETI, et al., 2014; BOTTONE, 2015; EFSA, 2017). Já a distribuição dos biotipos de *Y. enterocolitica* parece ser variável em diferentes regiões do mundo. Na Europa, por exemplo, o biotipo mais comum é o 4, seguido do biotipo 2 e 3 (EFSA, 2017). No Brasil, o Biotipo 4 é o mais associado a doença em humanos (FALCÃO et al., 2006). Entre os bio-sorotipos patogênicos, o 4/O:3 é, em geral, o mais prevalente em isolados de animais e humanos em todo o mundo (EFSA, 2017).

Diversos estudos sugerem que variações sazonais contribuem para o isolamento de *Y. enterocolitica*, de forma que esta seja mais prevalente em regiões frias ou períodos de inverno do que no verão ou em regiões quentes (LIANG et al., 2010; MARTINEZ et al., 2010; ONG et al., 2012; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014). Entretanto, Frondrevéz et al. (2014) observaram resultados divergentes na França, onde a prevalência de *Y. enterocolitica* em suínos foi

maior no verão (15,3%) em comparação com o inverno (5,9%), demonstrando que essa relação ainda não está bem estabelecida e que são necessários mais estudos epidemiológicos avaliando a prevalência de *Y. enterocolitica* de acordo com as variações sazonais para que essa relação seja realmente comprovada.

Além disso, alguns estudos sugerem que a carga microbiana competidora possa exercer papel inibidor para *Y. enterocolitica*. Uma vez que foram verificadas prevalências sorológicas de *Y. enterocolitica* menores em rebanhos com alta prevalência sorológica de *Salmonella* spp.. A relação inversamente proporcional ao status sorológico de *Salmonella* spp. nos rebanhos suínos, indica que granjas de baixo risco para *Salmonella* spp. possam apresentar maior prevalência de *Y. enterocolitica* (VON ALTROCK et al., 2011; NATHUES, et al., 2013).

No Brasil, não existem dados oficiais de yersiniose em humanos e ainda são poucos os estudos epidemiológicos relacionados a *Y. enterocolitica* tanto na cadeia produtiva de suínos quanto na saúde humana (RUSAK, 2013). Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de mais estudos epidemiológicos consistentes e representativos acerca de *Y. enterocolitica* no Brasil. Essas informações são fundamentais, pois podem contribuir para a adoção de medidas específicas de prevenção e controle, quando necessárias (RAHMAN et al., 2011; PAIXÃO et al., 2013; RUSAK et al., 2014).

2.4 *Yersinia enterocolitica*

2.4.1 Histórico e Características da espécie

A primeira infecção causada por *Y. enterocolitica* foi relatada em 1934, nos Estados Unidos, por McIver e Pike, que descreveram um isolado de abscesso facial, denominado na época de *Flavobacterium pseudomallei*. Em 1939, Schleifstein e Coleman, passaram a estudar esse isolado, juntamente com dois isolados de *Actinobacillus lignieri* e dois de *Pasteurella pseudotuberculosis*, ambos com origem de intestinos de seres humanos com sintomas de enterite. Por possuírem características semelhantes, esse grupo de bactérias passou a ser denominado *Bacterium enterocolitica* (BOTTONNE, 1997; HALLANVUO, 2009).

Em 1944 VanLoghem propôs a criação do gênero *Yersinia*, o nome foi dado em homenagem ao bacteriologista francês Alexander Jean Yersin que, em 1894, isolou pela primeira vez o agente causador da peste bubônica, denominado *Yersinia pestis* (BOTTONNE, 1997; FALCÃO et al., 2006; DRUMMOND et al., 2012). Em 1964, Frederiksen renomeou o *Bacterium enterocolitica* como *Yersinia enterocolitica* (BOTTONNE, 1997).

Em 1972, o gênero *Yersinia* foi incluído à família Enterobacteriaceae pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana e dele faziam parte as espécies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* (FALCÃO et al., 2006). Atualmente o gênero é composto de 17 espécies: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. aleksiciae*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. ruckery*, *Y. massiliensis*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenni*, *Y. entomophaga* e *Y. similis* (DRUMMOND et al., 2012).

As espécies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são consideradas patogênicas aos humanos e aos roedores. *Y. pestis* é causadora da peste bubônica, *Y. pseudotuberculosis* da adenite mesentérica e seps e a *Y. enterocolitica*, que é mais comum em humanos, é causadora de gastroenterite (FALCÃO et al., 2006). *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* e *Y. frederiksenii* são patógenos oportunistas em humanos (JOURDAN et al., 2002). As demais espécies do gênero *Yersinia* são consideradas ambientais e não causadoras de doença em humanos, mas também podem atuar como agentes patogênicos oportunistas (FÀBREGA; VILA, 2012).

Y. enterocolitica é um bacilo gram-negativo, com flagelos peritríquios que conferem motilidade a 25°C, mas não a 37 °C (BOTTONNE, 2015). Mede cerca de 0,5 x 0,8 µm de largura por 1 x 3 µm de comprimento, sendo menor do que as demais espécies pertencentes a família Enterobacteriaceae. É um micro-organismo anaeróbio facultativo e psicrotrófico, pois possui a capacidade de se multiplicar em temperaturas variando de 0 a 44°C, porém a temperatura ótima de multiplicação *in vitro* está entre 25 e 28°C. Resiste bem ao congelamento, podendo sobreviver em alimentos e líquidos congelados por períodos prolongados, mas é sensível ao calor sendo destruída pela pasteurização (BARI et al., 2011).

Y. enterocolitica apresenta características bioquímicas bastante heterogêneas e por isso pode ser dividida em seis biotipos (1A, 1B, 2, 3, 4, e 5), que possuem significado clínico e epidemiológico variável (FALCÃO et al., 2006; FÀBREGA; VILA, 2012). A maioria das cepas virulentas que causam infecções em humanos pertence aos biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5, enquanto as pertencentes ao biotipo 1A são consideradas espécies ambientais e podem não ter os mesmos fatores de virulência presentes em cepas invasivas, dessa forma não são comumente relacionadas com doença em humanos, exceto em grupos de risco como crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas (BOTTONNE, 2015).

O esquema antigênico de *Y. enterocolitica* inclui 76 sorogrupos somáticos e 44 antígenos flagelares. No entanto, na sorotipificação utiliza-se rotineiramente somente a caracterização dos antígenos somáticos (FALCÃO et al., 2006). Os principais sorotipos patogênicos descritos são O:1, 2, 3; O:2,3; O:3; O:8; O:9; O:4,32; O:5,27; O:13A,13b; O:18; O:20; e O:21 (DRUMMOND et al., 2012). Os sorotipos mais relacionados com doenças nos humanos são O:3, O:5,27, O:8 e O:9 (FALCÃO et al., 2006).

Ainda, baseado na hibridização do DNA-DNA e sequenciamento do gene *16s rRNA*, Neubauer et al. (2000) propuseram a divisão da espécie *Y. enterocolitica* em duas subespécies: *Y. enterocolitica* subespécie *paleártica* e *Y. enterocolitica* subespécie *enterocolitica*. A subespécie *paleártica* inclui linhagens de origem europeia pertencentes aos bio-sorotipo 4/O:3, 2/O:9, 3/O:5,27, 1A/O:7,8, 1A/O:6,30 e 1A/O:5 e a *enterocolitica*, inclui linhagens de origem americana pertencentes aos bio-sorotipo 1B/O:8, 1B/O:13, 1B/O:18, 1B/O:20, 1B/O:21 e 1A/O:7,8 (SACHEDEVA; VIRDI, 2004).

2.4.2 Fatores de Virulência

A patogenicidade de *Y. enterocolitica* está associada a produção de fatores de virulência (BOTTONNE, 2015). Os fatores de virulência produzidos por cepas pertencentes a bio-sorotipos patogênicos (1B e 2 a 5) são determinados pela presença de genes cromossômicos e de um plasmídeo de virulência de 70 Kb, altamente conservado, denominado pYV. Nas linhagens de *Y. enterocolitica* do biotipo 1A o plasmídeo pYV não está presente (REVELL; MILLER, 2001; SABINA, 2011).

O plasmídeo pYV é responsável por codificar o sistema de secreção do tipo III, translocando proteínas conhecidas como Ysc e Yops (*Yersinia outer proteins*) da célula bacteriana para o citoplasma de células hospedeiras (SABINA, 2011; ZADERNOWSKA et al., 2014). O sistema de secreção do tipo III está presente em todas as bactérias Gram-negativas patogênicas e atua contrariando as múltiplas respostas de sinalização ao sistema imune na célula hospedeira infectada (HALLANVUO, 2009). Yops (*Yersinia outer proteins*) são proteínas externas que paralisam o sistema imunológico e impedem a fagocitose pelos macrófagos (ZADERNOWSKA et al., 2014). Ainda, a transcrição de diversos genes pYV é dependente de um importante ativador de transcrição denominado *virF* (HALLANVUO, 2009).

O pYV também é responsável pela produção de adesina YadA (*Yersinia adhesina A*), uma proteína da membrana externa que permite a adesão às células hospedeiras (HALLANVUO, 2009; ZADERNOWSKA et al., 2014). YadA contribui para a adesão e invasão, ligando-se a moléculas da matriz extracelular como colágeno, laminina e fibronectina, servindo como um importante fator de colonização. Além disso, atua como um fator de resistência a resposta imune do hospedeiro, protegendo as bactérias contra a morte mediada pelo sistema complemento (EL TAHIR; SKURNIK, 2001).

Além da presença do plasmídeo de virulência, as cepas portadoras de pYV necessitam de uma série de genes codificados no cromossomo para poder expressar sua virulência total (REVELL; MILLER, 2001; SABINA, 2011). Alguns desses genes de virulência estão restritos a bactérias portadoras de pYV, enquanto outros ocorrem tanto em cepas portadoras quanto nas não portadoras do plasmídeo (SABINA, 2011).

Os genes de virulência codificados no cromossomo incluem o *ail* (*attachment invasion locus*), gene que codifica uma proteína de membrana externa que contribui para adesão, invasão e resistência à lise mediada pelo complemento, esse gene é encontrado apenas em cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* (FALCÃO et al., 2006; BOTTONE, 2015). O gene *yst*, codifica uma enterotoxina estável de *Yersinia*, essa enterotoxina tem estrutura e função semelhantes à enterotoxina de *Escherichia coli* enterotoxigênica. Ambas as toxinas ativam a forma particulada da guanilato ciclase, aumentando os níveis de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) no intestino, que exerce um papel

importante na regulação da homeostase intestinal de eletrólitos e líquidos. Por essa atividade pressupõe-se que *yst* contribua para a patogênese da diarreia aguda (REVELL; MILLER et al., 2001; FALCÃO et al., 2006). O gene *ystA* tem sido identificado apenas em cepas patogênicas de *Y. enterocolitica*, enquanto o *ystB* apenas em cepas do biótipo 1A, consideradas como não patogênicas (FALCÃO et al., 2006; PERUZY et al., 2017).

O gene *inv* (invasion) é altamente conservado e está presente no cromossomo de todas as cepas de *Y. enterocolitica*, mas é expresso apenas em bio-sorotipos patogênicos (DRUMMOND et al., 2012). Esse gene é responsável por codificar a invasina, uma proteína de membrana externa que é necessária para a translocação eficiente de bactérias através do epitélio intestinal. A invasina é uma molécula de adesão e invasão que atua durante a primeira fase da infecção e é responsável pela colonização e internalização nas células hospedeiras (SABINA, 2011; BOTTONE, 2015).

Outro gene cromossômico importante é o *ymoA* que codifica a proteína YmoA (*Yersinia-modulating protein*), essa proteína regula negativamente a expressão de vários genes, inibindo particularmente a expressão de *inv* e *ystA* (FÀBREGA; VILA, 2012). O gene *hreP* é específico da espécie *Y. enterocolitica*, ele codifica uma protease bacteriana de tipo subtilisina/Kexina que exerce influência sobre proteínas das células do hospedeiro, inclusive as do sistema imune, e por isso é necessária para a virulência total de *Y. enterocolitica* (HEUSIPP et al., 2001).

Um dos principais fatores de virulência de *Y. enterocolitica* é a capacidade de adesão devido a presença de fímbrias. As fímbrias são codificadas pelo gene *myf*, elas são sintetizadas na superfície bacteriana e recebem o nome de *mucoide Yersinia fibrillae* (Myf). As fímbrias conferem aspecto mucoide a célula bacteriana e são expressas somente a 25°C (FALCÃO et al., 2006).

Os genes *fepA*, *fepD* e *fes* estão relacionados a capacidade de *Y. enterocolitica* em captar o ferro, fator essencial para a multiplicação da maioria das bactérias. O ferro pode ser captado por *Y. enterocolitica* através de dois mecanismos distintos: através de moléculas quelantes de ferro, denominadas sideróforos, ou utilizando as moléculas de ferro ligadas à proteína heme. Os genes *fepA* e *fepD* codificam as proteínas responsáveis pelo transporte de

sideróforos, enquanto o gene *fes* codifica as proteínas que levam à liberação de ferro dos sideróforos no citoplasma (SCHUBERT et al., 1999).

Yersinióforo ou yersiniabactina é um sideróforo endógeno, sintetizado somente por *Y. enterocolitica* de alta virulência (1B/O:8) e codificado no *locus* do cromossomo denominado ilha de alta patogenicidade-HPI (SCHUBERT et al., 1999; CARNIEL, 2001). Cepas que possuem a ilha de alta patogenicidade (HPI) possuem maior facilidade de utilizar o ferro do que outras bactérias e podem ter sua sobrevivência e multiplicação favorecidas em condições de limitação de ferro nos tecidos do hospedeiro (CARNIEL, 2001).

O gene *tccC* é homólogo ao gene *insecticidal toxin complex (tc)* e está relacionado com a capacidade de sobrevivência de bactérias em insetos, porém não é documentada nenhuma relação entre *Y. enterocolitica* e insetos. Esse gene está associado predominantemente com isolados clínicos do biotipo 1A. Tennant et al., (2005) observaram que a capacidade de cepas de *Y. enterocolitica* biotipo 1A colonizarem o intestino de ratos reduziu após a deleção do gene *tccC*. Dessa forma, acredita-se que ele codifique alguma proteína que contribui para a atividade enterotóxica dessas cepas, mas o seu envolvimento com a patogenicidade de *Y. enterocolitica* ainda não está bem elucidado (TENNANT et al., 2005).

Ainda, o lipopolissacarídeo (LPS) é um componente importante de bactérias Gram-negativas, compõe a parte mais externa da parede celular e tem a função de proteger as células dos fatores ambientais. É constituído basicamente pelo lipídio A, que é responsável pelo efeito endotóxico do LPS, e pela cadeia polissacarídica externa, que constitui a região antigênica “O”, sendo esta a parte imunologicamente dominante da célula (HALLANVUO, 2009; FÀBREGA; VILA, 2012).

O antígeno O é um fator de virulência essencial de *Y. enterocolitica* que esta envolvido na colonização e invasão das células entéricas e, entre outras funções, desempenha um papel importante na resistência ao soro (ZHANG et al., 1997; FÀBREGA; VILA, 2012). Esse componente de membrana pode também estimular a virulência devido a sua capacidade de aumentar a hidrofobicidade, facilitando a passagem da bactéria através do muco que reveste o epitélio intestinal. Ainda, devido as cadeias somáticas alongadas (O) o LPS

pode ocultar proteínas associadas a virulência como Ail e YadA (FALCÃO et al., 2006).

2.4.3 Patogênese e manifestações clínicas em humanos

A infecção causada por *Y. enterocolitica* em seres humanos é adquirida geralmente por via fecal-oral, através da ingestão de água ou alimentos contaminados (HALLANVUO, 2009; FÀBREGA; VILA, 2012). A patogênese de *Y. enterocolitica* ainda não está bem elucidada, porém a maioria dos isolados clínicos apresenta duas propriedades patogênicas: a capacidade de penetrar no intestino, que é controlada por genes de virulência pYV e por isso está ausente em cepas não virulentas e a produção de enterotoxina estável ao calor, que é controlada pelo gene cromossômico *yst* (SABINA, 2011).

Logo após a entrada no organismo humano as células de *Yersinia* patogênicas têm que se adaptar as mudanças nas condições ambientais e se preparar para a resposta imune do hospedeiro (HALLANVUO, 2009). A temperatura desempenha um papel importante na patogênese da infecção por *Y. enterocolitica*, uma vez que a proteína expressa pelo gene *inv* é produzida em temperaturas menores do que 28°C ou em condições ácidas a 37°C, enquanto as expressas pelo gene *ail* são produzidas somente a temperatura de 37°C (BOTTONNE, 2015). A motilidade da bactéria é codificada por um gene localizado no plasmídeo, que é ativado entre temperaturas de 28°C e 37°C. Em temperaturas acima de 37°C a bactéria perde a motilidade. A produção de Myf, da mesma forma que Yops, YadA, e Ail, ocorre somente a 37 °C (FALCÃO et al., 2006).

Dessa forma, o aumento gradual da temperatura dentro do hospedeiro induz a expressão dos fatores de virulência necessários para estabelecer um foco de infecção (HALLANVUO, 2009; BOTTONNE, 2015). Devido a essas características, uma das etapas iniciais e fundamental na patogênese de *Y. enterocolitica* é a adaptação da bactéria à temperatura do organismo hospedeiro (HALLANVUO, 2009).

No estômago, as bactérias encontram o primeiro mecanismo de defesa importante do hospedeiro, o ácido gástrico (pH 1-2). Com a ajuda da urease as bactérias ureolíticas metabolizam as moléculas de ureia em CO₂ e amônia, a

liberação de amoníaco eleva o pH citoplasmático nas células bacterianas permitindo que a bactéria resista ao pH ácido. *Y. enterocolitica* possui uma urease bifuncional, que possui alta atividade em pH baixo, protegendo a células do efeito letal da acidificação citoplasmática e atividade reduzida em condições neutras, suficiente para manter uma via de utilização ureia como fonte de nitrogênio (YOUNG et al., 1996).

Após vencidos os primeiros mecanismos de defesa do hospedeiro a bactéria atinge o intestino. As próximas etapas da patogênese envolvem a aderência bacteriana e a translocação através da barreira epitelial intestinal. Grande parte das células de *Y. enterocolitica* ficam livres no lúmen intestinal e uma pequena porcentagem se adere à mucosa em diferentes tipos celulares do epitélio, entretanto a internalização da bactéria ocorre somente nas células M, que recobrem os folículos linfóides (placas de Peyer) na porção distal do intestino delgado (íleo terminal e cólon proximal) (FALCÃO et al., 2006; FÀBREGA; VILA, 2012; BOTTONE, 2015). Esse processo é desencadeado pela proteína invasina, que se liga a proteínas integrinas $\beta 1$ da superfície das células do hospedeiro, o que permite a internalização da bactéria num processo conhecido como "zíper" (ISBERG; BARNES, 2001).

As principais proteínas de *Y. enterocolitica* são expressas após a invasão às placas de Peyer, nesta etapa YadA, Ail e Yops medeiam a resistência contra o sistema imune do hospedeiro, a fagocitose e a apoptose dos macrófagos (MONACK, 1997; SABINA, 2011). As bactérias atravessam a membrana basal e a lâmina própria e se replicam no espaço extracelular. Esse processo é acompanhado pela atração de fagócitos que levam à formação de agregados monoclonais de bactérias em microabscessos, causando a destruição das placas de Peyer (BOTTONE, 2015). Os microabscessos ocorrem principalmente dentro das criptas intestinais podendo atingir as vilosidades que ficam bastante reduzidas, principalmente no íleo, onde são mais altas (FALCÃO et al., 2006).

Acredita-se que *Y. enterocolitica* seja transportada por fagócitos migrantes para os linfonodos mesentéricos, resultando em uma linfadenite mesentérica (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006; FÀBREGA; VILA, 2012). Os abscessos formados nos linfonodos mesentéricos permitem que *Y. enterocolitica* se dissemine através dos nodos linfáticos atingindo regiões mais

distantes (AUTENRIETH et al., 1996). Dentro dos abscessos, as bactérias resistem à fagocitose pelos neutrófilos e induzem a apoptose dos macrófagos (BOTTONNE, 2015).

Além disso, os fagócitos portadores da bactéria podem disseminá-la, via corrente sanguínea, para o fígado e o baço (FÀBREGA; VILA, 2012). Para a disseminação sistêmica, a presença de ferro nos tecidos do hospedeiro e a capacidade da cepa de *Y. enterocolitica* produzir sideróforos são fundamentais. A produção de sideróforos é uma atividade exclusiva de cepas altamente patogênicas, requerendo, nesses casos, o funcionamento da ilha de alta patogenicidade (HPI) (HALLANVUO, 2009).

Modelos experimentais em ratos mostram que *Y. enterocolitica* é capaz de atingir os linfonodos mesentéricos dentro de 24 horas após a inoculação oral e o fígado e baço em 48 a 72h (PEPE et al., 1995; MECSAS et al., 2001). Entretanto, em seres humanos saudáveis a infecção é geralmente autolimitada e restrita ao trato gastrointestinal e aos linfonodos regionais. Em ocasiões mais raras a bactéria pode se disseminar para outros tecidos causando sintomas mais graves (HALLANVUO, 2009).

A dose infectante para o homem não é perfeitamente conhecida, mas considera-se que deva estar acima de 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) (FALCÃO et al., 2006). As manifestações da gastroenterite podem variar de acordo com a idade e o sistema imune do hospedeiro e são relatadas principalmente em crianças menores de cinco anos de idade (DRUMMOND et al., 2012).

Os sinais clínicos, quando manifestados, iniciam-se após 24 a 48h da ingestão da bactéria e se restringem a diarreia aquosa a mucoide, auto-limitada, geralmente acompanhada de febre baixa, dores abdominais e em alguns casos náuseas e vômitos (HALLANVUO, 2009; FÀBREGA; VILA, 2012; DRUMMOND et al., 2012; BOTTONNE, 2015). Os sintomas podem se assemelhar a apendicite aguda (FÀBREGA; VILA, 2012).

Após a infecção gastrointestinal, alguns pacientes podem desenvolver eritema nodoso e artrite reativa pós-infecciosa, que desaparecem naturalmente em semanas ou meses (HALLANVUO, 2009; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014; BOTTONNE, 2015). A sepse é uma complicação rara da infecção por *Y. enterocolitica* e seu curso clínico pode incluir a formação de abscessos no fígado

e baço, faringite, pneumonia, meningite, celulite, empiema e osteomielite e pode evoluir para endocardite (FÁBREGA; VILA, 2012).

2.4.4 Susceptibilidade a antimicrobianos

Desde a sua descoberta por Alexander Fleming em 1928, os antimicrobianos têm sido um importante aliado no tratamento de doenças infecciosas. Contudo, o uso excessivo desses medicamentos, em paralelo com a habilidade inata das bactérias em evoluir, tem contribuído para a seleção de agentes patogênicos com elevado potencial de resistência aos antimicrobianos (AMR), representando atualmente um dos problemas de saúde pública mais complexos e urgentes no mundo (LAXMINARAYAN et al., 2016; MEHTA et al., 2017; VAN BOECKEL et al., 2017; SOMMER et al., 2017).

Estima-se que em 2050 a AMR represente um custo global de aproximadamente 100 trilhões de dólares e seja responsável por mais de 10 milhões de mortes, o que representa 1,8 milhões de óbitos a mais do que os causados por doenças como o câncer, por exemplo (O'NEILL, 2014; JASOVSKY et al., 2016; WHO, 2017). O uso indiscriminado dos antimicrobianos na produção animal, para promoção do crescimento e profilaxia em massa, é considerado a principal causa para o desenvolvimento crescente de AMR (VAN BOECKEL et al., 2017).

Os antimicrobianos são utilizados em baixas doses quando o objetivo é a promoção do crescimento, o que favorece o desenvolvimento da resistência (VAN BOECKEL et al., 2017). A AMR pode se desenvolver de duas maneiras: através da evolução vertical, quando as mutações que melhoram a tolerância aos antibióticos são transmitidas para a progênie; ou através da evolução horizontal, quando os genes de AMR são adquiridos de outras bactérias através da transdução de fagos, da conjugação (transferência de plasmídeos) ou da transformação natural (BAYM, et al., 2016; SOMMER et al., 2017).

O consumo de antimicrobianos na cadeia produtiva de suínos apresenta a maior média por unidade da população corrigida em comparação aos demais sistemas de produção animal (VAN BOECKEL et al., 2015). Tendo em vista a forte ligação epidemiológica entre *Y. enterocolitica* e a cadeia produtiva de carne suína, o monitoramento acerca do desenvolvimento de AMR torna-se

fundamental para fins de controle de resistência antimicrobiana, medidas de segurança alimentar e para o tratamento de yersiniose em humanos (FRAZÃO et al., 2017).

Infecções intestinais causadas por *Y. enterocolitica* são normalmente autolimitadas e não necessitam de tratamento específico com antimicrobianos (FALCÃO et al., 2006). No entanto, infecções em grupos de risco (crianças, idosos e imunocomprometidos), infecções sistêmicas e bacteremia comumente requerem o tratamento com esses medicamentos (FÀBREGA; VILA, 2012; BOTTONE, 2015). Nesses casos o uso de antimicrobianos que atuem efetivamente contra *Y. enterocolitica* é imprescindível, por isso os procedimentos terapêuticos devem ser orientados por investigações de perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos (BAÚ et al., 2001).

Y. enterocolitica é sensível a aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporinas de espectro estendido e trimetoprim-sulfametoxazol e apresenta resistência intrínseca à ampicilina, ticarcilina, amoxicilina-clavulanato, cefazolina, cefalotina, cefamandole e cefoxitina (CLSI, 2017; FRAZÃO et al., 2017). Tendo em vista tais características, os antimicrobianos de eleição para o tratamento de yersiniose são: aminoglicosídeos, tetraciclina, cotrimoxazol e ciprofloxacina (SZYFRES, 2001). Também são indicados antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas para o tratamento da doença, contudo recentemente foi demonstrado o desenvolvimento de resistência de *Y. enterocolitica* a essa classe de antimicrobianos (FABREGA; VILA, 2012).

A resistência de *Y. enterocolitica* a antimicrobianos β -lactâmicos é específica de acordo com o sorotipo e determinada, em parte, pela produção de duas β -lactamases sintetizadas pelos genes cromossômicos *blaA* e *blaB* (FALCÃO et al., 2006). Essas β -lactamases, são designadas β -lactamase A e B, as do tipo A são produzidas principalmente pelos sorotipos O:3 e O:9 e são as responsáveis pela resistência à penicilina, ampicilina, cefalotina e carbenicilina e as do tipo B são responsáveis por induzir a resistência a cefalosporinas (FALCÃO et al., 2006; BOTTONE, 2015). Contudo, a atividade antibacteriana *in vitro* deve ser vista com cautela, uma vez que pode não refletir necessariamente a eficácia da atividade antimicrobiana *in vivo* (FRAZÃO et al., 2017).

Estudos recentes têm mostrado uma evolução crescente no perfil de resistência de *Y. enterocolitica* a antimicrobianos *in vitro*. Frazão et al. (2017) ao avaliarem o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 34 cepas de *Y. enterocolitica* isoladas no Brasil num período de 30 anos (1979 a 2012), observaram que apesar do padrão de resistência inerente a cefazolina, cefalotina, ampicilina, ticarcilina e amoxicilina-ácido clavulânico ter sido exibido por todas ou quase todas as cepas avaliadas, aproximadamente metade delas também apresentaram resistência adquirida. Esse tipo de resistência foi observado para piperacilina-tazobactam, cefuroxima, cefepima (uma cefalosporina de quarta geração), trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico e nitrofurantoína.

Estudos anteriores relataram 36,0% de resistência a nitrofurantoína ou até mesmo cepas 100% suscetíveis (FUNK et al., 2000; GOUSIA et al., 2010). *Y. enterocolitica* usualmente apresenta sensibilidade a trimetoprim-sulfametoxazol, entretanto trabalhos recentes têm apresentado de 4,0% a 10,0% de cepas resistentes e este antimicrobiano (FUNK et al. 2000; RUSAK et al. 2014; FRAZÃO et al., 2017). Assim como para o ácido nalidíxico, para o qual o percentual de cepas resistentes descrito em estudos recentes atinge cerca de 23,0% (CAPILLA et al., 2004; FABREGA et al., 2010; FRAZÃO et al., 2017).

Frazão, et al. (2017) em sua pesquisa observaram variações no padrão de resistência intrínseca de cepas de *Y. enterocolitica* de diferentes biotipos isoladas no Brasil. Entretanto, nenhum dos genes plasmidiais que codificassem resistência a cefalosporinas de espectro estendido, tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas que foram pesquisados foram identificados nessas cepas, sugerindo que a resistência a essas classes antimicrobianas tenha origem cromossômica. Além disso, algumas das cepas permaneceram suscetíveis as drogas que são comumente utilizadas no tratamento de gastroenterite, infecções extraintestinais e hospitalares.

2.5 DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE *Y. enterocolitica*

A detecção e o isolamento de *Y. enterocolitica* em alimentos são considerados grandes desafios devido principalmente ao seu crescimento lento,

à presença de *Yersinia* spp. não patogênica em grande parte das amostras (incluindo estirpes não-patogênicas de *Y. enterocolitica*), à baixa concentração de cepas patogênicas nos alimentos e à dominância de micro-organismos competidores nesses substratos (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003; BONARDI et al., 2013; GUPTA, 2015). Essas características comumente levam a resultados falso-negativos (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003). Tendo em vista tais desafios, novos métodos convencionais e moleculares e o aprimoramento dos métodos já utilizados têm sido propostos para facilitar a detecção de *Y. enterocolitica* em alimentos (PETSIOS, 2016).

O isolamento direto não é considerado eficiente devido à baixa concentração do micro-organismos e à microbiota acompanhante nas amostras de alimentos, dessa forma para aumentar o número de células de *Y. enterocolitica* patogênicas as amostras devem ser enriquecidas em meios líquidos antes do isolamento em meios sólidos seletivos (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003). Normalmente a etapa de enriquecimento é demorada e exige em torno de 2 a 5 dias no caso do enriquecimento seletivo, ou até 3 semanas de incubação no caso do enriquecimento a frio (4°C) (VAN DAME et al., 2010; ZADERNOWSKA et al., 2014; GUPTA et al., 2015). Considerando também as etapas posteriores ao enriquecimento, o isolamento por métodos microbiológicos convencionais pode demorar de 5 a 10 dias para fornecer resultados (GUPTA et al., 2015).

De acordo como o protocolo de isolamento de *Y. enterocolitica* em amostras de alimentos e amostras ambientais, descrito pelo *International Standard Organization* (ISO 10273:2003), que também pode ser aplicado a amostras de tonsilas, três etapas devem ser executadas (ISO, 2003; EFSA, 2007). A primeira envolve a multiplicação em meios líquidos seletivos como o caldo Peptona, Sorbitol e Bile (PSB) e o caldo Irgasan, Ticarcilina e Cloreto de potássio (ITC). A próxima etapa consiste no cultivo em meios sólidos diferenciais: ágar cefsulodina-irgasanovobiocina (CIN) e ágar desoxicolato de sódio e cloreto de cálcio (SSDC). Por fim, são realizados testes de confirmação bioquímica e sorológica (ISO, 2003; EFSA, 2007).

A incubação em caldos de enriquecimento permite o crescimento de outros micro-organismos pertencentes a microbiota acompanhante, inclusive psicrotróficos. Para reduzir o número desses contaminantes é utilizado um

tratamento com meios alcalinos, como o hidróxido de potássio (KOH), uma vez que *Y. enterocolitica* é capaz de tolerar condições alcalinas em contraste com outras bactérias Gram-negativas (GUPTA et al., 2015; PETSIOS et al., 2016).

O ágar CIN é considerado o melhor meio para o isolamento de *Y. enterocolitica* devido aos agentes antimicrobianos presentes em sua composição que inibem o crescimento das demais enterobactérias (PETSIOS et al., 2016). Neste meio *Y. enterocolitica* forma pequenas colônias características, com um centro vermelho escuro (devido à fermentação com manitol) cercado por uma zona translúcida, que são chamadas colônias "red bull's-eye" (ISO, 2003).

Os isolados suspeitos após o plaqueamento seletivo podem ser identificados a nível de espécie por uma variedade de testes bioquímicos como: urease, ágar Kligler ferro, catalase, oxidase, indol, Voges-Proskauer, citrato de Simmons, L-ornitina, capacidade de fermentar carboidratos como sacarose, celobiose, L-ramnose, melibiose, L-sorbose, sorbitol e rafinose, além de testes de motilidade (TABELA 1) (ISO, 2003; EFSA, 2007).

A temperatura de incubação interfere diretamente na interpretação dos resultados bioquímicos, por isso esses testes devem ser executados em temperaturas entre 25°C e 30°C (MURROS-KONTIAINEN et al., 2011a). Ainda, testes rápidos comerciais como o API20E são considerados boas alternativas, já que expressam os resultados de maneira mais rápida do que os testes convencionais em tubos (PETSIOS et al., 2016).

Y. enterocolitica apresenta características altamente variáveis sendo divisível em um grande número de subgrupos (biotipos e sorotipos). Os biotipos são determinados de acordo com a atividade bioquímica (TABELA 2) e os sorotipos de acordo com antígenos de lipopolissacarídeos (LPS). A sorotipificação é baseada na expressão de LPS da membrana celular e no caso de *Y. enterocolitica* rotineiramente utiliza-se somente a caracterização dos antígenos somáticos O (FALCÃO et al., 2006). Os sorotipos mais comuns associados a doenças em humanos e animais são O:3, O:5,27, O:8 e O:9, dessa forma os anti-soros comerciais que visam esses antígenos são os mais utilizados (PETSIOS et al, 2016). Contudo, esse método de sorotipificação requer mão de obra qualificada e laboratórios capacitados para sua execução, além disso a interpretação dos resultados é subjetiva e existe a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com outras enterobactérias (GARZETTI et al., 2014).

TABELA 1 - DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESPÉCIES DE *Yersinia*.

Reações bioquímicas ^a															
Espécie									Fermentação						
	Produção de Indol	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	Urease	Motilidade	L-Ornitina	Mucato	Hidrólise da esculina	Sacarose	D-Celobiose	L-Ramnose	D-Melibiose	L-Sorbose	D-Rafinose	D-Sorbitol
<i>Y. pestis</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	V	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	V	-
<i>Y. enterocolitica</i>	V	+	-	+	+	+	-	V	+	+	-	-	V	-	V
<i>Y. intermedia</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. frederiksenii</i>	+	V	V	+	+	+	-	V	+	+	+	-	+	-	+
<i>Y. kristensenii</i> ^b	V	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Y. aleksiciae</i> ^b	V	-	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	-	V	-	+
<i>Y. aldovae</i>	-	+	V	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Y. rohdei</i>	-	V	+	V	+	+	-	-	+	+	-	V	+	V	+
<i>Y. mollareti</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>Y. bercovieri</i>	-	-	-	+	+	+	-	V	+	+	-	-	-	-	+
<i>Y. ruckeri</i>	-	-	+	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. massiliensis</i>	+	-	V	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	V	+
<i>Y. nurmii</i>	-	+	ND	-	+	+	ND	-	+	(+)	-	-	-	-	-
<i>Y. pekkanenii</i>	-	-	ND	+	-	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Y. entomophaga</i>	-	ND	+	-	+	+	ND	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>Y. similis</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

^a incubação a 25°C por 48 horas, exceção são os carboidratos para os quais as leituras são feitas por até 7 dias, se permanecendo negativas; +, ≥ 90% de amostras positivas; -, ≥ 90% de amostras negativas; (+); fracamente positiva; V (variável), 11 a 98% de amostras positivas; ND, não realizado; ^b *Y. aleksiciae* pode ser separada fenotipicamente de *Y. kristensenii* apenas pela atividade de lisina descarboxilase, *Y. aleksiciae* é lisina descarboxilase positiva e *Y. kristensenii* é negativa.

FONTE: Adaptado de Hurst et al. (2011), Murros-Kontinen et al. (2011a), Murros-Kontinen et al. (2011b) e Souza et al. (2011).

TABELA 2 - PROVAS BIOQUÍMICAS PARA BIOTIPIFICAÇÃO DE *Yersinia enterocolitica*.

Prova bioquímica ^a	Biotipo					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase (hidrólise de tween)	+	+	-	-	-	-
Hidrólise da esculina	V	-	-	-	-	-
Produção de indol	+	+	(+)	-	-	-
Fermentação de D-Xilose	+	+	+	+	-	V
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	(+)
Fermentação de trealose	+	+	+	+	+	-
Redução de nitrato	+	+	+	+	+	-
Pirazinamidase	+	-	-	-	-	-
β -D-Glucosidase	+	-	-	-	-	-
Prolina peptidase	V	-	-	-	-	-
Salicina	+	-	-	-	-	-
DNase	-	-	-	-	+	+

^a Incubação a 25°C por 48h; +: positivo; (+): reação positiva tardia; -: negativo; V: reação variável.

FONTE: Adaptado de Doyle, et al. (1997).

As principais dificuldades enfrentadas no isolamento pelo método convencional, além da demora na obtenção de resultados, estão associadas a presença de estirpes não patogênicas nos materiais testados. Além disso, nos meios seletivos, como o CIN, as colônias de estirpes patogênicas e não patogênicas crescem de maneira idêntica e por isso não podem ser diferenciadas (ZADERNOWSKA et al., 2014; GUPTA et al., 2015). Dessa forma, existe certa dificuldade em selecionar colônias adequadas para os ensaios bioquímicos e sorológicos. Porém, apesar dessas limitações o método convencional ainda é considerado como o padrão ouro para a pesquisa de *Y. enterocolitica* em alimentos (GUPTA et al., 2015).

Em amostras de tonsilas, local onde o *Y. enterocolitica* está presente em maior quantidade, tem sido demonstrado que o isolamento direto (sem o enriquecimento prévio) pode ser aplicado com sucesso (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; VAN DAME et al., 2010). Nesses casos, o isolamento direto torna-se extremamente vantajoso, uma vez que é menos trabalhoso em comparação com o uso de meios de enriquecimento, as amostras positivas são identificadas mais rapidamente e ainda é possível obter uma estimativa quantitativa, fornecendo informações adicionais sobre o nível de contaminação (VAN DAME et al., 2010).

Os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) estão sendo cada vez mais utilizados, uma vez que apresentam os resultados com maior rapidez e sensibilidade em comparação aos métodos

convencionais (PETSIOS et al., 2016). Outra vantagem, é que pela técnica de PCR as amostras não precisam necessariamente ser enriquecidas previamente e a técnica permite a caracterização mais precisa dos isolados (ZADERNOWSKA et al., 2014; GUPTA et al., 2015).

Vários ensaios de PCR foram desenvolvidos para *Y. enterocolitica* em amostras de alimentos (FREDRIKSSON-AHOMAA; KORKEALA, 2003). Muitos desses ensaios usam *primers* direcionados aos genes *yadA* ou *virF*, localizados no pYV. Contudo, devido à possível perda de plasmídeos, *primers* iniciadores visando genes cromossômicos de virulência também são utilizados, tendo como alvos mais comuns os genes *ail*, *inv* e *yst* (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2006; ZADERNOWSKA et al., 2014). Além disso, Garzeti et al. (2014) desenvolveram um protocolo de PCR multiplex que permite sorotipificar *Y. enterocolitica* de acordo com os quatro sorotipos que são mais associados com a doença em humanos (O:8, O:3, O:9, O:5,27).

Os estudos indicam diferenças significativas no nível de detecção de *Y. enterocolitica* dependendo do método utilizado (HALLANVUO, 2009; ZADERNOWSKA et al., 2014). As técnicas de PCR convencional e de PCR em tempo real diretamente dos caldos de pré-enriquecimento têm mostrado maior capacidade de detecção de *Y. enterocolitica* nas amostras do que o cultivo em placas, além disso tem se percebido que *Y. enterocolitica*, apesar de presente nas amostras, nem sempre forma colônias nos meios sólidos, o que reduz a sensibilidade do método convencional quando comparado a PCR (TEODORO et al., 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; BARI et al., 2011).

Além das técnicas de PCR outras técnicas moleculares como a Eletroforese em Gel de Agarose (PGFE) tem sido empregada com sucesso em estudos com *Y. enterocolitica* (PETSIOS et al., 2016). A PFGE é uma técnica de macrorestrição do DNA utilizando enzimas de restrição que fragmentam o DNA. Esses fragmentos são separados por eletroforese formando padrões específicos de DNA (HALLANVUO, 2009; CDC, 2018). O emprego dessa técnica é relacionado principalmente com estudos epidemiológicos (PETSIOS et al., 2016).

O PFGE é uma técnica bastante complexa com um poder discriminatório muito elevado. É considerada padrão ouro em epidemiologia molecular pois permite o agrupamento dos padrões de DNA dos isolados de acordo com o grau

de similaridade entre eles, evidenciando mais claramente as variações genômicas (MAGALHÃES et al., 2005). Dessa forma, quando existe uma relação epidemiológica entre bactérias com padrões de DNA idênticos, provavelmente trata-se de um surto. Por outro lado, bactérias de mesma espécie e genótipo, isoladas de pacientes que não possuem uma ligação epidemiológica, podem representar linhagens endêmicas (MAGALHÃES et al., 2005).

A fim de monitorar de forma consistente a presença de *Y. enterocolitica* patogênica em alimentos e na cadeia produtiva de suínos é essencial a adoção de métodos de detecção adequados e confiáveis, já que o método de detecção aplicado pode ter um impacto direto no resultado obtido (EFSA, 2007; GOUPTA et al., 2015).

2.6 CONTROLE DE *Yersinia enterocolitica* NA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA

Medidas de prevenção específicas para *Y. enterocolitica* adotadas tanto na produção primária quanto no abatedouro são necessárias para evitar a contaminação dos alimentos e consequentemente a veiculação do patógeno para humanos (DRUMMOND et al., 2012).

Para o controle de *Y. enterocolitica* nas etapas primárias de produção, diversas medidas de biossegurança devem ser adotadas visando minimizar os riscos de disseminação do agente nas unidades de exploração. Medidas como pedilúvios e mecanismos de desinfecção com agentes sanitizantes devem ser implantados nas entradas das granjas, assim como deve ser preconizada a troca de roupas, calçados e o controle sobre a entrada de pessoal estranho a atividade nas unidades de produção. Além disso, a manutenção das áreas de produção com cercas que protegem contra o acesso de animais domésticos e silvestres, instalações livres de insetos, roedores e carcaças ou material orgânico em decomposição também contribuem para o controle da disseminação de *Y. enterocolitica* nas propriedades (DRUMMOND et al., 2012).

Ainda com relação a produção primária, uma medida que pode ser considerada eficaz na prevenção é a introdução somente de animais livres de *Y. enterocolitica* nos rebanhos suínos. A utilização de um sistema de criação fechado, no qual núcleos primários (livres de patógenos) vendem animais

reprodutores para granjas secundárias de rebanho multiplicador e essas por sua vez vendem reprodutores para granjas de reprodução convencional, que entregam os animais para fazendas de terminação, pode ser um mecanismo eficaz para o controle de *Y. enterocolitica* (NESBAKKEN et al., 2007).

Esse esquema, conhecido como pirâmide reprodutiva, permite produzir animais livres de doenças como peste suína clássica, doença de Aujeszky, brucelose, leptospirose e sarna sarcóptica. O monitoramento nos núcleos reprodutores para algumas dessas doenças é realizado através de testes sorológicos. Sendo assim, considera-se que a adoção desse tipo de teste possa ser utilizada também para o controle de *Y. enterocolitica*. Considerando o uso dos testes sorológicos, quando ocorrer a eliminação de *Y. enterocolitica* nos níveis mais altos das pirâmides reprodutivas a sua prevalência provavelmente será reduzida também ao nível da população geral de suínos (NESBAKKEN et al., 2007).

No abatedouro, a utilização de testes sorológicos para *Y. enterocolitica* também pode ser considerada uma medida eficaz, tendo em vista que os lotes de animais sorologicamente positivos sejam abatidos em separado e não entrem em contato com os lotes negativos durante o período de transporte e espera. Como medida preventiva para a saúde humana, as carnes provenientes de lotes sorologicamente positivos devem ser destinadas ao tratamento térmico capaz de destruir o patógeno (NESBAKKEN et al., 2003).

Dentre as etapas do processo de abate, a escaldagem e o chamuscamento podem contribuir para reduzir o risco de contaminação por *Y. enterocolitica*, uma vez que são atividades que exigem o uso de temperaturas elevadas, as quais são capazes de destruir o patógeno (LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014).

Ainda, as técnicas de inspeção *post mortem* exigem a incisão de diversos linfonodos, contudo já foi demonstrado que tal prática aumenta o risco de contaminação por *Y. enterocolitica* na carcaça. A contaminação ocorre com maior frequência devido a incisão dos linfonodos mesentéricos e submaxilares. Diante disso, torna-se imprescindível que as facas utilizadas para incisão de linfonodos sejam higienizadas e esterilizadas antes de serem utilizadas para a inspeção de outras regiões da carcaça ou de novas carcaças (BRASIL. Ministério

da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 1995; NESBAKKEN et al., 2003; VAN DAMME et al., 2015).

As fezes podem ser uma pontencial fonte de contaminação das carcaças por *Y. enterocolitica*, por isso a restrição alimentar nas fazendas antes do abate é uma alternativa eficaz para reduzir o risco de extravasamento do conteúdo intestinal ou ruptura acidental dos intestinos pelos manipuladores durante a evisceração. Já foi demonstrado que a oclusão do reto com saco plástico também pode reduzir a contaminação por *Y. enterocolitica* durante o abate (NESBAKKEN; BORCH, 1994; LAUKKANEN et al., 2010; VAN DAMME et al., 2015). Animais com menos de 135 dias de vida apresentam maior excreção de *Y. enterocolitica* nas fezes, assim, durante o abate de animais mais jovens, indica-se que o cuidado na manipulação de vísceras e intestinos seja intensificado (NESBAKKEN et al., 2006).

Já animais mais velhos, com mais de 135 dias de idade, têm maior chance de contaminação das carcaças por *Y. enterocolitica* através das tonsilas palatinas. Nesse caso, a retirada completa da cabeça, tonsilas e língua antes da divisão das carcaças pode ser uma medida eficaz para evitar a contaminação (VAN DAMME et al., 2015; NESBAKKEN et al., 2006).

Contudo, quando este procedimento não é realizado, a serra de carcaça pode representar risco de contaminação cruzada por *Y. enterocolitica*, visto que entra em contato com as tonsilas palatinas durante a serragem da cabeça. Nesse caso, é indicado que durante a evisceração (e antes da serragem de carcaça) o operador retire completamente as tonsilas juntamente com a língua e o esôfago, de forma que nenhum material tonsilar siga com a cabeça (NESBAKKEN et al., 2003; VAN DAMME et al., 2015).

Como medida de prevenção da contaminação por *Y. enterocolitica* em humanos, as carnes de cabeça, que são mais propensas a contaminação pelo patógeno, não devem ser utilizadas para a produção de produtos que são consumidos crus (VAN DAMME et al., 2015; VAN DAMME et al., 2017).

Embora o controle de *Y. enterocolitica* seja mais eficiente nas etapas primárias de produção, as intervenções realizadas no abatedouro, relacionadas a serragem e remoção de partes das carcaças, práticas adequadas de higiene, oclusão do reto, esterilização de facas e utensílios e educação dos manipuladores, podem ser consideradas atualmente o método mais prático e

econômico para diminuir a incidência de contaminação cruzada por *Y. enterocolitica* durante as atividades de abate (NESBAKKEN et al., 2006; DRUMMOND et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2017**. ABPA, São Paulo, SP, p. 68, 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf> Acesso em: 10 fev. 2018.
- ABCS. Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Mapeamento da suinocultura brasileira**. Serviço de Apoio as Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE, Brasília, DF, 216. Disponível em: <http://www.abcs.org.br/attachments/-01_Mapeamento_COMPLETO_bloq.pdf> Acesso em: 24 abr. 2018.
- AUTENRIETH, I.B.; R. FIRSCHING. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. **Journal of Medical Microbiology**, v.44, p.285-294, 1996.
- BAER, A. A.; MILLER, M. J.; DIGLER, A. C. Pathogens of interest to the pork industry: a review of research on interventions to assure food safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 183-217, 2013.
- BANCERZ-KISIEL, A.; SAWEDA, W. Yersiniosis – a zoonotic foodborne diseases of relevance to public health. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.22, n.3, p.307-402, 2015.
- BARI, L.; HOSSAIN, A.; ISSHIKI, K.; UKUKU, D. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in foods. **Journal of Pathogens**, p. 1-13, 2011.
- BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 303–307, 2001.
- BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, 2016.
- BHADURI, S.; WESLEY, I. V.; BUSH, E.J. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains in Pigs in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v71, n.11, p. 7117–7121, 2005.
- BONARDI, S.; BASSI, L.; BRINDANI, F.; D'INCAU, M.; BARCO, L.; CARRA, E.; PONGOLINI, S. Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of

Salmonella enterica and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p.248-257, 2013.

BORTOLI, E. S.; BORTOLI, W.; SFACIOTTE, R. A. P.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos no meio oeste de Santa Catarina. **Archives of Veterinary Science**, v.22, n.1, p.40-48, 2017.

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

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an enduring human pathogen. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 32, n.1, 2015.

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

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

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n.º 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamento técnico de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 2017.

CAPILLA, S.; RUIZ, J.; GOÑI, P.; CASTILLO, J.; RUBIO, M. C.; JIMÉNEZ DE ANTA, M. T.; GÓMEZ-LUS, R.; VILA, J. Characterization of the molecular mechanisms of quinolone resistance in *Yersinia enterocolitica* O:3 clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, p.1068-71, 2004.

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

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)**. Disponível em <<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>> Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. ***Yersinia enterocolitica***. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/yersinia/>> Acesso em: 12 de janeiro de 2018.

CLSI. The Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th edition. **CLSI supplement M100-S26**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2017.

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

D'SILVA, J. **Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing**, p. 17, 2000. Disponível em: <https://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm_docs/2008/f/factory_farming_and_developing_countries_2000.pdf> Acesso em: 15 mai. 2017.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM Press. Whashington, DC, 1997.

EFSA. European Food Safety Authority. Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp.: Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. **The EFSA Journal**, v.595, p.1-30, 2007.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n.12, 2017.

EL TAHIR, Y.; SKURNIK, M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesion. **International Journal of Medical Microbiology**, v.291, p.209-218, 2001.

EUROPEAN COMMISSION. **Food: From farm to statistics**, p. 170, 2011. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/eurostat/documents/3930297/5966590/KS-32-11-743-EN.PDF>> Acesso em: 14 mai. 2017.

FÀBREGA, A.; ROCA, I.; VILA, J. Fluoroquinolone and multidrugresistance phenotypes associated with the overexpression of AcrAB and an orthologue of MarA in *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.457–63, 2010.

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

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

FONDREVEZ, M.; MINVIELLE, B.; LABBÉ, A.; HOUDAYER, C.; ROSE, N.; ESNAULT, E.; DENIS, M. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. **International Journal of Food Microbiology**, v.174, p.56-62, 2014.

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

FRAZÃO, M.R.; ANDRADE, L.N.; DARINI, A.L.C.; FALCÃO, J. P. Antimicrobial resistance and plasmid replicons in *Yersinia enterocolitica* strains isolated in Brazil in 30 years. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.21, n.4, p.44-480, 2017.

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

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

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.207-12, 2007.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; BUCHER, M.; HANK, C.; STOLLE, A.; KORKEALA, H. High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in Southern Germany: A slaughtering technique problem. **Systematic and Applied Microbiology**, v.24, p.457-463, 2011.

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

FUNK, J.A.; TROUTT, H.F.; DAVIS, S.A.; FOSSLER, C.P. In vitro susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from the oral cavity of swine. **Journal of Food Protection**, v. 63, p.395–9, 2000.

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

GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; SAKKAS, H.; LEVEIDIOTOU, S.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. **Foodborne Pathogens Diseases**, v.8, p.27–38, 2011.

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

GURTNER, M. ALTER, T.; KASINMIR, S.; LENNEBUR, M.; FEHLHABER, K. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Fattening Pigs. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.850-854, 2005.

HALLANVUO, S. **Foodborne *Yersinia*: Identification and molecular epidemiology of isolates from human infections**. 131f. Dissertação - Helsinki University Print, Helsinki, Finlândia, 2009.

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

HURST, M. R. H.; JONES, S. A.; BINGLING, T.; HARPER, L. A.; JACKSON, T. A.; GLARE, T. R. The Main Virulence Determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 Is a Broad-Host-Range Toxin Complex Active against Insects. **Journal of Bacteriology**, v.193, n.8, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Animais abatidos e peso total das carcaças, segundo os meses - Brasil**. IBGE, Brasília, DF. 2017. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201604caderno.pdf> Acesso em: 14 mai. 2017.

ISBERG, R. R.; BARNES, P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 1, p. 21–28, 2001

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **ISO 10273**. ISO, Geneva, 2003.

JASOVSKY, D.; LITTMANN, J.; ZORZET, A.; CARS, O. Antimicrobial resistance: a threat to the world's sustainable development. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 121, n. 3, p.159–164, 2016.

JOURDAN, A.; MARICHAL, M. D.; BYL, L.; WESLEY, I. Detection of *Yersinia* Species in Pig Tonsils by a 5' Nuclease Fluorogenic (TaqMan) Polymerase Chain Reaction Assay Specific for the 16S rRNA Gene. **Food Safety**, 2002.

JOUTSEN, S.; EKLUND, K.; LAUKKANEN-NINIOS, R.; STEPHAN, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, Sheep carrying pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 5/O:3 in the faces at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v.196, p. 78-82, 2016.

KAFERSTEIN, F. K. Actions to reverse the upward curve of foodborne illness. **Food Control**, v. 14, p. 101-109, 2003.

KICH, J. D.; MORES, N.; PIFFER, I, A.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L.; CARDOSO, M. Fatores associados a soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 398-405, 2005.

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.; MARTI, P. O.; SIEKKINEN, K.; RANTA, J. Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5444-5450, 2008.

LAUKKANEN, R.; MARTÍNEZ, P. O.; SIEKKINEN, K. M.; RANTA, J.; MAIJALA, R.; KORKEALA H. Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.6, p.681-688, 2009.

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

LAUKKANEN-NINIOS, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H. Enteropathogenic *Yersinia* in the pork production chain: challenges for control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1165-1191, 2014.

LAXMINARAYAN, L.; SRIDHAR, D.; BLASER, M.; WANG, M.; WOOLHOUS, M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. **Science**, 2016.

LIANG, J.; WANG, X.; XIAO, Y.; CUI, Z.; XIA, S.; HAO, Q.; YANG, J.; LUO, L.; WANG, S.; LI, K.; YANG, H.; GU, W.; XU, J.; KAN, B.; JING, H. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2949–56, 2012.

MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, J.C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p.155-161, 2005.

MARTINEZ, P. O.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; YULIA SOKOLOVA, Y.; ROASTO, M.; BERZINS, A.; KORKEALA, H. Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad Region) Pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.6, 2009.

MARTINEZ, P. O.; MYLONA, S.; DRAKE, I.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; CORRY, J. E. L. 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.

MARTINEZ, P. O.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; PALLOTTI, A.; ROSMINI, R.; HOUF, K.; KORKEALA, H. Variation in the Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in Slaughter Pigs from Belgium, Italy, and Spain. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.3, 2011.

MARTINS, B. T. F.; BOTELHO, C. V.; SILVA, D. A. L.; LANNA, F. G. P. A.; GROSSI, J. R.; CAMPOS-GALVAO, M. E. M.; YAMATOIGI, R. S.; FALCAO, J. P.; BERSOT, L. S.; NERO, L. A. *Yersinia enterocolitica* in a Brazilian pork production chain: Tracking of contamination routes, virulence and antimicrobial resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 276, p. 5-9, 2018.

MECSAS, J., BILIS, I., FALKOW, S. Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of na orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, v.69, p.2779–2787, 2001.

MEHTA, H.H.; PRATER, A.G.; SHAMOO, Y. Using experimental evolution to identify druggable targets that could inhibit the evolution of antimicrobial resistance. **The Journal of Antibiotics**, p.1-8, 2017.

MESSELHÄUSSER, U.; KÄMPF, P.; COLDITZ, J.; BAUER, H.; SCHREINER, H.; HÖLLER, C.; BUSCH, U. Qualitative and quantitative detection of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in different food matrices at retail level in Bavaria. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.1, p.39-44, 2011.

MONACK, D.M.; MECSA, J.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis, and Yopj is necessary for this cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 10385–10390, 1997.

MURROS-KONTIAINEN, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; JOHANSSON, P.; RAHKILA, R.; BJORKROTH, J. *Yersinia nurmii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2368–2372, 2011a.

MURROS-KONTIAINEN, A.; JOHANSSON, P.; NISKANEN, T.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; BJORKROTH, J. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2363–2367, 2011b.

NATHUES, C.; GRUNING, P.; FURTH, A.; VERSPOHL, J.; BLAHA, T.; KREIENBROCK, L.; MERLE, R. *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella enterica* and their simultaneous occurrence in German fattening pig herds and their environment. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 10, p. 1704-1711, 2013.

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

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

NESBAKKEN, T.; NESBAKKEN, T.; IVERSEN, T.; ECKNER, K.; LIUM, B. Testing of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig herds based on the natural dynamics of infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.11 p.99-104, 2006.

NESBAKKEN, T.; IVERSEN, T.; LIUM, B. Pig Herds Free from Human Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.12, p. 1860-1864, 2007.

NEUBAUER, N.; ALEKSIC, S.; HENSEL, A.; FINKE, E. J.; MEYER, H. *Yersinia enterocolitica* 16s rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. **International Journal of Medical Microbiology**, v.290, n.1, p.61-64, 2000.

O'GRADY, KENNY, K.; POWER, S.; EGAN, J.; RYAN, F. Detection of *Yersinia enterocolitica* serotyp O:9 in the faeces of cattle with false positive reactions in serological tests for brucellosis in Ireland. **The Veterinary journal**, v.216, p.133-135, 2016.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**, 2016. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf> Acesso em: 20 de outubro de 2017.

ONG, K.L.; GOULD, L.H.; CHEN, D. L.; JONES, T. F.; SCHEFTEL, J.; WEBB, T.H.; MODY, R. K.; MAHO, B. E. Changing Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* Infections: Markedly Decreased Rates in Young Black Children, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996-2009. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, n.5, p. S385-90, 2012.

PAIXÃO, R.; MORENO, L. Z.; SENA DE GOBBI, D. D.; RAIMUNDO, D. C.; HOFER, E.; MATTE, M. H.; FERREIRA, T. S. P.; de MOURA GOMES, V. T.; COSTA, B. L. P.; MORENO, A M. Characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and markets. **The Scientific World Journal**, 2013.

PEPE, J.C., WACHTEL, M.R., WAGAR, E., MILLER, V.L. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. **Infection and Immunity**. v.63, p.4837-4848, 1995.

PERUZY, M.F.; MURRU, N.; PERUGINI, A.G.; CAPUANO, F.; DELIBATO, E.; MERCOGLIANO, F.; KORKEALA, H.; THERESE, Y.; PROROGA, R. Evaluation of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains using SYBR Green real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 65, p.231-235, 2017.

PETSIOS, S.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of

Yersinia enterocolitica in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 55-72, 2016.

PLATT-SAMORAJ, A.; SYCZYLO, K.; SZCZERBA-TUREK A.; BANCERZ-KISIEL, A.; JABLONSKI, A.; LABUC, S.; PAJDAK, J.; OSHAKBAEVA, N.; SZWEDA, W. Presence of *ail* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A isolates from game animals in Poland. **The Veterinary Journal**, v.221, p.11-13, 2017.

POLJAK, Z.; DEWEY, C. E.; MARTIN, S. W.; ROSENDAL, T.; CHRISTENSEN, J.; CIEBIN, B.; FRIENDSHIP, R. M. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* shedding and bio-serotype distribution in Ontario finisher pig herds in 2001, 2002, and 2004. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 110-120, 2010.

RAHMAN, A.; BONNY, T.S.; STONSAOVAPAK, S.; ANANCHAIPATTANA, C. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks. **Journal of Pathogens**, 2011.

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

RUSAK, L. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Yersinia enterocolitica* isoladas de diferentes origens no Brasil**. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

RUSAK, L. A.; MOURA FALAVINA DOS REIS, C.; BARBOSA, A. V.; SANTOS, A.F.M.; PAIXAO, R.; HOFER, E.; VALLIM, D. C.; ASENSI, M.D. 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.

SABA, R. Z. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em suínos ao abate. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 4, p. 92, 2013.

SABINA, Y.; RAHMAN, A.; RAY, R. C.; MONTET, D. *Yersinia enterocolitica*: mode of transmission, molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. **Journal of Pathogens**, 2011.

SACHEDEVA, P.; VIRDI, J. S. Repetitive elements sequence (REP/ERIC) - PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existence of limited number of clonal groups. **FEMS Microbiology Letters**, n.20, p.193-201, 2004.

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

SHANMUGAPRIYA, S.; SENTHILMURUGAN, T.; THAYUMANAVAN, T. Genetic diversity among *Yersinia enterocolitica* isolated from chicken and fish in

and around Coimbatore City, India. **International Journal of Public Health**, v. 43, n.6, p.835-844, 2014.

SOMMER, M.O.A; MUNCK, C.; TOFT-KEHLER, R.V.; ANDERSSON, D.I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm?. **Nature Reviews Microbiology**, v.15, p. 689-696, 2017.

SOUZA, R. A.; FALCAÃO, D. P.; FALCAÃO, J. P. Emended description of *Yersinia massiliensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.1094–1097, 2011.

SOUZA, J. C. P. V.B.; AMARAL, A. L.; MORÉS, N.; TREMÉA, S. L.; MIELE, M. SANTOS FILHO, J. I dos. **Sistemas de produção de leitões baseado em planejamento, gestão e padrões operacionais**. 1ªed. Embrapa Aves e Suínos, p.114, 2013.

SPELLBERG, B.; HANSEN, G. R.; KAR, A.; CORDOVA, C. D.; PRICE, L. B.; JOHNSON, J. **Antibiotic Resistance in Humans and Animals**. Discussion Paper, National Academy of Medicine, Washington, DC. Disponível em: <<https://nam.edu/wp-content/uploads/2016/07/Antibiotic-Resistance-in-Humans-and-Animals.pdf>> Acesso em: 29 abr. 2018.

STAMM, I.; HAILER, M.; DEPNER, B.; KOPP, P. A.; RAU, J. 2013. *Yersinia enterocolitica* in diagnostic fecal samples from European dogs and cats: Identification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.3, p.887-893, 2013.

SZYFRES, P. N. A. B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: OPS, 2001.

TENNANT, S. M.; SKINNER, N.A.; JOE, A.; ROBINS-BROWNE, R. Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotipe 1A and their contribution to virulence. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p.6860-6867, 2005.

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

USDA, United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade 2017**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acesso em: 02 fev. 2018.

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

VAN BOECKEL, T. P.; GLENNON, E.E.; CHEN, D.; GILBERT, M.; ROBINSON, T.P.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; BONHOEFFER, S.; LAXMINARAYAN, S. Reducing antimicrobial use in food animals. **Science**, vol. 357(6358), p. 1350-1352, 2017.

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

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

VAN DAMME, I.; DE ZUTTER, L.; JACXSENS L.; NAUTA, M.J. Control of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in minced meat: Comparative analysis of different interventions using a risk assessment approach. **Food Microbiology**, v. 64, p. 83-95, 2017.

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

VON ALTROCK, A.; ROESLER, U.; MERLE, R.; WALDMANN, K. H. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains on Liver Surfaces of Pigs and Their Antimicrobial Susceptibility. **Journal of Food Protection**, v.73, n.9, p.1680–1683, 2010.

VON ALTROCK, A.; ROESLER, U.; WALDMANN, K-H. Herd Factors Associated with the Serological *Yersinia* Prevalence in Fattening Pig Herds. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 12, p. 1249-1255, 2011.

VON ALTROCK, A.; SEINIGE, D.; KEHRENBURG, C. *Yersinia enterocolitica* isolates from wild boars hunted in Lower Saxony, Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n.14, p. 4835-4840, 2015.

WANG, W.; QIU, H.; JIN, D.; CUI, Z.; KAN, B.; XIAO, Y.; XU, Y.; XIA, S.; WANG, H.; YANG, J.; WANG, X.; HU, W.; XU, J.; JING, H. O:8 serotype *Yersinia enterocolitica* strains in China. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.259-266, 2008.

WANG, X.; CUI, Z.; WANG, H.; TANG, L.; YANG, J.; GU, L.; JIN, D.; LUO, L.; QIU, H.; XIAO, Y.; XIONG, H.; KAN, B.; XU, J.; JING, H. Pathogenic Strains of *Yersinia enterocolitica* Isolated from Domestic Dogs (*Canis familiaris*) Belonging to Farmers Are of the Same Subtype as Pathogenic *Y. enterocolitica* Strains Isolated from Humans and May Be a Source of Human Infection in Jiangsu Province, China. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.5, p.1604-1610, 2010.

WANG, H.; TAY, M.; PALMER, J.; FLINT, S. Biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* and its persistence following treatment with different sanitation agents. **Food Control**, v. 73, p. 433 – 437, 2017.

WESLEY, I. V.; BHADURI, S.; BUSH, E. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Market Weight Hogs in the United States. **Journal of Food Protection**, v.71, n.6, p.1162-1168, 2008.

WHO. World Health Organization. **Antibacterial Agents in Clinical Development**. Geneva, Switzerland, 2017.

WILDEMAN, P.; GAVA, D.; SFACIOTTE, R.A.P.; MELO, F.D.; FERRAZ, S.M.; COSTA, U. M.; VAZ, E.K. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils at slaughter in Southern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 2017.

YOUNG, G.M.; AMID, D.; MILLER, V.L. A Bifunctional Urease Enhances Survival of *Pathogenic Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at Low pH. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 22, p.6487-6495, 1996.

ZADERNOWSKA, A.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. *Yersinia enterocolitica*: A Dangerous, But Often Ignored, Foodborne Pathogen. **Food Reviews International**, v.30, p. 53-70, 2014.

ZHANG, L.; RADZIEJEWSKA-LEBRECHT, J.; KRAJEWSKA-PIETRASIK, D.; TOIVANEN, P.; SKURNIK, M. Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. **Molecular Microbiology**, v.23, p.63–76, 1997.

3 OBJETIVOS

3.4 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença de *Yersinia enterocolitica* em diferentes pontos da cadeia produtiva de carne suína na região Oeste do Paraná.

3.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar *Y. enterocolitica* em granjas de suínos em fase de terminação, em abatedouro-frigorífico de suínos e em cortes cárneos de suínos;
- Determinar o perfil genético e avaliar a diversidade genética entre os isolados de *Y. enterocolitica*;
- Identificar a presença de genes relacionados a virulência;
- Identificar a presença de genes relacionados a resistência a antimicrobianos;
- Caracterizar o perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos.

4 BAIXA OCORRÊNCIA DE *Yersinia enterocolitica* PATOGENICA NA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS NO OESTE DO PARANÁ

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de *Y. enterocolitica* nas diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína e caracterizar os perfis genéticos e de resistência antimicrobiana dos isolados. O trabalho foi conduzido em granjas de suínos em terminação e abatedouro-frigorífico, no oeste do Paraná. Os mesmos lotes de suínos foram acompanhados na terminação e no abate. Amostras de água (225 ml) e ração (225 g) foram coletadas nas granjas. Amostras superficiais do piso das baias na granja e de pocilgas de espera no abatedouro foram obtidas utilizando-se *overshoes*. Para amostragem das mesmas carcaças em diferentes etapas do processo os animais foram marcados no início do abate. Amostras superficiais de 400 cm² de carcaças, equipamentos e cortes finais (áreas delimitadas por moldes de 10 x 10 cm) e amostras de utensílios (*pool* de quatro utensílios) foram obtidas por esfregaço de esponjas pré-umedecidas (NaCl 0,85%). Foram amostradas tonsilas (12,5 g) e linfonodos mesentéricos (12,5 g). *Y. enterocolitica* foi pesquisada pelo método ISO 10273 modificado, os isolados foram confirmados (genes *16s rRNA* e *inv*) e sorotipificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Adicionalmente foram submetidos à detecção de genes de patogenicidade (*ail*, *ystB*, *virF*, *myfA*, *ystA*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC*, *ymoA*, *hrep* e *sat*) e de resistência (*emrD*, *yfhD* e *marC*), à Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) e à avaliação do perfil fenotípico de resistência antimicrobiana. Das 800 amostras coletadas, foram obtidos três isolados de *Y. enterocolitica*, provenientes de uma amostra de tonsila palatina (0,12%), todos pertencentes ao sorotipo O:3. Os perfis de macrorrestrição foram comparados aos perfis de isolados do sorotipo O:3 obtidos de amostras de suínos coletadas em Minas Gerais. Os isolados dos dois estados apresentaram alto grau de similaridade genética entre eles (mais de 92%) e resultados positivos para os genes de virulência *inv*, *ail*, *ystA*, *myfA*, *hrep*, *ymoA*, *tccC* e *virF* e para os genes de resistência testados. Este trabalho reporta a baixa ocorrência de *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de suínos na região oeste do Paraná e a sua baixa variabilidade genética em isolados do sorotipo O:3 circulantes nos estados do Paraná e Minas Gerais. Apesar da baixa ocorrência de *Y. enterocolitica*, foram identificados genes que codificam importantes fatores de virulência e de resistência de *Y. enterocolitica*, demonstrando o potencial patogênico desses isolados.

Palavras-chave: patogenicidade, resistência antimicrobiana, carne suína, yersiniose, zoonose

4.4 INTRODUÇÃO

A carne suína é a fonte de proteína de origem animal mais produzida e consumida no mundo (USDA, 2017). No Brasil, de uma forma geral, sua produção tem apresentado índices consideráveis de crescimento nas últimas

décadas e o sistema intensivo de criação, associado ao melhoramento genético, a nutrição e sanidade animal são os principais responsáveis por esse aumento na produtividade (D'SILVA, 2000; ABCS, 2014). Contudo, características importantes do sistema intensivo de criação, como o uso de bebedouros e comedouros coletivos, a alta densidade de fezes, o contato direto entre os animais e a lotação das baias, podem acabar predispondo os animais a carregarem patógenos importantes (LAUKKANEN et al., 2008; LAUKKANEN et al., 2009).

Yersinia enterocolitica é um enteropatógeno emergente, com grande importância na cadeia produtiva de carne suína (BANCERZ-KISIEL et al., 2016; EFSA, 2017). Os suínos, principalmente na fase de terminação, podem atuar como reservatórios carregando o patógeno de forma assintomática nos gânglios linfáticos, tonsilas e intestinos. Dessa maneira, em condições inadequadas de manipulação durante o abate, pode ocorrer a disseminação de *Y. enterocolitica* para a carcaça, ambiente, utensílios e para os produtos finais (LAUKKANEN et al., 2008; POLJAK et al., 2010; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014).

O potencial patogênico de *Y. enterocolitica* para humanos é determinado por fatores de virulência codificados por genes localizados no cromossomo da célula bacteriana ou em um plasmídeo, designado pYV (REVELL & MILLER, 2001; SABINA, 2011). Os genes de virulência cromossômica incluem *ail* (adesão e invasão), *inv* (invasão), *myf* (presença de fímbrias), *hreP* (elemento responsivo ao hospedeiro), *yst* (toxina estável de *Yersinia*), *ymoA* (modulação dos genes *inv* e *ystA*), *tccC* (possível relação com atividade enterotóxica) e os genes *fes* e *fep* (produção e liberação de ferro em cepas altamente patogênicas) (SCHUBERT et al., 1999; HEUSIPP et al., 2001; REVELL & MILLER et al., 2001; TENNANT et al., 2005; SABINA, 2011; DRUMMOND et al., 2012; FÀBREGA & VILA, 2012; BOTTONE, 2015; PERUZY et al., 2017). Dentre os genes pYV de virulência, está incluso o gene regulador de transcrição (*virF*), que é responsável pela regulação da produção de proteínas de virulência importantes como YadA (adesina A) e Yops (outras proteínas de *Yersinia*), que atuam na adesão e combate às células do sistema imunológico do hospedeiro (HALLANVUO, 2009; ZADERNOWSKA et al., 2014; PERUZY et al., 2017).

A crescente preocupação mundial com o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (AMR) tem direcionado grande parte das pesquisas à

identificação de AMR em bactérias patogênicas veiculadas por alimentos. *Y. enterocolitica* normalmente é sensível a aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporinas de espectro estendido e trimetoprim-sulfametoxazol (FRAZÃO et al., 2017). Contudo, devido às variações nas populações bacterianas, alguns micro-organismos acabam facilmente trocando material genético, resultando em mutações que podem conferir resistência a antimicrobianos aos quais a bactéria era sensível anteriormente (BAYM, et al., 2016; SOMMER et al., 2017).

No Brasil, não existem dados oficiais de yersiniose em humanos e poucos estudos são relacionados a *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de carne suína dificultando o entendimento da sua importância epidemiológica no sistema produtivo de carne suína do país e na saúde humana (FALCÃO et al., 2006; PAIXÃO et al., 2013; RUSAK et al., 2014). A identificação das etapas que exercem maior influência sobre a contaminação por *Y. enterocolitica*, desde a criação até o abate dos animais, é fundamental para que sejam determinadas medidas de prevenção e controle específicas para o patógeno, com o objetivo de garantir a inocuidade dos produtos finais (VAN DAMME et al., 2015).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo identificar a ocorrência de contaminação por *Y. enterocolitica* patogênica nas diferentes etapas da cadeia produtiva de suínos e realizar a caracterização dos isolados obtidos quanto ao perfil genotípico de virulência e ao perfil genotípico e fenotípico de resistência à antimicrobianos.

4.5 MATERIAL E MÉTODOS

4.5.2 Área de estudo e coleta de amostras

A coleta de amostras e o isolamento de *Y. enterocolitica* foram realizadas entre setembro de 2016 e fevereiro de 2017. As coletas foram realizadas em granjas de suínos em fase de terminação e em abatedouro-frigorífico de suínos, regularmente fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, localizados na região Oeste do Paraná. Dez lotes de suínos de diferentes produtores foram acompanhados nas granjas de terminação e, os mesmos lotes, durante as

atividades de abate. Foram coletadas amostras ambientais, de equipamentos e utensílios, carcaças, linfonodos, tonsilas e de cortes finais *in natura* (TABELA 3).

TABELA 3 - AMOSTRAS COLETADAS ENTRE SETEMBRO DE 2016 E FEVEREIRO DE 2017 EM DEZ GRANJAS DE TERMINAÇÃO DE SUÍNOS E EM UM ABATEDOURO-FRIGORÍFICO DE SUÍNOS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.

Amostra	Especificação	Unidade amostral	Número de amostras
Produção			
Baia	Amostra ambiental	Overshoes ^a	10
Ração		25 g	10
Água		225 ml	10
Abate			
Pocilga	Amostra ambiental	Overshoes ^a	10
	Após sangria	400 cm ²	100
	Após chamuscamento	400 cm ²	100
Carcaça	Após evisceração	400 cm ²	100
	Após lavagem final	400 cm ²	100
	Tonsilas palatinas	12,5 g	100
	Linfonodos mesentéricos	12,5 g	100
Processamento			
Faca	Antes do processamento	<i>Pool^b</i>	20
	Durante o processamento	<i>Pool^b</i>	20
Luvas de aço	Antes do processamento	<i>Pool^c</i>	20
	Durante o processamento	<i>Pool^c</i>	20
Mesa de desossa	Antes do processamento	400 cm ²	10
	Durante o processamento	400 cm ²	10
Esteira	Antes do processamento	400 cm ²	10
	Durante o processamento	400 cm ²	10
Produtos	Cortes <i>In natura</i>	400 cm ²	40
TOTAL			800

^a Conforme descrito por Botteldoorn et al. (2003)

^b *Pool* de 04 facas representa uma amostra de faca

^c *Pool* de 04 luvas de aço representa uma amostra de luvas

Fonte: a autora (2018)

Amostras superficiais do piso das baias nas granjas e das pocilgas de espera nos abatedouros foram obtidas através de *overshoes* (BOTTELDOORN et al., 2003). As amostras de água e ração foram coletadas diretamente dos cochos dos animais, em recipientes esterilizados. No abatedouro, dez suínos de cada lote foram marcados no início do processo do abate para permitir a amostragem das mesmas carcaças nos quatro pontos de avaliação.

Amostras superficiais de 400 cm² de carcaças, mesas e esteiras de manipulação e cortes finais *in natura* foram obtidas por esfregaço de esponjas (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA) pré-umedecidas (NaCl 0,85%) em quatro áreas delimitadas por moldes estéreis de 10 x 10 cm (100 cm²). Os utensílios de processamento (facas e luvas de aço) foram amostrados por esfregaço de

esponjas pré-umedecidas em *pool*, no qual uma amostra foi composta pelo esfregaço de quatro utensílios. Amostras de tonsilas palatinas e de linfonodos mesentéricos dos animais marcados foram obtidas durante o abate, individualmente, com auxílio de bisturis estéreis. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos apropriados (Nasco™, Fort Atkinson, WI, EUA) e mantidas em refrigeração até o momento das análises laboratoriais.

4.5.3 Detecção e isolamento de *Y. enterocolitica*

As amostras foram submetidas à pesquisa de *Y. enterocolitica* conforme o protocolo ISO 10273 com modificações (ISO, 2003). Alíquotas de 25 ml de água e 25 g de ração foram diluídas em 225 ml de Peptone-Sorbitol-Bile (PSB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), homogeneizadas em Stomacher Seward 400® por um minuto (230rpm). As amostras de superfícies e de linfonodos/tonsilas foram diluídas em 160 mL e 112,5 mL de solução salina peptonada 0,1%, respectivamente, e igualmente homogeneizadas. Alíquotas de 40 mL dessas amostras foram transferidas para tubos tipo falcon e centrifugadas a $2.000 \times g$ por 15 min, o *pellet* obtido foi suspenso em 10 mL de caldo PSB e incubado a 25°C por 72 h. Após a incubação, alíquotas de 0,5 mL das culturas em PSB foram transferidas para 4,5 mL de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5% por 20 segundos e, em seguida, semeadas em ágar Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas a 30 °C por 18 h - 48 h, quando colônias típicas de *Y. enterocolitica* foram observadas (colônias pequenas, com centro vermelho do tipo “*red bull’s eyes*”). Até três colônias suspeitas de cada placa foram selecionadas, purificadas e submetidas aos testes bioquímicos de produção de urease, indol, citrato, fermentação de glicose, produção de gás a partir da glicose, fermentação da lactose, produção de H₂S, motilidade e descarboxilação da lisina, para a confirmação dos resultados (ISO, 2003). A cepa de *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* ATCC® 9610™ foi utilizada como controle positivo.

4.5.4 Extração do DNA

Os isolados que apresentaram perfis bioquímicos compatíveis com *Y. enterocolitica* foram submetidos à extração do DNA por método térmico, descrito por Medici, et al. (2003) com modificações. Para a extração do DNA, 500 µl das culturas cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Becton Dickinson - BD, Heidelberg, Germany) foram transferidos para microtubos de 1.500 µl e centrifugados durante 10 minutos a $4.000 \times g$. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 1.000 µl de Tampão Fosfato Salino (PBS) e homogeneizado em agitador tipo vortex. Os microtubos foram novamente centrifugados a $4.000 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 300 µl de água destilada isenta de DNase-RNase (Sigma, Sigma-Aldrich s.r., Gallarate, Milão, Itália). Essa suspensão foi aquecida a 100 °C por 15 minutos e, posteriormente, centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos estéreis e armazenados a -20 °C até o momento do uso.

4.5.5 Identificação molecular

O DNA extraído foi submetido a duas PCR multiplex, uma para detecção dos genes *16s rRNA* e *inv* para confirmação da espécie e a outra para a detecção de genes associados aos principais sorotipos de *Y. enterocolitica*: *per* (O:9), *wbbU* (O:3), *wbcA* (O:8) e *wzt* (O:5,27); conforme descrito por Garzetti, et al. (2014). As reações de amplificação foram conduzidas com 12,5 µL do Gotaq Green Master Mix (Promega), 200 nMol de cada *primer*, 1 µL do DNA extraído e água livre de nuclease até completar o total de 25 µL. As condições utilizadas para amplificações das duas PCR multiplex foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 40 s, anelamento primário a 58 °C por 40s, extensão a 72 °C por 60s, e extensão final a 72 °C por 8 min (GARZETTI et al., 2014). As sequências de *primers* e tamanhos dos produtos esperados estão especificados na TABELA 4. A cepa de *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* ATCC® 9610™ foi utilizada como controle positivo.

Alíquotas de 10 µl dos produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% e tampão de 0,5X Tris/Ácido Bórico/EDTA,

corados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados em transiluminador L-PIX-HE (Loccus do Brasil) sob luz ultravioleta.

TABELA 4 - GENES PESQUISADOS, SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO E SOROTIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Yersinia enterocolitica*.

PCR	Gene alvo	Sequência do <i>primer</i> 5'- 3'	Tamanho do produto (pb)
Multiplex ^a	<i>16s rRNA</i>	FW: AATACCGCATAACGTCTTCGGA RV: CTTCTTCTGCGAGTAACGTCAAT	330
	<i>Inv</i>	FW: TGGCATCAATCTCGTGATTTTCG RV: GTTGCCCTGAATATCTAAAGTGAC	1009
Multiplex ^a	<i>Per</i> (O:9)	FW: TCCTTCTCCAAATATATAGGTGCCA RV: ATGCGGCATTAGATGAGATGGA	837
	<i>wbbU</i> (O:3)	FW: ACCTCGTATTTTTGAAGATGATCGC RV: GTACTCAATAACTTGCTGTTCGGA	463
	<i>wbcA</i> (O:8)	FW: TGATGAACGAGGCGAGTTTGT RV: TACTCCGTCTGTTATGCGGATTTAG	269
	<i>Wzt</i> (O:5,27)	FW: GTTAGTTCCTGCATCTGATCGCC RV: ATCCAGCATCCATGGCTCC	662

^a Conforme Garzetti, et al. (2014)

Fonte: a autora (2018)

4.5.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Os isolados identificados como *Y. enterocolitica* foram submetidos à macrorestrição do DNA com a enzima *XbaI*, conforme indicado pelo PulseNet (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EUA), seguindo o protocolo descrito por Ribot et al. (2006). Os produtos da macrorestrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (Agarose Seakem Gold 1% em tampão TE 0,5X), utilizando o equipamento CHEF-DR II (BioRad, Philadelphia, NY, EUA) com os seguintes parâmetros: voltagem de 6 V/cm, switch time inicial de 2,2s, switch time final de 63,8s, ângulo de 120° e tempo de corrida de 16 horas. Os géis obtidos foram corados em banhos com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e os padrões de bandas foram visualizados em transiluminador L-PIX-HE (Loccus do Brasil) sob luz ultravioleta, e comparados ao padrão da *Salmonella* Braenderup ATCC BAA664, através do programa Bionumerics 6.6 (Applied Maths, Gand, Bélgica), considerando otimização de 1% e coeficiente de Dice a 5%.

4.5.7 Detecção de genes de virulência

Os isolados confirmados como *Y. enterocolitica* foram submetidos a PCR para detecção de genes de virulência. Os genes *ail* e *ystB* foram pesquisados através de uma PCR multiplex, utilizando os *primers* descritos por Martins et al. (2018). Os genes *virF*, *myfA*, *ystA*, *ystC*, *fepA*, *fepD*, *fes*, *tccC*, *ymoA* e *hreP* foram identificados através de PCRs individuais, utilizando *primers* compilados no trabalho de Bhagat e Viridi (2007). Todas as reações foram conduzidas com 12,5 µL de Gotaq Green Master Mix (Promega), 200 nMol de cada *primer*, 1 µL do DNA extraído e água livre de nuclease até completar 25 µL. Os *primers* utilizados e as condições de amplificação para cada gene alvo estão apresentados na TABELA 5.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% e tampão de 0,5X Tris/Ácido Bórico/EDTA, corados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados em transiluminador L-PIX-HE (Loccus do Brasil) sob luz ultravioleta.

4.5.8 Perfil de resistência a antimicrobianos

A suscetibilidade fenotípica aos antimicrobianos foi determinada pelo método de disco-difusão de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2017). Foram testados 19 antimicrobianos pertencentes a 12 classes: (1) aminoglicosídeos: gentamicina (10µg), canamicina (30µg) e amicacina (30µg); (2) fluorquinolonas: ciprofloxacina (5µg) e norfloxacina (10µg); (3) tetraciclinas: doxiciclina (30µg) e tetraciclina (30µg); (4) fenicóis: cloranfenicol (30µg); (5) cefalosporinas de terceira geração: ceftazidime (30µg), ceftriaxona (30µg) e cefotaxime (30µg); (6) cefalosporinas de quarta geração: cefepime (30µg); (7) inibidor da via do folato: trimetoprim+sulfametaxazole (25µg); (8) carbapenem: imipinem (10µg); (9) monobactams: azteronan (30µg) (10) quinolona: ácido nalidíxico (30µg); (11) penicilinas: ampicilina (10µg) e amoxicilina (10µg); (12) combinação de

TABELA 5 - GENES PESQUISADOS, SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS, REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) UTILIZADAS E TAMANHO ESPERADO DOS PRODUTOS PARA DETERMINAÇÃO DE VIRULÊNCIA E DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE YERSINIA ENTEROCOLITICA.

Gene alvo	Sequência do primer ^{5'} - 3'	Protocolo de Amplificação					Tamanho do produto (pb)
		Desnaturação Inicial	Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão final	
<i>ail</i> ^a	FW: GGC CAT CTT TCC GCA TCA AC RV: CTG CCC CGT ATG CCA TTG A	95°C/5min	30	95°C/40s	58°C/40s	72°C/60s 72°C/8 min	129
<i>ystB</i>	FW: GGA CAC CGC ACA GCT TAT ATT RV: TGA CTC TGG TGC CCT CTT TT						198
<i>Virf</i> ^b	FW: TCA TGG CAG AAC AGC AGT CAG RV: ACT CAT CTT ACC ATT AAG AAG	94°C/10min	30	94°C/30s	55°C/60s	72°C/120s 72°C/10 min	591
<i>myfA</i> ^b	FW: CAG ATA CAC CTG CCT TCC ATC T RV: CTC GAC ATA TTC CTC AAC ACG C	94°C/10min	35	94°C/60s	58°C/110s	72°C/110s 72°C/10 min	272
<i>yastA</i> ^b	FW: ATC GAC ACC AAT AAC CGC TGA G RV: CCA ATC ACT ACT GAC TTC GGC T	94°C/10min	25	94°C/5s	61°C/30s	72°C/30s 72°C/10 min	79
<i>ystC</i> ^b	FW: GAG GCT GAG TGC GG RV: GCA GGA TTG CAA CA	94°C/10min	30	94°C/60s	38°C/60s	72°C/60s 72°C/10 min	83
<i>fepA</i> ^b	FW: F - TAC GCC AAA ATA CCT TAC GAT RV: TGT AAA TAC ACC CCC ACC TGA	94°C/10min	30	94°C/60s	56°C/60s	72°C/60s 72°C/10 min	438
<i>fepD</i> ^b	FW: GTG TGA TTG CCT TAC TAT TG RV: CGG TCA TCC TTT TAT TAC GG	94°C/10min	30	94°C/60s	55°C/60s	72°C/60s 72°C/10 min	381
<i>fes</i> ^b	FW: GCC GGC AGG CAC AGC GTA AT RV: GGC CAA CCC ACC CAA AAC TT	94°C/10min	30	94°C/60s	58°C/60s	72°C/60s 72°C/10 min	561
<i>tccC</i> ^b	FW: GGG CAA AAA ATG CGT GAA GAG AG RV: TTT ACC GGA ATA ACG CAC AGT TTT A	94°C/10min	30	94°C/60s	51°C/110s	72°C/110s 72°C/10 min	1035
<i>ymoA</i> ^b	FW: GAC TTT TCT CAG GGG AAT AC RV: GCT CAA CGT TGT GTG TCT	94°C/10min	30	94°C/60s	50°C/60s	72°C/60s 72°C/10 min	330
<i>hrep</i> ^b	FW: GCC GCT ATG GTG CCT CTG GTG TG RV: CCC GCA TTG ACT CGC CCG TAT C	94°C/10min	35	94°C/60s	60°C/60s	72°C/60s 72°C/10 min	757
<i>yfhD</i> ^c	FW: CGT CTT CTA CCA TCT CAC TG RV: ACT GCC AGT TAG CAC AAT AA	95°C/5min	35	95°C/30s	50°C/30s	72°C/60s 72°C/5 min	632
<i>emrD</i> ^c	FW: AAC CAT TTA CGT TCC TGT TG RV: CGC GGT CTG ATA ACA ARA AG	95°C/5min	35	95°C/30s	52°C/30s	72°C/60s 72°C/5 min	551
<i>marC</i> ^c	FW: CCC CAT AAA ATC AGC GAA AC RV: CAA ACC CAT TAA CGA TG	95°C/5min	35	95°C/60s	54°C/30s	72°C/60s 72°C/5 min	460
<i>sat</i> ^b	FW: CCG ATG GTG GGG TTT TCT CAA G RV: GGG ATT ACC GCC GAC CAC ACT A	94°C/10min	30	94°C/60s	55°C/60s	72°C/60s 72°C/10min	456

^a PCR multiplex descrito por Martins et al. (2018).

^b PCR individual obtido das informações compiladas no trabalho de Bhagat e Virdi, (2007).

^c PCR individual descrito por Martins et al. (2018). Fonte: a autora (2018)

inibidores da β -lactamase: amoxicilina+clavulanato (30 μ g). Os resultados foram interpretados de acordo com os padrões de susceptibilidade de enterobactérias, (CLSI, 2017). Além disso, o teste de sinergia de duplo disco (DDST) foi realizado para detectar a produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) (EUCAST, 2013).

Para a determinação genotípica de resistência a antimicrobianos, os isolados foram submetidos a PCR individuais para detecção dos genes *yfhD*, *emrD*, *marC* e *sat* (MARTINS et al., 2018; BHAGAT & VIRDI, 2007). Os protocolos utilizaram 12,5 μ L do Gotaq Green Master Mix (Promega), 200 nMol de cada *primer*, 1 μ L do DNA extraído e água livre de nuclease até completar 25 μ L. Os *primers* e condições de amplificação para cada gene alvo estão apresentadas na TABELA 5. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% e tampão de 0,5X Tris/Ácido Bórico/EDTA, corados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados em transiluminador L-PIX-HE (Loccus do Brasil) sob luz ultravioleta.

4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 800 amostras analisadas, 108 apresentaram crescimento de colônias características de *Y. enterocolitica* em ágar CIN, sendo que destas foram selecionados 307 isolados típicos. Após testes bioquímicos, 91 isolados, obtidos de 48 amostras, apresentaram perfil bioquímico compatível com *Y. enterocolitica*. Esses isolados foram submetidos a confirmação molecular, na qual somente três isolados, com origem de uma amostra de tonsila palatina, foram confirmados como *Y. enterocolitica* por amplificarem os genes *16srRNA* e *inv* (TABELA 6 e FIGURA 1).

Considerando os resultados apresentados foi verificado uma frequência de isolamento de *Y. enterocolitica* de 0,12% entre todas as amostras avaliadas e de 1% considerando somente as amostras de tonsilas palatinas. Os três isolados identificados como *Y. enterocolitica* apresentaram amplificação dos produtos de PCR para o gene *wbbu*, dessa forma foram caracterizados como pertencentes ao sorotipo O:3 (FIGURA 1).

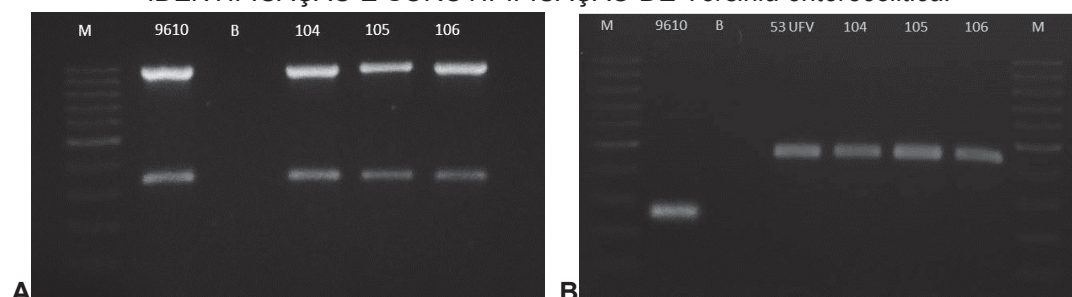
TABELA 6 – NÚMERO DE AMOSTRAS COM CRESCIMENTO DE COLÔNIAS TÍPICAS DE *Yersinia enterocolitica* EM ÁGAR CEFsulODIN-IRGASAN-NOVOBIOICIN (CIN) E NÚMERO DE COLÔNIAS ISOLADAS, NÚMERO DE AMOSTRAS E DE ISOLADOS SUGESTIVOS EM TESTES BIOQUÍMICOS E NÚMERO DE AMOSTRAS E DE ISOLADOS CONFIRMADOS POR PCR, OBTIDOS DE AMOSTRAS COLETADAS DE DIFERENTES PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS, ENTRE SET/2016 E FEV/2017, NO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ.

Amostra	N	NA/NB	NC/ND	NE/NF
Produção				
Overshoes (baia)	10	7/21	4/5	0/0
Ração	10	4/12	0/0	0/0
Água	10	4/12	2/6	0/0
Abate				
Overshoes (pocilga)	10	7/20	5/11	0/0
Carcaça (sangria)	100	0/0	0/0	0/0
Carcaça (chamuscamento)	100	2/3	0/0	0/0
Carcaça (evisceração)	100	0/0	0/0	0/0
Carcaça (lavagem final)	100	1/3	0/0	0/0
Tonsilas palatinas	100	52/149	25/40	1/3
Linfonodos mesentéricos	100	19/55	12/29	0/0
Processamento				
Faca AP	20	1/3	0/0	0/0
Faca DP	20	1/3	0/0	0/0
Luva AP	20	1/2	0/0	0/0
Luva DP	20	2/6	0/0	0/0
Mesa AP	10	0/0	0/0	0/0
Mesa DP	10	2/5	0/0	0/0
Esteira AP	10	1/3	0/0	0/0
Esteira DP	10	0/0	0/0	0/0
Cortes in natura	40	4/10	0/0	0/0
Total	800	108/307	48/91	1/3

N – número de amostras coletadas; NA - número de amostras que apresentaram colônias típicas em ágar CIN; NB - número de isolados obtidos do ágar CIN; NC - número de amostras sugestivas nos testes bioquímicos; ND - número de isolados sugestivos nos testes bioquímicos; NE - número de amostras positivas na PCR para os genes *16s rRNA* e *inv*; NF - número de isolados positivos na PCR para os genes *16s rRNA* e *inv*. AP - antes do processamento; DP - durante o processamento

Fonte: a autora (2018).

FIGURA 1. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DE PCR PARA IDENTIFICAÇÃO E SOROTIPIFICAÇÃO DE *Yersinia enterocolitica*.



Legenda: (A) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR multiplex para os genes *16s rRNA* (330 pb) e *inv* (1009 pb), para identificação de isolados de *Y. enterocolitica*; (B) Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR multiplex para sorotipificação, através da detecção dos genes *per* (837 pb), *wbbU* (436 pb), *wbcA* (269 pb) e *wzt* (662 pb). M: 100 bp DNA ladder; 9610: *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* ATCC® 9610™; B: branco; 53UFV: cepa de *Y. enterocolitica* sorotipo O:3 previamente conhecida; 104, 105 e 106: identificação dos isolados. Fonte: a autora (2018).

Apesar da baixa frequência de isolamento, a identificação de *Y. enterocolitica* em amostra de tonsila palatina condiz com os dados da literatura, que apontam esse tecido linfático como o local de maior detecção do patógeno (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014; VAN DAMME, et al., 2015; FONDREVEZ et al., 2014). A presença de *Y. enterocolitica* nas tonsilas de suínos é considerada como um dos principais fatores de risco para a contaminação das carcaças e consequentemente do produto final (WILDEMANN et al., 2017).

A baixa frequência de isolamento de *Y. enterocolitica* em tonsilas de suínos ao abate também já foi reportada em outros estudos realizados em diversas regiões do Brasil. No Estado de São Paulo foi reportada ocorrência de 2,9% de *Y. enterocolitica* em tonsilas de suínos, na região oeste de Santa Catarina foi reportada ocorrência de 13,6% e 25,0% (apenas 0,2% de cepas patogênicas) e na região de Viçosa (MG) de aproximadamente 5% (SABA et al., 2013; BORTOLI et al., 2017; WILDEMANN et al., 2017; MARTINS et al., 2018).

Em outros países, principalmente no continente Europeu, são demonstradas prevalências elevadas de *Y. enterocolitica* em tonsilas de suínos. Aproximadamente 93,0% na Espanha, 89,0% na Estônia, 64,0% em Latvia, 44,0% na Inglaterra, 32,0% na Itália, 13,7% na França, 52,0% na Finlândia, 37,0% e 44,0% na Bélgica, 34,0% na Rússia, 88,0% na Suíça e de 58,0% e 70,0% no sul da Alemanha (tonsilas e fezes de suínos) (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; BUCHER et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009; MARTINEZ, et al., 2010; VAN DAMME et al., 2010; MARTINEZ et al., 2011; FONDREVEZ, et al., 2014). Na China e Estados Unidos a prevalência de *Y. enterocolitica* em tonsilas de suínos é de 22,0% e 10%, respectivamente (WESLEY et al., 2008; LIANG et al., 2012).

Contudo, cabe destacar que diferenças significativas no nível de detecção de *Y. enterocolitica* podem ocorrer de acordo com o método de detecção e isolamento utilizado (HALLANVUO, 2009; ZADERNOWSKA et al., 2014). As técnicas de PCR convencional e de PCR em tempo real de amostras cultivadas em caldos de pré-enriquecimento têm mostrado maior capacidade de detecção de *Y. enterocolitica* do que o cultivo em placas. Autores já demonstraram que apesar de *Y. enterocolitica* estar presente nas

amostras nem sempre é capaz de formar colônias nos meios sólidos, o que reduz a sensibilidade dos métodos convencionais de detecção (TEODORO et al., 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; BARI et al., 2011).

Na União Europeia *Y. enterocolitica* é considerada um patógeno emergente devido ao elevado número de notificações de casos de yersiniose verificados na última década. Nesses países a yersiniose tem ocupando a terceira posição entre as zoonoses de origem alimentar mais reportadas aos órgãos de vigilância (EFSA, 2017). Estima-se que 70% dos casos estejam relacionados com o consumo da carne suína contaminada (FOSSE, 2008). No Brasil, entretanto, não existem dados oficiais a respeito da ocorrência de yersiniose em humanos.

A carga microbiana competidora pode exercer papel inibidor para *Y. enterocolitica*. Estudos demonstram que a prevalência sorológica de *Y. enterocolitica* apresenta uma relação inversamente proporcional ao status sorológico de *Salmonella* spp. nos rebanhos suínos. Dessa forma, a tendência é que em rebanhos de categoria de baixo risco para *Salmonella* spp. a prevalência de *Y. enterocolitica* seja elevada (VON ALTROCK et al., 2011; NATHUES, et al., 2013). Tendo em vista a alta prevalência de *Salmonella* spp. nos rebanhos de suínos no Brasil, principalmente na região sul, esse pode ter sido um importante fator para o baixo isolamento de *Y. enterocolitica* na presente pesquisa (BESSA et al., 2004; CASTAGNA et al., 2004; KICH et al., 2005; SCHWARZ et al., 2009; KICK & SOUZA, 2015).

Estudos indicam que variações sazonais podem contribuir para o isolamento de *Y. enterocolitica*, de forma que esse patógeno seja mais prevalente durante o inverno ou período frio do que no verão ou período quente (ONG et al., 2012; LAUKKANEN-NINIOS et al., 2014; LIANG et al., 2010; MARTINEZ et al., 2010). Na região oeste do Paraná, no verão podem ser registradas temperaturas superiores a 35 °C, período no qual a presente pesquisa foi realizada (GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2018). Dessa forma, pode-se sugerir que as condições climáticas observadas no momento da coleta das amostras tenham exercido influência para o baixo isolamento de *Y. enterocolitica*.

Contudo, deve-se levar em consideração que estudos realizados na França e na Finlândia demonstraram resultados divergentes a essa hipótese,

nos quais *Y. enterocolitica* foi mais prevalente nas estações mais quentes do ano (FONDREVEZ et al., 2014; IBANEZ et al., 2016). Esses resultados demonstram que a relação entre as variações sazonais e a prevalência de *Y. enterocolitica* ainda não está bem estabelecida e que mais estudos são necessários para comprová-la.

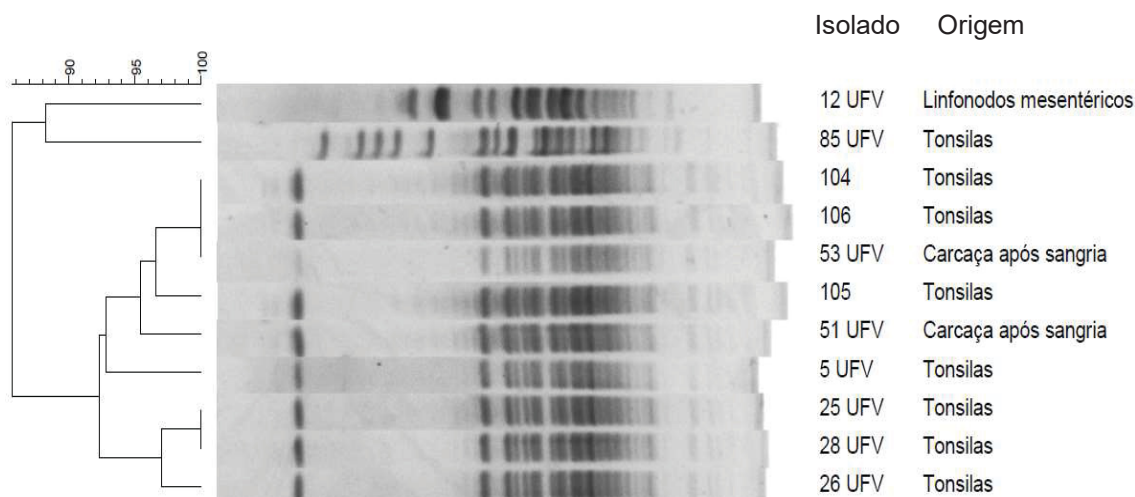
O sorotipo de *Y. enterocolitica* mais prevalente em humanos e animais na Europa, Estados Unidos, China e Brasil é o O:3 (FALCÃO et al., 2006; WANG et al., 2008; WESLEY, 2008; LIANG et al., 2012; GARZETI, et al., 2014; BOTTONE, 2015; EFSA, 2017), sendo que o mesmo sorotipo foi identificado nos três isolados obtidos nesta pesquisa (isolados codificados como 104, 105 e 106). Martins et al. (2018) ao avaliarem amostras coletadas em diferentes etapas da cadeia produtiva de suínos na região de Viçosa (MG) também observaram a prevalência do sorotipo O:3.

Os perfis de macrorrestrição dos isolados 104, 105 e 106 de *Y. enterocolitica* foram comparados aos perfis de oito isolados obtidos de amostras de suínos coletadas na região de Viçosa – MG (MARTINS et al., 2018). Esses isolados foram agrupados em dois *clusters* com identidade variando entre 88% e 92%, apresentando, de maneira geral, alto grau de similaridade genética entre eles. Os três isolados obtidos no Paraná foram agrupados em um único *cluster*, juntamente com seis isolados obtidos em Minas Gerais, esse *cluster* apresentou 92% de similaridade. Perfis clonais foram observados entre as amostras 104, 106 e 53UFV (FIGURA 2).

A identificação do mesmo sorotipo O:3 e a alta similaridade genética entre os isolados obtidos no estado do Paraná e no estado de Minas Gerais indicam uma baixa variabilidade genética nas cepas de *Y. enterocolitica* do sorotipo O:3 circulantes entre essas duas regiões. Esse resultado corrobora com o reportado por Rusak et al. (2014), que ao realizarem a análise de PFGE de bio-sorotipos de *Y. enterocolitica* provenientes de suínos, alimentos e pacientes clínicos no Brasil, observaram a formação de nove *clusters* com mais de 87% de similaridade e todos os isolados pertencentes ao bio-sorotipo 4/O:3 foram agrupados em apenas um desses *clusters* (RUSSAK et al., 2014). A identificação o sorotipo O:3 em amostras de suínos, alimentos e humanos reforça o papel importante que o suíno exerce

na epidemiologia das infecções em humanos causada por *Y. enterocolitica* 4/O:3 (FALCAO et al., 2006; RUSSAK et al., 2014).

FIGURA 2. PADRÕES DE PFGE APÓS A MACRORRESTRIÇÃO (ENZIMA XBAI) DOS ISOLADOS DE *Yersinia enterocolitica* OBTIDOS DAS AMOSTRAS COLETADAS DE SUÍNOS NO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ, COMPARADOS A OITO ISOLADOS DE *Yersinia enterocolitica* COLETADOS DE SUÍNOS NA REGIÃO DE VIÇOSA, MINAS GERAIS (UFV).



Legenda: UFV – cepas obtidas na região de Viçosa – MG. As similaridades entre os pulsotipos de PFGE identificados foram estimadas usando o coeficiente de Dice (5% de tolerância). Fonte: a autora (2018).

Os isolados de *Y. enterocolitica* obtidos nesta pesquisa apresentaram resultados positivos para os genes de virulência *inv*, *ail*, *ystA*, *myfA*, *hrep*, *ymoA*, *tccC* e *virF* e negativos para os genes *ystB*, *ystC*, *fepA*, *fepD* e *fes* (TABELA 7). A presença desses genes demonstra o potencial patogênico dos isolados.

O gene *virF* indica a presença do plasmídeo de virulência (pYV), o qual é responsável por codificar um dos principais fatores de patogenicidade de *Y. enterocolitica*, o sistema de secreção de tipo III (HALLANVUO, 2009; SABINA, 2011; ZADERNOWSKA et al., 2014). Além da presença do plasmídeo de virulência, uma série de genes codificados no cromossomo são necessários para *Y. enterocolitica* poder expressar sua virulência total (REVELL & MILLER, 2001; SABINA, 2011).

Dentre os genes cromossômicos de virulência estão o *inv*, *ail*, *ystA*, *myfA*, *hrep*, *ymoA*, *tccC*. Esses genes codificam proteínas que atuam em sinergia para que ocorra a adesão, internalização e produção de moléculas necessárias a atividade enterotóxica e para contornar o sistema imune do

hospedeiro (REVELL & MILLER et al., 2001; HEUSIPP et al., 2001; FALCÃO et al., 2006; SABINA, 2011; DRUMMOND et al., 2012; BOTTONE, 2015). A ausência dos genes *fepA*, *fepD* e *fes* indica que os isolados obtidos nesse estudo possuem capacidade limitada para a utilização do ferro, fator essencial ao desenvolvimento da maioria dos micro-organismos (SCHUBERT et al., 1999).

Com relação ao perfil genotípico de resistência aos antimicrobianos, todos os isolados apresentaram resultados positivos para os genes *yfhD*, *emrD* e *marC*, que estão relacionados com a multirresistência de *Y. enterocolítica* (MARTINS et al., 2018). Assim como possuíam em seu material genético o gene *sat*, relacionado à expressão de uma enzima de resistência antimicrobiana contra estreptograminas (virginiamicina), antimicrobiano utilizado como aditivo na alimentação animal (SEOANE & LOBO, 2000; BHAGAT & VIRDI, 2007) (TABELA 7).

TABELA 7 - RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA NOS ISOLADOS DE *Yersinia enterocolítica* OBTIDOS DE UMA AMOSTRA DE TONSILA PALATINA DE SUÍNO.

Função	Localização	Genes alvo	Identificação do Isolado		
			104	105	106
Virulência	Cromossomo	<i>Inv</i>	+	+	+
		<i>Ail</i>	+	+	+
		<i>ystA</i>	+	+	+
		<i>ystC</i>	-	-	-
		<i>myfA</i>	+	+	+
		<i>hreP</i>	+	+	+
		<i>fepA</i>	-	-	-
		<i>fepD</i>	-	-	-
		<i>fes</i>	-	-	-
		<i>ymoA</i>	+	+	+
		<i>tccC</i>	+	+	+
		<i>virF</i>	+	+	+
Resistência	Cromossomo	<i>yfhD</i>	+	+	+
		<i>emrD</i>	+	+	+
		<i>marC</i>	+	+	+
		<i>sat</i>	+	+	+

Legenda: (+) reação positiva; (-) reação negativa. Fonte: a autora (2018).

Quanto ao perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos os isolados de *Y. enterocolítica* 104 e 105 apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, amoxicilina e ampicilina, e resistência intermediária a ciprofloxacina e sulfa+trimetoprim. O isolado 106 demonstrou resistência a amoxicilina, ampicilina e cefotaxima; e resistência intermediária a

ciprofloxacina, amoxicilina+clavulanato e imipinem. Os três isolados foram sensíveis aos demais antimicrobianos testados (TABELA 8).

TABELA 8 - PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE TRÊS ISOLADOS DE *Yersinia enterocolitica* OBTIDOS DE UMA AMOSTRA DE TONSILA PALATINA DE SUÍNOS.

Classe	Antimicrobiano	Isolado		
		104	105	106
Fenicóis	Cloranfenicol (30µg)	S	S	S
	Ceftazidime (30µg)	S	S	S
Cefalosporina de III geração	Ceftriaxona (30µg)	S	S	S
	Cefotaxima (30µg)	S	S	R
Cefalosporina de IV geração	Cefepime (30µg)	S	S	S
	Kanamicina (30µg)	S	S	S
Aminoglicosídeo	Gentamicina (10µg)	S	S	S
	Amikacina (30µg)	S	S	S
Fluorquinolona	Ciprofloxacina (5µg)	I	I	I
	Norfloxacina (10µg)	S	S	S
Quinolona	Ácido nalidíxico (30µg)	R	R	S
Tetraciclina	Doxiciclina (30µg)	S	S	S
	Tetraciclina (30µg)	S	S	S
Inibidor do folato	Sulfa+trimetoprim (25µg)	I	I	S
Penicilina	Amoxicilina (10µg)	R	R	R
	Ampicilina (10µg)	R	R	R
B-lactâmicos	Amoxicilina+Clavulanato (30µg)	S	S	I
Monobactams	Azteronan (30µg)	S	S	S
Carbapenem	Imipinem (10µg)	S	S	I

Legenda: S – sensível; I – sensibilidade intermediária; R – resistente. Fonte: a autora (2018).

Os isolados mostraram-se sensíveis aos grupos de antimicrobianos que a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda para o tratamento de yersiniose, sejam eles: tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina e cefalosporinas de terceira geração (FÀBREGA & VILA, 2012). Contudo foi verificada resistência intermediária a ciprofloxacina, um antimicrobiano pertencente a classe das fluorquinolonas que também é considerado pela OMS um dos principais antimicrobianos de eleição para o tratamento da yersiniose (FÀBREGA & VILA, 2012). A resistência de *Y. enterocolitica* ao ácido nalidíxico, outra quinolona, também já foi recentemente demonstrada, e acredita-se que esteja relacionada com algum mecanismo de mutação cromossômica (CAPILLA et al., 2004; FÀBREGA & VILA, 2010; FÀBREGA & VILA, 2012; FRAZÃO et al., 2017; MARTINS et al., 2018).

A resistência à ampicilina e amoxicilina já era esperada, uma vez que essa é uma característica intrínseca de *Y. enterocolitica* (CLSI, 2017). Bem como a sensibilidade de *Y. enterocolitica* aos antimicrobianos das

classes aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e cefalosporinas de espectro estendido, aos quais *Y. enterocolitica* usualmente é sensível (FRAZÃO et al., 2017). O isolado 106 apresentou resistência a cefotaxima, uma cefalosporina de espectro estendido e, por isso, foi avaliado quanto a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), enzima que possui a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta geração (EUCAST, 2013). Contudo, o isolado não apresentou resultado característico de sinergia de duplo disco, sendo considerado negativo para a produção de tal enzima.

Estudos recentes têm demonstrado cada vez mais o isolamento de cepas de *Y. enterocolitica* multirresistentes a antimicrobianos (MEYER et al., 2011; YE et al., 2016; FRAZÃO et al., 2017; MARTINS et al., 2018). Todos os isolados desta pesquisa apresentaram perfil genotípico de multirresistência. Ainda, o isolado 106 demonstrou resistência a antimicrobianos de pelo menos três classes distintas, podendo ser classificado como um isolado multirresistente (SHWARZ et al., 2010).

Cabe destacar que o uso indiscriminado dos antimicrobianos na produção animal, para promoção do crescimento e profilaxia em massa, é uma das principais causas para o desenvolvimento de resistência (VAN BOECKEL et al., 2017). O consumo de antimicrobianos na cadeia produtiva de suínos é um dos maiores em comparação aos demais sistemas de produção animal (VAN BOECKEL et al., 2015). Tendo em vista a forte ligação epidemiológica entre *Y. enterocolitica* e a cadeia produtiva de carne suína, o monitoramento acerca do desenvolvimento de AMR pode ser considerado fundamental para fins de controle de resistência antimicrobiana, medidas de segurança alimentar e para o tratamento de yersiniose em humanos (FRAZÃO et al., 2017).

4.7 CONCLUSÃO

Este trabalho reporta a baixa ocorrência de *Y. enterocolitica* na cadeia produtiva de suínos na região oeste do Paraná e a sua baixa variabilidade genética em isolados do sorotipo O:3 circulantes entre os estados do Paraná e Minas Gerais. Apesar da baixa ocorrência de *Y.*

enterocolítica, foram identificados genes que codificam importantes fatores de virulência de *Y. enterocolítica*, demonstrando o potencial patogênico desses isolados. Ainda, as cepas apresentaram resistência a importantes antimicrobianos utilizados no tratamento de yersiniose, bem como perfil genotípico de multirresistência a antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ABCS. Associação Brasileira de Criadores de Suínos. **Produção de Suínos: teoria e prática** (1ª Edição). ABCS, Brasília, DF, p. 908, 2014.
- BANCERZ-KISIEL, A.; SAWEDA, W. Yersiniosis – a zoonotic foodborne diseases of relevance to public health. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.22, n.3, p.307-402, 2015.
- BARI, L.; HOSSAIN, A.; ISSHIKI, K.; UKUKU, D. Behavior of *Yersinia enterocolítica* in foods. **Journal of Pathogens**, p. 1-13, 2011.
- BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, 2016.
- BESSA, C. B.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.
- BHAGAT, N.; VIRDI, J.S. Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolítica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, p. 177-183, 2007.
- BORTOLI, E. S.; BORTOLI, W.; SFACIOTTE, R. A. P.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Pesquisa de *Yersinia enterocolítica* em suínos abatidos no meio oeste de Santa Catarina. **Archives of Veterinary Science**, v.22, n.1, p.40-48, 2017.
- BOTTELDOORN, N.; HEYNDRICKX, M.; RIJPENS, N.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p.891-903, 2003.
- BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolítica*: Revisitation of an enduring human pathogen. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 32, n.1, 2015.
- BUCHER, M.; MEYER, C.; GROTZBACH, B.; WACHECK, S.; STALLE, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA. Epidemiological Data on Pathogenic *Yersinia enterocolítica* in Southern Germany During 2000-2006. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 3, p. 273-280, 2008.

CAPILLA, S.; RUIZ, J.; GOÑI, P.; CASTILLO, J.; RUBIO, M. C.; JIMÉNEZ DE ANTA, M. T.; GÓMEZ-LUS, R.; VILA, J. Characterization of the molecular mechanisms of quinolone resistance in *Yersinia enterocolitica* O:3 clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, p.1068-71, 2004.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. R. I. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p 141-147, 2004.

CLSI. The Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th edition. **CLSI supplement M100-S26**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2017.

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

D'SILVA, J. **Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing**, p. 17, 2000. Disponível em: <https://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm_docs/2008/f/factory_farming_and_developing_countries_2000.pdf> Acesso em: 15 mai. 2017.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n.12, 2017.

EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance**. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden, 2013.

FÀBREGA, A.; ROCA, I.; VILA, J. Fluoroquinolone and multidrugresistance phenotypes associated with the overexpression of *AcrAB* and an orthologue of *MarA* in *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.457–63, 2010.

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

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

FONDREVEZ, M.; MINVIELLE, B.; LABBÉ, A.; HOUDAYER, C.; ROSE, N.; ESNAULT, E.; DENIS, M. Prevalence of pathogenic *Yersinia*

enterocolitica in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. **International Journal of Food Microbiology**, v.174, p.56-62, 2014.

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

FRAZÃO, M.R.; ANDRADE, L.N.; DARINI, A.L.C.; FALCÃO, J. P. Antimicrobial resistance and plasmid replicons in *Yersinia enterocolitica* strains isolated in Brazil in 30 years. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.21, n.4, p.44-480, 2017.

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, p.207-12, 2007.

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

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. **Clima do Paraná**. 2018. Disponível em: <<http://www.turismo.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=393>> Acesso em: 02. Mai 2018.

HALLANVUO, S. **Foodborne *Yersinia*: Identification and molecular epidemiology of isolates from human infections**. 131f. Dissertação - Helsinki University Print, Helsinki, Finlândia, 2009.

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

IBANEZ, T. R.; LAUKKANEN-NINIOS, R.; HAKKINEN, M.; JOHANSSON, T.; VILAR, M.; KORKEALA, H. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Finnish Slaughter Pigs. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p. 677-681, 2016.

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **ISO 10273**. ISO, Geneva, 2003.

KICH, J. D.; MORES, N.; PIFFER, I, A.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L.; CARDOSO, M. Fatores associados a soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 398-405, 2005.

KICH, J. D.; SOUZA, J. C. P. V. B. **Salmonela na suinocultura brasileira: do problema ao controle**. 186p. Brasília, DF. Embrapa, 2015.

LAUKKANEN, R.; MARTI, P. O.; SIEKKINEN, K.; RANTA, J. Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5444-5450, 2008.

LAUKKANEN, R.; MARTÍNEZ, P. O.; SIEKKINEN, K. M.; RANTA, J.; MAIJALA, R.; KORKEALA, H. Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.6, p.681-688, 2009.

LAUKKANEN-NINIOS, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H. Enteropathogenic *Yersinia* in the pork production chain: challenges for control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1165-1191, 2014.

LIANG, J.; WANG, X.; XIAO, Y.; CUI, Z.; XIA, S.; HAO, Q.; YANG, J.; LUO, L.; WANG, S.; LI, K.; YANG, H.; GU, W.; XU, J.; KAN, B.; JING, H. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2949–56, 2012.

MARTINEZ, P. O.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; YULIA SOKOLOVA, Y.; ROASTO, M.; BERZINS, A.; KORKEALA, H. Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad Region) Pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.6, 2009.

MARTINEZ, P. O.; MYLONA, S.; DRAKE, I.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; CORRY, J. E. L. 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.

MARTINEZ, P. O.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; PALLOTTI, A.; ROSMINI, R.; HOUF, K.; KORKEALA, H. Variation in the Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in Slaughter Pigs from Belgium, Italy, and Spain. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.3, 2011.

MARTINS, B. T. F.; BOTELHO, C. V.; SILVA, D. A. L.; LANNA, F. G. P. A.; GROSSI, J. R.; CAMPOS-GALVAO, M. E. M.; YAMATOOGI, R. S.; FALCAO, J. P.; BERSOT, L. S.; NERO, L. A. *Yersinia enterocolitica* in a Brazilian pork production chain: Tracking of contamination routes, virulence and antimicrobial resistance. **Intenational Journal of Food Microbiology**, v. 276, p. 5-9, 2018.

MEDICI, D. D.; CROCI, L.; DELIBATO, E.; PASQUALE, S. D.; FILETII, E.; TOTI, L. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella entérica* Serotype Enteritidis in Poultry. **Applied and enEironmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 34566-3461, 2003.

MEYER, C.; STOLLE, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA. Comparison of Broth Microdilution and Disk Difusion Tesr for Antimicrobial Resistance Testing in *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 Strains. **Mticrobial Drug Resistance**, v. 17, n. 3, p. 479-484, 2011.

NATHUES, C.; GRUNING, P.; FURTH, A.; VERSPOHL, J.; BLAHA, T.; KREIENBROCK, L.; MERLE, R. *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella enterica* and their simultaneous occurrence in German fattening pig herds and their environment. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 10, p. 1704-1711, 2013.

PAIXÃO, R.; MORENO, L. Z.; SENA DE GOBBI, D. D.; RAIMUNDO, D. C.; HOFER, E.; MATTE, M. H.; FERREIRA, T. S. P.; de MOURA GOMES, V. T.; COSTA, B. L. P.; MORENO, A M. Characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and markets. **The Scientific World Journal**, 2013.

PERUZY, M.F.; MURRU, N.; PERUGINI, A.G.; CAPUANO, F.; DELIBATO, E.; MERCOGLIANO, F.; KORKEALA, H.; THERESE, Y.; PROROGA, R. Evaluation of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains using SYBR Green real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 65, p.231-235, 2017.

POLJAK, Z.; DEWEY, C. E.; MARTIN, S. W.; ROSENDAL, T.; CHRISTENSEN, J.; CIEBIN, B.; FRIENDSHIP, R. M. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* shedding and bio-serotype distribution in Ontario finisher pig herds in 2001, 2002, and 2004. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 110-120, 2010.

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

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59–67, 2006.

RUSAK, L. A.; MOURA FALAVINA DOS REIS, C.; BARBOSA, A. V.; SANTOS, A.F.M.; PAIXAO, R.; HOFER, E.; VALLIM, D. C.; ASENSI, M.D. 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.

SABA, R. Z. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em suínos ao abate. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 4, p. 92, 2013.

SABINA, Y.; RAHMAN, A.; RAY, R. C.; MONTET, D. *Yersinia enterocolitica*: mode of transmission, molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. **Journal of Phatogens**, 2011.

- SCHUBERT, S.; FISCHER, D.; HEESEMANN, J. Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6387–6395, 1999.
- SCHWARZ, P.; CALVEIRA, A.; SELLA, A.; BESSA, M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; CARDOSO, M. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1028-1034, 2009.
- SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMIJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W.; Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 65, p. 601-604, 2010.
- SEOANE, A.; LOBO, J. M. G. Identification of a Streptogramin A Acetyltransferase Gene in the Chromosome of *Yersinia enterocolitica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 905-909, 2000.
- SOMMER, M.O.A; MUNCK, C.; TOFT-KEHLER, R.V.; ANDERSSON, D.I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm?. **Nature Reviews Microbiology**, v.15, p. 689-696, 2017.
- TENNANT, S. M.; SKINNER, N.A.; JOE, A.; ROBINS-BROWNE, R. Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and their contribution to virulence. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p.6860-6867, 2005.
- TEODORO, V. A. M.; PINTO, P. S. A.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; MORAES, M. P.; PINTO, M. S. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.9-14, 2006.
- USDA, United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade 2017**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acesso em: 02 fev. 2018.
- VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 16, p. 1–6, 2015.
- VAN BOECKEL, T. P.; GLENNON, E.E.; CHEN, D.; GILBERT, M.; ROBINSON, T.P.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; BONHOEFFER, S.; LAXMINARAYAN, S. Reducing antimicrobial use in food animals. **Science**, vol. 357(6358), p. 1350-1352, 2017.
- VAN DAMME, I.; HABIB, I.; DE ZUTTER, L. *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. **Food Microbiology**, v. 27, p.158–161, 2010.

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

VON ALTROCK, A.; ROESLER, U.; WALDMANN, K-H. Herd Factors Associated with the Serological *Yersinia* Prevalence in Fattening Pig Herds. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 12, p. 1249-1255, 2011.

WANG, W.; QUI, H.; JIN, D.; CUI, Z.; KAN, B.; XIAO, Y.; XU, Y.; XIA, S.; WANG, H.; YANG, J.; WANG, X.; HU, W.; XU, J.; JING, H. O:8 serotype *Yersinia enterocolitica* strains in China. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.259-266, 2008.

WILDEMANN, P.; GAVA, D.; SFACIOTTE, R.A.P.; MELO, F.D.; FERRAZ, S.M.; COSTA, U. M.; VAZ, E.K. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils at slaughter in Southern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 2017.

WESLEY, I. V.; BHADURI, S.; BUSH, E. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Market Weight Hogs in the United States. **Journal of Food Protection**, v.71, n.6, p.1162-1168, 2008.

YE, Q.; WU, Q.; HU, H.; ZHANG, J.; HUANG. Prevalence and characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail food in China. **Food Control**, v. 61, p. 20-27, 2016.

ZADERNOWSKA, A.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. *Yersinia enterocolitica*: A Dangerous, But Often Ignored, Foodborne Pathogen. **Food Reviews International**, v.30, p. 53-70, 2014.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o baixo isolamento de *Y. enterocolitica* observado nesta pesquisa associado ao levantamento bibliográfico realizado a partir de estudos conduzidos em diversos estados brasileiros, pode-se considerar que, com relação à *Y. enterocolitica*, os suínos e seus produtos representam atualmente baixo risco para a saúde pública no país. Contudo, o desenvolvimento de mais pesquisas visando identificar a prevalência nacional do patógeno ainda são necessárias, bem como a identificação com maior precisão da associação entre a prevalência de outros patógenos, como *Salmonella spp.* e a presença de *Y. enterocolitica*, visto que essa informação poderia esclarecer melhor a relação competitiva desse patógeno. Ainda, avaliações mais direcionadas ao efeito exercido pelas variações climáticas sobre a prevalência de *Y. enterocolitica* também poderiam contribuir para elucidar sua epidemiologia.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2017**. ABPA, São Paulo, SP, p. 68, 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf> Acesso em: 10 fev. 2018.
- ABCS. Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Mapeamento da suinocultura brasileira**. Serviço de Apoio as Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE, Brasília, DF, 216. Disponível em: <http://www.abcs.org.br/attachments/-01_Mapeamento_COMPLETO_bloq.pdf> Acesso em: 24 abr. 2018.
- AUTENRIETH, I.B.; R. FIRSCHING. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. **Journal of Medical Microbiology**, v.44, p.285-294, 1996.
- BAER, A. A.; MILLER, M. J.; DIGLER, A. C. Pathogens of interest to the pork industry: a review of research on interventions to assure food safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 183-217, 2013.
- BANCERZ-KISIEL, A.; SAWEDA, W. Yersiniosis – a zoonotic foodborne diseases of relevance to public health. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.22, n.3, p.307-402, 2015.
- BARI, L.; HOSSAIN, A.; ISSHIKI, K.; UKUKU, D. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in foods. **Journal of Pathogens**, p. 1-13, 2011.
- BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 303–307, 2001.
- BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, 2016.
- BESSA, C. B.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.
- BHAGAT, N.; VIRDI, J.S. Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, p. 177-183, 2007.
- BHADURI, S.; WESLEY, I. V.; BUSH, E.J. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains in Pigs in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v71, n.11, p. 7117–7121, 2005.
- BONARDI, S.; BASSI, L.; BRINDANI, F.; D'INCAU, M.; BARCO, L.; CARRA, E.; PONGOLINI, S. Prevalence, characterization and antimicrobial

susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p.248-257, 2013.

BORTOLI, E. S.; BORTOLI, W.; SFACIOTTE, R. A. P.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos no meio oeste de Santa Catarina. **Archives of Veterinary Science**, v.22, n.1, p.40-48, 2017.

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

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

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an enduring human pathogen. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 32, n.1, 2015.

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

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

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n.º 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamento técnico de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 2017.

BUCHER, M.; MEYER, C.; GROTZBACH, B.; WACHECK, S.; STALLE, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA. Epidemiological Data on Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany During 2000-2006. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 3, p. 273-280, 2008.

CAPILLA, S.; RUIZ, J.; GOÑI, P.; CASTILLO, J.; RUBIO, M. C.; JIMÉNEZ DE ANTA, M. T.; GÓMEZ-LUS, R.; VILA, J. Characterization of themolecular mechanisms of quinolone resistance in *Yersinia enterocolitica* O:3 clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, p.1068-71, 2004.

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

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. R. I. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p 141-147, 2004.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)**. Disponível em <<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>> Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. ***Yersinia enterocolitica***. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/yersinia/>> Acesso em: 12 de janeiro de 2018.

CLSI. The Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th edition. **CLSI supplement M100-S26**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pensylvania, USA, 2017.

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

D'SILVA, J. **Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing**, p. 17, 2000. Disponível em: <https://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm_docs/2008/f/factory_farming_and_developing_countries_2000.pdf> Acesso em: 15 mai. 2017.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM Press. Whashington, DC, 1997.

EFSA. European Food Safety Authority. Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp.: Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. **The EFSA Journal**, v.595, p.1-30, 2007.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n.12, 2017.

EL TAHIR, Y.; SKURNIK, M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesion. **International Journal of Medical Microbiology**, v.291, p.209-218, 2001.

EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance.** European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Sweden, 2013.

EUROPEAN COMMISSION. **Food: From farm to statistics**, p. 170, 2011. Disponível em: <
<http://ec.europa.eu/eurostat/documents/3930297/5966590/KS-32-11-743-EN.PDF>> Acesso em: 14 mai. 2017.

FÀBREGA, A.; ROCA, I.; VILA, J. Fluoroquinolone and multidrugresistance phenotypes associated with the overexpression of *AcrAB* and an orthologue of MarA in *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.457–63, 2010.

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

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

FONDREVEZ, M.; MINVIELLE, B.; LABBÉ, A.; HOUDAYER, C.; ROSE, N.; ESNAULT, E.; DENIS, M. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. **International Journal of Food Microbiology**, v.174, p.56-62, 2014.

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

FRAZÃO, M.R.; ANDRADE, L.N.; DARINI, A.L.C.; FALCÃO, J. P. Antimicrobial resistance and plasmid replicons in *Yersinia enterocolitica* strains isolated in Brazil in 30 years. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.21, n.4, p.44-480, 2017.

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

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

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.207-12, 2007.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; BUCHER, M.; HANK, C.; STOLLE, A.; KORKEALA, H. High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in Southern Germany: A slaughtering technique problem. **Systematic and Applied Microbiology**, v.24, p.457-463, 2011.

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

FUNK, J.A.; TROUTT, H.F.; DAVIS, S.A.; FOSSLER, C.P. In vitro susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from the oral cavity of swine. **Journal of Food Protection**, v. 63, p.395–9, 2000.

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

GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; SAKKAS, H.; LEVEIDIOTOU, S.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. **Foodborne Pathogens Diseases**, v.8, p.27–38, 2011.

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. **Clima do Paraná**. 2018. Disponível em: <<http://www.turismo.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=393>> Acesso em: 02. Mai 2018.

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

GURTLER, M. ALTER, T.; KASINMIR, S.; LENNEBUR, M.; FEHLHABER, K. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Fattening Pigs. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.850-854, 2005.

HALLANVUO, S. **Foodborne Yersinia: Identification and molecular epidemiology of isolates from human infections**. 131f. Dissertação - Helsinki University Print, Helsinki, Finlândia, 2009.

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

HURST, M. R. H.; JONES, S. A.; BINGLING, T.; HARPER, L. A.; JACKSON, T. A.; GLARE, T. R. The Main Virulence Determinant of *Yersinia entomophaga* MH96 Is a Broad-Host-Range Toxin Complex Active against Insects. **Journal of Bacteriology**, v.193, n.8, 2011.

IBANEZ, T. R.; LAUKKANEN-NINIOS, R.; HAKKINEN, M.; JOHANSSON, T.; VILAR, M.; KORKEALA, H. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Finnish Slaughter Pigs. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p. 677-681, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Animais abatidos e peso total das carcaças, segundo os meses - Brasil**. IBGE, Brasília, DF. 2017. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abat-e-leite-couro-ovos_201604caderno.pdf> Acesso em: 14 mai. 2017.

ISBERG, R. R.; BARNES, P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 1, p. 21–28, 2001

ISO. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **ISO 10273**. ISO, Geneva, 2003.

JASOVSKY, D.; LITTMANN, J.; ZORZET, A.; CARS, O. Antimicrobial resistance: a threat to the world's sustainable development. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 121, n. 3, p.159–164, 2016.

JOURDAN, A.; MARICHAL, M. D.; BYL, L.; WESLEY, I. Detection of *Yersinia* Species in Pig Tonsils by a 5' Nuclease Fluorogenic (TaqMan) Polymerase Chain Reaction Assay Specific for the 16S rRNA Gene. **Food Safety**, 2002.

JOUTSEN, S.; EKLUND, K.; LAUKKANEN-NINIOS, R.; STEPHAN, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, Sheep carrying pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 5/O:3 in the faces at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v.196, p. 78-82, 2016.

KAFERSTEIN, F. K. Actions to reverse the upward curve of foodborne illness. **Food Control**, v. 14, p. 101-109, 2003.

KICH, J. D.; MORES, N.; PIFFER, I. A.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L.; CARDOSO, M. Fatores associados a soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 398-405, 2005.

KICH, J. D.; SOUZA, J. C. P. V. B. **Salmonela na suinocultura brasileira: do problema ao controle**. 186p. Brasília, DF. Embrapa, 2015.

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.; MARTI, P. O.; SIEKKINEN, K.; RANTA, J. Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5444-5450, 2008.

LAUKKANEN, R.; MARTÍNEZ, P. O.; SIEKKINEN, K. M.; RANTA, J.; MAIJALA, R.; KORKEALA, H. Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.6, p.681-688, 2009.

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

LAUKKANEN-NINIOS, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H. Enteropathogenic *Yersinia* in the pork production chain: challenges for control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1165-1191, 2014.

LAXMINARAYAN, L.; SRIDHAR, D.; BLASER, M.; WANG, M.; WOOLHOUS, M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. **Science**, 2016.

LIANG, J.; WANG, X.; XIAO, Y.; CUI, Z.; XIA, S.; HAO, Q.; YANG, J.; LUO, L.; WANG, S.; LI, K.; YANG, H.; GU, W.; XU, J.; KAN, B.; JING, H. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered in Chinese abattoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2949–56, 2012.

MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, J.C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p.155-161, 2005.

MARTINEZ, P. O.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; YULIA SOKOLOVA, Y.; ROASTO, M.; BERZINS, A.; KORKEALA, H. Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad Region) Pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.6, 2009.

MARTINEZ, P. O.; MYLONA, S.; DRAKE, I.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; CORRY, J. E. L. 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.

MARTINEZ, P. O.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; PALLOTTI, A.; ROSMINI, R.; HOUF, K.; KORKEALA, H. Variation in the Prevalence of

Enteropathogenic *Yersinia* in Slaughter Pigs from Belgium, Italy, and Spain. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.3, 2011.

MARTINS, B. T. F.; BOTELHO, C. V.; SILVA, D. A. L.; LANNA, F. G. P. A.; GROSSI, J. R.; CAMPOS-GALVAO, M. E. M.; YAMATOIGI, R. S.; FALCAO, J. P.; BERSOT, L. S.; NERO, L. A. *Yersinia enterocolitica* in a Brazilian pork production chain: Tracking of contamination routes, virulence and antimicrobial resistance. **Intenational Journal of Food Microbiology**, v. 276, p. 5-9, 2018.

MECSAS, J., BILIS, I., FALKOW, S. Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of na orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, v.69, p.2779–2787, 2001.

MEDICI, D. D.; CROCI, L.; DELIBATO, E.; PASQUALE, S. D.; FILETII, E.; TOTI, L. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella entérica* Serotype Enteritidis in Poultry. **Applied and enEironmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 34566-3461, 2003.

MEHTA, H.H.; PRATER, A.G.; SHAMOO, Y. Using experimental evolution to identify druggable targets that could inhibit the evolution of antimicrobial resistance. **The Journal of Antibiotics**, p.1-8, 2017.

MESSELHÄUSSER, U.; KÄMPF, P.; COLDITZ, J.; BAUER, H.; SCHREINER, H.; HÖLLER, C.; BUSCH, U. Qualitative and quantitative detection of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in different food matrices at retail level in Bavaria. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.1, p.39-44, 2011.

MEYER, C.; STOLLE, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA. Comparison of Broth Microdilution and Disk Difusion Tesr for Antimicrobial Resistance Testing in *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 Strains. **Mticrobial Drug Resistance**, v. 17, n. 3, p. 479-484, 2011.

MONACK, D.M.; MECSA, J.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis, and Yopj is necessary for this cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 10385–10390, 1997.

MURROS-KONTIAINEN, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; JOHANSSON, P.; RAHKILA, R.; BJORKROTH, J. *Yersinia nurmii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2368–2372, 2011a.

MURROS-KONTIAINEN, A.; JOHANSSON, P.; NISKANEN, T.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, H.; BJORKROTH, J. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2363–2367, 2011b.

NATHUES, C.; GRUNING, P.; FURTH, A.; VERSPOHL, J.; BLAHA, T.; KREIENBROCK, L.; MERLE, R. *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella enterica* and their simultaneous occurrence in German fattening pig herds and their environment. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 10, p. 1704-1711, 2013.

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

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

NESBAKKEN, T.; NESBAKKEN, T.; IVERSEN, T.; ECKNER, K.; LIUM, B. Testing of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig herds based on the natural dynamic of infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.11 p.99-104, 2006.

NESBAKKEN, T.; IVERSEN, T.; LIUM, B. Pig Herds Free from Human Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.12, p. 1860-1864, 2007.

NEUBAUER, N.; ALEKSIC, S.; HENSEL, A.; FINKE, E. J.; MEYER, H. *Yersinia enterocolitica* 16s rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. **International Journal of Medical Microbiology**, v.290, n.1, p.61-64, 2000.

O'GRADY, KENNY, K.; POWER, S.; EGAN, J.; RYAN, F. Detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in the faeces of cattle with false positive reactions in serological tests for brucellosis in Ireland. **The Veterinary Journal**, v.216, p.133-135, 2016.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**, 2016. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf> Acesso em: 20 de outubro de 2017.

ONG, K.L.; GOULD, L.H.; CHEN, D. L.; JONES, T. F.; SCHEFTEL, J.; WEBB, T.H.; MODY, R. K.; MAHO, B. E. Changing Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* Infections: Markedly Decreased Rates in Young Black Children, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996–2009. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, n.5, p. S385–90, 2012.

PAIXÃO, R.; MORENO, L. Z.; SENA DE GOBBI, D. D.; RAIMUNDO, D. C.; HOFER, E.; MATTE, M. H.; FERREIRA, T. S. P.; de MOURA GOMES, V. T.; COSTA, B. L. P.; MORENO, A. M. Characterization of *Yersinia*

enterocolitica biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and markets. **The Scientific World Journal**, 2013.

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

PERUZY, M.F.; MURRU, N.; PERUGINI, A.G.; CAPUANO, F.; DELIBATO, E.; MERCOGLIANO, F.; KORKEALA, H.; THERESE, Y.; PROROGA, R. Evaluation of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains using SYBR Green real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 65, p.231-235, 2017.

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

PLATT-SAMORAJ, A.; SYCZYLO, K.; SZCZERBA-TUREK A.; BANCERZ-KISIEL, A.; JABLONSKI, A.; LABUC, S.; PAJDAK, J.; OSHAKBAEVA, N.; SZWEDA, W. Presence of *ail* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A isolates from game animals in Poland. **The Veterinary Journal**, v.221, p.11-13, 2017.

POLJAK, Z.; DEWEY, C. E.; MARTIN, S. W.; ROSENDAL, T.; CHRISTENSEN, J.; CIEBIN, B.; FRIENDSHIP, R. M. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* shedding and bio-serotype distribution in Ontario finisher pig herds in 2001, 2002, and 2004. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 110-120, 2010.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59–67, 2006.

RAHMAN, A.; BONNY, T.S.; STONSAOVAPAK, S.; ANANCHAIPATTANA, C. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks. **Journal of Pathogens**, 2011.

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

RUSAK, L. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Yersinia enterocolitica* isoladas de diferentes origens no Brasil**. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

RUSAK, L. A.; MOURA FALAVINA DOS REIS, C.; BARBOSA, A. V.; SANTOS, A.F.M.; PAIXAO, R.; HOFER, E.; VALLIM, D. C.; ASENSI, M.D. 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.

SABA, R. Z. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em suínos ao abate. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 4, p. 92, 2013.

SABINA, Y.; RAHMAN, A.; RAY, R. C.; MONTET, D. *Yersinia enterocolitica*: mode of transmission, molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. **Journal of Phatogens**, 2011.

SACHEDEVA, P.; VIRDI, J. S. Repetitive elements sequence (REP/ERIC) - PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existece of limited number of clonal groups. **FEMS Microbiology Letters**, n.20, p.193-201, 2004.

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

SCHWARZ, P.; CALVEIRA, A.; SELLA, A.; BESSA, M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; CARDOSO, M. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1028-1034, 2009.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMIJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W.; Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 65, p. 601-604, 2010.

SHANMUGAPRIYA, S.; SENTHILMURUGAN, T.; THAYUMANAVAN, T. Genetic diversity among *Yersinia enterocolitica* isolated from chicken and fish in and around Coimbatore City, India. **International Journal of Public Health**, v. 43, n.6, p.835-844, 2014.

SEOANE, A.; LOBO, J. M. G. Identification of a Streptogramin A Acetyltransferase Gene in the Chromosome of *Yersinia enterocolitica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 905-909, 2000.

SOMMER, M.O.A; MUNCK, C.; TOFT-KEHLER, R.V.; ANDERSSON, D.I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm?. **Nature Reviews Microbiology**, v.15, p. 689-696, 2017.

SOUZA, R. A.; FALCAÃO, D. P.; FALCAÃO, J. P. Emended description of *Yersinia massiliensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.1094–1097, 2011.

SOUZA, J. C. P. V.B.; AMARAL, A. L.; MORÉS, N.; TREMÉA, S. L.; MIELE, M. SANTOS FILHO, J. I dos. **Sistemas de produção de leitões baseado em planejamento, gestão e padrões operacionais**. 1ª ed. Embrapa Aves e Suínos, p.114, 2013.

SPELLBERG, B.; HANSEN, G. R.; KAR, A.; CORDOVA, C. D.; PRICE, L. B.; JOHNSON, J. **Antibiotic Resistance in Humans and Animals**. Discussion Paper, National Academy of Medicine, Washington, DC. Disponível em: <<https://nam.edu/wp-content/uploads/2016/07/Antibiotic-Resistance-in-Humans-and-Animals.pdf>> Acesso em: 29 abr. 2018.

STAMM, I.; HAILER, M.; DEPNER, B.; KOPP, P. A.; RAU, J. 2013. *Yersinia enterocolitica* in diagnostic fecal samples from European dogs and cats: Identification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.3, p.887-893, 2013.

SZYFRES, P. N. A. B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: OPS, 2001.

TENNANT, S. M.; SKINNER, N.A.; JOE, A.; ROBINS-BROWNE, R. Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotipe 1A and their contribution to virulence. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p.6860-6867, 2005.

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

USDA, United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade 2017**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acesso em: 02 fev. 2018.

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

VAN BOECKEL, T. P.; GLENNON, E.E.; CHEN, D.; GILBERT, M.; ROBINSON, T.P.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; BONHOEFFER, S.; LAXMINARAYAN, S. Reducing antimicrobial use in food animals. **Science**, vol. 357(6358), p. 1350-1352, 2017.

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

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

VAN DAMME, I.; DE ZUTTER, L.; JACXSSENS L.; NAUTA, M.J. Control of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in minced meat: Comparative analysis of different interventions using a risk assessment approach. **Food Microbiology**, v. 64, p. 83-95, 2017.

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

VON ALTROCK, A.; ROESLER, U.; MERLE, R.; WALDMANN, K. H. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains on Liver Surfaces of Pigs and Their Antimicrobial Susceptibility. **Journal of Food Protection**, v.73, n.9, p.1680–1683, 2010.

VON ALTROCK, A.; ROESLER, U.; WALDMANN, K-H. Herd Factors Associated with the Serological *Yersinia* Prevalence in Fattening Pig Herds. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 12, p. 1249-1255, 2011.

VON ALTROK, A.; SEINIGE, D.; KEHRENBURG, C. *Yersinia enterocolitica* isolates from wild boars hunted in Lower Saxony, Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n.14, p. 4835-4840, 2015.

WANG, W.; QUI, H.; JIN, D.; CUI, Z.; KAN, B.; XIAO, Y.; XU, Y.; XIA, S.; WANG, H.; YANG, J.; WANG, X.; HU, W.; XU, J.; JING, H. O:8 serotype *Yersinia enterocolitica* strains in China. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.259-266, 2008.

WANG, X.; CUI, Z.; WANG, H.; TANG, L.; YANG, J.; GU, L.; JIN, D.; LUO, L.; QUI, H.; XIAO, Y.; XIONG, H.; KAN, B.; XU, J.; JING, H. Pathogenic Strains of *Yersinia enterocolitica* Isolated from Domestic Dogs (*Canis familiaris*) Belonging to Farmers Are of the Same Subtype as Pathogenic *Y. enterocolitica* Strains Isolated from Humans and May Be a Source of Human Infection in Jiangsu Province, China. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.5, p.1604-1610, 2010.

WANG, H.; TAY, M.; PALMER, J.; FLINT, S. Biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* and its persistence following treatment with different sanitation agents. **Food Control**, v. 73, p. 433 – 437, 2017.

WESLEY, I. V.; BHADURI, S.; BUSH, E. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Market Weight Hogs in the United States. **Journal of Food Protection**, v.71, n.6, p.1162-1168, 2008.

WHO. World Health Organization. **Antibacterial Agents in Clinical Development**. Geneva, Switzerland, 2017.

WILDEMANN, P.; GAVA, D.; SFACIOTTE, R.A.P.; MELO, F.D.; FERRAZ, S.M.; COSTA, U. M.; VAZ, E.K. Low occurrence of pathogenic *Yersinia*

enterocolitica in pig tonsils at slaughter in Southern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 2017.

YE, Q.; WU, Q.; HU, H.; ZHANG, J.; HUANG. Prevalence and characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail food in China. **Food Control**, v. 61, p. 20-27, 2016.

YOUNG, G.M.; AMID, D.; MILLER, V.L. A Bifunctional Urease Enhances Survival of *Pathogenic Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at Low pH. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 22, p.6487-6495, 1996.

ZADERNOWSKA, A.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. *Yersinia enterocolitica*: A Dangerous, But Often Ignored, Foodborne Pathogen. **Food Reviews International**, v.30, p. 53-70, 2014.

ZHANG, L.; RADZIEJEWSKA-LEBRECHT, J.; KRAJEWSKA-PIETRASIĆ, D.; TOIVANEN, P.; SKURNIK, M. Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. **Molecular Microbiology**, v.23, p.63–76, 1997.

APÊNDICE 1 – INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY: AUTHOR INFORMATION PACK



INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY

An official journal of the [International Committee on Food Microbiology and Hygiene \(ICFMH\)](#) of the [IUMS](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.2
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.5



ISSN: 0168-1605

DESCRIPTION

The *International Journal of Food Microbiology* publishes papers dealing with all aspects of food microbiology. Articles must present information that is novel, has high impact and interest, and is of high scientific quality. They should provide scientific or technological advancement in the specific field of interest of the journal and enhance its strong international reputation. Preliminary or confirmatory results as well as contributions not strictly related to **food microbiology** will not be considered for publication.

Full-length original research papers, short communications, review articles and book reviews in the fields of **bacteriology**, **mycology**, **virology**, **parasitology**, and **immunology** as they relate to the production, processing, service and consumption of foods and beverages are welcomed. Within this scope, topics of specific interest include: (1) incidence and types of food and beverage **microorganisms**, microbial interactions, **microbial ecology** of foods, intrinsic and extrinsic factors affecting microbial survival and growth in foods, and **food spoilage**; (2) microorganisms involved in food and beverage fermentations (including probiotics and starter cultures); (3) **food safety**, indices of the sanitary quality of foods, microbiological **quality assurance**, biocontrol, microbiological aspects of **food preservation** and novel preservation techniques, predictive microbiology and **microbial risk assessment**; (4) foodborne microorganisms of **public health** significance, and microbiological aspects of foodborne diseases of microbial origin; (5) methods for microbiological and immunological examinations of foods, as well as rapid, automated and molecular methods when validated in food systems; and (6) the biochemistry, physiology and molecular biology of microorganisms as they directly relate to **food spoilage**, **foodborne disease** and food **fermentations**.

Papers that do not have a direct food or beverage connection will not be considered for publication.

The following examples provide some guide as to the type of papers that will not be admitted to the formal review process (for a more extensive list please refer to the journal's [Guide for Authors](#): Studies in animal models that determine the responses of probiotic microorganisms in the gastrointestinal tract; Fundamental physiology and gene expression studies of food/ beverage microorganisms, unless they directly relate to the food/ beverage ecosystem; The isolation and characterization of antimicrobial substances such as essential oils, bacteriocins etc, unless their efficacy is tested and validated in the food/beverage ecosystem; Development of new methods for the analysis of microorganisms, unless the method is tested and validated in the food/beverage ecosystem.

This journal also publishes special issues of selected, peer-reviewed papers from suitable meetings, workshops, conferences, etc, related to the field of food microbiology.

AUDIENCE

Industrial and food Microbiologists, Bacteriologists, Immunologists, Mycologists, Parasitologists, Virologists, Food Hygienists.

IMPACT FACTOR

2016: 3.339 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Cambridge Scientific Abstracts
EMBiology
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Science Citation Index
CAB Abstracts
FSTA (Food Science and Technology Abstracts) Scopus
MEDLINE®

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

L. Coccolin, DISAFA, Largo Braccini 2, Università di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095, Grugliasco, Torino, Italy

Editors

J.F. Ayala-Zavala, Center for Food Research and Development (CIAD), Hermosillo, Sonora, Mexico

J. Chen, University of Georgia, Griffin, Georgia, USA

B. Kimura, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan

G. LaPointe, University of Laval, Québec, Quebec, Canada

A. Mas, University Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

M.H. Zwietering, Wageningen University, Wageningen, Netherlands

Editor: Food Mycology

N. Magan, Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire, England, UK

Editorial Board Members

A. Aertsen, K.U. Leuven, Leuven, Belgium

A. Allende, CEBAS CSIC, Murcia, Spain

A.A. Al-Nabulsi, Jordan University of Science and Technology, Irbid, Jordan

N. Arneborg, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

M Aslam, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Lacombe, Alberta, Canada

J-C. Augustin, Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

T. Aymerich, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Girona, Spain

J. Baranyi, Institute of Food Research, Colney, Norwich, England, UK

J. Bautista-Gallego, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

L.R. Beuchat, University of Georgia, Griffin, Georgia, USA

J. Björkroth, University of Helsinki, Helsinki, Finland

M. Bondi, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

S. Bover-Cid, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Monells, Spain

J. Bowman, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, Australia

F. Carlin, INRA, Avignon, France

G. Cebrián, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

A. Chaurasia, Indian Council of Agricultural Research (ICAR), Uttar Pradesh, India

L. Coroller, Université de Brest, QUIMPER, France

J.E.L. Corry, University of Bristol, Langford, Bristol, UK

A. Corsetti, Università di Teramo, Teramo, Italy

C.N. Cutter, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA

P. Dantigny, Microbiologiques et Alimentaires Agro-Sup Dijon, Dijon, France

H.M.W. den Besten, Wageningen Universiteit, Wageningen, Netherlands

F.H.J. Devlieghere, Universiteit Gent, Gent, Belgium

B. Dixon, Bureau of Microbial Hazards, Ottawa, Ontario, Canada

K.J. Domig, Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Vienna, Austria

M. du Toit, University of Stellenbosch, Matieland, South Africa

H.P. Dwivedi, bioMérieux, Inc., Hazelwood, Missouri, USA

D. Ercolini, University of Naples Federico II, Naples, Italy

W. Fang, Zhejiang University, Zhejiang, China

B. Franco, Universidade de São Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil

P.M. Fratamico, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Wyndmoor, Pennsylvania, USA

- A. Gálvez**, Universidad de Jaén, Jaen, Spain
- M. Gänzle**, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
- P. García Suárez**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC, Villaviciosa (Asturias), Spain
- A.H. Geeraerd**, KU Leuven, Leuven, Belgium
- R. Geisen**, Max-Rubner-InFederal Research Centre for Nutrition, Karlsruhe, Germany
- A. Gill**, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada
- J.E. Gómez Marín**, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia
- J.B. Gurtler**, United States Department of Agriculture, Wyndmoor, Pennsylvania, USA
- J.-P. Guyot**, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France
- R.A. Holley**, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada
- W.H. Holzapfel**, Handong Global University, Gyeongbuk, The Republic of Korea
- M. Jakobsen**, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark
- X. Jiao**, Yangzhou University, Yangzhou, China
- T.H. Jones**, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Lacombe, Alberta, Canada
- H. Joosten**, WU Argrotechnology & Food Sciences, Wageningen, Netherlands
- K. Jordan**, Teagasc, Moorepark, Fermoy, Cork, Ireland
- V.K. Juneja**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Wyndmoor, Pennsylvania, USA
- S. Keller**, Food and Drug Administration (FDA), Bedford Park, Illinois, USA
- W.J. Kelly**, Metabolism and Microbial Genomics Section, Food an, Palmerston North, New Zealand
- A. Kiermeier**, Sardi, Glenside, South Australia, Australia
- G. Klein**, TiHo Hannover: Tierärztliche Hochschule, Hannover, Germany
- S. Koseki**, Hokkaido University, Sapporo, Japan
- K. Koutsoumanis**, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece
- Y. Le Loir**, INRA, Rennes Cedex, France
- S.L. Leong**, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala, Sweden
- F. Leroy**, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium
- C. Löfström**, Danmarks Tekniske Universitet (DTU), Kgs. Lyngby, Denmark
- A. López-Malo**, Universidad de las Americas-Puebla, San Andres Cholula, Puebla, Mexico
- M. Malfeito Ferreira**, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal
- S. Marin**, Universitat de Lleida, Lleida, Spain
- S. Mattiucci**, Sapienza Università di Roma, Rome, Italy
- L. Maunula**, University of Helsinki, Helsinki, Finland
- D. Meloni**, University of Sassari, Sassari, Italy
- J.M. Membré**, INRA Centre de Nantes, NANTES Cedex 3, France
- A. Moretti**, ISPA-CNR, Bari, Italy
- G.-J. Nychas**, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
- G.C. Paoli**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Wyndmoor, Pennsylvania, USA
- E. Parente**, Università della Basilicata, Potenza, Italy

A. Querol, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Burjassot, Valencia, Spain

A. Rajkovic, Ghent University, Belgium

K. Rantsiou, Università di Torino, Grugliasco, Torino, Italy

L.J. Robertson, Norwegian University of Life Sciences, Oslo, Norway

D. Rodríguez-Lázaro, Universidad de Burgos, Burgos, Spain

M.B. Rokni, Tehran University of Medical Sciences, Iran

T. Ross, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, Australia

J. Rovira, Universidad de Burgos, Burgos, Spain

F.M. Ruggeri, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

E. Ryser, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

A. Sant'Ana, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

D.W. Schaffner, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA

S. Sela, Agricultural Research Organization (ARO), Bet Dagan, Israel

L. Settanni, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy

P. Skandamis, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

R. Stephan, Universität Zürich, Zurich, Switzerland

N. Strachan, University of Aberdeen, Aberdeen, UK

P. Taormina, John Morrell & Co., Cincinnati, Ohio, USA

T.M. Taylor, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

P.C. Teixeira, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal

M. Uyttendaele, Universiteit Gent, Gent, Belgium

V.P. Valdramidis, University of Malta, Msida, Malta

A. Valero, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

C. Varela, The Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, South Australia, Australia

K. Warriner, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

R.C. Williams, Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, Virginia, USA

D.L. Zhang, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, China

D. Zhou, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

- Full-length Research Articles are complete reports of original, scientifically sound research. They must contribute new knowledge and be organized as described in this Guide. Manuscripts should not exceed 8000 words. Please follow carefully the organization of the sections described in "Preparation of text files" (see below).
- Short Communications are brief reports of scientifically sound research, but of limited scope (for example, limited number of samples analysed), that contribute new knowledge. They should be prepared as described in this Guide, and should not exceed 4000 words. Please follow carefully the organization of the sections described in "Preparation of text files" (see below).
- Reviews are papers which provide an analysis of a scientific or applied field, which include all important findings and bring together reports from a

number of sources. Manuscripts should not exceed 12,000 words (excluding references). Review articles may be invited by the Editor or the Editorial Board. Alternatively, potential authors considering the preparation of a Review article should contact the Editor to suggest the topic and its scope, providing an outline in the form of major headings and a summary statement. In any case, such articles are subject to the normal processes of peer review and revision.

Subjects not considered for publication

- Development of methods if not validated in situ. To be suitable for publication in IJFM, new methods for the detection and/or quantification of target microorganisms must be validated in artificially and naturally contaminated foods. Such papers focusing on method development without application in the food matrix should be submitted to journals dealing with microbiological methods or applied microbiology.
- Natural and safe antimicrobial substances: since an extended literature is available on this subject, IJFM publishes only relevant and innovative papers. More specifically:
 - in the case of essential oils, spices and chemical compounds: the antimicrobial activity should be tested in real food systems to validate their efficacy, testing in vitro only would not be sufficient for publication in IJFM. Moreover a detailed chemical analysis of the natural extract should be presented with indication of which compounds are exerting the antimicrobial activity;
 - for bacteriocins, surveys of bacteriocin-producing strains in food products would not be considered unless the genes responsible for production were genetically characterized to show originality of such genes. IJFM gives priority to papers describing new bacteriocins (as determined by genetic approaches, N-terminal sequencing or results on antimicrobial spectrum and mechanisms) and application of bacteriocinogenic strains in situ, other than surveys of bacteriocin-producing strains in food products.
- Surveys focusing on the detection and quantification of toxins and microbial metabolites (mycotoxins, bacterial toxins, biogenic amines) and papers presenting new methods for detection and quantification of toxins and microbial metabolites will not be published in IJFM, unless they do contain correlated microbiological data of food safety significance. Papers presenting analytical data only should be sent to toxicology or food control journals.
- Gut microbiology and probiotic-targeted papers will have to present relevant direct links to food microbiology/safety. Animal models or studies in which the host is the main target of investigation should be submitted to appropriate journals and not to IJFM.
- Microbiological aspects of the production of ingredients should be submitted to suitable biotechnology journals. However, papers that consider the use of microorganisms to enhance the level of specific vitamins, amino acids, flavours, colours, polysaccharides etc in foods/beverages will be considered by IJFM.
- Papers where the microbiology is only focused on primary production, without a clear connection to quality and safety of foods, should be sent to journals related to primary production.
- Microbiology specifically related to human health without a clear focus on its relation to foods/ beverages should be submitted to medical journals or similar.
- Repetition of studies conducted in other countries and locations, e.g. work on patterns of antibiotic resistance, prevalence of specific pathogens etc., will not be considered unless new scientific information has been achieved and clearly documented in the manuscript.

Furthermore:

- the word "probiotic" should only be used for organisms where real health effects are shown;
 - "prediction and validation" should only be used if prediction and validation are really carried out with new independent data;
 - for papers on modelling, parameter values should always be presented also with a measure of their confidence (confidence interval, standard error).
 - the number of significant digits should be in relation to the accuracy of the data measured. It should be noted that significant number are NOT digits after the decimal point. Both 34 and 0.00025 have two significant figures and 34.0 and 0.000252 have three significant figures. Figures like 234.573 generally have largely overdone accuracy. Log numbers of microbial concentrations generally have only one digit after the decimal point.

Lastly, it is responsibility of the authors to pay attention to grammar and spelling.

Additional information

Questions regarding content of a proposed submission can be directed to the Editor-in-Chief:

Professor Luca Coccolin
DIVAPRA, Faculty of Agriculture, University of
Turin Via Leonardo da Vinci Grugliasco Turin
Italy

E-mail: lcocolin@gmail.com

It is the author's responsibility to ensure that manuscripts are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Manuscripts written in poor English will not be accepted for further review.

Review policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Editor-in-Chief and Editors have the right to decline formal review of the manuscript when it is deemed that the manuscript is:

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
- 4) of insufficient novelty for a wide international readership;
- 5) fragmentary and provides marginally incremental results; or
- 6) is poorly written.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) Supplemental files (where applicable)*

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and viceversa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
 - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests

in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If

excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
 - The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below. **Gold open access**
- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
 - A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 4050**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo

period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more.](#)

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers. **Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript.**

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

- For replication of experiments it should be clearly stated if it are replications of a single sample (not advised), or true independent reproduction of the relevant experimental conditions.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 400 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

- Keywords should not contain words that are also used in the title

When preparing your paper, authors should avoid using the term microflora and instead use **microbiota**. In addition please do not use the expression rDNA but rather **rRNA gene (S)**.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10^9 in America, 10^{12} in Europe) is ambiguous and should not be used. Units must be indicated as g/L and not gL^{-1} .

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Embedded math equations

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this ([related support information](#)).

If equations from Microsoft Word 2007 are not correctly represented in the pdf, this might be solved by storing the word file as Word 97-2003 document (*.doc), and upload.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
 - Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the

relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/international-journal-of-food-microbiology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the Authors. Please ensure that every reference cited within the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list, they should follow the standard reference style and should include a substitution of the publication date with either "unpublished results" or "personal communication". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript.

All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. **Note that journal names are to be abbreviated.** The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Examples:

Reference to a journal publication:

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1> Ono, K., Yamamoto, K., 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 211-219.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E. B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Kramer, J.M., Gilbert, R.J., 1989. *Bacillus cereus*. In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 22-70.

Caddick, M.X., 1994. Nitrogen metabolite repression. In: Martinelli, S.D., Kinghorn, J.R. (Eds.), *Aspergillus: 50 Years on*, *Progress in Industrial Microbiology*, vol. 29. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 323-353.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received

(Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to

editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).