

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

Marta Leitzke¹, Eliana Knackfuss Vaz²

¹Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PROBIC/UDESC.

²Orientadora, Departamento de Medicina Veterinária CAV – eliana.vaz@udesc.br.

Palavras-chave: Genes de virulência. Infecção alimentar. PCR convencional.

Yersinia enterocolitica é uma bactéria Gram-negativa que está associada à doença entérica em animais e principalmente em humanos. A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) ocasionadas por este patógeno é um problema emergente de saúde pública. A bactéria é veiculada principalmente por alimentos a base de carne suína, visto que esta espécie é portadora assintomática deste agente em tonsilas e trato intestinal. Com isso no momento do abate do suíno pode haver a contaminação da carcaça e conseqüentemente, do seu produto final, a partir destes tecidos infectados. Outro fator é a capacidade de sobrevivência e multiplicação da bactéria em alimentos refrigerados que reforça a preocupação relacionada a este agente, bem como sustenta a necessidade de detecção deste patógeno em alimentos de origem animal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Yersinia enterocolitica* patogênica em tonsila de suínos sadios no momento do abate no estado de Santa Catarina. Para isto, foi utilizado um PCR convencional multiplex que detecta a presença de genes de virulência (*ail*, *yadA* e *virF*). Foram coletadas aleatoriamente tonsilas de 400 carcaças de suínos de terminação que foram ao abate, em quatro frigoríficos com inspeção sanitária federal no estado de Santa Catarina, três deles localizados na região Oeste e um na região Sul do estado. A seguir, as amostras foram armazenadas em sacos estéreis e individuais e mantidas refrigeradas até o momento das análises. Iniciando pela extração do DNA, as tonsilas foram fragmentadas, colocadas em sacos estéreis contendo 5mL de água peptonada a 1% (Himedia) e homogeneizadas em equipamento Stomacher por quatro minutos. A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit Prep/Preamp (NewGene), conforme recomendações do fabricante. Em seguida na reação da polimerase em cadeia convencional (cPCR) multiplex a solução final utilizada foi definida como: 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 0,4uM de cada iniciador(*forward* e *reverse*), 1x de PCR buffer e 1,25U da enzima Taq polimerase, com temperatura de anelamento dos iniciadores de 60°C. Ao realizar a cPCR multiplex do controle positivo, por se tratar de *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:8, o gene *yadA* apresentou fragmento de 759pb e não de 849pb como observado para os demais sorotipos. Desta forma tornou-se difícil separar as bandas dos genes *yadA* e *virF*, devido a proximidade de tamanho dos fragmentos. Assim, sugeriu-se neste caso, realizar a cPCR para o gene *virF* separadamente. A sensibilidade da técnica de cPCR para detecção do gene *ail* foi de 0,6ng/μL e para os genes *yadA* e *virF* foi de 0,06ng/μL, e ao testar para a detecção dos três genes juntos, a sensibilidade ficou em 0,6ng/uL. Neste estudo, é reportado o primeiro relato de ocorrência de *Yersinia enterocolitica* patogênica em tonsilas de suínos abatidos no estado de Santa Catarina utilizando a técnica de PCR. Os mecanismos de patogenicidade de *Yersinia enterocolitica* são

complexos e para que a bactéria seja capaz de causar a doença faz-se necessário a presença de um conjunto de genes de virulência, os quais podem se localizar no DNA cromossomal ou plasmideal da bactéria. Dentre estes genes destacam-se os genes cromossomais *ail* e plasmidiais *yadA* e *virF*. Apesar de observada uma baixa ocorrência do agente nas amostras de tonsila de suínos aqui avaliados (1 amostra), os três genes associados à patogenicidade foram detectados e confirmados por sequenciamento. O sequenciamento parcial dos três genes de virulência da amostra aqui detectada, identificou três mudanças de aminoácidos exclusivas, sendo uma no gene *virF* e duas no gene *yadA*. Entretanto, devido a poucas sequências de *Yersinia enterocolitica*, que apresentem estes genes, disponíveis no GenBank, é difícil desenhar qualquer painel epidemiológico. A utilização da técnica de cPCR pode ser uma excelente alternativa para detecção de *Yersinia enterocolitica*, visto que é capaz de reduzir o tempo da análise, quando comparada ao método tradicional, largamente utilizado em alimentos. Além de ser mais rápida, sensível e específica, pode ser usada para diferenciar facilmente cepas de *Yersinia enterocolitica* patogênicas de cepas não patogênicas através da pesquisa dos genes de virulência, dispensando os passos de biotipagem e sorotipagem. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram uma baixa ocorrência de *Yersinia enterocolitica* patogênica no estado de Santa Catarina em tonsilas de suínos ao abate em frigoríficos com inspeção federal.