

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



**Dissertação**

**Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de  
leite**

**Alana Borges Tavares**

Pelotas, 2015

**Alana Borges Tavares**

**Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração Sanidade Animal).

Orientador: Cláudio Dias Timm  
Coorientadora: Natacha Deboni Cereser

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

T231f Tavares, Alana Borges

Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite / Alana Borges Tavares ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Natacha Deboni Cereser, coorientadora. — Pelotas, 2015.

33 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Ordenha. 2. Leite. 3. água. 4. Mão. 5. Gastroenterite. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Cereser, Natacha Deboni, coorient. III. Título.

CDD : 636.234

Alana Borges Tavares

Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23 de fevereiro de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)  
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr<sup>a</sup>. Helenice Gonzalez de Lima  
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr<sup>a</sup>. Natacha Deboni Cereser  
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de São Paulo Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza da Motta  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **Agradecimentos**

A minha família pelo apoio incondicional a todas as minhas decisões, permitindo que o desejo de continuar estudando fosse realizado.

Ao meu namorado pela paciência e amor dedicados em todos os momentos desta caminhada.

Aos amigos e colegas pelo companheirismo, tornando estes dois anos mais agradáveis e divertidos.

Ao meu orientador por me guiar de forma paciente pelo caminho correto tornando a realização desta etapa possível.

## Resumo

TAVARES, Alana Borges. **Fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* durante a produção de leite**. 2015. 33f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar as possíveis fontes de contaminação de *Yersinia enterocolitica* em diferentes pontos do processo de ordenha de vacas leiteiras em oito propriedades da região de Pelotas, RS, distribuídos em quatro períodos diferentes ao longo de um ano. *Y. enterocolitica* é uma bactéria psicrotrofica, responsável por causar gastroenterite em humanos, principalmente em bebês e crianças, a partir do consumo de água ou alimentos contaminados, sendo o leite cru um destes. Foram analisadas amostras de leite cru de conjunto logo após a ordenha, água de estábulo leiteiro, mão de ordenhador, balde de recolhimento do leite e insuflador de teteiras. As amostras de leite cru e água foram coletadas em frascos estéreis e as amostras de mão de ordenhador, balde e teteiras foram coletadas com o auxílio de zaragatoas estéreis. As amostras de leite cru foram submetidas a um pré-enriquecimento em água peptonada tamponada a 4°C durante 30 dias, sendo posteriormente incubadas em caldo PSTA, adicionado de ampicilina, a 28°C durante 48h. As amostras de água foram filtradas em membrana de éster de celulose e incubadas em caldo TSB a 30°C durante 24h. As amostras de leite após incubação em PSTA, as membranas utilizadas na filtração da água incubadas em TSB, bem como o material de mãos, balde e teteiras coletadas nas zaragatoas, foram semeadas em ágar MacConkey e incubados a 30°C durante 24h, para a obtenção de colônias. Colônias características foram analisadas através de duplex PCR para confirmação da espécie. Os perfis moleculares dos isolados de *Y. enterocolitica* foram comparados utilizando a técnica de rep-PCR. *Y. enterocolitica* foi isolada de 9,37% (3/32) das amostras de leite, 6,25% (2/32) das amostras de água e 12,5% (4/32) das amostras de mão. Não houve similaridade no perfil de bandas dos isolados encontrados, entretanto foi identificada a presença de cepas diferentes na mesma amostra, demonstrando uma variedade grande de cepas distribuídas no ambiente. A presença de *Y. enterocolitica* em leite cru no Brasil é preocupante, já que uma quantidade considerável do produto ainda é comercializado de forma clandestina, expondo o consumidor ao risco de infecção pela bactéria, ao consumi-lo sem tratamento térmico adequado.

**Palavras-chave:** ordenha; leite; água; mão; gastroenterite

## Abstract

TAVARES, Alana Borges. **Contamination sources of *Yersinia enterocolitica* during milk production**. 2015. 33f. Dissertation (Master Degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

This work was performed in order to determine the possible *Yersinia enterocolitica* contamination sources at different points of the dairy cows milking process in eight properties of Pelotas, RS, over four different periods distributed in a year. *Y. enterocolitica* is a psychrotrophic bacterium responsible for causing gastroenteritis in humans, especially in infants and children, from the consumption of contaminated water or food, and raw milk. Raw milk samples were analyzed immediately after milking, water of milking parlor, milker's hands, milk collection bucket and inflator liners. The samples of raw milk and water were collected in sterile bottles and milker hand samples, bucket and liners were collected with sterile swabs. The raw milk samples were subjected to a pre-enrichment peptone water buffered at 4°C for 30 days and subsequently incubated in PSTA broth ampicillin added at 28°C for 48h. Water samples were filtered through cellulose ester membrane and incubated in TSB medium at 30°C for 24h. The milk samples after incubation in PSTA, the TSB where the membranes used in water filtration were incubated and the material of the hands material, bucket and liners collected in the swabs were plated on MacConkey agar and incubated at 30°C for 24h, to obtain colonies. Characteristics colonies were analyzed by duplex PCR to confirm the species. The molecular profiles of *Y. enterocolitica* isolates were compared using rep-PCR. *Y. enterocolitica* was isolated from 9,37% (3/32) of milk samples, 6,25% (2/32) of water samples and 12,5% (4/32) of hand samples. There weren't similarities in the band profile of the isolates found, however showed the presence of different strains of the same sample, demonstrating a variety of strains distributed in the environment. The presence of *Y. enterocolitica* in raw milk in Brazil is dangerous, considering that the product is sold clandestinely, exposing consumers to the risk of infection by the bacterium, to consume it without proper heat treatment.

**Key words:** milking; milk; water; hand; gastroenteritis

## **Lista de Figuras**

Figura 1 Eletroforese em gel de agarose dos produtos da rep-PCR..... 23

## Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>Y. enterocolitica</i> .....	18
Tabela 2	Fontes de isolamento de <i>Y. enterocolitica</i> no período de Setembro de 2013 a Junho de 2014.....	19

## Lista de Abreviaturas

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
HCl	Ácido Clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KD	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitros
µL	Microlitros
µg	Microgramas
min	Minutos
NaCl	Cloreto de Sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
Qsp	Quantidade suficiente para
Rep	Elemento repetitivo palindrômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TSB	Caldo tripticase de soja
TRIS	TRIS hidroximetil aminometano
UK	Reino Unido

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Obtenção das amostras.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Coleta, acondicionamento e transporte das amostras.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Obtenção dos isolados.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Identificação de <i>Yersinia enterocolitica</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Extração do DNA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Perfis moleculares.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>24</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>25</b>

## 1 Introdução

No Brasil, segundo o IBGE (2014a), em 2013, foram adquiridos pelas indústrias de beneficiamento de leite, um total de 23,545 bilhões de litros do produto, representado um aumento de 5,4% em relação ao ano anterior. Os meses que se destacaram em termos de produção foram outubro (14,8%), novembro (14,0%) e dezembro (13,0%) e o estado com maior captação, no referido ano, foi Minas Gerais, participando com 6,16 bilhões de litros de leite, enquanto que o Rio Grande do Sul ficou em segundo lugar, com 3,46 bilhões de litros de leite.

Mais recentemente, durante o terceiro trimestre do ano de 2014, foram adquiridos 6,267 bilhões de litros de leite pelas indústrias, este valor representou um aumento de 4,6% em comparação com o 3º trimestre de 2013 e 8,1% sobre o 2º trimestre de 2014, exercendo um aumento crescente nos meses do referente período. Dentro desta produção, a região sul ficou, durante este período, em primeiro lugar sendo responsável por 38,7%, ultrapassando a região sudeste que representou uma produção de 38,6%. O estado do Rio Grande do Sul permaneceu em segundo lugar no Brasil, tendo produzido 991.210 mil litros, o que compreende 15,8% da produção nacional (IBGE, 2014b).

O leite é um alimento essencial para a população, estando a sua qualidade relacionada aos cuidados higiênico-sanitários durante a sua produção, quando pode ser contaminado por micro-organismos indesejáveis. *Yersinia enterocolitica* é uma bactéria patogênica transmitida ao homem através do consumo de alimentos contaminados, como leite cru ou inadequadamente processado (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Além de causar doença no ser humano, as bactérias psicrotróficas, como *Yersinia enterocolitica*, podem comprometer a qualidade do leite através da produção de enzimas que causam modificações nos seus componentes, diminuindo o valor nutricional e comprometendo as características do produto e de seus derivados. A contaminação do leite por esses micro-organismos pode estar relacionada ao sistema de produção bem como à forma de armazenamento do produto dentro da propriedade (NÖRNBERG et al, 2009).

*Y. enterocolitica* pertence à família enterobacteriaceae e é um bastonete Gram negativo móvel abaixo de 30°C. É oxidase negativa, fermenta glicose e produz urease. Cresce em uma faixa de temperatura de -2°C a 45°C, mas sua temperatura ótima fica entre 22 e 29°C (JAY, 2005). A maioria das cepas não resiste ao cloro na concentração de 1-5ppm e a mono-cloramina a 1-4ppm (EL-ZANFALY et al, 2008).

Esta espécie bacteriana contém 6 biotipos, 5 deles patogênicos, e mais de 50 sorotipos diferenciados por variação antigênica na parede lipopolissacarídica da célula (BARI et al, 2011). O biotipo 1A é geralmente não patogênico enquanto os biotipos 2, 3, 4 e 5 têm patogenicidade baixa e o 1B altamente patogênico (FREDRIKSSON-AHOMAA et al, 2012). Apesar do biotipo 1A ser considerado não patogênico, tem sido relatado o seu envolvimento em infecções nosocomiais e surtos alimentares (BHAGAT e VIRDI, 2011). Os biosorotipos mais frequentemente isolados em humanos doentes são 3/O:3, 4/O:3, 2/O:9, 1B/O:8, 2/O:5 e 2/O:27 (RAHMAN et al, 2011).

A virulência desta espécie se deve principalmente à presença de um plasmídeo de 70KD (REVELL e MILLER, 2001). O plasmídeo de virulência de *Y. enterocolitica* possui um *operon* chamado Yop que codifica para um grupo de proteínas efetoras chamado Yops que, quando inseridas para o interior da célula, afeta a sua funcionalidade impedindo a fagocitose (VIBOUD e BLISKA, 2005). A secreção destas proteínas depende da presença de cálcio e de uma temperatura de 37°C, bem como de um de um aparelho de secreção chamado Ysc, que contém 20 diferentes proteínas (ALLAOUI et al, 1995). É um aparelho de secreção especializado que permite o transporte de Yops através da membrana celular eucariótica (CORNELIS e WOLF-WATZ, 1997).

A secreção de algumas Yops ainda depende da presença de um grupo de proteínas chamado Syc. Cada proteína deste grupo se liga especificamente a uma proteína do grupo Yop auxiliando na sua função (WATTIAU et al, 1996).

Dois genes presentes em *Y. enterocolitica*, estão intimamente ligados à capacidade desta bactéria de invadir células de mamíferos, os genes *inv* e *ail* (MILLER et al, 1988). Enquanto o gene *inv* está presente no gênero *Yersinia*, o gene *ail* é isolado apenas de cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas, geralmente ligadas à doença em humanos.

A proteína Invasina, originária da expressão do gene *inv*, está presente na membrana externa e tem a função de se ligar a integrinas na superfície apical de

células M intestinais, auxiliando a translocação bacteriana, através destas células, para placas de Peyer (MILLER e FALKOW, 1988; CLARK et al, 1998; PEPE e MILLER, 1993). A expressão desta proteína acontece na fase estacionária e em baixas temperaturas (PEPE e MILLER, 1993), variando de acordo com o sorotipo (ULICZKA et al, 2011). O regulador de transcrição RovA controla o gene *inv* (REVELL e MILLER, 2000), portanto, a presença deste é determinante para o funcionamento do gene. A proteína Ail está presente na membrana celular (MILLER et al, 1990) e contribui para a adesão e invasão das células bacterianas através da parede intestinal (MILLER et al, 1988). Esta proteína somente é expressa a temperatura de 37°C (BIEDZKA-SAREK et al, 2005).

Além destes, esta espécie ainda tem a capacidade de secretar uma enzima termoestável chamada Yst (DELOR et al, 1990), frequentemente encontrada em cepas de *Y. enterocolitica* biotipo 1A diagnosticadas como causadoras de diarreia (SINGH e VIRDI, 2004). Esta enterotoxina é produzida geralmente a 28°C mas um estudo já demonstrou a possibilidade de isolados pertencentes ao biotipo 1A produzirem esta toxina a 37°C em pH de 7,5 (SINGH e VIRDI, 2004). Yst resiste ao tratamento térmico a 121°C durante 30min, representando perigo de intoxicação para o consumidor, se presente previamente no leite cru, pois pode conservar-se íntegra após o processo de pasteurização (BOYCE et al, 1979).

Outro fator que contribui para a invasão celular é a presença de YadA, uma proteína que tem diversas funções, entre elas promover a aderência celular, resistência antimicrobiana e proteção antifagocítica (BIEDZKA-SAREK et al, 2005). Esta adesina é expressa somente a temperatura de 37°C (NEUBAUER et al, 2000) e em combinação com o antígeno O presente na camada lipopolissacarídica. Tem sido relacionada com o aumento da resistência à ação bactericida no soro sanguíneo (BIEDZKA-SAREK et al, 2005).

O biotipo 1B, considerado o mais patogênico, contém ainda uma ilha de patogenicidade chamada Ysa que codifica para outro sistema de secreção que secreta um conjunto complexo de 15 proteínas (MATSUMOTO e YOUNG, 2006), o qual, por sua vez, é necessário para a secreção de outro conjunto de proteínas chamado Ysp. A expressão dos genes Ysa depende do pH, que deve estar neutro ou básico e temperatura em torno de 26°C (WALKER e MILLER, 2009). Embora a sua função não tenha sido ainda identificada, sabe-se que é determinante para a virulência (HALLER et al, 2000; MATSUMOTO e YOUNG, 2006).

Apesar de a legislação brasileira não exigir a pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em água e alimentos, diferentes autores têm relatado a ocorrência desta bactéria em leite e derivados (SCHIEMANN e TOMA, 1978; VIDONI e DELMAS, 1981; YUCEL e ULUSOY, 2006; HANIFIAN e KANI, 2012; NAJDENSKI et al, 2012), sendo frequentemente a colonização bacteriana do trato intestinal dos bovinos a origem da contaminação (RUEGG, 2003). A água também é uma importante fonte de contaminação e disseminação desta bactéria. Cepas de *Y. enterocolitica* com potencial patogênico já foram isoladas de água sem tratamento (SANDERY et al, 1996; HAYASHIDANI et al, 2003; IWATA et al, 2005) e também de água potável (SCHINDLER, 1984; PANDOVE et al, 2012), ratificando a sua importância como fonte para a transmissão da bactéria.

A doença causada por *Y. enterocolitica*, caracterizada por gastroenterite, é considerada a 3ª zoonose mais notificada na Europa (EFSA, 2012). Os indivíduos mais suscetíveis a infecções por esta bactéria são bebês e crianças jovens (RAHMAN et al, 2011). *Y. enterocolitica* tem capacidade de sobreviver a baixas temperaturas (HANNA et al, 1977), tornando o risco ainda maior, já que a refrigeração é muito utilizada como método de conservação de produtos lácteos e é considerada muitas vezes segura.

Entre 1996 e 2007, foram reportados 1.335 casos de infecções por *Y. enterocolitica*, 3,5 casos por 1000 habitantes, no Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). Este levantamento incluiu casos confirmados por laboratórios de 10 estados norte-americanos (LONG et al, 2010), demonstrando ser esta bactéria uma importante causa de doenças transmitidas por alimentos (DTA). É estimado que 116.716 pessoas sejam infectadas anualmente por *Y. enterocolitica* nos EUA (SCALLAN et al, 2011). Em países em desenvolvimento, é rara a existência de vigilância epidemiológica de casos de yersiniose, já que muitas vezes o diagnóstico não revela o causador da gastroenterite. Em países como Estados Unidos, Nova Zelândia e membros da União Europeia existem órgãos responsáveis pelo registro da incidência de casos, bem como da possível origem das infecções (GALINDO et al, 2011), podendo a casuística da doença ser monitorada.

O consumo de leite cru ou inadequadamente pasteurizado, bem como de seus derivados, tem sido historicamente relacionado a infecções por *Y. enterocolitica* em humanos (BLACK et al, 1978). Em 1995, houve um surto de *Y. enterocolitica* em moradores das cidades de Upper Valley, Vermont e New Hampshire, EUA, ligado ao

consumo de leite pasteurizado (ACKERS et al, 2000). Mais recentemente, foi relatado um surto relacionado com produtos lácteos inadequadamente pasteurizados, no estado da Pensilvânia, EUA (LONGENBERGER et al, 2014). Em estudo realizado neste mesmo estado (VOORHEES et al, 2011), no período de março a agosto de 2011, 16 pacientes foram confirmados com a bactéria e todos relataram ter ingerido água mineral ou leite pasteurizado certificado pelo Departamento de Agricultura da Pensilvânia. Estes estudos demonstram o perigo potencial que o leite pode representar como fonte de contaminação de *Y. enterocolitica* para os humanos. Fatores relacionados à higiene dos equipamentos de ordenha, do ambiente e dos manipuladores podem levar à contaminação do leite, elevando o risco de ocorrência de DTA (MIGUEL et al, 2012). Conseqüentemente, a manutenção da segurança dos alimentos deve ser garantida durante todo o processo de produção, onde a obtenção do leite deve ser um ponto gerador de contaminação a ser considerado (RUEGG, 2003).

Considerando a hipótese de que a água utilizada para limpeza de equipamentos, as mãos dos ordenhadores, o balde utilizado para recolhimento do leite ordenhado e os insufladores das teteiras possam ser fontes de contaminação de *Y. enterocolitica* para o leite, o trabalho teve como objetivo determinar as possíveis fontes de contaminação de *Y. enterocolitica* durante a obtenção do leite em propriedades rurais.

## **2 Materiais e métodos**

### **2.1 Obtenção das amostras:**

Foram realizadas coletas em oito propriedades localizadas na região de Pelotas, Rio Grande do Sul, com sistema de ordenha sem canalização e com tanques resfriadores próprios. Foram obtidas amostras de três pontos do fluxograma de ordenha, balde, insuflador de teteira e mão de ordenhador, bem como da água utilizada durante o processo e de leite de conjunto obtido logo após o término da ordenha.

Durante um ano, foram feitas quatro coletas de três em três meses (setembro e dezembro de 2013 e março e junho de 2014) em cada propriedade, gerando um total de 160 amostras analisadas durante este período.

### **2.2 Coleta, acondicionamento e transporte das amostras:**

As amostras de água foram coletadas com cuidados de assepsia, impedindo o contato do frasco coletor estéril com a torneira, diretamente destas, localizadas no interior do estabelecimento, após escoamento durante três minutos, em volume de aproximadamente 400mL (APHA, 2001).

As amostras representativas das mãos dos manipuladores, dos equipamentos e utensílios, foram coletadas com o auxílio de zaragatoas estéreis. As amostras de superfície dos baldes, foram coletadas através da fricção da zaragatoa em uma área de 100cm<sup>2</sup> delimitada através de gabarito de aço inoxidável (APHA, 2001). Os insufladores foram coletados antes do início da ordenha, friccionando as zaragatoas em movimentos circulares na porção final de cada um (McDONALD et al, 1993). No caso das amostras de mão dos ordenhadores, a zaragatoa foi friccionada em movimentos giratórios da parte inferior da palma direita, até a extremidade dos dedos, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo, já nas bordas, foi passada a zaragatoa em movimentos de vai e vem avançando em um dos lados da mão onde a linha do punho se inicia, passando entre os dedos e ao

final do outro lado da mão até o punho (APHA, 2001). Após a obtenção das amostras, as zaragatoas foram mergulhadas em quatro mililitros de água peptonada a 0,1%. As amostras de leite cru, em volume de 200mL, foram coletadas com o auxílio de uma concha estéril diretamente do balde que recebe o leite ordenhado e acondicionadas em frasco estéril (BRITO et al, 1998).

Logo após as coletas, as amostras foram transportadas ao laboratório em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

### **2.3 Obtenção dos isolados:**

Para a obtenção dos isolados, o material das zaragatoas foi semeado diretamente por esgotamento em ágar MacConkey (Kasvi, Itália) e incubadas a 30°C por 24h.

As amostras de água foram processadas segundo as recomendações da U.S. Food and Drug Administration – FDA (WEAGANT e FENG, 2007) para obtenção de colônias isoladas, conforme descrito a seguir. As amostras foram filtradas em membrana de éster de celulose de 47mm de diâmetro e poros 0,45 $\mu$  (APHA, 2001), as quais foram depositadas em frascos tipo Erlenmeyer contendo 100mL de caldo Tripticase de Soja (TSB, Acumedia, EUA) e incubadas a 30°C durante 24h. Após o enriquecimento, foi feita semeadura em ágar MacConkey e incubação a 30°C durante 24h.

Quanto às amostras leite, 25mL foram adicionados a 225mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Isofar, Brasil) para pré-enriquecimento por 30 dias a 4°C. Após, 1mL do pré-enriquecimento foi adicionado em 100mL de caldo Peptona Sacarose Tris Azida de Sódio Ampicilina (PSTA) composto por 1g de peptona A (Acumedia), 1g de Sacarose (Synth, Brasil), 3g de TRIS hidroximetil aminometano (Ludwig Biotec, Brasil), 0,0125g de Verde Brilhante (Synth), 0,192g de Azida de Sódio (Synth) e água destilada qsp 1 L, suplementado com Ampicilina (Sigma Aldrich, EUA) na concentração de 5mg/L e incubados a 28°C durante 48h (VIDON e DELMAS, 1981). Após o enriquecimento, foi feita semeadura em ágar MacConkey e incubação a 30°C durante 24h.

Três colônias lactose negativas de cada amostra obtidas através da semeadura em MacConkey foram semeadas em Infusão de Cérebro e Coração

(BHI, Acumedia) e, após incubação a 30°C por 24h, foram misturadas com 20% de glicerol, para manutenção de estoque a -70°C.

## **2.4 Identificação de *Y. enterocolitica*:**

### **2.4.1 Extração do DNA**

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

### **2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase**

Foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase para identificação de *Y. enterocolitica*, conforme Neubauer et al (2000). Cada 25µL da mistura de reação continha os *primers* específicos para o gene *rRNA 16S* na concentração de 10ng; 2,5µL mix dNTP 10x; 0,5U de *Taq DNA polimerase*; 5x de tampão; 0,5µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne, Staffordshire, UK) a 94°C durante 10min, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 1min, 68°C por 25s e 72°C por 30s. Uma extensão final foi realizada a 72°C durante 10min. Os produtos de PCR, corados com GelRed™ (Uniscience, São Paulo, Brasil), foram visualizados em gel de agarose 1,5% (Panreac Química SA, Barcelona, Espanha) utilizando L-PIX 112 EX (Loccus biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). Como controle positivo, foi utilizada *Y. enterocolitica* ATCC 9610.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na identificação de *Y. enterocolitica*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' a 3')	Gene alvo	Tamanho da amplificação (pb)	Referência
Y1	AATACCGCATAACGTCTTCG	16S	330	Neubauer et al (2000)
Y2	CTTCTTCTGCGAGTAACGTC			

### 2.4.3 Perfis moleculares

Os isolados de *Y. enterocolitica* foram agrupados através da técnica de reação em cadeia da polimerase com elemento repetitivo palindrômico (rep-PCR), fazendo uso do *primer* (GTG)<sub>5</sub> (VERSALOVIC et al, 1991). Os perfis de bandas obtidos foram analisados segundo Tenover et al (1995), cuja classificação se dá em quatro formas: indistinguíveis (nenhuma banda diferente), intimamente relacionadas (2-3 bandas distintas), possivelmente relacionadas (4-6 bandas distintas) e diferentes (mais de 7 bandas distintas).

As condições da rep-PCR foram as seguintes: 2,5µL de DNA, 2µL do oligonucleotídeo 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3', 12,5µL de Master Mix (Qiagen, Alemanha) e 8µL de água para completar o volume da reação. Para a amplificação foram realizados 1 ciclo de 94°C por 5min, 30 ciclos subsequentes de 95°C por 30s, 45°C por 1min e 60°C por 5min, e finalmente 1 ciclo de 60°C por 16 min. Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões amplificadas, os produtos da rep-PCR foram corados com GelRed e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 2%.

### 3 Resultados e discussão

*Y. enterocolitica* foi isolada da água utilizada no estábulo leiteiro, das mãos dos ordenhadores e de leite cru imediatamente após a ordenha (Tabela 2).

Tabela 2 – Fontes de isolamento de *Y. enterocolitica* no período de Setembro de 2013 a Junho de 2014.

Propriedades rurais	Amostras				
	Leite*	Água	Mãos	Balde	Teteira
A	----	+++	+++	----	----
B	----	----	----	----	----
C	----	----	---+	----	----
D	+++	----	---+	----	----
E	----	----	---+	----	----
F	---+	---+	----	----	----
G	---+	----	----	----	----
H	----	----	----	----	----

Nas colunas onde aparecem quatro símbolos (+ ou -), cada um corresponde a uma coleta. A ordem das coletas é a mesma em toda linha. Ausência de *Y. enterocolitica* (-); presença de *Y. enterocolitica* (+).

Das amostras de leite analisadas, 9,37% (3/32) foram positivas para *Y. enterocolitica*. Esse resultado é semelhante ao encontrado em um estudo realizado no Irã (HANIFIAN e KANI, 2012), no qual foi revelada a presença da espécie em 7,62% (27/354) amostras de leite cru e menor que o encontrado por Yucel e Ulusoy (2006) em um estudo na Turquia, no qual foi identificada a presença de *Y. enterocolitica* em 25% (25/100) das amostras. Nestes dois países, bem como no Brasil, é comum o consumo de leite cru nas propriedades rurais e produção de

derivados de forma artesanal (ANUALPEC, 1998; YUCEL e ULUSOY, 2006; HANIFIAN e KANI, 2012). Embora no Brasil a comercialização de leite cru diretamente ao consumidor seja proibida pelo decreto-lei nº 923 de 10 de outubro de 1969 (BRASIL, 1969), este produto em muitos casos, é vendido clandestinamente, expondo o consumidor ao risco de contrair patógenos que este produto possa estar veiculando (ABRAHÃO et al, 2005).

No Brasil, anteriormente, já houve relato de isolamento de *Y. enterocolitica* em leite cru no estado do Rio de Janeiro. Nesta ocasião, a frequência de isolamento foi de 32,4% (TIBANA et al, 1987), nível considerado alto em comparação com outro trabalho realizado no estado de São Paulo (TASSINARI et al, 1994), no qual a frequência de isolamento de *Y. enterocolitica* em leite cru foi de 19,4%, valor já elevado em relação ao encontrado na nossa pesquisa. Entre os anos de 1980 e 1990, o Centro Nacional de Referência em *Y. enterocolitica* fez 468 isolamentos do gênero *Yersinia* em alimentos, 46 amostras continham *Y. enterocolitica*, sendo que 12 eram de leite cru (FALCÃO, 1991). Os resultados do nosso estudo mostram que o problema ainda persiste, chamando a atenção para o risco a que está exposto o consumir deste produto sem tratamento térmico. O fato de termos isolado *Y. enterocolitica* em três das oito (37,5%) propriedades rurais que fizeram parte do estudo é um dado ainda mais preocupante, pois sugere que, mesmo ocasionalmente, leite contaminado com *Y. enterocolitica* pode ser comercializado e consumido. Por outro lado, essa contaminação parece não ser persistente dentro da propriedade, uma vez que não houve isolamento do leite em mais de uma coleta na mesma propriedade.

A água é considerada uma das principais fontes de contaminação e disseminação de patógenos, principalmente quando não é submetida a tratamento adequado. No nosso trabalho, foi possível isolar *Y. enterocolitica* de 6,25% (2/32) das amostras de água de 25% (2/8) das propriedades, entretanto, nestas não foi possível encontrar *Yersinia enterocolitica* no leite parecendo não haver uma relação. Esta bactéria já foi isolada de água de abastecimento, poços com motor e nascentes na Turquia (GÖNÜL e KARAPINAR, 1991), onde 6% (6/100) das amostras revelaram ser positivas para a presença de *Y. enterocolitica*, bem como de rio em Wiscosin, EUA, onde foi possível identificar a espécie em 8,25% (25/303) das amostras (MEADOWS e SNUDDEN, 1982). No Brasil, já foi relatada a presença do micro-organismo em oito coleções aquáticas naturais na cidade do Rio de Janeiro

(FREITAS et al, 1987). Estes estudos, juntamente com os resultados obtidos no nosso trabalho, refletem a distribuição desta espécie bacteriana em diversos tipos de ambientes aquáticos. A presença de *Y. enterocolitica* na água das propriedades estudadas é preocupante, já que esta água é utilizada pelos ordenhadores para limpeza de equipamentos e também para uso pessoal em suas casas. Como agravante, foi observado durante a pesquisa que nenhuma das propriedades fazia algum tipo de tratamento da água, como recomenda a Instrução Normativa 51 do Ministério da Agricultura, de 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002), que estabelece que a água destinada à produção de leite deve estar dentro de padrões de qualidade adequados. Outros trabalhos também têm reportado amostras de água de propriedades rurais brasileiras fora dos padrões de potabilidade (AMARAL et al, 2003; BARCELLOS et al, 2006; NUNES et al, 2010; JOÃO et al, 2011).

Além do isolamento a partir de leite e água, foi possível isolar a bactéria de 12,5% (4/32) das amostras de mãos dos ordenhadores. Apesar dos ordenhadores não manipularem diretamente o leite, eles são a principal ligação entre equipamentos, utensílios, animais e o leite, podendo concorrer para a transferência de contaminação entre estes. Embora outros micro-organismos já tenham sido pesquisados em mãos de ordenhadores, além do nosso trabalho, não existem estudos na região envolvendo a bactéria em questão e este possível ponto de contaminação.

Já foram pesquisadas outras espécies bacterianas durante a ordenha, e os autores consideraram que o manipulador pode ser o responsável pela disseminação de patógenos para outras etapas do processamento e, conseqüentemente, para o leite (ZADOKS et al, 2002; CHYIE et al, 2004; KAGKLI et al, 2007; OLIVINDO et al, 2009). Portanto, é de suma importância que seja realizada a antissepsia adequada das mãos, antes e durante a ordenha, especialmente nas propriedades leiteiras da região, de característica familiar, onde foi observado que a mesma pessoa manipula os animais e os equipamentos.

Embora *Y. enterocolitica* não tenha sido isolada de amostras de balde e teteiras, a correta higienização dos equipamentos com produtos adequados e água de qualidade segue sendo imprescindível para a obtenção de um leite seguro.

Não houve reincidência no isolamento da bactéria nas coletas seguintes nos mesmos pontos, parecendo que a contaminação é bastante variável ou que é facilmente eliminada. Nas propriedades A e F foi possível isolar *Y. enterocolitica* de

amostras diferentes durante a mesma coleta (1YAA1, 1YAM1 e 4YFA1, 4YFL2, 4YFL4), no entanto a rep-PCR não revelou similaridade entre os isolados (Figura 1), o que sugere que as fontes de contaminação podem ser constituídas por pontos diversos e que várias formas de disseminação da bactéria podem estar envolvidas.

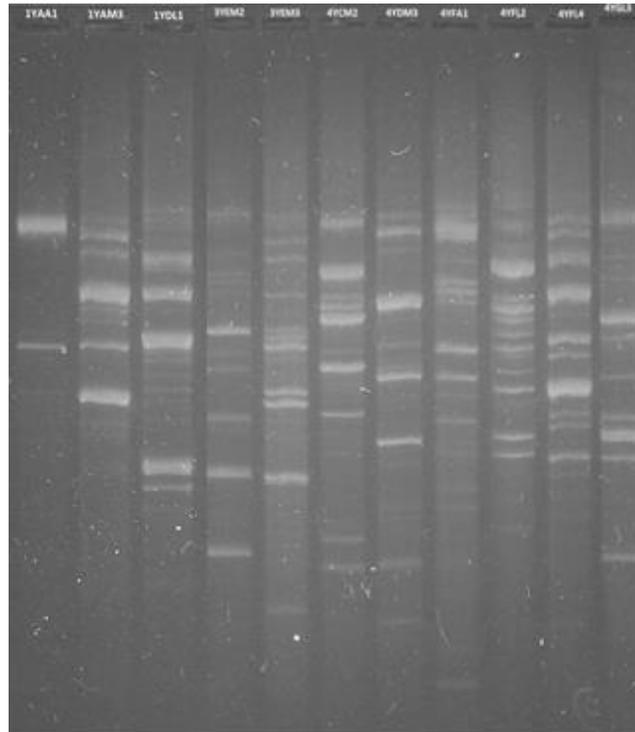


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da rep-PCR.

As inscrições nas extremidades superiores das colunas correspondem aos isolados. 1YAA1: 1ª coleta, propriedade A, amostra de água; 1YAM3: 1ª coleta, propriedade A, amostra de mão; 1YDL1: 1ª coleta, propriedade D, amostra de leite; 3YEM2 e 3YEM3: 3ª coleta, propriedade E, amostras de mão; 4YFA1: 4ª coleta, propriedade F, amostra de água; 4YFL2 e 4YFL4: 4ª coleta, propriedade F, amostras de leite; 4YGL1: 4ª coleta, propriedade G, amostra de leite.

A variedade de perfis moleculares observados na rep-PCR representa a diversidade de cepas existente nas amostras analisadas. Corroborando este fato, uma amostra de mão de ordenhador (propriedade E) e uma amostra de leite (propriedade F) apresentaram cada uma, dois isolados com perfis de bandas diferentes entre si (3YEM2 e 3YEM3; 4YFL2 e 4YFL4), demonstrando a ocorrência de cepas distintas, simultaneamente, na mesma amostra.

A presença de *Y. enterocolitica* no leite revela que há falhas no processo de obtenção do produto e, embora a origem da contaminação do leite não tenha sido

determinada pela rep-PCR, a bactéria foi isolada da água utilizada na ordenha e das mãos dos ordenhadores, dois pontos fundamentais para o controle higiênico-sanitário. Cuidados especiais devem ser dirigidos à qualidade da água utilizada no estábulo leiteiro, pois entra em contato com os equipamentos que recebem o leite podendo contaminá-lo, e à higiene das mãos dos ordenhadores, que é quem tem contato com todas as etapas do processo neste tipo de atividade, podendo ser disseminador de patógenos para o leite cru.

#### **4 Considerações Finais**

O leite cru produzido no sul do Brasil pode estar contaminado por *Y. enterocolitica*. Embora ocorra de forma esporádica, um percentual preocupante de propriedades ocasionalmente produz leite cru contaminado pela bactéria, o que indica negligência em relação aos os cuidados relativos ao controle de *Y. enterocolitica* nos estabelecimentos leiteiros. Além da adoção de medidas higiênico-sanitárias apropriadas durante a produção do leite, sugerimos maior rigor no controle do comércio ilegal de leite cru e no esclarecimento da população quanto aos perigos de consumir leite sem o tratamento térmico recomendado pela legislação.

A presença de *Y. enterocolitica* em água e mãos de ordenhadores é um alerta para que haja maior atenção na higienização das mãos de quem manipula os equipamentos para a obtenção do leite e para que seja dada maior importância ao tratamento da água usada durante a ordenha.

## Referências

ABRAHÃO, R.M.C.M.; NOGUEIRA, P.A.; MALUCELLI, M.I.C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science** [da] Universidade Federal do Paraná. v.10, n.2, p.1-17, 2005.

ACKERS, M.L.; SCOENFELD, S.; MARKMAN, J.; SMITH, M.G.; NICHOLSON, M.A.; DEWITT, W.; CAMERON, D.N.; GRIFFIN, P.M.; SLUTSKER, L. An Outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 Infections Associated with Pasteurized Milk. **The Journal of Infectious Diseases**. v.181, p.1834-7, 2000.

ALLAOUI, A.; SCHULTE, R.; CORNELIS, G.R. Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* *virC* operon: characterization of *yscE, F, G, I, J, K* required for Yop secretion and *yscH* encoding YopR. **Molecular Microbiology**. v.18, n.2, p.343-355, 1995.

ANUALPEC. Mudança de escala na pecuária de leite. **Anuário da Pecuária Brasileira**. p.223-230, 1998.

AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista Saúde Pública** [da] Universidade de São Paulo. v.37, n.4, p.510-514, 2003.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, p.676, 2001.

BARCELLOS, C.M.B.M.R.; RODRIGUES, L.S.R.; COSTA, C.C.; OLIVEIRA, P.R.O.; SILVA, I.J.; JESUS, É.F.M.; ROLIM, R.G. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, Minas Gerais,

Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública** [da] Fundação Oswaldo Cruz. v.22 n.9, p.1967-1978, 2006

BARI, L.; HOSSAIN, M.A.; ISSHIKI, K.; UKUKU, D. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. **Journal of pathogens**. v.2011, 2011.

BHAGAT, N.; VIRDI, J.S. The enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. **Critical Reviews in Microbiology**. v.37, p.25-39, 2011.

BIEDZKA-SAREK, M.; VENHO, R.; SKURNIK, M. Role of YadA, Ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, **Infection and Immunity**. v.73, p.2232-2244, 2005.

BLACK, R.E.; JACKSON, R.J.; TSAI, T.; MEDVESKY, M.; SHAYEGANI, M.; FEELEY, J.C.; MACLEOD, K.I.E.; WAKELEE, A.M. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. **The New England Journal of Medicine**. v.298, p.76-79, 1978.

BOYCE, J.M.; EVANS, E.J. Jr; EVANS, D.G.; DuPONT, H.L. Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. **Infection and Immunity**. v.25, n.2, p.532-537, 1979.

BRASIL. **Decreto-lei nº 923, DE 10 de outubro de 1969**. Diário Oficial da União. Seção 1. p.8601, 1969.

BRASIL. **Instrução Normativa n.51, de 18 de setembro de 2002**. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal. 39p, 2002.

BRITO, M.A.V.P. ; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.18, n.1, p.39-44, 1998.

CHYIE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**. n.21, p.535-541, 2004.

CLARK, M.A; HIRST, B.H; JEPSON, M.A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. **Infection and Immunology**. v.66, p.1237-1243, 1998.

CORNELIS, G.R.; WOLF-WATZ, H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. **Molecular Microbiology**. v.23, n.5, p.861-867, 1997.

DELOR, I.; KAECKENBEECK, A.; WAUTERS, G.; CORNELIS, G.R. Nucleotide Sequence of yst, the *Yersinia enterocolitica* Gene Encoding the Heat-Stable Enterotoxin, and Prevalence of the Gene among Pathogenic and Nonpathogenic Yersiniae. **Infection and Immunity**. v.58, n.9, p.2983-2988, 1990.

EFSA. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. **EFSA Journal**. v.10, p.1-442, 2012.

EL-ZANFALY, H.T.; ABDALLAH, S.A.; KHEIRALLA, Z.H. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in different Egyptian water resources: the relation with bacterial indicators, survival and resistance to antibiotics and disinfectants. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**. v.4, n.4, p.499-503, 2008.

FALCÃO, D.P. Occurrence of *Yersinia* spp. in foods in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. v.14, p.179-182, 1991.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. p. 33-81, Rio de Janeiro: Atheneu, 2003.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; CERNELA, N.; HÄCHLER, H.; STEPHAN, R. *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001–2010. **European Journal of Clinical Microbiology Infection and Disease**. v.31, p.1543-1550, 2012.

FREITAS, A.C.; NUNES, M.P.; RICCIARDI, I.D. Ocorrência de *Yersinia* sp. em redutos aquáticos naturais, na cidade do Rio de Janeiro / Occurrence of *Yersinia* sp. in aquatic natural resources of the city of Rio de Janeiro. **Review of Microbiology**. v.18, n.3, p.235-42, 1987.

GALINDO, C.L.; ROSENZWEIG, J.A.; KIRTLEY, M.L.; CHOPRA, A.K. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. **Journal of Pathogens**. v.2011, 16 p, 2011.

GÖNÜL, S.A.; KARAPINAR, M. The microbiological quality of drinking water supplies of Izmir City: the incidence of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**. v.13, n.1, p.69-73, 1991.

HALLER, J. C.; CARLSON, S.; PEDERSON, K. J.; PIERSON, D. E. A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. **Molecular Microbiology**. v.36, p.1436-1446, 2000.

HANNA, M.O.; STEWART, C.; CARPENTER, L. ANDERZANT, C. Effect of heating, freezing and pH on *Yersinia enterocolitica*-like organisms from meat. **Journal of Food Protection**. v.40, p.689-692, 1977.

HANIFIAN, S.; KHANI, S. Prevalence of virulent *Yersinia enterocolitica* in bulk raw milk and retail cheese in northern-west of Iran. **International Journal of Food Microbiology**. v.155, p.89-92, 2012.

HAYASHIDANI, H.; ISHIYAMA, Y.; OKATANI, T. A.; YOSHIDA, S.; ISHIKAWA, M.; KATO, Y.; OHTOMO, Y.; SAITO, M.; HORISAKA, T.; KANEKO, K.; OGAWA, M. Molecular genetic typing of *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 isolated in Japan. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.529, p.363-365, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária – Março de 2014a.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária – Setembro de 2014b.

IWATA, T.; UNE, Y.; OKATANI, A. T.; KANEKO, S.; NAMAI, S.; YOSHIDA, S.; HORISAKA, T.; HORIKITA, T.; NAKADAI, A.; HAYASHIDANI, H. *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 infection in breeding monkeys in Japan. **Microbiology and Immunology**. v.49, n.1, p.1-7, 2005.

JAY, J.M. Gastreenterites de origem alimentar causadas por espécies de *Vibrio*, *Yersinia* e *Campylobacter*. In: JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. p.583-594, São Paulo: Artmed, 2005.

JOÃO, J.H.; ROSA, C.A. da V.L.; NETO, A.T.; PICININ, L.C.A.; FUCK, J.J.; MARIN, G. Qualidade da água utilizada na ordenha de propriedades leiteiras do Meio Oeste Catarinense, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias** [da] Universidade do Estado de Santa Catarina. v.10, n.1, p.9-15, 2011.

KAGKLI, D. M.; VANCANNEYT, M.; HILL, C.; VANDAMME, P.; COGAN, T. M. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. **International Journal of Food Microbiology**. n.114, p.243-251, 2007.

LONG, C.; JONES, T. F.; VUGIA, D. J.; SCHEFTEL, J.; STROCKBINE, N.; RYAN, P.; SHIFERAW, B.; TAUXE, R. V.; GOULD, L. H. *Yersinia Pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* Infections, FoodNet, 1996–2007. **Emerging Infectious Diseases**. v.16, n.3, p.566-567, 2010.

LONGENBERGER, A. H.; GRONOSTAJ, M.P.; YEE, G. Y.; JOHNSON, L.M.; LANDO, J.F.; VOORHEES, R.E.; WALLER, K.; WELTMAN, A.C.; MOLL, M.; LYSS, S.B.; CADWELL, B.L.; GLADNEY, L.M.; OSTROFF, S.M. *Yersinia enterocolitica* infections associated with improperly pasteurized milk products: southwest Pennsylvania, March-August 2011. **Epidemiology and Infection**. v.142, p.1640-1650, 2014.

MATSUMOTO, H.; YOUNG, G.M. Proteomic and functional analysis of the suite of Ysp proteins exported by the Ysa type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* Biovar 1B. **Molecular Microbiology**. v.59, n.2, p.689-706, 2006.

MEADOWS, C.A.; SNUDDEN, B.H. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Waters of the Lower Chippewa River Basin, Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**. v.43, n.4, p.953-954, 1982.

McDONALD, J.S.; KINSER, M.L.; ADAMS, D.S. Studying the effects of backflushing milking units. **Veterinary Medicine**. v.88, n.4, p.382-386, 1993.

MIGUEL, P.R.R.; POZZA, M.S.S.; CARON, L.F.; ZAMBOM, M.A.; POZZA, P.C. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina** [da] Universidade Estadual de Londrina. v.33, n.1, p.403-416, 2012.

- MILLER, V.L.; FALKOW, S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**. v.56, p.1242-1248, 1988.
- MILLER, V.L.; FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Factors essential for the penetration of mammalian cells by *Yersinia*. **Current Topics of Microbiology and Immunology**. v.138, p.15-39, 1988.
- MILLER, V. L.; BLISKA, J. B.; FALKOW, S. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* ail gene and characterization of the Ail protein product. **Journal of Bacteriology**. v.172, n.2, p.1062-1069, 1990.
- NAJDENSKI, H.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; WERBROUCK, H.; COILLIE, E. V. Quantification of *Yersinia enterocolitica* in raw milk using qPCR **Veterinary Microbiology**. v.160, p.428-434, 2012.
- NEUBAUER, H.; HENSEL, A.; ALEKSIC, S.; MEYER, H. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the Genus *Yersinia*. **Systematic and Applied Microbiology**. v.23, p.58-62, 2000.
- NORNBERG, M. L. B. F.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n.2, p.157-163, 2009.
- NUNES, A.P.; LOPES, L.G.; PINTO, F. de R.; AMARAL, L.A. do. Qualidade da água subterrânea e percepção dos consumidores em propriedades rurais. **Nucleus** [da] Fundação Educacional de Ituverava. v.7, n.2, 2010.
- OLIVINDO, C.S.; CHAPAVAL, L.; VILLARROEL, A.B.S.; ALVES, F.S.F.; SOUSA, F.G.C. de; FERNANDES, F.E.P. Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, n.7, p.1317-1321, 2009.
- PANDOVE, G.; SAHOTA, P.; VERMA, S.K.; MAHAJAN, V.; SINGH, D.; Singh, J.P. Epidemiology, virulence and public health significance of *Yersinia enterocolitica* in drinking water. **African Journal of Microbiology Research**. v.6, n.30, p.5905-5913, 2012.

PEPE, J.C.; MILLER, V.L. The biological role of invasin during a *Yersinia enterocolitica* infection. **Infectious Agents and Disease**. v.2, p.236-241, 1993.

RAHMAN, A.; BONNY, T.S.; STONSAOVAPAK, S.; ANANCHAIPATTANA, C. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks. **Journal of Pathogens**. v.2011, p.1-11, 2011.

REVELL, P.A.; MILLER, V.L. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. **Molecular Microbiology**. v.35 p.677-685, 2000.

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

RUEGG, P.L. Practical food safety interventions for dairy production. **Journal of Dairy Science**. n.86, p.E1-E9, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W.; **Molecular cloning: a laboratory manual**. v.2, 2001.

SANDERY, M.; STINEAR, T.; KAUCNER, C. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental waters by PCR. **Journal of Applied Bacteriology**. v.80, n.3, p.327-332, 1996.

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. **Emerging Infectious Diseases**. v.17, p.7-15, 2011.

SCHIEMANN, D.A.; TOMA, S. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**. v.35, n.1, p.54-58, 1978.

SCHINDLER, P.R. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from drinking water in South Bavaria. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**. v.180, p.76-84, 1984.

SINGH, I.; VIRDI, J.S. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Medical Microbiology**. v.53, p.1065-1068, 2004.

TASSINARI, A.R.; FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Incidence of *Yersinia* spp. in food in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. v.21, p.263-270, 1994.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, n.9, p.2233-2239, 1995.

TIBANA, A.; WARNKEN, M.B.; NUNES, M.P.; RICCIARD, I.D.; NOLETO, A.L.S. Occurrence of *Yersinia* species in raw and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**. n.7, p.543-620, 1987.

ULICZKA, F.; PISANO, F.; SCHAAKE, J. STOLZ, T. ROHDE, M.; FRUTH, A.; STRAUCH, E.; SKURNIK, M.; BATZILLA, J.; RAKIN, A.; HEESEMANN, J.; DERSCH, P. Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human yersiniosis. **PLoS Pathogens**. v.7, n.7, p.1-24, 2011.

WALKER, K.A.; MILLER, V.L. Synchronous gene expression of the *Yersinia enterocolitica* Ysa type III secretion system and its effectors. **Journal of Bacteriology**. v.191, n.6, p.1816-1826, 2009.

WATTIAU, P.; WOESTYN, S.; CORNELIS, G.R. Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. **Molecular Microbiology**. v.20, p.255-262, 1996.

WEAGANT, S.D.; FENG, P. *Yersinia enterocolitica*. U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual online**, Chapter 8, 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072633.htm>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

VERSALOVIC, J.T.; KOEUTH, T; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**. v.19, p.6823-6831, 1991.

VIBOUD, G. I.; BLISKA, J. B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**. v.59, p.69-89, 2005.

VIDON, D. J.; DELMAS, C. L. Incidence of *Yersinia enterocolitica* in Raw Milk in Eastern France. **Applied and Environmental Microbiology**. v.41 n.2 p.355-359, 1981.

VOORHEES, R.; CASEY, M.; SILVESTRI, S.; YEE, G.; JOHNSON, L.; OSTROFF, S.; WELTMAN, A.; WALLER, K.; MOLL, M.; NAMBIAR, A.; LANDO, J.; LONGENBERGER, A.; GRONOSTAJ, M. *Yersinia enterocolitica* infections associated with pasteurized milk-Southwestern Pennsylvania, March-August, 2011. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.60, n.41, 2011.

YUCEL, N.; ULUSOY, H. A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples **Food Control**. v.17, p.383-388, 2006.

ZADOKS, R. N.; Van LEEUWEN, W. B.; KREFT, D.; FOX, L.K.; BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y. H.; van BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, n.11, p.3894-3902, 2002.