

EFEITO DA MOAGEM NO ISOLAMENTO DE  
*Yersinia enterocolitica* EM CARNE BOVINA

KATY PAULA SILVA MARQUES  
Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Janeiro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da  
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

---

Marques, Katy Paula Silva

M357e Efeito da moagem no isolamento de Yersinia  
enterocolitica em carne bovina. Piracicaba,  
1991.

70p.

Diss. (Mestre) - ESALQ  
Bibliografia.

1. Bactéria em carne bovina - Isolamento -  
Moagem 2. Carne bovina - Análise 3. Carne bovi  
na - Bacteriologia I. Escola Superior de Agri-  
cultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 664.9297

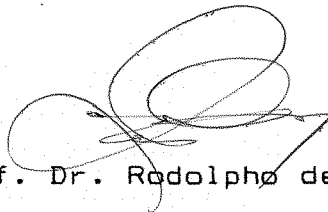
EFEITO DA MOAGEM NO ISOLAMENTO DE  
*Yersinia enterocolitica* EM CARNE BOVINA

Katy Paula Silva Marques

Aprovada em: 27 de fevereiro de 1991

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo	LCT/ESALQ
Prof. Dr. Luis Eduardo Gutierrez	LQI/ESALQ
Profa. Dra. Rahme Melly Neder	LCT/ESALQ



Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

Orientador

*Ao meu esposo DANIEL  
pelo carinho e  
ensinamentos que muito  
contribuíram para execução  
deste trabalho.*

*DEDICO.*

*Aos meus pais ALCIDES e WILMA  
pelo carinho e atenção.*

*OFEREÇO.*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Rodolpho de Camargo pela segura orientação, incentivo e apoio recebido durante todo o desenvolvimento deste trabalho.
- À Dra. Deise Passetto Falcão do Departamento de Ciências Farmacêuticas- UNESP de Araraquara pelo fornecimento da cultura padrão de *Yersinia enterocolitica*.
- À Professora Dra. Isabel Yoko Ito do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, pelo apoio e fornecimento de reagentes indispensáveis para a realização desta pesquisa.
- À Direção da Fundação Educacional de Barretos que permitiu a execução da parte experimental em seus laboratórios.
- Ao Professor Dr. Jonathan Biele do Departamento de Matemática e Estatística da Universidade de Iowa (E.U.A.) pela análise estatística dos dados.
- Ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo por esclarecimentos prestados.
- À Professora Solange Guidolin Canniatti Brazaca do Departamento de Economia Doméstica pela amizade e esclarecimentos prestados.

Ao Técnico de Laboratório Iosshiaki Iwashima do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Catanduva pela valiosa colaboração durante a fase experimental.

As Bibliotecárias da Biblioteca Central e Setorial do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela revisão feita nas referências bibliográficas.

Aos técnicos do Setor de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial Cecília e Hilcias pela amizade demonstrada.

À amiga Clara Castro Leite pela revisão de Português realizada nesta dissertação.

À amiga de curso Angela Líbia Cardoso pelo carinho, amizade e ensinamentos, que muito auxiliaram para a realização deste estudo.

Às amigas Maria Sebastiana e Cleuza pelo apoio e carinho recebidos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente tornaram possível a execução do presente trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Ocorrência de <i>Yersinia enterocolitica</i> em alimentos .....	4
2.2. Observações bibliográficas importantes pa- ra a metodologia de isolamento de <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> .....	16
2.3. Considerações generalizadas quanto a quali- dade microbiológica da carne bovina. Conta- gem total .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1. Origem e preparo das amostras .....	25
3.2. Cultura padrão .....	26
3.3. Procedimento das análises .....	26
3.3.1. Contagem de bactérias mesófilas ae- róbias ou anaeróbias facultativas mesófilas. Contagem total .....	26
3.3.2. Isolamento de <i>Yersinia enterocoliti-</i> <i>ca</i> .....	27
3.3.3. Identificação bioquímica de <i>E. en-</i> <i>terocolitica</i> .....	29
3.4. Análises estatísticas .....	29



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1. Contagem total .....	31
4.2. Avaliação do efeito da moagem na dissemina- ção de <i>Yersinia enterocolitica</i> nas amos- tras de produtos cárneos analisados .....	35
4.3. Ocorrência de <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	35
5. FIGURAS E TABELAS .....	39
6. CONCLUSÕES .....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA N°		Página
1	"Box plots" referentes aos indicadores de qualidade e de grupo analisados ....	39
2	Distribuição das contagens totais verificadas nas 25 amostras de cada tratamento .....	40
3	"Plot" do logaritmo da contagem total de bactérias versus temperatura para carne de primeira (em pedaço e moída) .	41
4	"Plot" do logaritmo da contagem total de bactérias versus temperatura para carne de segunda (em pedaço e moída) ..	42

## LISTA DE TABELAS

TABELA N°		Página
1	Contagem total e ocorrência de <i>Yersinia enterocolitica</i> para as 25 amostras de carne de primeira em pedaço .....	43
2	Contagem total e ocorrência de <i>Yersinia enterocolitica</i> para as 25 amostras de carne moída de primeira .....	44
3	Contagem total e ocorrência de <i>Yersinia enterocolitica</i> para as 25 amostras de carne em pedaço de segunda .....	45
4	Contagem total e ocorrência de <i>Yersinia enterocolitica</i> para as 25 amostras de carne moída de segunda .....	46
5	Quadro de análise de variância (ANOVA) .	47
6	Variação exponencial da contagem total nas 100 amostras de produtos cárneos analisados .....	48
7	Ocorrência de <i>Yersinia enterocolitica</i> nas 100 amostras de carne refrigerada (-1 a 7°C) .....	49
8	Características bioquímicas típicas de <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	50

EFEITO DA MOAGEM NO ISOLAMENTO DE  
*Yersinia enterocolitica* EM CARNE BOVINA

Autora: KATY PAULA SILVA MARQUES

Orientador: Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO

## RESUMO

Foram analisadas microbiologicamente 100 amostras de carne bovina coletadas de supermercados na cidade de Barretos-SP.

As amostras foram obtidas quando encontravam-se estocadas sob temperatura de -1 a 7°C.

Na ocasião da amostragem 25 amostras de carne de primeira em pedaço foram pesadas em duas porções de 100 g, sendo uma delas moída na hora e a outra embrulhada separadamente. O mesmo procedimento foi obedecido para as 25 amostras de carne de segunda qualidade.

Realizou-se contagem padrão em placas e isolamento de *Yersinia enterocolitica* para as 100 amostras coletadas.

Verificou-se que nenhuma amostra de carne ultrapassou o limite de  $3,0 \times 10^6$  (nível máximo estabelecido pela Legislação Brasileira). No entanto, 16% das amostras de carne de primeira moída e 24% das amostras de carne moída de segunda mostraram contagens acima do nível permitido.

As porcentagens de isolamento de *Yersinia enterocolitica* nas amostras foram respectivamente: carne de primeira em pedaço e segunda (8 e 12%); carne moída de primeira e segunda (12 e 16%).

Ficou estabelecido que a moagem contribui significativamente para o aumento da contaminação da carne e também, com baixa evidência, pode cooperar para a disseminação de *Y. enterocolitica* em carne bovina.

THE EFFECT OF GRINDING OF THE ISOLATION OF  
*Yersinia enterocolitica* IN BEEF

Author: KATY PAULA SILVA MARQUES

Adviser: Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO

## SUMMARY

A study of the effect of grinding on the microbiological quality of ground beef was conducted in Brazil, in the town of Barretos - São Paulo State.

A hundred samples of beef of two different Brazilian cuts were collected. One cut (which we called "first cut") comprised: round and rumps sirloin, loin and rib. The other one (which we called "second cut") comprised: brisket, square chuck, shank, plate and flank. The samples were collected in a period of six months following the same standard procedures which established that whole part should be stored at the temperature range part should be stored at the temperature range and ground at the sampling moment.

As an indication of microbiological quality, the total plate count test was performed on the whole and ground parts of the same sample and also the presence of the pathogenic bacteria *Yersinia enterocolitica* was investigated in all samples.

The results of this study have shown that neither cuts of the whole beef had plate counts above  $3.0 \times 10^6$  UFC/g (maximum allowed by Brazilian Regulations).

The presence of *Yersinia enterocolitica* was detected in 8% of the "first cut" and in 12% of the "second cut" in the whole parts. These levels have increased to 12% and 16% for the first and "second cuts" respectively after grinding procedures.

These results indicated that the grinding process can contribute to a significant increase infection in only ground beef which indicates that new methods of cleaning up the grinding machine should be adopted so that the problem could be overcome or at least reduced.

## 1. INTRODUÇÃO

Sob o ponto de vista de segurança alimentar a carne crua é tradicionalmente considerada como um alimento de "alto risco". Esta opinião origina-se, em parte, do grande número de patógenos transmissíveis, que são mais ou menos intrínsecos neste substrato. Além disso, o alto teor de umidade e nutrientes que a carne contém, possibilita que ocorra a proliferação da maioria dos microrganismos patogênicos, se as condições de estocagem assim o permitirem.

A habilidade de bactérias como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp causarem doenças originadas de produtos cárneos é bem conhecida. Contudo, na última década, outras bactérias foram reconhecidas como patógenos associados a este tipo de alimento e entre elas *Yersinia enterocolitica*, microrganismo Gram negativo pertencente a família *Enterobacteriaceae*.



Uma característica importante aliada ao caráter insalubre de *Y. enterocolitica*, encontra-se em sua capacidade de desenvolvimento em temperatura de refrigerador. Desta forma, possui habilidade de multiplicação em carnes bovinas ou suínas quando incubadas na faixa de 1,0 a 7,0°C e na presença da microbiota normal destes produtos. Isto a diferencia da maioria das bactérias patogênicas, pois as mesmas são frequentemente consideradas pobres competidoras quando inoculadas ou presentes entre a microbiota normal dos alimentos, principalmente sob refrigeração.

No Brasil, poucos são os relatos sobre a ocorrência de *Yersinia enterocolitica* em alimentos, a qual é eloqüente na Europa, Japão, Estados Unidos e Canadá. Paradoxalmente, encontram-se muitos estudos quanto à qualidade microbiológica da carne fresca ou moída. Cabe salientar que diversos autores apresentaram metodologias diferentes e analisaram a sanidade destes tipos de produtos. Diversas fontes de contaminação foram apontadas e entre elas podem ser destacadas: deficiências no controle de higiene durante o abate do animal; tempo e temperatura de estocagem nos pontos de venda a varejo; excesso de manipulação, etc. Todavia, a possível fonte de contaminação proveniente dos equipamentos de moagem ou "cutters", apesar de algumas vezes citada, não foi analisada laboratorialmente.

Os fatos apresentados evidenciam, princi-

palmente nos países em desenvolvimento, a importância de vários estudos que somem informações sobre as condições de higiene das carnes "in natura" que vêm sendo comercializadas e também orientar as partes interessadas na melhoria da qualidade e integridade destes produtos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ocorrência de *Yersinia enterocolitica* em alimentos

A bactéria hoje conhecida como *Yersinia enterocolitica*, foi isolada pela primeira vez por SCHLEIFSTEIN & COLEMAN em 1939 e denominada por estes pesquisadores, em 1943, como *Bacterium enterocoliticum*.

Posteriormente, bactérias semelhantes bioquimicamente foram isoladas recebendo diversas denominações tais como: *Pasteurella pseudotuberculosis rodentium*, *Pasteurella x*, *Pasteurella y*, *Germe x*, *Pasteurella pseudotuberculosis* tipo b. FREDERIKSEN (1964), reuniu características bioquímicas suficientes entre elas para propor uma nova espécie denominada *Yersinia enterocolitica*. NILEHN (1969) e WAUTERS et alii (1972), realizaram sua classificação em cinco grupos ou biotipos. Os últimos autores citados ainda descreveram 34 antígenos O e 20 antígenos H para o referido microrganismo.

KRIEG & HOLT (1984), classificaram o gênero *Yersinia* na família *Enterobacteriaceae* dividindo-o em 7

espécies: *Yersinia enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. ruckeri*, *Y. pestis*, *Y. intermedia* e *Y. pseudotuberculosis*.

Por ter demonstrado patogenicidade desde seu primeiro isolamento, *Yersinia enterocolitica* sempre foi objeto de estudo para vários pesquisadores e muitos diagnósticos clínicos tendo esta bactéria como agente etiológico foram relatados (HANNUSELA & HAVONEN, 1969; SONNEWIRTH & WEAVER, 1970; LAFLEUR & MARTINEAU, 1973; GUTMAN et alii, 1973; ZEN-YOGI et alii, 1973; BECH et alii, 1974; HAGEN et alii, 1974; QUAN et alii, 1974).

O processo infeccioso devido a bactéria *Y. enterocolitica* pode manifestar-se de várias formas dependendo do "strain" (sorotipo e biotipo), dosagem, fatores genéticos, idade e condição física do hospedeiro (BOTTONI, 1977; LARSON, 1979).

LARSON (1979), sugeriu a classificação em três estágios para as várias manifestações clínicas das yersinioses. O primeiro deles é manifestado entre dois a três dias após a contração da doença, sendo caracterizado por enterite, linfadenite, apendicite, ileíte terminal, tonsilite, pneumonia, febre de origem desconhecida, septicemia e algumas formas de infecções localizadas de grave aspecto tais como erisipelas e abscessos. A fase secundária, também conhecida como estado de complicação, aparece entre uma a três semanas e freqüentemente requer a hospitalização

do paciente. Os sintomas apresentados nesta fase incluem hemorragias de pele, artrite reumatóide, inflamações musculares e processo infeccioso do coração e pericárdio. Na fase terciária, é manifestado o aumento das glândulas das orelhas, lesões desestruturadas no sistema sinovial, culminando com as doenças auto-imunes.

Apesar do esforço de vários autores no sentido de determinar a epidemiologia, bem como as fontes de infecção por *Y. enterocolitica*, estes fatores ainda não foram bem elucidados. Assim, o microrganismo tem sido isolado de diversas origens, tais como: fezes (GREENWOOD et alii, 1975; PISZOLITO et alii, 1979; DAVENISH & SHIEMANN, 1981; MARTINES & MOURA, 1984; NUNES & RICCIARDI, 1986), água (HIGHSMITH et alii, 1977; SCHIEMAN, 1978; LANGELAND, 1983; FREITAS et alii, 1987) e diversos tipos de alimentos incluindo: vegetais (MOLLARETT et alii, 1979; LANDGRAF & FALCÃO, 1987), frutos do mar (TOMA, 1973; PEIXOTO et alii, 1979; QUAN, 1979), confeitos (DELMAS & VIDON, 1985), alimentos infantis (CULLEN et alii, 1986), leite e derivados (BLACK et alii, 1978; BRODSKY, 1984; AHMED et alii, 1986; MOHAMMAD & DRAUGHON, 1987; ROWE, 1988; GREENWOOD & HOPPER, 1989).

Quanto ao consumo de leite relacionado a "moléstias", é interessante relatar que o primeiro grande surto de envenenamento alimentar devidamente caracterizado como iersiniose, ocorreu por consumo de leite achocolatado.

Este fato ocorreu na Divisão Administrativa de Oneida, em Nova York, onde cerca de 220 crianças de uma escola primária foram acometidas com caso agudo de gastroenterite. Trinta e seis crianças foram hospitalizadas e dezesseis apresentaram apendicite, antes que o agente etiológico *Y. enterocolitica* sorogrupo 0:8 biotipo 1 de Wauters fosse identificado. A bactéria foi isolada tanto dos pacientes como das embalagens cartonadas contendo o alimento. Pesquisas posteriores revelaram falhas no processamento pós pasteurização do produto (BLACK et alii, 1978).

Diversos autores também demonstraram a presença de *Y. enterocolitica* em vários tipos de carne. HANNA et alii (1976) analisaram microbiologicamente a presença desta bactéria em carnes de ovinos e bovinos, quando estocadas por 21 a 35 dias em temperaturas de 0 a 3°C. A maior incidência do microrganismo foi observada após 28 dias, em carne cortada em pequenos pedaços e embalada sob condição de alto vácuo. No estudo foi discutido que o risco potencial do crescimento desta bactéria em alimentos cárneos pode ser principalmente devido a quatro fatores: tratamento térmico inadequado, excesso de manipulação, contaminação cruzada e todos estes fatores aliados a capacidade psicrótrófica do microrganismo. Estes mesmos autores, em 1977, complementaram estas afirmações mostrando claramente a importância da temperatura no desenvolvimento de *Y. enterocolitica* em amostras de carnes suínas e bovinas, quando

inoculadas artificialmente. Amostras estocadas sob temperaturas de 0 a 1°C apresentaram acréscimos lentos no número de células viáveis num período de 1 a 10 dias. Entretanto, foi observado incremento significativo das mesmas para amostras estocadas a 7°C durante o mesmo período. Esta última temperatura apresentada foi considerada marginal para a estocagem de carnes, representando riscos à salubridade do produto.

Suínos tem sido frequentemente associados com casos de iersinioses. HURVEL et alii (1979) realizaram um estudo sobre 854 amostras de conteúdo fecal de suínos coletado em um abatedouro na Suécia. As estirpes de *Y. enterocolitica* isoladas pertenciam ao sorotipo 0:3, ao qual também pertence a maioria das cepas isoladas de infecções humanas, naquele país.

Na Bélgica, WAUTERS (1979) coletou, durante 36 meses, 302 amostras de língua de porco em vários supermercados de venda a varejo. A partir deste material, 168 linhagens de *Y. enterocolitica* pertencentes ao sorotipo 0:3 foram encontrados, concluindo o autor que a bactéria tem como "habitat" normal a cavidade oral de suínos. Resultados similares foram apresentados por TOMA et alii (1979). Estes autores, estudando 1.219 cepas isoladas de seres humanos, animais, água e alimentos, observaram que frequentemente apresentavam as mesmas características bioquímicas, sorológicas e de fagotipagem das comumente isoladas de suínos.

STERN & PIERSON (1979) concluíram que estes animais constituem verdadeiros reservatórios de *Y. enterocolitica* sorotipo 0:3.

ASAKAWA et alii (1979) analisaram um total de 992 amostras quanto a presença de *Y. enterocolitica* em produtos cárneos que foram distribuídos respectivamente em 492 amostras de carne bovina, 300 amostras de carne suína, 150 de fatias de presunto e também 50 amostras de "swabs" recolhidos com gaze esterilizada da superfície de tábuas de cortar carne em açougues. Foi detectado *Y. enterocolitica* em 4% das amostras de fatias de presunto e em 3% das amostras de carne de porco analisadas.

Nenhuma cepa foi isolada a partir de carne bovina, no entanto, 46% das amostras de superfície de tábuas de cortar carne estavam altamente contaminadas com a referida bactéria. De acordo com os resultados obtidos, os autores relataram que as contaminações cruzadas entre carne crua e cozida podem ser facilitadas pelas tábuas de cortar carne. Os autores também incriminaram a carne como a principal fonte de infecção humana por este microrganismo.

QUAN (1979), classificou em sua pesquisa, bioquímica e sorologicamente 367 amostras de *Y. enterocolitica* recebidas pela Divisão de Doenças Transmitidas por vetores do "Center for Disease Control" (CDC), de Atlanta, GA. Destas culturas, 43 foram isoladas a partir de alimentos (leite, carne e ostra) sendo que 22



(51,1%) não foram tipáveis e 21 (48,9%) estavam distribuídas em 11 sorogrupos. Foi concluído que o potencial de transmissão de *Y. enterocolitica* para humanos, através destes alimentos, é significativo, especialmente quando o microrganismo está presente em grande número.

Foi citado por FUKUSHIMA et alii (1979), no Japão, a evidência do envolvimento de moscas na contaminação de alimentos com *Y. enterocolitica* originária de suínos. Em várias fazendas daquele país, a bactéria foi isolada a partir de moscas capturadas de cozinhas e estas apresentaram os mesmos biotipos das estirpes comumente isoladas de fezes de porcos criados no local.

*Yersinia enterocolitica* tem sido também isolada de produtos avícolas. Assim, NORBERG (1981), examinando 82 amostras de frango congelado obtidas de açougues, na Suécia, relatou que 18 amostras (2,2%) apresentaram *Campylobacter fetus sub jejuni*, 20 (24,5%) continham *Y. enterocolitica* e em apenas uma foi detectada *Salmonella typhimurium*. O autor deduziu que apesar da carne de frango e dos ovos constituírem os principais vetores de *Salmonella* sp, os dados obtidos mostraram que *C. fetus* e *Y. enterocolitica* são muito mais comuns neste tipo de alimento, devendo, portanto, serem incluídos na rotina do controle microbiológico dos produtos granjeiros.

DE BOER et alii (1982), também pesquisando produtos avícolas, citam que muitos estudos têm sido

publicados descrevendo a microbiologia dos referidos produtos durante o processamento e estocagem. Em sua pesquisa, observaram que as carcaças de frango são isentas de bactérias psicotróficas contaminantes após a fase de escaldadura, que geralmente é realizada a 50-58°C. Citam os autores que a contaminação com os principais psicotróficos Gram negativos ocorre durante a estocagem a baixas temperaturas.

Salsichas tipo bolonha embaladas sob vácuo foram estudadas por NIELSEN & ZEUTHEN em três trabalhos distintos (1985a, 1985b, 1986). No primeiro estudo, os pesquisadores verificaram a influência da flora láctica no desenvolvimento de bactérias patogênicas, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteridis*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus*. Os autores observaram o desenvolvimento normal de células do sorotipo 0:3 de *Yersinia enterocolitica*, quando inoculadas e as amostras incubadas a temperatura de 5°C. Apenas houve inibição da bactéria posteriormente, pela inoculação conjunta de *Lactobacillus* sp. Os autores deduziram que decréscimos nos valores de pH influenciam o desenvolvimento de *Y. enterocolitica* neste tipo de produto. No segundo estudo, NIELSEN & ZEUTHEN (1985b), inocularam as mesmas bactérias citadas acima, entretanto testando a capacidade de desenvolvimento das mesmas em diferentes concentrações de cloreto de sódio. Para adições de sal até 4,5% em tempe-

raturas de 2 e 5°C somente *Y. enterocolitica* não foi inibida.

Como a temperatura teve um papel importante na estocagem de salsichas tipo bolonha, no terceiro trabalho dos autores (NIELSEN & ZEUTHEN, 1986), esta característica extrínseca ao produto foi estudada com maiores detalhes. Os pesquisadores demonstraram o efeito de flutuações de temperatura de estocagem no desenvolvimento de algumas bactérias deterioradoras como *Brochothrix thermosphacta*, *Serratia liquefaciens* e *Lactobacillus* sp e patogênicas como *Y. enterocolitica* e *Vibrio* sp.

As temperaturas utilizadas foram -2,0, 2,0 e 5,0°C. *Yersinia enterocolitica* não se desenvolveu no produto sob temperatura constante de -2°C, contudo, foi capaz de se desenvolver nas temperaturas de 2,0 e 5,0°C em grande número.

PALUMBO (1986), também estudando o efeito da temperatura de estocagem no desenvolvimento de bactérias patogênicas, cita que o armazenamento de alimentos a 5°C, tradicionalmente foi considerado como adequado para restrição destes microrganismos em alimentos. No entanto, relata o autor um novo grupo de bactérias patogênicas com capacidade psicrotrófica, capazes de se desenvolverem competitivamente em alimentos estocados a 5°C. As bactérias que se adequaram a este critério foram: *Clostridium botulinum* tipo

E, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila*.

TERNSTRON & MOLIN (1987), pesquisaram a incidência de *Y. enterocolitica* em 135 amostras de carne de origem avícola, suína e bovina. Esta bactéria foi isolada em 14 amostras de carne de porco e em 5 amostras de carne de frango. Nas amostras de carne bovina foram encontrados linhagens não tipáveis com o "kit" de antisoros disponíveis. Apesar de não ter encontrado os sorotipos normalmente envolvidos em surtos de envenenamentos alimentares, os autores citam a importância desta bactéria, colocando-a entre os "meat born pathogens" ou microrganismos patogênicos "nascidos" da carne.

TOLEDO & FALCÃO (1980), evidenciam que apesar de *Y. enterocolitica* ser um microrganismo isolado com muita frequência em várias regiões do mundo, poucos são os relatos de seu isolamento no Brasil. O primeiro isolamento foi descrito em nosso país, a partir de abscessos hepáticos de macaco, em 1968. Em 1976, citam os autores que foi isolada a primeira linhagem de origem humana das fezes de uma criança com quadro de apendicite. Posteriormente, outras linhagens foram isoladas em São Paulo e no Rio de Janeiro (GIORGI et alii, 1969; STUMPF et alii, 1978; PISZOLITO et alii, 1979).

*Yersinia* sp, em nosso meio, também foi isolada a partir do leite (UBOLDI-EIROA et alii, 1984;

TIBANA et alii, 1987); carne bovina e suína (WARKEN et alii, 1987; UBOLDI-EIROA et alii, 1988) e amostras de água de diversas origens (FREITAS, 1986).

LANDGRAF & FALCÃO (1987), pesquisaram a presença de *Yersinia* sp em 138 amostras de alimentos e verificaram que nenhuma das cepas isoladas pertenciam a sorogrupos reconhecidamente patogênicos. Entretanto, citaram que a presença dessa bactéria em alimentos mantidos sob refrigeração deve ser vista com restrição, uma vez que cepas de sorotipos de *Y. enterocolitica* considerados não patogênicos estão se adaptando ao homem.

WARKEN et alii (1987), verificaram a incidência de espécies de *Yersinia* sp em amostras de carnes comercializadas no Rio de Janeiro. Vinte e cinco amostras de vários tipos de carnes foram analisadas. *Yersinia* sp foi isolada em 80% das amostras de carne bovina e de frango; em 60% das amostras de carne moída e de fígado; e em 20% de carne de porco. Quinze linhagens foram identificadas como *Yersinia intermedia*, nove como *Y. enterocolitica*, quatro como *Y. kristensenii* e uma como *Y. frederiksenii*.

UBOLDI-EIROA et alii (1988), pesquisaram a presença de *Yersinia* sp em lingüiça fresca comercializada na região de Campinas, Estado de São Paulo. Sessenta e uma amostras do produto processadas com mistura de carne suína e bovina pertencentes a seis marcas comerciais foram coletadas durante um ano e meio. Das amostras analisadas

14,7% apresentaram contaminação por espécies de *Yersinia*. A autora comentou que os sorotipos geralmente associados a processos patogênicos no homem são: 0:3; 0:5,27; 0:6,6; 0:8 e 0:9. Ficou também esclarecido que embora a bactéria não sobreviva a tratamentos térmicos de pasteurização ou cocção não se deve subestimar o risco potencial de contaminação com *Yersinia* sp quando ocorre cocção incompleta do produto ou contaminações cruzadas durante seu preparo pelo consumidor.

Trabalhos recentes demonstraram que nos últimos dez anos os relatos da incidência de *Y. enterocolitica* em alimentos aumentaram em todo mundo. Foi sugerido que o incremento na pesquisa deste enteropatógeno seja devido a quatro fatores respectivamente: conscientização do potencial patogênico da bactéria, aperfeiçoamento da metodologia de isolamento, desenvolvimento contínuo de produtos mantidos sob refrigeração e o aumento na demanda destes produtos pelo homem moderno (GILMOUR & WALKER, 1988; MATTILA & FROST, 1988).

LECHONOWICH (1989) demonstrou que *Yersinia* sp pode desenvolver, em produtos cárneos, populações de 100 a 10 milhões de células por grama quando inoculados e mantidos a 7°C durante 10 dias. O pesquisador comentou que estes alimentos estocados em temperatura inadequada de refrigeração (superior a 7°C) representam sérios riscos para saúde pública.

## 2.2. Observações bibliográficas importantes para a metodologia de isolamento de *Y. enterocolitica*.

Muitos métodos têm sido propostos para o isolamento de *Y. enterocolitica* a partir de materiais clínicos, alimentos ou espécimes provenientes do ambiente.

As técnicas propostas para o isolamento de *Yersinia* sp, geralmente propiciam sua multiplicação em caldos de enriquecimento incubados em temperaturas de refrigerador. Posteriormente, aliquotas provenientes do caldo de enriquecimento são estriadas em agar seletivo. No método de enriquecimento clássico é recomendado o uso de solução salina tamponada (pH = 7,6) a 4°C por 21 dias (ZEN-YOGI, 1974).

GREENWOOD et alii (1975), citaram que mesmo com a utilização de meios e procedimentos convencionais, o organismo é difícil de ser isolado. Devido ao intrincado isolamento, vários caldos de enriquecimento seletivo vêm sendo sugeridos e geralmente apresentando sucesso somente para determinados "strains".

WAUTERS (1973), demonstrou que "strains" clínicos tais como 0:3 e 0:9 podem se desenvolver em caldo selenito cistina com 40 mg/l de novobiocina e em caldo Rappaport Modificado (RMC) contendo cloreto de magnésio, verde malaquita e carbenicilina dissolvidos.

STERN & PIERSON (1979), verificaram completa

inibição do sorotipo O:8, pela utilização do caldo RMC para o isolamento de *Y. enterocolitica* a partir de ostras frescas.

Com o objetivo de aperfeiçoar novas técnicas para o isolamento de *Y. enterocolitica*, vários autores relataram metodologias diferentes na literatura. AULISIO et alii (1980), descreveram um método de isolamento para a referida bactéria apresentando sensibilidade 10 a 1.000 vezes maior do que os outros anteriormente citados. A metodologia consiste no tratamento da amostra com agente alcalino (solução salina a 0,5% contendo 0,5% de KOH), após a fase de enriquecimento. O tratamento alcalino tem como objetivo a eliminação de grande parte dos microrganismos competidores que dificultam o isolamento de espécies do gênero *Yersinia*. DE BOER et alii (1982) observaram a eliminação de grande número de bactérias, tais como: *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Enterobacter* que encontravam-se em grande quantidade em carcaças de frango, pela utilização desta técnica.

DOYLE et alii (1981), utilizando a técnica proposta por AULISIO et alii (1980), apresentaram uma metodologia mais específica para o isolamento de *Y. enterocolitica*, a partir de carnes. Os autores avaliaram quatro técnicas para o isolamento deste microrganismo. Duas delas (enriquecimento seletivo em caldo Rappaport Modificado e enriquecimento em solução salina tamponada) envolveram



resfriamento a 4°C por 21 dias. As outras duas (enriquecimento em caldo Rappaport Modificado e caldo de enriquecimento com selenito de sódio) foram desenvolvidos em temperatura ambiente. Todas as amostras foram tratadas com solução salina de KOH após enriquecimento e posteriormente estriadas em Ágar Mac Conkey. Neste estudo ficou claramente demonstrado que o meio de enriquecimento a frio por 14 a 21 dias, utilizando solução salina tamponada seguida de tratamento alcalino, foi a técnica de maior sucesso para o isolamento de *Y. enterocolitica* a partir de carnes, pois várias linhagens virulentas foram isoladas, tais como: 0:3, 0:8, 0:6,30, 0:13,7, 0:18 e 0:46.

DOYLE & HUGDAHL (1983), observaram que o enriquecimento por 14 a 21 dias é moroso dificultando os testes de rotina para alimentos e com o intuito de solucionar o problema, estes autores descreveram uma nova metodologia também para carnes. Neste trabalho os autores pretenderam três objetivos: reduzir o tempo de enriquecimento de 14 a 21 dias para três dias ou menos, isolar pelo menos dez células do microrganismo por grama de alimento, e isolar todos os sorotipos clinicamente importantes. Testes foram avaliados utilizando amostragens de 1,0 e 25 g de carne inoculados com *Yersinia enterocolitica* e incubadas a 25°C e 4°C. Posteriormente, as amostras foram expostas ao tratamento alcalino proposto por AULISIO et alii (1980). As melhores condições para o isolamento do

organismo durante o enriquecimento a 25°C foram encontradas depois de 42 e 72 horas de incubação para amostras de 1,0 g e depois de 24 e 48 horas para amostras de 25,0 g. Para o enriquecimento a frio, os melhores resultados foram após 14 dias de incubação. Quanto a técnica do tratamento alcalino, ficou exposto que o isolamento de *Y. enterocolitica*, a partir do enriquecimento a 4°C ou 25°C, pode ser realizado pela exposição ao KOH a 0,25% por dois minutos ou ao KOH a 0,5% por 15 segundos. Assim, ficou concluído pelos autores que a técnica de enriquecimento a 25°C, combinada com tratamento alcalino, apresenta a mesma eficácia da técnica utilizando enriquecimento a 4°C com posterior tratamento alcalino para o isolamento de *Y. enterocolitica*, a partir de carnes.

Os meios seletivos utilizados após a fase de enriquecimento no isolamento de *Y. enterocolitica* a partir de alimentos também encontram-se em fase de aperfeiçoamento. Desta forma, vários meios são relatados na literatura: Agar Mac Conkey (ASAKAWA et alii, 1973; FEELEY et alii, 1976; HANNA et alii, 1977; AULISIO et alii, 1980; DE BOER et alii, 1982; SCHIEMANN, 1983; DOYLE & HUGDAHL, 1983; CULLEN et alii, 1986; TERNSTRON & MOLIN, 1987; LANDGRAF & FALCÃO, 1987), Ágar SS-Salmonella-Shigella (FEELEY et alii, 1976; FEELEY & SCHIEMAN, 1984; TERNSTRON & MOLIN, 1987): Ágar Seletivo para *Yersinia* (UBOLDI-EIROA et alii, 1984), Ágar Cefsulodin - Irgasan e Novobiocina (DAVENISH & SCHIEMAN, 1981; SCHIEMANN, 1983; FUKUSHIMA, 1985; WAUTERS et alii,

1988; UBOLDI-EIROA et alii, 1988; GREENWOOD & HOPPER, 1989); Ágar citrato desoxycolato também conhecido como Leifson Agar Modificado (WAUTERS, 1973), Ágar Bismuto Sulfito (HANNA et alii, 1977; STERN & OBLINGER, 1980); Ágar Rappaport Modificado mais tween 80 e sorbitol (LEE, 1977); Ágar desoxycholate (WARKEN et alii, 1987); Ágar Mac Conkey mais tween 80 (STERN, 1981; LEE et alii, 1980).

FEELEY & SCHIEMANN (1984), citam que muitos tipos de agar seletivo para enterobactérias têm sido propostos para o isolamento de *Yersinia enterocolitica*, incluindo Mac Conkey, Salmonella-Shigella, Eosina Azul de Metileno, Lactose Uréia e Drigalsky. Os autores também comentam que os meios de Mac Conkey e SS são os mais populares, entretanto não sendo satisfatórios para o isolamento de todas as estirpes de *Yersinia enterocolitica*.

TOLEDO (1989), relata que recentemente foram propostos vários meios especiais para o isolamento da bactéria, mas segundo a autora não há vantagens nítidas destes meios sobre os de Mac Conkey e SS quando os mesmos são utilizados em medicina para pacientes portadores de diarreia aguda.

O ágar CIN (cefsulodin - irgasan e novobiocina) segundo FEELEY & SCHIEMANN (1984), é um meio seletivo e diferencial que provê a recuperação de todos os "strains" de *Yersinia enterocolitica* com 18 a 20 horas de incubação a 30°C.

### 2.3. Considerações generalizadas quanto a qualidade microbiológica da carne bovina. Contagem total

O processo de deterioração de carnes frescas é extremamente complexo, nele podendo intervir variada flora microbiana, presença ou ausência de ar atmosférico e principalmente a carga contaminante inicial que é decisiva no desencadeamento do processo em si.

SHARF (1972), relata que os microrganismos contaminam a carne a começar do próprio animal. Os contaminantes podem ser disseminados durante as diferentes fases do preparo da carcaça, no ato da sangria, esfolagem, na evisceração e durante a limpeza ou toalete.

BAXTER & ILLSTON (1976), descrevem, que a contaminação bacteriana das carnes resfriadas tem sido descrita desde 1880. A partir de então, numerosos pesquisadores verificaram as alterações geradas no produto procurando identificar os grupos microbianos mais comuns.

DAINTY (1971), descreve que os microrganismos geralmente são considerados como principais agentes causais da deterioração de carnes frescas. Sendo assim, a determinação de seu número (Contagem Total) é recomendada como método padrão de qualidade do produto. O autor apresenta como desvantagem do método, a inexistência de um meio de cultura que seja totalmente não seletivo aos diferentes

tipos de microrganismos encontrados no referido alimento.

De acordo com EMSWILLER et alii (1976), a Contagem Total pode ser recomendada no controle de qualidade da carne refrigerada indicando a possível deterioração do produto ou condições decorridas durante o processamento e/ou estocagem.

GREEN (1976), comenta que em controle de qualidade é frequentemente difícil saber quais bactérias (ou grupo de bactérias) enumerar para um determinado produto alimentício. Todavia, para a maioria dos alimentos, o método de Contagem Total pode ser utilizado como indicador de qualidade.

No Brasil, a resolução 13/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA (1978) do Ministério da Saúde, analisando o limite da contagem padrão em placas (nível máximo) para carnes frescas refrigeradas ou congeladas, carne moída, etc, estabelece que o mesmo é de  $3,0 \times 10^6$  bactérias/g.

A qualidade microbiológica da carne moída bovina tem sido objeto de estudo de vários investigadores em diferentes áreas geográficas. MARTINELLI FILHO et alii (1975) descrevem que a carne moída constitui um meio altamente favorável para a multiplicação de bactérias. Foi comentado pelos autores que a fragmentação dos tecidos com

liberação de suco celular propicia a proliferação das mesmas no produto.

GRANER et alii (1971), relatam que a população microbiana existente na carne moída encontrada no comércio varejista depende da qualidade sob o ponto de vista microbiológico, da matéria prima utilizada no seu preparo, do estado de limpeza do equipamento empregado, do tempo e da temperatura de armazenamento. SUMNER (1978) ressaltou que a qualidade microbiológica do produto final é uma resultante dos cuidados observados nas diferentes fases do processamento.

Segundo WYATT & GUY (1980), a qualidade microbiológica da carne moída depende da carne utilizada durante o processamento e também do tempo e temperatura de estocagem.

Relatos foram publicados incriminando produtos contendo carne moída como fonte de microrganismos associados com infecção e intoxicação alimentar. Entre eles, podem ser destacados: hamburger, bolo de carne, almondegas, carne moída cozida, etc. (GOEPFERT & KIM, 1975; TIVARI & MAXCI, 1972).

Uma pesquisa feita de 1968 a 1977 nos Estados Unidos indicou que a carne de boi e de frango e seus subprodutos foram veículos de 50% dos casos de infecção ou envenenamento alimentar. Carne moída cozida, salsicha de

porco e frango foram os veículos mais frequentes (BRYAN, 1980).

O uso da contagem total como indicador de qualidade para carne moída, também é muito difundido. ROGERS & MC CLESKER (1957), salientam que os números encontrados nas contagens de bactérias obtidas de amostras de carne moída são claramente indicativas da qualidade do produto.

LARKIN et alii (1972), utilizaram a contagem total de bactérias para a avaliação da qualidade microbiológica da carne bovina moída. Os autores verificaram que 36% das amostras apresentaram mais de  $5,0 \times 10^6$  bactérias por grama.

Segundo ALDELAIMY & STYLES (1975), a deterioração é organolépticamente detectável quando a contagem total atinge  $10^8$  bactérias por grama. Com contagens iniciais de  $10^4$  a  $10^5$  bactérias/g o período de conservação do produto pode atingir 3 a 4 dias quando estocado a  $5^{\circ}\text{C}$ .

LEITE et alii (1988), verificaram valores superiores a  $10^6$  para contagem total em 11% das amostras de carne moída examinadas. Segundo o ICMFS - International Committee on Microbiological Specification for Food (1978), com estes números de células bacterianas o alimento pode estar em fase de deterioração.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Origem e preparo das amostras

Realizou-se exame microbiológico em 100 amostras de carne bovina adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Barretos - SP, no período compreendido entre novembro de 1989 a julho de 1990.

Na ocasião da amostragem, carne de primeira em pedaço (coxão mole, patinho, contra-filé, etc) foi pesada em duas porções de 100 g sendo uma delas moída na hora e a outra embrulhada separadamente. Neste ínterim, foi anotada a temperatura que as amostras encontravam-se estocadas.

As amostras foram coletadas apenas quando suas temperaturas de estocagem encontravam-se entre  $-1,0$  a  $7,0^{\circ}\text{C}$ .

O mesmo procedimento foi obedecido para amostragem de carne de segunda qualidade (músculo, acém, retalhos de carne de diversas origens, etc).

Uma vez adquiridas, as amostras foram trans-



portadas em caixas de material isotérmico, contendo blocos de gelo. O transporte foi feito imediatamente para o laboratório, a fim de serem analisadas o mais rapidamente possível.

### 3.2. Cultura Padrão

FEELEY et alii (1976), recomendam a utilização de *Yersinia enterocolitica* em cultura pura para auxiliar o pesquisador durante as fases de identificação.

Nesta pesquisa, foi utilizada como cultura padrão a cepa de *Yersinia enterocolitica* FCF 451 - Ye 4 0:3 VIII obtida do Banco de Culturas do Departamento de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade do Estado de São Paulo (UNESP).

### 3.3. Procedimento das análises

#### 3.3.1. Contagem de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas mesófilas. Contagem Total.

Para a contagem total, 11,0 g de cada amostra de carne foram homogeneizadas em 99 ml de água peptonada a 0,1% em liquidificador estéril por dois minutos. A partir do material triturado (diluição  $10^{-1}$ ) foram realizadas

diluições decimais sucessivas em água peptonada a 0,1%. A partir das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , o material foi semeado em duplicata pela técnica "Pour Plate" utilizando o meio de cultura PCA (Plate Count Agar DIFCO-0479) e incubados a 35°C/24 horas. A seguir, procedeu-se a contagem das colônias e interpretação dos resultados segundo o INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD - ICMSF (1978).

### 3.3.2. Isolamento de *Yersinia enterocolitica*

Para a pesquisa de *Yersinia enterocolitica* foi utilizada a metodologia proposta por FEELEY & SCHIEMANN (1984) onde 25,0 g de cada amostra foram homogeneizadas em 225 ml de solução fosfato salina pH = 7,6 contendo 1/15M de cloreto de sódio. Posteriormente, este material foi incubado a 25°C durante 48 horas (DOYLE & HUGDAHL, 1983), para permitir o enriquecimento primário.

Após o período de enriquecimento, uma alíquota de 0,5 ml de cada amostra foi colocada em 4,5 ml de solução salina de alcali diluído (0,5% e 0,25% respectivamente). A seguir 0,1 ml das culturas tratadas com alcali foram inoculadas em Agar Mc Conkey e Agar Salmonella - Shigella e incubadas a 25°C por 48 horas.

As colônias suspeitas de *Y. enterocolitica* foram isoladas em número de aproximadamente cinco por placa em Agar Nutriente inclinado, seguido de incubação a 25°C por 48 horas. Posteriormente, foram examinadas quanto a pureza por meio de novas estrias em Agar Mac Conkey e Agar Salmonella-Shigella.

As colônias típicas de *Y. enterocolitica* aparecem em ambos meios de cultura arredondadas, incolores e transparentes. Contudo, o diâmetro das mesmas frequentemente aparece diferente. Assim, as colônias provenientes do Agar Mac Conkey aparecem maiores com 3 mm de diâmetro, e as semeadas em meio SS com 1 mm de diâmetro, após o período proposto para a incubação.

A maioria das estirpes de *Y. enterocolitica* não utiliza a lactose apresentando, desse modo, pequenas colônias incolores após 48 horas nos referidos meios (TOLEDO & FALCÃO, 1980; STERN & PIERSON, 1979).

FEELEY & SCHIEMANN (1984), relataram que a lactose usualmente não é fermentada por *Yersinia* sp nos meios para enterobactérias comumente usados. Porém, estirpes ocasionais fermentadoras de lactose podem ser encontradas. Por esta razão, colônias lactose positivas devem ser selecionadas quando se assemelharem em tamanho e morfologia com *Y. enterocolitica*. Desta forma, quando havia semelhanças culturais, estas colônias lactose positivas foram semeadas para posterior identificação bioquímica.

### 3.3.3. Identificação bioquímica de *Yersinia enterocolitica*

As colônias suspeitas provenientes do Agar Mac Conkey e/ou Salmonella-Shigella e previamente caracterizadas por coloração de Gram foram identificadas bioquimicamente segundo esquema proposto por FALCÃO (1981). Os principais testes bioquímicos realizados para o isolamento de *Yersinia enterocolitica* neste estudo podem ser observados na Tabela 8.

### 3.4. Análises Estatísticas

De acordo com o planejamento experimental feito para a obtenção dos dados das Tabelas 1, 2, 3 e 4, tem-se dois fatores categorizados em dois níveis: o primeiro é o indicador de qualidade o qual assume os valores 0 (zero) no caso de carne de primeira e 1 (um) para carne de segunda; o segundo é denominado indicador de grupo cujo valor 0 (zero) foi atribuído para carne em pedaço e 1 (um) para carne moída.

A temperatura também foi um fator observado mas não categoricamente. Para análise da influência deste fator na contagem total, utilizou-se análise de regressão a fim de avaliar o quanto a temperatura afeta o número de bactérias.

A análise de variância (ANOVA) foi feita com a finalidade de verificar a significância dos fatores envolvidos (indicador de qualidade e indicador de grupo).

A possibilidade de infecção através da moagem com *Yersinia enterocolitica* nas amostras de carne, foi analisada via cálculos de probabilidade condicional, acompanhados de intervalos de confiança.

A ocorrência de *Yersinia enterocolitica* foi analisada em termos percentuais.

Para a análise estatística dos dados obtidos, foi utilizado o pacote estatístico SAS "Statistical Analysis System".

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Contagem total

Os resultados da contagem total de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas mesófilas (também conhecida como contagem total), para as amostras de carne de primeira e segunda (moída e pedaço) encontram-se respectivamente nas Tabelas 1, 2, 3, e 4. A análise estatística da variância entre os tratamentos está demonstrada na Tabela 5.

Através da análise de variância (ANOVA) ficou demonstrado que a qualidade da carne (primeira ou segunda) não influencia na contagem total de bactérias. Contudo, ficou expresso de modo claro a diferença significativa entre carne em pedaço e moída.

Os "box plots" (gráficos de caixas) são úteis para demonstrar estas distribuições mostrando o valor mínimo e o máximo e a porcentagem da distribuição em intervalos de 25%. As "caixas" demonstram a concentração de 50% dos valores centrais da distribuição. A linha horizontal

existente nos mesmos representa a mediana (valor acima e abaixo do qual estão 50% dos valores da distribuição).

Os "box plots" adjacentes apresentados na Figura 1, mostram graficamente que o logaritmo da contagem total de bactérias para a carne moída é maior do que para carne em pedaço. O fato apresentado (comprovado pela Análise de Variância - ANOVA), indica que o moedor de carne contribuiu significativamente para o aumento da contaminação da carne, tendo em vista que as carnes moídas foram provenientes das mesmas peças que originaram as carnes em pedaço.

Através dos "box plots" adjacentes da Figura 1, também pode ser verificado que a carne de segunda parecer ter uma contagem ligeiramente superior a de primeira. Entretanto, os cálculos de análise de variância (ANOVA), demonstraram que esta pequena variação é desprezível ou seja, a qualidade da carne (primeira ou segunda) não afeta a contagem total de bactérias.

A variação exponencial da contagem total verificada nas 100 amostras de produtos cárneos analisados, pode ser observada na Figura 2.

Na Tabela 6, a distribuição exponencial permite observar que o aumento das unidades formadoras de colônias/g de amostra pós moagem foi da ordem de onze vezes.

As Figuras 3 e 4 demonstraram respectivamente

a influência da temperatura para as amostras de carne (moída e pedaço) de primeira e segunda qualidade.

As inclinações das curvas de regressão linear (coeficientes de regressão) não foram significativamente diferentes de zero.

Os resultados exprimem que o intervalo de temperatura (-1 a 7°C) não influenciou no aumento da contagem bacteriana para os indicadores de qualidade e de grupo analisados. Contudo, observa-se nestes gráficos que a média do logaritmo da contagem bacteriana em carne moída é maior do que em carne em pedaço.

Nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 também encontram-se destacadas as contagens totais cujos valores não estão enquadrados na resolução 13/78, aprovada pela COMISSÃO DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS - CNNPA (1978) e conforme decreto estabelecido pelo GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO (1978). Ficou estabelecido pelos referidos órgãos para carne em peça ou moída, o limite máximo para contagem total de  $3,0 \times 10^6$  bactérias/g.

Com base nestes normativos, verificou-se que nenhuma amostra de carne em pedaço de primeira ou segunda ultrapassou o limite mencionado. No entanto, 16% das amostras de carne de primeira e 24% das amostras de segunda, após a moagem, mostraram contagens acima do nível estabelecido pelos órgãos competentes citados.

Comparando-se os valores obtidos nesta pes-



quisa com o padrão ( $\leq 5,0 \times 10^5$ ) estabelecido na Bulgária, França e Portugal (BURZYNSKA et alii, 1969<sup>1</sup>; MILEY & ROVACHEV, 1970<sup>2</sup>) citado por ALMEIDA (1983), verifica-se que 4% das amostras de carne em pedaço de primeira (CP 1a.); 12% de carne em pedaço de segunda (CP 2a.); 60% de carne moída de primeira (CM 1a) e 84% de carne moída de 2a.(CM 2a) não se enquadraram no padrão dos países citados.

Contrariamente nenhuma amostra deste estudo (CP 1a., CP 2a., CM 1a. ou CM 2a.) apresentou contagem superior a  $1,0 \times 10^7$  bactérias/g. WESTHOF & FELDSTEIN (1976) pesquisando a qualidade bacteriológica da carne moída no Estado de Maryland (E.U.A.), constatou que 18% das amostras coletadas excederam  $1,0 \times 10^7$  bactérias/g. No Canadá, (Ontário), DUITSCHAEVER et alii (1973) verificaram que 30% das amostras de carne moída analisadas também excederam este alto valor de contagem.

No Brasil, LEITE et alii (1988), verificaram que 18% das amostras de carne moída analisadas apresentaram contagens entre  $10^6$ - $10^7$  bactérias/g.

---

<sup>1</sup>BURZYNSKA, H.; FRASUNRIEWICZ, B.; SEDRZEIEWSKA, H.; LEWICKA, J.; NOWOTKO, S.; WALIKIEWICZ WASI; LEWSKA, J.; VORROITER, J. Bacterial contamination of refrigerated minced meat. *Food Science and Technology Abstracts*, Washington, 1(12): 5883, 1969.

<sup>2</sup>MILEY, M. & ROVACHEV, A. Microbiological and biochemical studies of semi-manufactured meat products. I. Microflora of minced meat. *Food Science and Technology Abstracts*, Washington, 2(7): 5629, 1970.

#### 4.2. Avaliação do efeito da moagem na disseminação de *Yersinia enterocolitica* nas amostras de produtos cárneos analisados

Estimou-se a probabilidade condicional de que carne moída seja contaminada com *Yersinia enterocolitica*, dado que o pedaço correspondente que a originou não encontrava-se infectado.

A qualidade da carne (primeira ou segunda) não foi considerada.

Os cálculos de probabilidade condicional (95% de confiabilidade), resultaram no intervalo de confiança de 0 a 0,14.

Em termos estatísticos, o intervalo apresentado demonstra pequena evidência de que o processo de moagem possa contribuir com a disseminação de *Y. enterocolitica*. No entanto, não é suficientemente diferente de zero para que a hipótese seja rejeitada.

Como não foram observadas referências bibliográficas desta natureza no Brasil ou Exterior, fica sugerido que novos trabalhos devam ser realizados para efeito de comparação.

#### 4.3. Ocorrência de *Yersinia enterocolitica*

As porcentagens de isolamento de *Yersinia en-*

*terocolitica* para as amostras de carne de primeira em pedaço e moída respectivamente (CP 1a e CM 1a) e carne de segunda em pedaço e moída (CP 2a e CM 2a) encontram-se na Tabela 7. As porcentagens descritas são respectivamente as seguintes: CP 1a (8%); CM 1a (12%); CP 2a (12%) e CM 2a (16%).

Estes valores são comparáveis em média a outros obtidos no Exterior. Um estudo conduzido no oeste da Alemanha revelou que 28,9% das amostras de frango, 34% das amostras de carne de porco e 10,8% de carne de boi, obtidas de mercados de venda a varejo estavam contaminadas com *Y. enterocolitica* (SWAMINATHAN et alii, 1982).

No Japão, de 61 amostras de carne bovina analisadas no período de 1973 a 1974, 14,6% apresentaram a referida bactéria (INOUE & KUROSE, 1975). Entretanto, WARREN et alii (1987) pesquisando a ocorrência de *Yersinia* sp em carnes comercializadas no Rio de Janeiro relatam que *Y. enterocolitica* foi isolada em 40% das amostras.

Relacionando os fatos apresentados parece indispensável ressaltar que as porcentagens encontradas nesta pesquisa só deverão ser comparadas de maneira correta com autores que amostrarem carnes estocadas sob refrigeração (em temperaturas abaixo de 7°C). Isto porque a referida bactéria encontra condições melhores de desenvolvimento de 7 a 25°C. Este intervalo de temperatura representa condições

ascendentes de desenvolvimento do patógeno, culminando com a temperatura ótima de crescimento.

As possíveis vias de contaminação da carne bovina com *Y. enterocolitica* podem estar relacionadas a diversos fatores. Muitos pesquisadores consideram suínos como verdadeiros reservatórios da bactéria.

SCHIEMANN (1980), isolou o patógeno em 49% das amostras de carne de porco obtidas em açougues no Canadá. CRISTENSEN (1982) relatou a incidência de *Y. enterocolitica* em 26,05% de língua de porco coletada na Dinamarca, contudo nenhuma cepa foi isolada a partir de línguas bovinas. ASAKAWA et alii (1979) através de "swabs" de mesas de cortar carne em açougues verificaram que 46% das superfícies das mesmas estavam altamente contaminadas com *Yersinia enterocolitica*.

Da correlação dos fatos apresentados no parágrafo anterior, infere-se que a carne suína reflete preocupação para os produtos cárneos de origem bovina quanto a contaminação com *Yersinia enterocolitica*. Isto porque, mesas ou tábuas de cortar carne em açougues são comuns para os referidos produtos.

Outras vias de contaminação também podem ser elucidadas, a começar do próprio abatedouro. STERN (1981), descreve que *Y. enterocolitica* procedente de órgãos entéricos pode contaminar várias partes da carcaça bovina

durante a matança e toaleta das mesmas. O autor ainda incrimina a manipulação como via de disseminação.

Um considerável montante de informações tem sido compilado nos últimos dez anos a respeito da epidemiologia, isolamento e métodos de identificação de *Yersinia enterocolitica*. Entretanto, um grande número de patogenias não foi completamente esclarecido, assim como uma metodologia de isolamento efetiva ainda não foi reportada.

SWAMINATHAN et alii (1982), relatam que muitos meios seletivos e diferenciais têm sido desenvolvidos, no entanto os caldos de enriquecimento utilizados na fase anterior da metodologia necessitam de maior refinamento. O autor ainda cita que os processos bioquímicos utilizados para a confirmação dos isolados de *Y. enterocolitica* devem ser standardizados.

Apesar de todas as dificuldades apresentadas para o isolamento e identificação de *Y. enterocolitica*, a metodologia proposta por DOYLE & HUGDAHL (1983) mostrou-se eficaz, uma vez que foi possível isolar e identificar a referida bactéria em 12% das amostras coletadas nesta pesquisa.

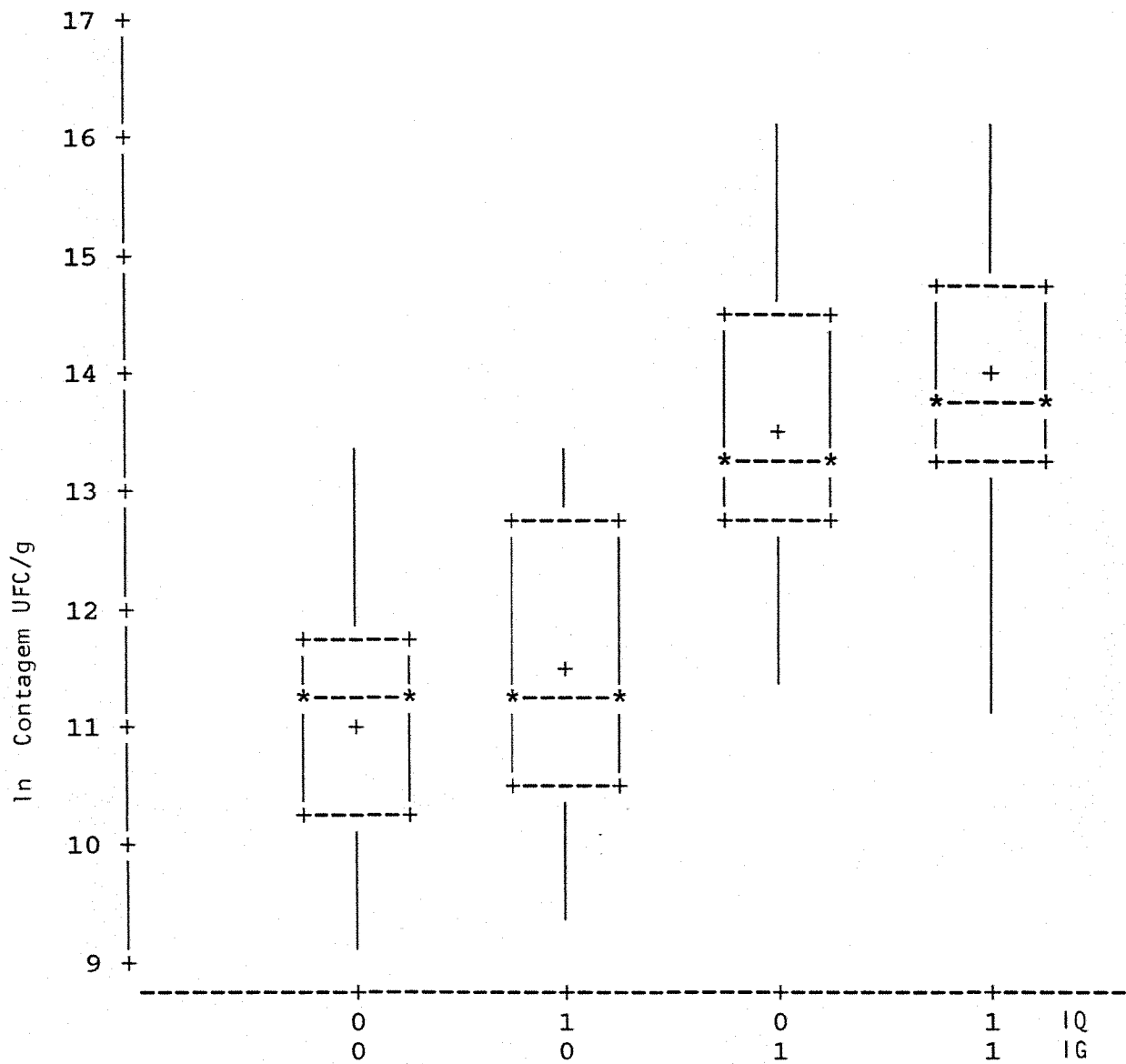


Figura 1. "Box plots" referentes aos indicadores de qualidade e de grupo analisados.

Indicador de qualidade (IQ): 0 - carne de primeira  
1 - carne de segunda

Indicador de grupo (IG) : 0 - carne em pedaço  
1 - carne moída

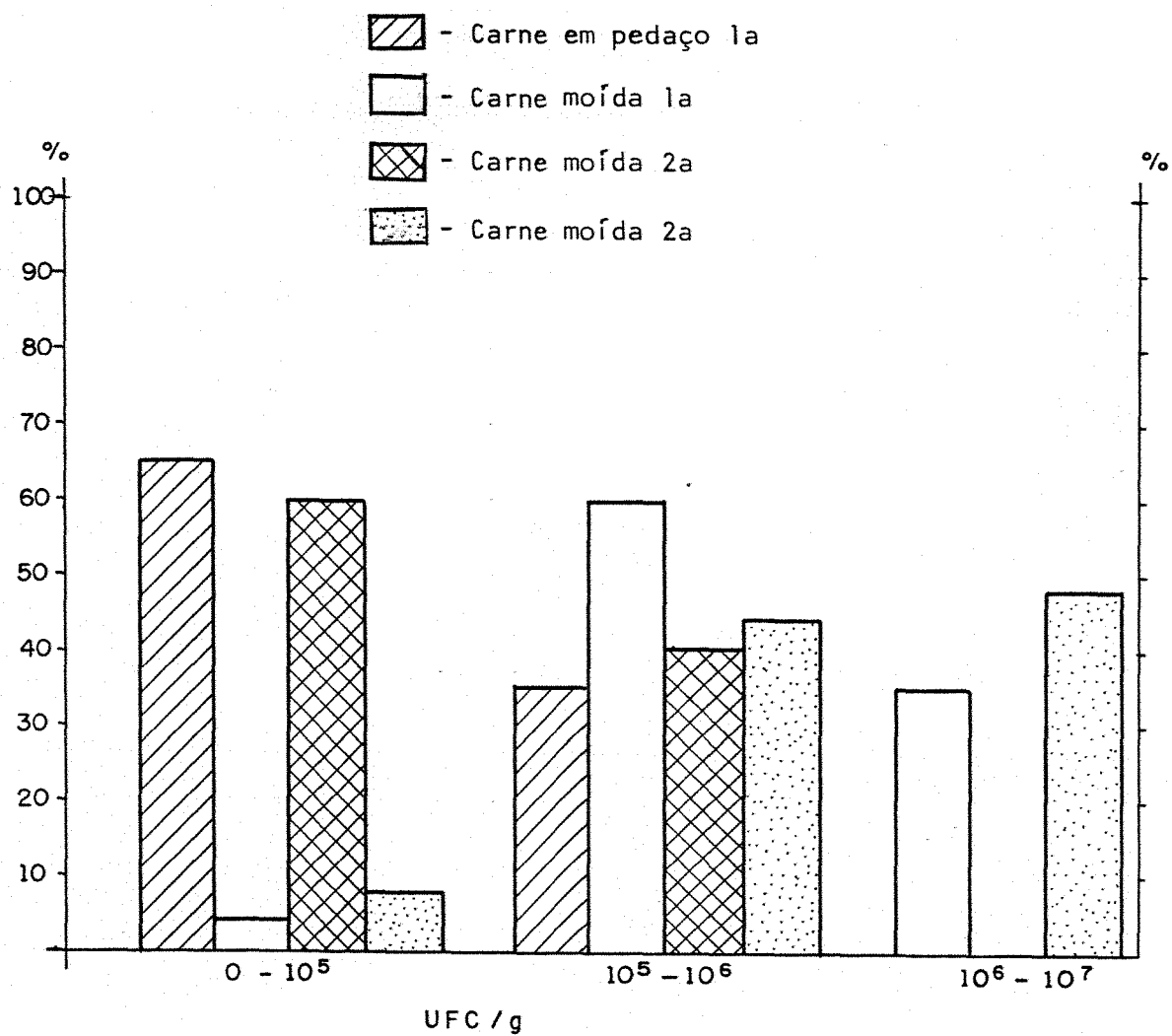


Figura 2. Distribuição das contagens totais verificadas nas 25 amostras de cada tratamento.

Δ : Carne moída  
\* : Carne em pedaço  
- - - : Linha de regressão para carne moída  
— : Linha de regressão para carne em pedaço

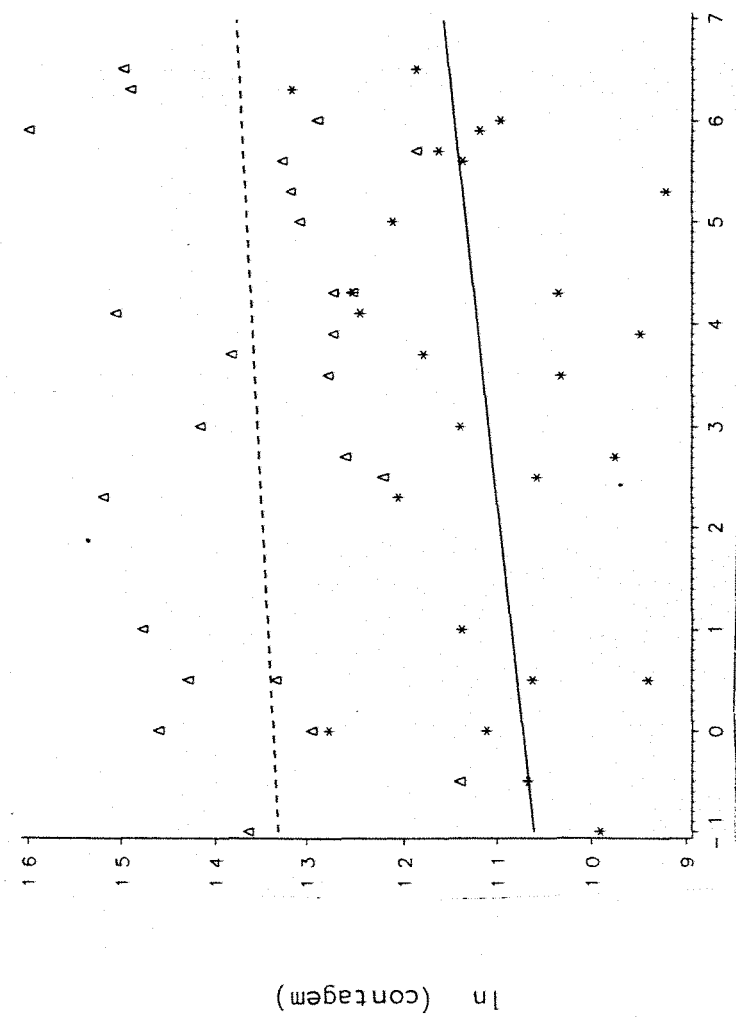


Figura 3. "Plot" do logaritmo da contagem total de bactérias versus temperatura para carne de primeira (em pedaço e moída).



$\Delta$  : Carne moída  
 \* : Carne em pedaço  
 - - - : Linha de regressão para carne moída  
 — : Linha de regressão para carne em pedaço

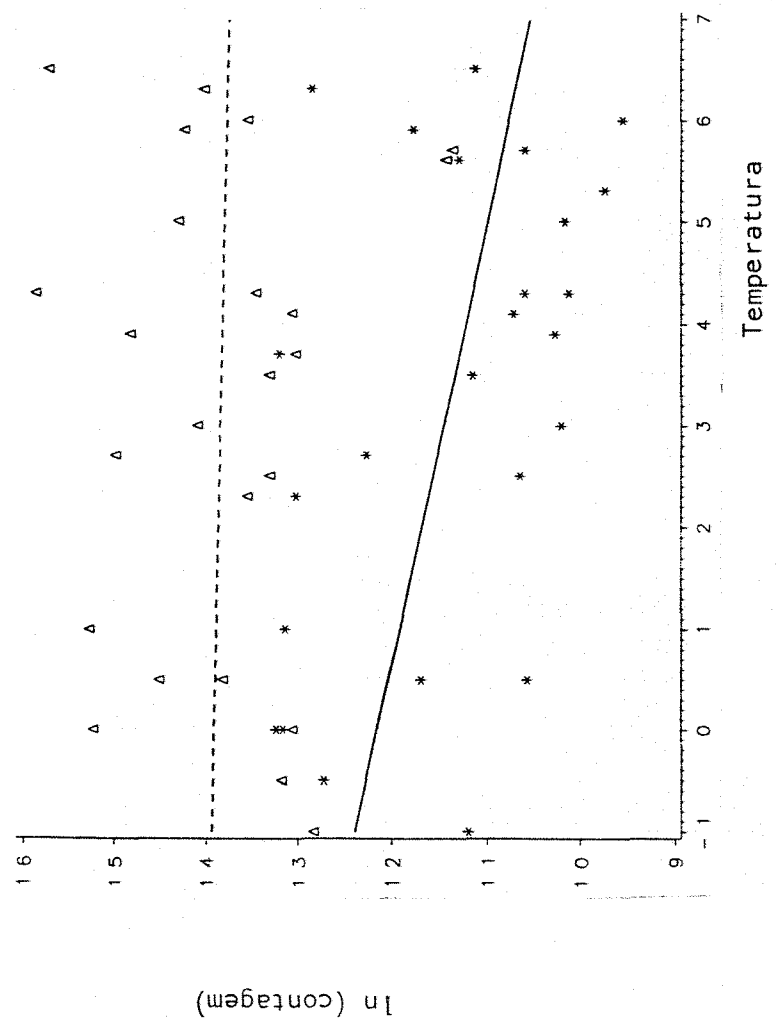


Figura 4. "Plot" do logaritmo da contagem total de bactérias versus temperatura para carne de segunda (em pedaço e moída).

Tabela 1. Contagem total e ocorrência de *Yersinia enterocolitica* para as 25 amostras de carne de primeira em pedaço.

Indicador de qualidade	Indicador de grupo	Temperatura	Repetição	Contagem UFC*/g	Indicador de <i>Y. enterocolitica</i>
0	0	2.5	1	39000	0
0	0	5.9	2	71000	0
0	0	1.0	3	87000	0
0	0	0.0	4	67000	0
0	0	6.3	5	510000	1
0	0	2.7	6	17000	0
0	0	5.3	7	10000	0
0	0	-0.5	8	43000	0
0	0	0.5	9	41000	0
0	0	6.0	10	57000	0
0	0	-1.0	11	20000	0
0	0	0.5	12	12000	0
0	0	3.0	13	88000	0
0	0	4.3	14	270000	0
0	0	3.7	15	130000	0
0	0	6.5	16	140000	0
0	0	5.0	17	180000	0
0	0	5.7	18	110000	0
0	0	3.9	19	13000	0
0	0	4.3	20	31000	0
0	0	5.6	21	85000	1
0	0	3.5	22	30000	0
0	0	0.0	23	350000	0
0	0	2.3	24	170000	0
0	0	4.1	25	250000	0

Indicador de qualidade: 0 - carne de primeira; Indicador de grupo: 0 - carne em pedaço

Indicador de *Yersinia enterocolitica*: 0 - negativo; 1 - positivo

\* Unidade Formadora de Colônia

Tabela 2. Contagem total e ocorrência de *Yersinia enterocolitica* para as 25 amostras de carne moída de primeira.

Indicador de qualidade	Indicador de grupo	Temperatura	Repetição	Contagem UFC*/g	Indicador de <i>Y. enterocolitica</i>
0	1	2.5	1	200000	0
0	1	5.9	2	8500000**	0
0	1	1.0	3	2600000	0
0	1	0.0	4	2200000	0
0	1	6.3	5	2900000	1
0	1	2.7	6	290000	0
0	1	5.3	7	520000	0
0	1	-0.5	8	89000	0
0	1	0.5	9	1600000	0
0	1	6.0	10	390000	0
0	1	-1.0	11	840000	0
0	1	0.5	12	620000	0
0	1	3.0	13	1400000	0
0	1	4.3	14	330000	0
0	1	3.7	15	1000000	0
0	1	6.5	16	3100000**	0
0	1	5.0	17	470000	0
0	1	5.7	18	140000	0
0	1	3.9	19	330000	0
0	1	4.3	20	270000	1
0	1	5.6	21	570000	1
0	1	3.5	22	350000	0
0	1	0.0	23	420000	0
0	1	2.3	24	3900000**	0
0	1	4.1	25	3400000**	0

Indicador de qualidade: 0 - carne de primeira; Indicador de grupo: 1 - carne moída

Indicador de *Yersinia enterocolitica*: 0 - negativo; 1 - positivo

\*Unidade Formadora de colônia

\*\*Amostra com contagem total superior a permitida pela CNNPA (1978).

Tabela 3. Contagem total e ocorrência de *Yersinia enterocolitica* para as 25 amostras de carne em pedaço de segunda.

Indicador de qualidade	Indicador de grupo	Temperatura	Repetição	Contagem UFC */g	Indicador de <i>Y. enterocolitica</i>
	0	2.5	1	42000	1
	0	5.9	2	130000	0
	0	1.0	3	510000	0
	0	0.0	4	560000	0
	0	6.3	5	370000	0
	0	2.7	6	210000	0
	0	5.3	7	17000	0
	0	-0.5	8	330000	0
	0	0.5	9	39000	0
	0	6.0	10	14000	0
	0	-1.0	11	73000	0
	0	0.5	12	120000	0
	0	3.0	13	27000	0
	0	4.3	14	40000	1
	0	3.7	15	540000	0
	0	6.5	16	68000	0
	0	5.0	17	26000	0
	0	5.7	18	40000	0
	0	3.9	19	29000	0
	0	4.3	20	25000	0
	0	5.6	21	81000	1
	0	3.5	22	70000	0
	0	0.0	23	520000	0
	0	2.3	24	450000	0
	0	4.1	25	45000	0

Indicador de qualidade: 1 - carne de segunda; Indicador de grupo: 0 - carne em pedaço

Indicador de *Yersinia enterocolitica*: 0 - negativo; 1 - positivo

\*Unidade Formadora de colônia

Tabela 4. Contagem total e ocorrência de *Yersinia enterocolitica* para as 25 amostras de carne moída de segunda.

Indicador de qualidade	Indicador de grupo	Temperatura	Repetição	Contagem UFC*/g	Indicador de <i>Y. enterocolitica</i>
		2.5	1	600000	1
		5.9	2	1500000	0
		1.0	3	4300000**	0
		0.0	4	4100000**	0
		6.3	5	1200000	0
		2.7	6	3200000**	0
		5.3	7	9800000**	0
		-0.5	8	530000	0
		0.5	9	1000000	0
		6.0	10	750000	0
		-1.0	11	370000	0
		0.5	12	2000000	1
		3.0	13	1300000	0
		4.3	14	690000	1
		3.7	15	450000	0
		6.5	16	6500000**	0
		5.0	17	1600000	0
		5.7	18	87000	0
		3.9	19	2700000	0
		4.3	20	7600000**	1
		5.6	21	93000	0
		3.5	22	600000	0
		0.0	23	470000	0
		2.3	24	760000	0
		4.1	25	470000	0

Indicador de qualidade: 1 - carne de segunda; Indicador de grupo: 1 - carne moída.

Indicador de *Yersinia enterocolitica*: 0 - negativo; 1 - positivo

\*UFC - Unidade formadora de colônia

\*\*Amostras com contagem superior a permitida pela CNNPA (1978).

Tabela 5. Quadro de Análise de Variância (ANOVA).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Probabilidade de significância
Grupo (Moída ou Pedação)	1	153.12859875	153.12859875	130.87	0.0001
Qualidade (Primeira ou Segunda)	1	2.71034723	2.71034723	2.32	0.1323
Repetição	24	46.60805484	1.94200228	1.66	0.0515
Resíduo	73	85.4156	1.17		
Total	99	287.86			



Tabela 7. Ocorrência de *Yersinia enterocolitica* nas 100 amostras de carne refrigerada (-1 a 7°C).

Tipo de Carne	Amostras analisadas	Número de amostras positivas para <i>Yersinia enterocolitica</i>	% de amostras contendo <i>Yersinia enterocolitica</i>
Carne em pedaço de primeira (CP 1a)	25	2	8
Carne moída de primeira (CM 1a)	25	3	12
Carne em pedaço de segunda (CP 2a)	25	3	12
Carne moída de segunda (CM 2a)	25	4	16



Tabela 8. Características bioquímicas típicas de *Yersinia enterocolitica*.

Teste bioquímico	Reação típica
Motilidade a 22°C	+
Motilidade a 37°C	-
Urease	+
Fenilalanina	-
$\beta$ galactosidade	+
Citrato	-
Ramnose	-
Sacarose	+
Glucose (gás)	-
Salicina	-
Lisina	-
Arginina	-
Ornitina	+

Fonte: FALCÃO (1981)

## 6. CONCLUSÕES

1. A qualidade da carne (primeira ou segunda) e a contagem total de bactérias estiveram negativamente correlacionadas.

2. Do mesmo modo, a temperatura ( $-1^{\circ}\text{C}$  a  $7^{\circ}\text{C}$ ), os indicadores de grupo (moída ou pedaço) e os indicadores de qualidade (primeira ou segunda) mostraram-se negativamente correlacionados.

3. Nenhuma amostra de carne em pedaço de primeira ou segunda qualidade ultrapassou o limite de contagem total estabelecido pela Comissão de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA (1978), provavelmente por terem sido amostradas sob temperatura adequada de refrigeração.

4. As amostras de carne analisadas pós moagem apresentaram contagens microbianas elevadas, sendo que 16% de carne de primeira e 24% das amostras de segunda não se

enquadraram no padrão brasileiro. Tais fatos apontam a moagem como causa de disseminação bacteriana uma vez que as carnes moídas foram provenientes das mesmas peças que originaram as carnes em pedaço.

5. Os resultados além de denotarem a má qualidade existente no processo de moagem, sugerem ainda a necessidade dos órgãos competentes elaborarem programas de cuidados higiênicos/sanitários. Estes deverão visar a garantia de um produto sadio, não apenas perante a legislação em vigor, mas principalmente perante o consumidor.

6. O processo de moagem demonstrou pequena cooperação (embora não desprezível) na disseminação de *Y. enterocolitica* para as amostras de carne analisadas.

7. A ocorrência de *Yersinia enterocolitica* em termos percentuais foi maior para a carne de segunda qualidade (12% para pedaço e 16% para moída) do que para primeira qualidade que apresentou respectivamente 8 e 12%.

8. Tendo em vista a importância já ressaltada por vários pesquisadores quando da constatação da existência de *Y. enterocolitica* em carnes, é conveniente que mais estudos sejam realizados na pesquisa do microrganismo em questão.

É possível que casos de envenenamento alimentar venham surgir sendo necessário portanto, que estejamos preparados para o diagnóstico preciso da doença, bem como para tomar medidas referentes a sua epidemiologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A.H.; MOUSTAFA, K.M.; EL-BASSIONY, T.A.E. Growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in yogurt. *Journal of Food Protection*, Ames, 49(12): 983-5, Dec. 1986.
- ALDELAIMY, K.S. & STYLES, M.E. Microbial quality and shelf life of raw ground beef. *Canadian Journal of Public Health*, Ottawa, 66(4): 317-31, Apr. 1975.
- ALMEIDA, R.C.C. Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas, vendidos no varejo no município de Campinas. Campinas, 1983. 103p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- ASAKAWA, Y.; AKAHANE, S.; SHIOZAWA, W.; HONNA, T. Investigations of source and route of *Yersinia enterocolitica* infection. *Contributions to Microbiology and Immunology*, Basel, 5(2): 115-21, Feb. 1979.
- ASAKAWA, Y.; AKAHANE, S.; KAGATA, N.; NOGUCHI, M.; SAKAZAKY, R.; TAMURA, K. Two community outbreak of human infection with *Yersinia enterocolitica*. *The Journal of Hygiene*, London, 71(4): 715-23, Dec. 1973.

- AULISIO, C.C.G.; MEHLMAN, I.J.; SANDERS, A.C. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 39(1): 135-40, Jan. 1980.
- BAXTER, M.Z. & ILLSTON, G.M. Psychrotrophic meat spoilage within a freezing works. *New Zealand Veterinary Journal*, Wellington, 24(8): 177-80, Aug. 1976.
- BECH, K.; LARSEN, J.H.; HANSEN, J.M.; NERUP, J. *Yersinia enterocolitica* infections and thyroid disorders. *The Lancet*, London, 2(7886): 951-2, Oct. 1974.
- BLACK, R.G., JACKSON, R.J.; ISAI, T.; MEDEVESKY, M.; SHAYEGANI, M. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due contaminated chocolate milk. *New England Journal of Medicine*, Boston, 293(2): 76-9, Feb. 1978.
- BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. *Critical Reviews in Microbiology*, London, 5(6): 211-41, June, 1977.
- BRODSKY, M.H. Evaluation of the bacteriological health risk of 60 day aged raw milk cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, Ames, 47(7): 530-1, July, 1984.
- BRYAN, F.L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *Journal of Food Protection*, Ames, 43(2): 140-50, Feb. 1980.
- COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS, 1978. Resolução aprovada pela CNNPA. Resolução nº 13/78. Diário Oficial da União, 25 de julho, p.11.616 - 11.617.

CRISTENSEN, S.G. The prevalence of *Yersinia enterocolitica* in slaughter animals, water and raw milk in Denmark. In: ROBERTS, T.A. *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity*, London, Academic Press, 1982. cap. 3, p.157.

CULLEN, B.T.; FALCÃO, D.P.; LANDGRAF, M. Análise microbiológica de alimentos infantis. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 17(2): 126-31, abr./jun. 1986.

DAVENISH, J.A. & CHIEMANN, D.A. An abbreviated scheme for identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from food enrichments on CIN (Cefsulodin - Irgasan - Novobiocin) agar. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 27 (9): 937-42, Sept. 1981.

DAYNTY, R.H. The control and evaluation of spoilage. *Journal of Food Technology*, Washington, 6(2): 209-24, Feb. 1971.

DE BOER, E.; HARTOG, B.J.; OOSTEROM, J. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in poultry products. *Journal of Food Protection*, Ames, 45(4): 322-5, Mar. 1982.

DELMAS, C.L. & VIDON, D.J.M. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from foods in France. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 50 (4): 767-71, Oct. 1985.

DOYLE, M.P. & HUGDAHL, M.B. Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 45(1): 127-35, Jan. 1983.

- DOYLE, M.P.; HUGDAHL, M.B.; TAYLOR, S.L. Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 42(2): 661-6, Feb. 1981.
- DUITSCHAEVER, C.L.; ANORTT, D.R., BULLOCK, D.H. Bacteriological quality of raw refrigerated ground meat. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, 36(5): 375-7, May. 1973.
- EMSWILLER, B.S.; PIERSON, C.J.; KOTULA, A.W. Bacteriological quality and shelf life of ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 31(6): 826-30, June. 1976.
- FALCÃO, D.P. *Yersinia enterocolitica*. In: TRABULSI, L.R. *Atualização em microbiologia clínica: microbiologia das infecções intestinais*. Rio de Janeiro, Atheneu, 1981. cap. 8, p.79-80.
- FEELEY, J.C. & SCHIEMANN, D.A. *Yersinia*. In: SPECK, M.L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, Washington, American Public Health Association, 1984. p.351-67.
- FEELEY, J.C.; LEE, W.H.; MORRIS, G.K. *Yersinia enterocolitica*. In: SPECK, M.L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, Washington, American Public Health Association, 1976. p.351-7.
- FIELD, R.A.; SMITH, F.C.; DEANE, D.D.; THOMAS, G.M., KOTULA, W. Sources of variation at the retail level in bacteriological condition of ground beef. *Journal of Food Protection*, Ames, 40(6): 385-88, June, 1977.



- FREDERIKSEN, W. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis* like bacteria ("*Bacterium enterocoliticum*", "*Pasteurella x*"). In: SCANDINAVIAN CONGRESS OF PATHOLOGY AND MICROBIOLOGY, 14., Oslo, 1964. Proceedings, Oslo, Roberts ed., 1965.
- FREITAS, A.C. Estudos ecológicos de *Yersinia* sp em redutos aquáticos naturais na cidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1986. 122p. (Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- FREITAS, A.C.; NUNES, M.P.; RICCIARDI, D.L. Sobrevivência de *Yersinia enterocolitica* em diversos sistemas aquáticos experimentais. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 18 (4): 311-7, out/dez. 1987.
- FUKUSHIMA, H. Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 50(3): 710-2, Sep. 1985.
- FUKUSHIMA, H.; ITO, Y.; SAITO, K.; TSUBOKURA, M., OTSUKI, K. Role of the fly in the transport *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 38 (5): 1009-10, Nov. 1979.
- GILMDUR, S.J. & WALKER, S.J. Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* - like bacteria. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, Washington, 65 (17): 2135-65, July, 1988.

- GIORGI, W., MATERA, A.; MOLLARET, H.H.; CASTRO, P.A.F. Isolamento de *Yersinia enterocolitica* de abscessos hepáticos de sagüis (*Callithrix penicillata* e *Callithrix jacchus*). *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 36(2): 123-127, abr/jun. 1969.
- GOEPFERT, J.M. & KIM, H.V. Behavior of selected food borne pathogens in ground beef. *Journal of Milk Technology, Ames*, 38(8): 449-52, Aug. 1975.
- GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Decreto nº 12.486. Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas. *Diário Oficial, Estado de São Paulo*, 21 de outubro, 1978. p.3-4.
- GRANER, M.; MARTINELLI FILHO, A., CRUZ, V.F. Microbiologia da carne moída. 1. Contagem total de bactérias. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba*, 32(1): 81-7, jan/dez. 1971.
- GREEN, S.I. Microbiological aspects of quality control. *Food Manufacture, Washington*, 51(7): 55-71, July, 1976.
- GREENWOOD, J.R.; FLANIGAN, S.M.; PICKETT, M.J.; MARTIN, W.J. Clinical isolation of *Yersinia enterocolitica* in cold temperature enrichment. *Journal of Clinical Microbiology, London*, 2(9): 559-61, Nov. 1975.
- GREENWOOD, M.H. & HOPPER, W.L. Improved methods for the isolation of *Yersinia* species from milk and foods. *Food Microbiology, London*, 6(9): 99-104, June. 1989.

- GUTMAN, L.T.; OTTESEN, E.A.; QUAN, T.J., NOCE, P.S.; KATZ, S.L. An interfamilial outbreak of *Yersinia enterocolitica* enteritides. *New England Journal of Medicine*, Boston, 288(10): 1372-7, Oct. 1973.
- HAGEN, A.G.; LASSEN, J.; BERGE, L.N. Erysipelas - like disease caused by *Yersinia enterocolitica*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Chicago, 6(3): 101-2, Mar. 1974.
- HANNA, M.O.; ZINK, D.L.; CARPENTER, L.L.; VANDERZANT, C. *Yersinia enterocolitica* - like organisms from vacuum packaged beef and lamb. *Journal of Food Science*, Chicago, 41(5): 1254-6, Sept./Oct. 1976.
- HANNA, M.O.; STEWART, J.C.; ZINK, D.L.; CARPENTER, Z.L.; VANDERZANT, C. Development of *Yersinia enterocolitica* on raw and cooked beef and pork at different temperatures. *Journal of Food Science*, Chicago, 42(5): 1180-4, Sep./Oct. 1977.
- HANNUSELA, M. & HAVONEN, P. Erytrema nodosum due *Yersinia enterocolitica*. *Scandicavian Journal of Infectious Diseases*, Chicago, 1(2): 17-9, Feb. 1969.
- HIGHSMITH, A.K.; FEELEY, J.C.; SKALKY, P.; WELLS, J.C.; WOOD, B.T. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from well water and groth in distilled water. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 34(6): 745-50, Dec. 1977.

- HURVEL, B.; GLATTHARD, V.; THAL, E. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine at abattoir in Sweeden. *Contributions of Microbiology and Immunology*, Basel, 5(9): 243-8, Sept. 1979.
- INOUE, M. & KUROSE, M. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from cow's intestinal contents and beef meat. *Japanese Journal Veterinary Science*, Tokyo, 37(8): 91-7, Aug. 1975.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. *Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration*. 2ed. Toronto, University of Toronto, 1978. v.1, 434p.
- KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Baltimore, Williams & Wilkins, Baltimore, 1984. v.1.
- LAFLEUR, H. & MARTINEAU, B. *Yersinia enterocolitica* - 67 human cases. *Contributions to Microbiology and Immunology*, Basel, 2(10): 123-7, Oct. 1973.
- LANDGRAF, M. & FALCÃO, D.P. Isolamento de *Yersinia* sp em alimentos diversos. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 18(1): 93-7, jan/mar. 1987.
- LANGELAND, G. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica* like bactéria in drinking water and sewage sludge. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, Copanhangen, 91(11): 179-85, Nov. 1983.

LARKIN, E.P.; TIERNEY, J.T.L.; REYSES, A.L.; NOVELLI, R.S.; READ, J. Microbiological content of ground beef: a study of large metropolitan area. Abstract of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 72: 19, 1972.

LARSON, J.H. The spectrum of clinical manifestations of infections with *Yersinia enterocolitica* and their pathogenesis. *Yersinia enterocolitica: Biology Epidemiology and Pathology*, p.257-269. Basel, 1979.

LECHONOWICH, R.V. Microbiological challenges of refrigerated foods. *Food Laboratories News*, Liysmedelsverk, 16 (5): 47-52; May. 1989.

LEE, W.H. Two plating media modified with tween 80 for isolating *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 33(1): 215-6, Jan. 1977.

LEE, W.R.; HARRIS, M.E.; MC CLAIN, D.; SMITH, R.E.; JOHNSTON, R.W. Two modified selenite media for the recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 39(1): 205-9, Jan. 1980.

LEITE, C.G.F.; VALENTINI, S.R.; FALCÃO, D.P. Pesquisa de enteropatógenos em alimentos cárneos crus. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 8(2): 155-68, fev. 1988.

- MARTINELLI FILHO, A.M.; GRANER, M.; CRUZ, V.F. Microbiologia da carne moída: 3. Avaliação da qualidade em diferentes épocas do ano. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 32(1): jan/dez. 1975.
- MARTINES, M.B. & MOURA, R.A.A. *Yersinia enterocolitica* em fezes de crianças com diarréia aguda. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 15(1): 33-4, jan/mar. 1984.
- MATTILA, T. & FROST, A.J. The growth of potential food poisoning organisms on chicken and pork muscle surfaces. *Journal of Applied Bacteriology*, Washington, 65(6): 455-61, Dec. 1988.
- MOHAMMAD, K.A. & DRAUGHON, F.A. Growth of *Yersinia enterocolitica* in pasteurized skim milk. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(10): 849-52, Oct. 1987.
- MOLLARETT, H.H.; BERCOVIER, H.; ALONSO, J.M. Summary of the data received at the WHO reference of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to Microbiology and Immunology*, Basel, 5(3): 174-84, Mar. 1979.
- NILEHN, B. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric diseases. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, Copenhagen, 206(7): 1-48, July. 1969.

- NIELSEN, H.J.S. & ZEUTHEN, P. Influence of lactic acid bacteria and the overall flora development of pathogenic bacteria in vacuum packed, cooked emulsion - style sausage. *Journal of Food Protection*, Ames, 48(1): 28-34, Jan. 1985a.
- NIELSEN, H., J.S. & ZEUTHEN, P. Sodium chloride and pathogenic bacteria in a vacuum - packed minced meat product. *Journal of Food Protection*, Ames, 48(2): 150-5, Feb. 1985b.
- NIELSEN, H.J.S. & ZEUTHEN, P. Grow of spoilage bacteria in broth and vacuum packed bolonha-type sausage at fluctuating temperatures and low temperature storage. *Journal of Food Protection*, Ames, 48(11): 886-90, Nov. 1986.
- NORBERG, P. Enteropathogenic bacteria in frozen chicken. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 42(1): 32-4, July, 1981.
- NUNES, M.P. & RICCIARDI, I.D. *Yersinia enterocolitica*, isolamento concomitante de fezes humanas e cão. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 17(3): 220-4, July/Sept. 1986.
- PALUMBO, S.A. Is refrigeration enough to restrain food-borne pathogens? *Journal of Food Protection*, Ames, 49(12): 1003-9, Dec. 1986.
- PEIXOTO, S.S.; FINNE, G.; HANNA, M.O.; VANDERZANT, C. Presence, growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in oysters, shrimp and crab. *Journal of Food Protection*, Ames, 42(10): 974-81, Oct. 1979.

- PISZOLITO, A.C.; FALCÃO, D.P.; SHIMIZU, M.T.; GALVÃO, S.H.M.; GERALDINI, E. The first isolation of human *Yersinia enterocolitica* in Brazil: case report. *Contributions of Microbiology and Immunology*, Basel, 5(3): 169-173, Mar. 1979.
- QUAN, T.J. Biotypic and serotypic profiles of 367 *Yersinia enterocolitica* cultures of human and environmental origin in the United States. *Contributions to Microbiology and Immunology*, Basel, 5(3): 83-7, 1979.
- QUAN, T.J., MEEK, J.,L.; TSUCHIYA, K.R.; HUDSON, B.N.; BARNES, A.M. Experimental pathogenicity of north america isolates of *Yersinia enterocolitica*. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, 129(3): 341-4, Mar. 1974.
- RACCACH, M. & HENRICKSON, R.L. Storage stability and bacteriological profile of refrigerated ground beef from eletrically stimulated hot-borned carcasses. *Journal of Food Protection*, Ames, 41(12): 957-60, Dec. 1978.
- ROGERS, R.E. & MC CLESKER, C.S. Bacteriological quality of ground beef in retail markets. *Food Technology*, Champaign, 11(5): 318-20, June, 1957.
- ROWE, M.T. The efect of carbon dioxide on the growth of *Yersinia enterocolitica* in a simulated milk medium. *Letters in Applied Microbiology*, Ireland, 7(8): 135-7, Aug. 1988.
- SCHIEMAN, D.A. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from surface and well waters in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 24(9): 1048-52, Sept. 1978.



SCHIEMAN, D.A. Isolation of toxigenic *Yersinia enterocolitica* from retail pork products. *Journal of Food Protection*, Ames, 43(5): 360-5, Mar. 1980.

SCHIEMAN, D.A. Comparison of enrichment and plating media for recovery of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* from inoculated beef stew. *Journal of Food Protection*, Ames, 46(11): 957-64, Nov. 1983.

SCHLEIFSTEIN, J.I. & COLEMAN, M. An unidentified microorganism resembling *Bacillus ligneri* and *Pasteurella pseudotuberculosis*<sup>1</sup> and pathogenic in man. *New York State Journal of Medicine*, New York, 39(11): 1749-53, Nov. 1939.

SCHLEIFSTEIN, J. & COLEMAN, M. *Bacterium enterocoliticum*. In: STATE DEPARTMENT OF HEALTH. *Annual Report*, 1943. Albany, 1944. p.56.

SHARF, J.M. Carnes e produtos cárneos. In: *Métodos recomendados para o exame microbiológico de alimentos*, São Paulo, Polígono, 1972. cap. 13, pg. 145-155.

SONNEWIRTH, A.C. & WEAVER, R.E. *Yersinia enterocolitica*. *New England Journal of Medicine*. Boston, 283(11): 1468-1477, Nov. 1970.

STERN, N.J. Isolation of potentially virulent *Yersinia enterocolitica* from variety meats. *Journal of Food Science*, Chicago, 46(1): 41-42, Jan/Feb. 1981.

- STERN, N.J. & OBLINGER, J.L. Recovery of *Yersinia enterocolitica* from surfaces on inoculated hearts and livers. *Journal of Food Protection*, Ames, 43(9): 706-8, Sept. 1980.
- STERN, N.J. & PIERSON, M.D. *Yersinia enterocolitica* a review of the psychrotrophic water and food borne pathogen. *Journal of Food Science*, Chicago, 44(6): 736-42, Nov/Dec. 1979.
- STUMPF, M.; RICCIARDI, I.D.; OLIVEIRA, N.; SABRÁ, A.; BERNHOEFT, M. *Yersinia enterocolitica* as a cause of infantile diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, São Paulo, 11 (6): 383-4, dez. 1978.
- SUMNER, J.L. Microbiological evaluation of retail ground beef in Izmir, Turkey. *Journal of Food Production*, Ames, 41(2): 104-6, Feb. 1978.
- SWAMINATHAN, B.; HARMON, M.C.; MEHLMAN, I.J. *Yersinia enterocolitica* a review. *Journal of Applied Bacteriology*, Washington, 52: 151-83, 1982.
- TERNSTRÖM, A. & MOLIN, G. Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(2): 141-6, Feb. 1987.
- TIBANA, A.; WARKEN, M.B.; NUNES, P.N.; RICCIARDI, D.I.; NOLETO, A.L. Occurrence of *Yersinia* species in raw and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(7): 580-3, July, 1987.

- TIVARI, N.F. & MAXCY, R.B. Comparative growth of *Salmonella*, coliforms and other other members of the microflora of raw and radurized ground beef. *Journal of Milk and Food Technology*, Chicago, 39: 401-9, 1972.
- TOLEDO, M.R.F. *Yersinia*. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 2.ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1989. cap. 28, p.161-2.
- TOLEDO, M.R.F. & FALCÃO, D.P. *Yersinia enterocolitica* fermentadora rápida de lactose a partir de material de garganta. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 11(4): 136-137, dez. 1980.
- TOMA, S. Survey on the incidence of *Yersinia enterocolitica* in the province on Ontário. *Canadian Journal of Public Health*, Ottawa, 64(7): 477-9, July. 1973.
- TOMA, S.; LAFLEUR, L.; DEIDRICK, V.R. Canadian experience with *Yersinia enterocolitica*. *Contributions of Microbiology and Immunology*, Basel, 5(3): 144-9, Mar. 1979.
- UBOLDI-EIROA, M.N.; CULLEN, B.T.; FALCÃO, D.P.; LEITÃO, M. F.F. *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia atipica* em leite cru e pasteurizado. *Coletânea do Instituto Tecnológico de Alimentos*, Campinas, 14(1): 27-37, jan/dez. 1984.
- UBOLDI-EIROA, M.N.; FALCÃO, D.P.; TANIWAKI, W.F.; SILVEIRA, A. Pesquisa de *Yersinia* sp em lingüiças frescas comercializadas na região de Campinas. *Coletânea do Instituto Tecnológico de Alimentos*, Campinas, 18(2): 134-9, jul./dez. 1988.

- WARKEN, M.B.; NUNES, M.,P.; NOLETO, A.L. Incidence of *Yersinia* species in meat samples purchased in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(7): 578-9, July, 1987.
- WAUTERS, G. Improved methods for the isolation and recognition of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to Microbiology and Immunology*, Basel, 2(2): 68-69, Feb./Jul., 1973.
- WAUTERS, G. Carriage of *Yersinia enterocolitica* serotype 3 by pigs as a source of human infection. *Contributions of Microbiology and Immunology*, Basel, 5(4): 249-59, May, 1979.
- WAUTERS, G.; GOOSSENS, M.J.; JANSSENS, M.; VANDEPITTE, J. New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 54(4): 851-4, Apr. 1988.
- WAUTERS, G.; LEMINOR, L.; CHALON, A.M.; LASSEN, J. Supplément au schéma antigénique de "*Yersinia enterocolitica*". *Annales de L'Institut Pasteur*, Paris, 122(6): 951-6, Juin. 1972.
- WESTHOFF, D. & FELDSTEIN, F. Bacteriological analysis of ground beef. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, 39(6): 401-4, June. 1976.
- WYATT, J.C. & GUY, V. Relationships of microbial quality of retail meat samples and sanitary conditions. *Journal of Food Protection*, Ames, 43(5): 385-389, May. 1980.

ZEN-YOGI, H.; SAKAI, S.; MURAYAMA, T.; YANAGAMA, Y. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from swine, cattle and rats an abattoir. *Japanese Journal of Microbiology*, Tokyo, 18(3): 103-5, Mar. 1974.

ZEN-YOGI, H.; MURUYAN, T.; SASSAI, S.; KIMURA, S.; MIZUMO, T.; MOMOSE, T. An outbreak of enterities due *Yersinia enterocolitica* occurring at a junior high school. *Japanese Journal of Microbiology*, Tokyo, 17(5): 220-1, May. 1973.