

***Yersinia enterocolitica* EM PESCADOS DO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS PRONTOS PARA COMÉRCIO**

NATÁLIA VOLPATO DA CONCEIÇÃO¹; KAROLINE KAEFER²; AGNES DE SOUZA³; JANAINA VIANA DA ROSA⁴; CLÁUDIO DIAS TIMM⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – natalia-volpato@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kaeferkarol@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – agnes_isadora@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – janavrosa@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um aumento na produção e no consumo mundial de peixes. Estima-se que a produção mundial de pescado seja em torno de 100 milhões de toneladas/ano, sendo 70 delas destinadas exclusivamente à alimentação humana. O pescado e seus derivados têm grande importância na dieta, contribuindo com a oferta mundial de proteína de origem animal (LUCIANO, 2009).

As características nutricionais dos pescados fazem deles um alimento benéfico à saúde, pois são ricos em proteínas, vitaminas, nutrientes e gorduras insaturadas. Entretanto, a questão da saúde pública, referindo-se à segurança alimentar, é uma preocupação (LUCIANO, 2009).

As bactérias do gênero *Yersinia* pertencem à família Enterobacteriaceae abrangendo as espécies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. Esta última é um microrganismo caracterizado como um bacilo Gram-negativo, psicotrófico, que tem capacidade de multiplicar-se em temperaturas de 0 a 44°C, sendo a ótima entre 25 e 28°C. Resiste bem ao congelamento, sobrevivendo em alimentos congelados. *Y. enterocolitica* é a espécie que mais predomina entre os humanos, causa principalmente síndrome gastrointestinal, variando de enterite aguda a linfadenite mesentérica (FALCÃO; FALCÃO, 2006). É uma bactéria emergente e a contaminação se dá através de alimentos contaminados, sendo o pescado um vetor desta enfermidade (AKHILA et al, 2013). O processo artesanal de evisceração pode ser um fator de contaminação, caso não sejam observados os cuidados higiênicos e sanitários adequados durante a manipulação do pescado (FONSECA, 2011).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Y. enterocolitica* em pescados prontos para o comércio.

2. METODOLOGIA

Para obtenção de amostras, foram realizadas coletas de treze desembarques de pescado na colônia de pescadores Z-3, no município de Pelotas, RS, e no mercado público do município de Rio Grande, RS, provenientes de capturas realizadas com métodos artesanais no estuário da Lagoa dos Patos durante os meses de abril, junho, julho, setembro e outubro de 2014. Foram coletados aleatoriamente cinco peixes após o processamento (evisceração e higienização) para venda aos consumidores, totalizando 65 amostras. Os pescados foram colocados em sacos estéreis e imediatamente encaminhados ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo, para análise.

Para a pesquisa de *Y. enterocolitica*, foi coletado material com uso de zaragatoa estéril, a qual foi passada três vezes em cada um dos dois lados do dorso e posteriormente dos dois lados da superfície interna do pescado e imediatamente semeada por esgotamento em ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Após incubação a 37°C por 24 horas, três colônias lactose negativas foram semeadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e, após incubação a 37°C por 24 horas, foram misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -70°C.

A extração de DNA dos isolados suspeitos de *Y. enterocolitica* foi realizada conforme SAMBROOK; RUSSEL (2001). Resumidamente, o *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em BHI foi ressuscitado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -70°C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

A Identificação dos isolados suspeitos de *Y. enterocolitica* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa do gene rRNA 16S, utilizando os *primers* AATACCGCATAACGTCTTCG e CTTCTTCTGCGAGTAACGTC, conforme WANNET et al (2001), com modificações. Cada reação teve volume final de 25 µL. Foram utilizados 12,5 µL de Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil), 1 µL (10 pmol) de cada *primer*, 2 µL de DNA e 8,5 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido por 36 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento dos *primers* a 62°C durante 45 s e extensão a 72°C durante 45 s e extensão final a 72°C durante 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *Y. enterocolitica* ATCC 0098.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram acompanhados 13 desembarques e analisadas 65 amostras de peixes processados para a venda, dos quais 30 eram *Micropogonias furnieri* (corvina), 15 *Mugil platanus* (tainha), ambos de desembarques realizados na Z-3, e 20 *Paralichthys orbignyanus* (linguado), obtidos no mercado público de Rio Grande. As espécies que albergavam o microrganismo pesquisado foram *P. orbignyanus* e *M. furnieri*, sendo este o primeiro registro de isolamento de *Y. enterocolitica* dessas espécies de pescado.

Y. enterocolitica foi isolada de 7,7% (5/65) das amostras de peixes já eviscerados e prontos para o comércio, 1,5% (1/65) de *P. orbignyanus* e 6% (4/65) de *M. furnieri*, sendo todos os isolados obtidos de amostras coletadas no mês de outubro.

Em um estudo anterior realizado na cidade de Coimbatore, na Índia (AKHILA et al, 2013), foram analisadas 56 amostras de peixes coletados em peixarias. Foram obtidas amostras da superfície, guelras e intestino dos pescados, das quais 20% (11) estavam contaminadas com a bactéria *Y. enterocolitica*. Em outra pesquisa também realizada na cidade de Coimbatore

(SHANMUGAPRIYA et al, 2014), foram analisadas 24 amostras de peixes, coletados de peixarias no período de dezembro de 2010 a março de 2011, das quais 75% (18) apresentavam contaminação por *Y. enterocolitica*. Esta diferença de resultados dos trabalhos citados em comparação com o nosso pode ser devida às distintas espécies de pescado estudadas.

A qualidade do peixe fresco eviscerado pode ser influenciada pela ausência de hábitos higiênicos dos manipuladores, superfícies contaminadas e utensílios não sanificados (DAMS et al, 1997). Supondo-se que a contaminação por *Y. enterocolitica* observada nas amostras seja por esses motivos, é importante observar as questões de higiene, especialmente nos equipamentos e no manuseio do pescado, para evitar a contaminação e reduzir riscos à saúde dos consumidores.

4. CONCLUSÕES

É possível constatar que peixes das espécies *P. orbignyanus* e *M. furnieri* podem albergar a bactéria *Y. enterocolitica*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHILA,S.;PRIYA,S.;MURUGN,T.;THAYUMANAVAN,T. Molecular diversity analysis of *Yersinia enterocolitica* isolated from marine marketed fish. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v.2, n.9, p.204-214, 2013.

DAMS, R.I.; TEIXEIRA, E.; BEIRÃO, L.H. Práticas de higiene e sanificação em indústria de pescado congelado. **Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos**, Curitiba, v.15, n.2, p. 160-166, 1997.

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

FONSECA, A.M. **Introdução ao Design Higiênico de Instalações e Equipamentos para a Indústria Alimentar**. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Mestrado integrado em Medicina Veterinária, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

LUCIANO, L.G. **Qualidade microbiológica de peixes e frutos do mar em Botucatu**. 2009. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**.. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3.ed.

SHANMUGAPRIYA, S.; SENTHILMURUGAN, T.; THAYUMANAVAN, T. Genetic Diversity among *Yersinia enterocolitica* Isolated from Chicken and Fish in and around Coimbatore City, India. **Iranian Journal of Public Health**, Coimbatore, v. 43, n. 6, p. 835-844, 2014.

WANNET, W.J.B.; REESSINK. M.; BRUNINGS, H. A.; MAAS, H.M.E. Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a Rapid and Sensitive Duplex PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, p.4483–4486, 2001.