

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 12/04/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DETECÇÃO DE GENES
DE VIRULÊNCIA DE *Yersinia enterocolitica* EM AMOSTRAS DE LEITE
BOVINO DE TANQUES DE EXPANSÃO DE PROPRIEDADES DO CENTRO-
OESTE PAULISTA**

AMANDA BEZERRA BERTOLINI

BOTUCATU- SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DETECÇÃO DE GENES
DE VIRULÊNCIA DE *Yersinia enterocolitica* EM AMOSTRAS DE LEITE
BOVINO DE TANQUES DE EXPANSÃO DE PROPRIEDADES DO CENTRO-
OESTE PAULISTA**

AMANDA BEZERRA BERTOLINI

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária FMVZ-UNESP- Botucatu para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Co-orientadora: Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bertolini, Amanda Bezerra.

Isolamento, identificação molecular e detecção de genes de virulência de *Yersinia enterocolitica* em amostras de leite bovino de tanques de expansão de propriedades do centro-oeste paulista / Amanda Bezerra Bertolini. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros

Capes: 50505009

1. Análise microbiológica. 2. Diagnóstico molecular. 3. Bovino de leite. 4. Leite - Bacteriologia. 5. Derivados do leite - Microbiologia. 6. Saúde pública. 7. Yersiniose.

Palavras-chave: análise microbiológica; diagnóstico molecular; leite bovino; saúde pública; yersiniose.

Nome do Autor: Amanda Bezerra Bertolini

Título: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Yersinia enterocolitica* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO DE TANQUES DE EXPANSÃO DE PROPRIEDADES DO CENTRO-OESTE PAULISTA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Hélio Langoni

Membro da Banca

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ- UNESP- Botucatu

Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

Membro da Banca

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências- UNESP- Botucatu

Data da defesa: 12 de abril de 2018.

Dedico este trabalho à minha família, que sempre esteve ao meu lado em todas as minhas decisões, em especial aos meus pais Aromes e Angeli e meu marido Pedro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP - pelo financiamento do projeto, com o auxílio à pesquisa processo 2016/15908-6 e com a bolsa de Mestrado, processo 2016/03582-9.

Agradeço aos meus pais Angeli e Aromes Bezerra, por absolutamente tudo, pois vocês são meu alicerce, minha vida, minhas inspiração, meu tudo.

Agradeço meu Marido Pedro Mady Bertolini, meu maior incentivador, meu companheiro e meu amigo de todas as horas.

Agradeço minha sogra Yara Mady Bertolini, que me recebeu tão bem em sua casa durante o tempo que precisei, e sempre se demonstrou preocupada com todas as etapas do meu projeto.

Agradeço a minha orientadora Simone Baldini Lucheis, e minha co-orientadora Maria Izabel Merino de Medeiros por terem feito mais que seus papéis, sendo minhas amigas e parceiras nessa jornada.

Agradeço aos amigos Marcelo, Lívia, Wesley, Maria Fernanda, Mirian, Fábio, não só pelas ajudas, mas pela amizade e companheirismo, eu tenho muita sorte na vida, pois só encontro amigos incríveis como vocês.

Agradeço ao professor e coordenador da pós graduação o Doutor Helio Langoni por ter me recebido de braços abertos na pós graduação, me incentivando e indicando durante o processo seletivo.

Agradeço ao professor Márcio Garcia Ribeiro pela disponibilização do curso de microbiologia que foi indispensável para que pudesse realizar as análises microbiológicas.

Agradeço ao Fernando José P Listoni, técnico do laboratório de microbiologia da FMVZ, por toda a paciência de me ensinar, sempre com muita dedicação, é incrível ter um profissional como você disponível em uma Universidade.

Agradeço a Profa. Juliana Falcão, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, por ceder gentilmente a amostra de DNA de Yersinia enterocolitica 8081, e por tirar várias dúvidas por e-mail bem no início do meu trabalho.

Agradeço a FIOCRUZ por cederem gentilmente as cepas referência de *Yersinia* do grupo sorológico 1B, 2, 3, 4 e 5 (Referência FIOCRUZ Clist: 3438, 3439, 3440, 3442 e 3443), procedentes da coleção de culturas do Departamento de Bacteriologia do IOC/FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ).

LISTA DE QUADRO

QUADRO 1. Identificação das amostras de leite positivas à <i>Yersinia enterocolitica</i> e submetidas ao sequenciamento, com os resultados disponíveis na base de dados do GenBank™	44
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Localização dos municípios onde ocorreram as coletas e o número respectivo de amostras de leite dos tanques de expansão analisados de cada município. Botucatu, SP, 2018.	31
FIGURA 2: Esquema de todo procedimento de coleta de amostras e análises microbiológicas: coleta do leite do tanque, pré enriquecimento em água peptonada a 4°C por 30 dias, seguido de enriquecimento em caldo PSTA a 28°C por 48 horas, emplacamento em três diferentes meios de cultura e testes bioquímicos para as colônias suspeitas. Botucatu, SP, 2018.	33
FIGURA 3: (A) Todas as amostras foram semeadas em água peptonada e (B) permaneceram em geladeira (com termômetro) por 30 dias a 4°C. Botucatu, SP, 2018.	34
FIGURA 4: Decorridos os 30 dias de pré enriquecimento, (A) 1 mL do material enriquecido foi inoculado em 100mL do Caldo PSTA; (B) e, em seguida, levado para a estufa a 28°C por 48 horas. Botucatu, SP, 2018.	35
FIGURA 5: Cepas puras de <i>Yersinia enterocolitica</i> nos meios de ágar Hektoen (A), Yersinia ágar (B) e Agar Mac Conkey (C) Botucatu, SP, 2018.	36
FIGURA 6: Realização das provas bioquímicas em EPM, MILI e Citrato. Em seguida, as mesmas foram incubadas em estufa a 28°C para a identificação Botucatu, SP, 2018.	37
FIGURA 7: As colônias suspeitas foram semeadas em painel de identificação de enterobactérias API 20E (BioMerieux®). Botucatu, SP, 2018.	38
FIGURA 8: Gel de agarose a 2% apresentando seis amostras de leite bovino dentre 102 dos tanques de expansão amplificaram para <i>Yersinia enterocolitica</i> (linhas 2 a 7), Ladder de 100pb (linha 1), controle positivo (linha 8) e controle negativo (linha 9). Botucatu, SP, 2018.	43
FIGURA 9: Teste de competitividade realizado em ágar <i>Yersinia</i> . (A) <i>Yersinia enterocolitica</i> pura; (B) Isolamento a partir do leite cru contaminado na escala 5 de McFarland, com crescimento exuberante de bactéria mucóide e não característica; (C) cultivo em escala 1 de MacFarland, apresentando crescimento abundante de bactéria mucóide Botucatu, SP, 2018.	47
FIGURA 10: (A) Suíno em trabalho de parto ao lado do tanque de expansão; (B) Leitão bebendo restos de leite da saída do tanque de expansão no momento da coleta de leite. Botucatu, SP, 2018.	50

LISTA DE ABREVIações

ail- Adhesion invasion locus

Células M- Microfold cells

Inv- Invasion

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PSTA- Caldo peptona sacarose tris azida de sódio ampicilina

pYV- Plasmid for Yersinia virulence

VirF- Virulence regulon transcriptional activator

Y. enterocolitica- Yersinia enterocolitica

YadA- Yersinia adhesin A

Yops- Yersinia outer membrane proteins

Yst-Yersinia stable toxin

YstB- Yersinia stable toxin B

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Características gerais de <i>Yersinia spp.</i>	18
2.2 <i>Yersinia enterocolitica</i> : taxonomia e propriedades gerais	19
2.3 <i>Y. enterocolitica</i> : epidemiologia.....	19
2.4 Fatores de virulência e patogenia	21
2.5 A doença em humanos	24
2.6 Importância no leite	25
2.7 Métodos de isolamento e identificação de <i>Yersinia enterocolitica</i>	26
2.8 Sensibilidade antimicrobiana e tratamento	28
3. Objetivos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Número de amostras e propriedades rurais visitadas para coleta das amostras de leite do tanque	30
4.2 Aquisição de cepas referência de <i>Yersinia</i>	32
4.3 Análises microbiológicas	32
4.3.1 Pré-enriquecimento das amostras	33
4.3.2 Inoculação em Caldo PSTA	34
4.3.3 Inoculação em meios de cultura.....	35
4.3.4 Controle de efetividade da metodologia e teste de competitividade	36
4.3.5 Provas bioquímicas	37
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase convencional.....	38
4.4.1. Extração do DNA	39
4.4.2 Identificação para <i>Yersinia spp.</i>	39
4.4.3 Identificação de <i>Yersinia enterocolitica</i>	40
4.4.4 Pesquisa da presença de genes de virulência de <i>Yersinia enterocolitica</i> patogênica: <i>inv</i> , <i>ail</i> , <i>YadA</i> , <i>virF</i> , <i>ystA</i> e <i>ystB</i>	40
4.4.5 Sequenciamento	41

5	RESULTADOS.....	42
5.1	Análises microbiológicas e características fenotípicas das colônias.....	42
5.2	Análises moleculares.....	42
6.	DISCUSSÃO.....	46
7.	CONCLUSÕES.....	53
8.	REFERÊNCIAS.....	54
9.	TRABALHO CIENTÍFICO.....	61
	Anexo 1 – Atestado do Comitê de ética.....	74
	Anexo 2 Eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento genético Sanger.	75

BERTOLINI, A.B. **Isolamento, identificação molecular e detecção de genes de virulência de *Yersinia enterocolitica* em amostras de leite bovino de tanques de expansão de propriedades do Centro-Oeste paulista.** Botucatu, 2018. p.80. Defesa de Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O leite e seus derivados são bons meios para o desenvolvimento de microorganismos patogênicos e deteriorantes, exigindo cuidados rigorosos com a ordenha, processamento e armazenamento. Entre os vários grupos de bactérias que podem ser desenvolvidas em leite refrigerado cru, *Yersinia enterocolitica*, um enteropatógeno invasivo para humanos, é uma delas. Esta bactéria pode causar a uma série de sintomas clínicos intestinais e extraintestinais, variando de gastroenterite leve a linfadenite mesentérica, semelhante a apendicite. Para avaliar a prevalência de *Yersinia enterocolitica* patogênica no leite cru de tanques de expansão localizados no estado de São Paulo, foram avaliadas 102 amostras de leite bovino, pelas análises microbiológicas, seguido de provas bioquímicas; a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciamento genético. Não houve o isolamento de *Yersinia enterocolitica* pelas provas microbiológicas. A análise de PCR revelou seis (6) amostras positivas para *Yersinia enterocolitica* (5,9%), confirmadas por sequenciamento genético. Somente o gene *inv*, foi detectado, presente em cepas virulentas e avirulentas. Portanto, ainda que o patógeno estudado não represente um risco potencial nas amostras de leite analisadas neste estudo, foram observados diversos fatores de risco nas fazendas visitadas e uma grande contaminação da microbiota presente no leite, podendo-se afirmar que a qualidade do leite cru em tanques de expansão das fazendas avaliadas é de risco para a saúde pública.

Palavras-chave: análise microbiológica, diagnóstico molecular, leite bovino, saúde pública, yersiniose.

BERTOLINI, A.B. **Isolation, molecular identification and detection of the virulence genes of *Yersinia enterocolitica* in bovine milk samples from dairy farms' s bulk tanks in the Central-West region of the State of São Paulo.** Botucatu, 2018. p.80. Defesa de dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Milk and its byproducts are good means for the development of pathogenic and deteriorating microorganisms, demanding rigorous care with milking, processing and storage. Among the various groups of bacteria that can be grown in raw refrigerated milk, *Yersinia enterocolitica*, an invasive enteropathogen for humans, is one of them. This bacterium can cause a number of intestinal and extraintestinal clinical symptoms, ranging from mild gastroenteritis to mesenteric lymphadenitis, similar to appendicitis. To evaluate the prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in raw milk from bulk tanks milk located in the state of São Paulo, 102 bovine milk samples were evaluated by microbiological analysis, followed by biochemical tests; the Polymerase Chain Reaction (PCR) and genetic sequencing. There was no isolation of *Yersinia enterocolitica* by microbiological tests. PCR analysis revealed six (6) positive samples for *Yersinia enterocolitica* (5.9%), confirmed by genetic sequencing and later, identification of virulence genes by PCR. Only the *inv* gene, present in virulent and avirulent strains, was found. Therefore, although the pathogen studied does not present a potential risk in the milk samples analyzed in this study, several risk factors were observed in the farms visited and a great contamination of the microbiota present in the milk, and it can be stated that the quality of raw milk in tanks of the farms evaluated is a risk to public health.

Keywords: microbiological analysis, molecular diagnosis, bovine milk, public health, yersiniosis.

7. CONCLUSÕES

- A elevada contaminação microbiana nas amostras de leite cru avaliadas dificultou o isolamento de *Yersinia enterocolitica* com o uso das técnicas microbiológicas recomendadas;
- A Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) utilizada no presente estudo permitiu a identificação de *Yersinia enterocolitica* a partir de leite de tanques de expansão com alta carga microbiana, indicando que nesta situação, esta é a melhor metodologia.
- Verificou-se apenas o gene *inv* nas amostras de *Yersinia enterocolitica* identificadas à prova de cPCR, não sendo possível afirmar que tais cepas eram patogênicas.

8. REFERÊNCIAS*

AHOMAA, M. F.; KORJEALA, H. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 220-229, 2003.

ARCURI, F. E.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. P. V. P.; BRITO, J. R. F.; LARGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrófilas contaminantes de leite cru refrigerado. **Cienc. Rural**, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

BALAKRISHNA, K.; RADHIKA, M.; MURALI, H. S. Specific identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by monoclonal antibodies generated against recombinant attachment invasion locus (rAil) protein. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, n. 2, p. 533-539, 2012.

BARLOW, B.; GANDHI, R. Suppurative mesenteric adenitis: *Yersinia enterocolitica*. **Am. J. Dis. Child.**, v. 135, n. 2, p. 171-172, 1981.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. 17. ed. São Paulo: Editora Melhoramentos, 1976.

BORRALHO E ALBUQUERQUE, M. C.; CARDOSO, M. Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em linguiças frescas de porco em Porto Alegre, RS. **Cienc. Rural**, v. 29, n. 4, p. 727-729, 1999.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*, the charisma continues. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 2, p. 257-276, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 2 ago. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Apresentação de surtos de DTA**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2017.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; SARTOLI, L. S.; MARQUES, H. Z. **Mapa da qualidade do leite**. Jaboticabal: Esalq- Usp, 2016. v. 1, p. 28.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22 p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 2008. 337 p.

CHANDLER, N. D.; PARISI, M. T. *Yersinia enterocolitica* masquerading as appendicitis. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 148, n. 5, p. 527-528, 1994.

DALBY, T.; RASMUSSEN, E.; SCHIELLERUPS, P.; KROGFELT, K. A. Development of an LPS-based Elisa for diagnosis of *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in Danish Patients: a follow-up study. **BMC Microbiol.**, v. 17, p. 125, 2017.

DALLAL, M. M. S.; TABARRAIE, A.; MOEZARDALAN, K. Comparison of four methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw and pasteurized milk from northern Iran. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, n. 1, p. 87-91, 2004.

DARWISH, S. F.; ASFOUR, H. A. E.; ALLAM, H. A. Incidence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in raw milk samples of different animal species using conventional and molecular methods. **Alexandria J. Vet. Sci.**, v. 44, p. 174-185, 2015.

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. **OpenEpi**: open source epidemiologic statistics for public health. Disponível em: <www.OpenEpi.com>. Acesso em: 16 out. 2015.

DRUMONT, N.; MURPHY, P. B.; RINGWOOD, T.; PRENTICE, M. B. *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 9, n. 3, p. 174-89, 2012.

FALCÃO, D. P. Occurrence of *Yersinia* spp. in foods in Brasil. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 14, n. 2, p. 179-182, 1991.

FALCÃO, D. P.; GIORGI, W.; IMBRIANI, E. M.; SENTOME, E. H. T.; PINCETTA, L. A. *Yersinia enterocolitica*: inquérito epidemiológico em suínos. **Biológico**, v. 46, p. 281-308, 1981.

FALCÃO, D. P.; SHIMIZU, M. T. Avaliação de técnicas de isolamento de *Yersinia enterocolitica* a partir das fezes de camundongo infectados experimentalmente. **Rev. Microbiol.**, v. 18, p. 324-329, 1987.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Rev. Cienc. Farm. Basica Apl.**, v. 27, n. 1, p. 9-19, 2006.

FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P.; DIAS, A. M. G.; CORREA, E. F. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. **Food Microbiol.**, v. 19, n. 4, p. 269-276, 2002.

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

FRAZÃO, M. R.; FALCÃO, J. P. Genotypic diversity and pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* biotype 2 strains isolated in Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 118, n. 4, p. 1058-1067, 2015.

FRAZÃO, R. F.; ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C.; FALCÃO, J. P. Antimicrobial resistance and plasmid replicons on *Yersinia enterocolitica*, strains isolated in Brazil in 30 years. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 21, n. 4, p. 477-480, 2017.

GÜRTLES, M.; ALTER, T.; KISIMIR S.; LINNEBUR, M.; FEHLHABER, K. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. **J. Food Prot.**, v. 68, n. 4, p. 850-854, 2005.

HANIFIAN, S.; KHANI, S. Prevalence of virulent *Yersinia enterocolitica* in buck raw milk and retail cheese in northern-west of Iran. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 155, n. 1-2, p. 89-92, 2012.

HAORAN, W.; MANDY, T.; PALMER, J.; FLIST, S. Biofilm formation of *Yersinia enterocolitica* and its persistence following treatment with different sanitation agents. **Food Control**, v. 73, p. 433-437, 2017.

HEESEMANN, J. Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of *Yersinia* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 48, n. 1-2, p. 229-233, 1987.

HERRANEN, S. H. M.; JAAKKONEM, A.; NUIMMELA, M.; RANTA, R.; BOTTELDOORN, N.; ZUTTER, L.; AHOMAA, F. M. Validation of ISO method 10273 detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. **Int. J. Food Microbiol.**, n. 18, p. 160-168, 2018.

HONDA, K.; IWANAGA, N.; IZUMI, Y.; TSUJI, Y.; KAWAHARA, C.; MICHITSUJI, T.; HIGASHI, S.; KAWAKAMI, A.; MIGITA, K. Reactive arthritis caused by *Yersinia enterocolitica* enteritidis. **Intern. Med.**, v. 56, n. 10, p. 1239-1242, 2017.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Yersinia* species, *Yersinia enterocolitica* isolated, from raw milk in farm bulk tanks. **J. Dairy Sci.**, v. 98, n. 2, p. 798-803, 2015.

KAYLEGIAN, K. E.; MORGAM, R.; GALTON, D. M.; BOOR, K. J. Raw milk consumption beliefs and practices among New York State dairy producers. **Food Prot. Trends**, v. 28, p. 184-191, 2008.

KHANI, S.; HANIFIAN, S. Fate of *Yersinia enterocolitica* during manufacture, ripening and storage of Lighvan cheese. **J. Food Microbiol.**, v. 15, p. 156-141, 2012.

KONEMAN, E. W.; PROCOP, G. W. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006. p. 265-366.

LAMBERTZ, L. T.; NILSSON, C.; HALLANVUO, S.; LINDBLAND, M. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*, in food. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 19, p. 6060-6067, 2008.

LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Marcadores de patogenicidade em *Yersinia enterocolitica* O:3 isoladas de suínos do Rio de Janeiro. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 17, n. 1, p. 19-24, 1997.

LEE, L. A.; GERBER, A. R.; LONSWAY, D. R.; SMITH, J. D.; CARTER, G. P. N.; POHR, D.; PARRISH, C. M.; SIKES, R. K.; FINTON, R. J.; TAUXE, R. W. *Yersinia enterocolitica* O:3 infection in infants and children associated with the household preparation of chitterlings. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, p. 984-987, 1990.

LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. Estudo da microbiota aeróbica e prevalência de *Yersinia enterocolitica* em casos de mastite bovina. **Hig. Aliment.**, v. 14, n. 71, p. 41-47, 2000.

MALTEZ, F.; MACHADO, J.; ROCHA, A. M.; GONÇALVES, P.; MORGADO, A.; PROENÇA, R. *Yersinia enterocolitica*. Estudo da seroprevalência e apresentação de 3 casos clínicos. **Acta Med. Port.**, v. 6, p. 223-225, 1993.

MANTLE, M.; BASARABA, L.; PERCOOK, S. C.; GALL, D. G. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 11, p. 3292-3299, 1989.

MATTOCK, E.; BLOCKER, A. J. How do the virulence factors of *Shigella* work together to cause disease? **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 7, p. 64, 2017.

McFARLAND, J. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **JAMA**, v. 14, p. 1176-1178, 1907.

McNALLY, A.; DALTON, T.; LA RAGIONE, R. M.; STAPLETON, K.; MANNING, G.; NEWELL, D. *Yersinia enterocolitica* isolates of differing biotypes from humans and animals are adherent, invasive and persist in macrophages, but differ in cytokine secretion profiles *in vitro*. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1725-1734, 2016a

McNALLY, A.; THOMSON, N. R.; REUTER, S.; WREN, B. W. Add, stir and reduce: *Yersinia* spp. as a model bacteria for pathogen evolution. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 177-190, 2016b.

NICOLLE, P.; MOLLARET, H. H.; BRAULT, J. Nouveaux résultats sur la lysotypie de *Yersinia enterocolitica* portant sur plus de 4000 souches d'origine diverse. **Rev. Epidemiol. Sante Publique**, v. 24, p. 479-496, 1976.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, A. T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 2, p. 167-171, 2001.

PAERREGAARD, A.; ESPERSEN, F.; JENSEN, O. M.; SILURNIK, D. M. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 1, p. 253-260, 1991.

PINTO, P. S. A.; TEODORO, V. A. M.; VANETTI, M. C. D.; BELIVALACQUA, P. D.; MORAES, M. P.; PINTO, M. S. Aplicação de técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 1, p. 9-14, 2006.

PORTNOY, D. A.; FALKOW, S. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. **J. Bacteriol.**, v. 148, n. 3, p. 877-883, 1981.

RASMUSSEN, H. N.; OLSEN J. E.; RASMUSSEN, O. F. RAPD analysis of *Yersinia enterocolitica*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 19, p. 359-362. 1994.

RAYMOND, P.; GUIFFES, A.; LABBE, A.; DENIS, M.; ESNAULT, E. Diversity of *Yersinia enterocolitica* population in a slaughterhouse between 2009 and 2010 and discrimination ability of *mlva* compared to *pfge*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF BIOLOGICAL, CHEMICAL AND PHYSICAL HAZARDS IN PIGS AND PORK, 12., 2017, Foz do Iguaçu. **Proceeding...** Foz do Iguaçu: Embrapa Suínos e Aves, 2017. p. 51-54.

RUEGG, P. L. Pratical food safety interventions for dairy produvtion. **J. Dairy Sci.**, v. 86, n. esp., suppl., p. E1- E9, 2003.

RUSAK, L. A.; REIS, F. C. M. F.; BARBOSA, A. V.; SANTOS, A. F. M.; PAIXÃO, R.; HOLER, E.; VALLIM, D. C.; ASENSI, M. D. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries**, v. 8, n. 12, p. 1533-1540, 2014.

RUUSUNEN, M.; SALONEN, M.; PULKKINEN, H.; HUUSKONEN, M.; HELLSTROM, S.; REVEZ, J.; HANNINEN, M. L.; FREDRIDSSON-AHOMAA, M.; LINDSTROM, M. Pathogenic bacteria in finnish bulk tank milk. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 10, n. 2, p. 99-106, 2013.

SACHDEVA, P.; VIRDI, J. P. Repetitive elements sequence (REP/ERIC)-PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1^a reveal existence of limited number of clonal groups. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 240, n. 2, p. 193-201, 2004.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ÂNGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States - Major Pathogens. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SERRA, M. **Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP.** 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle sanitário em serviços de alimentação**. 7. ed. São Paulo: Editora Varela, 2014.

SOLTAN-DALLAL, M. M.; TABARRAIE, A.; MOEZARDALAN, K. Comparison of four methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw and pasteurized milk from northern Iran. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, n. 1, p. 87- 91, 2004.

STENKOVA, A. M.; ISAEVA, M. P.; RASSKAZOV, V. A. Development of a miltuplex PCR procedure for detection of *Yersinia* genus with identification of pathogenic species (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*). **Mol. Genet. Microbiol. Virol.**, v. 23, n. 3, p. 119-125, 2008.

TASSINARI, A. R.; FRANCO, B. D.; LANDGRAF, M. Incidence of *Yersinia* spp. in foods in São Paulo, Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 21, n. 3, p. 263-270, 1994.

TAVARES, A. B.; SOUZA, A. I. A.; DULAC, C. F.; MOREIRA, L. M.; DOMINGUEZ, L.; GONZALEZ, H. L.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 69, n. 2, p. 483-490, 2017.

TEODORO, V. A. M.; PINTO, P. S. A.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, M. P.; PINTO, M. S. Aplicação da técnica de PCR na detecção da *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 1, p. 9-14, 2006.

THOERNER, P.; BIN KINGOMBE, C. I.; BÖGLI-STUBER, K.; BISSIG-CHOISAT, B.; WASSEANNAR, T. M.; FREY, J.; JEMMI, T. PCR detection of virulence gene distribution. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 3, p. 1810-1816, 2003.

TIBANA, A.; WARNKEN, M. B.; NUNES, M. P. Ocurrence of *Yersinia* species in raw and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brasil. **J. Food Prot.**, v. 50, p. 580-583, 1987.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

VIDON, D.; DELMAS, C. L. Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in Eastern France. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 355-359, 1981.

WAUTERS, G.; KANDOLO, K.; JANSSENS, M. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v. 9, p. 14-21, 1987.

YE, Y. W.; LING, N.; HAN, Y. J.; WU, Q. P. Detection and prevalence of pathogenic yersinia enterocolitica in refrigerated and frozen dairy products by duplex pcr and dot hybridization targeting the virf and ail genes. **J. Dairy Sci.**, v. 97, p.785- 91, 2014.

the *Yersinia* reference strains of the serological group 1B, 2, 3, 4, and 5 (FIOCRUZ Reference CLIST: 3438, 3439, 3440, 3442, and 3443), from the collection of cultures of the Department of Bacteriology of IOC/FIOCRUZ of Rio de Janeiro, RJ).

REFERENCES

1. ARCURI, F. E., P. D. L. SILVA, M. P. V. P. BRITO, J. R. F. BRITO, C. C. LARGE, and M. M. A. MAGALHÃES. 2008. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrófilas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciênc. Rural*. 38:2250-2255.
2. BALAKRISHNA, K., M. RADHIKA, and H. S. MURALI. 2012. Specific identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by monoclonal antibodies generated against recombinant attachment invasion locus (rAil) protein. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:533-539.
3. BARLOW, B. and R. GANDHI, 1981. Suppurative mesenteric adenitis: *Yersinia enterocolitica*. *Am. J. Dis. Child.* 135:171-172.
4. BORRALHO E ALBUQUERQUE, M. C. and M. CARDOSO. 1999. Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em linguças frescas de porco em Porto Alegre, RS. *Ciênc. Rural*. 29:727-729.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Available at: <http://www.agricultura.gov.br>. Accessed 02 August 2017.
6. DALLAL, M. M. S., A. TABARRAIE, and K. MOEZARDALAN. 2004. Comparison of four methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw and pasteurized milk from northern Iran. *Int. J. Food Microbiol.* 94:87-91.
7. DARWISH, S. F., H. A. E. ASFOUR, and H. A. ALLAM. 2015. Incidence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in Raw Milk Samples of Different Animal Species Using Conventional and Molecular Methods. *Alexandria J. Vet. Sci.* 44:174-185.

8. DEAN, A. G., K. M. SULLIVAN, and M. M. SOE. **OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Update 2015/05/04. Available at: www.OpenEpi.com. Accessed 16 October 2015.**
9. DRUMMOND, N., B. P. MURPHY, T. RINGWOOD, M. B. PRENTICE, J. F. BUCKLEY, and S. FANNING. 2012. ***Yersinia enterocolitica*: A brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain.** *FoodBorne Pathog Dis.* **9:174-89.**
10. FALCÃO, J. P. and D. P. FALCÃO. 2006. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **27:9-19.**
11. FALCÃO, J. P., D. P. FALCÃO, A. P. SILVA, A. C. MALASPINA, and M. BROCCHI. 2006. **Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica*, strains, from human, animal and food, origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil.** *J. Med. Microbiol.* **55:1539-1548.**
12. FALCÃO, J. P., D. P. FALCÃO, A. M. G. DIAS, and E. F. CORREA. 2002. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. *Foods Microbiol.* **19:269-276.**
13. HANIFIAN, S. and S. KHANI. 2012. Prevalence of virulent *Yersinia enterocolitica* in buck raw milk and retail cheese in northern-west of Iran. *Int. J. Food Microbiol.* **155:89-92.**
14. KAYLEGIAN, K. E., R. MOAG, D. M. GALTON, and K. J. BOOR. 2008. Raw milk consumption beliefs and practices among New York State dairy producers. *Food Prot. Trends.* **28:184-191.**
15. BIER, O. *Bacteriologia e imunologia.* 17. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1976.
16. PADILHA, M. R. F., Z. F. FERNANDES, A. T. C. A. LEAL, N. C. LEAL, and A. M. P. ALMEIDA. 2001. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **34:67-171.**
17. PINTO, P. S. A., V. A. M. TEODORO, M. C. D. VANETTI, P. D. BELIVALACQUA, M. P. MORAES, and M. S. PINTO. 2006. Aplicação de técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **58:9-14.**

18. RASMUSSEN, H. N.; OLSEN J. E.; RASMUSSEN, O. F. RAPD. 1994 analysis of *Yersinia enterocolitica*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 19, p. 359-362.
19. RUEGG, P. L. 2003. Practical food safety interventions for dairy production. *J. Dairy Sci.* 86:E1-E9.
20. RUSAK, L. A., F. C. M. F. REIS, A. V. BARBOSA, A. F. M. SANTOS, R. PAIXÃO, E. HOLER, D. C. VALLIM, and M. D. ASENSI. 2014. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8:1533-1540.
21. RUUSUNEN, M., M. SALONEN, H. PULKKINEN, M. HUUSKONEN, S. HELLSTROM, J. REVEZ, M. L. HANNINEN, M. FREDRIKSSON-AHOMAA, and M. LINDSTROM. 2013. Pathogenic bacteria in Finnish bulk tank milk. *Foodborne Pathog. Dis.* 10:99-106.
22. SILVA JUNIOR, E. A. 2014. Manual de controle sanitário em serviços de alimentação, 7. ed. Varela, São Paulo, Brazil.
23. SOLTAN-DALLAL, M. M., A. TABARRAIE, and K. MOEZARDALAN. 2004. Comparison of four methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw and pasteurized milk from northern Iran. *Int. J. Food Microbiol.* 94:87- 91.
24. STENKOVA, A. M., M. P. ISAEVA, and V. A. RASSKAZOV. 2008. Development of a multiplex PCR procedure for detection of *Yersinia* genus with identification of pathogenic species (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*). *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 23:119-125.
25. TAVARES, A. B., A. I. A. SOUZA, C. F. DULAC, L. M. MOREIRA, L. DOMINGUEZ, H. L. GONZALEZ, N. D. CERESER, and C. D. TIMM. 2017. Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 69:483-490.
26. TEODORO, V. A. M., P. S. A. PINTO, M. C. D. VANETTI, M. P. BEVILACQUA, and M. S. PINTO. 2006. Aplicação da técnica de PCR na detecção da *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58:9-14.
27. THOERNER, P., C. I. BIN KINGOMBE, K. BOGLI-STUBER, B. BISSIG-CHOISAT, T. M. WASSENAAR, J. FREY, and T. JEMMI. 2003. PCR detection of virulence gene distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1810-1816.

28. TRABULSI, L. R. and F. ALTERTHUM. 2015. *Microbiologia*, 6. ed. Atheneu, São Paulo, Brazil.
29. VIDON, D. and C. L. DELMAS. 1981. Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in Eastern France. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:355-359.
30. WAUTERS, G., K. KANDOLO, and M. JANSSENS. 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9:14-21.