



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**CELLYNEUDE DE SOUZA OLIVINDO**

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS UTILIZANDO A TÉCNICA  
DE PCR EM SEQUÊNCIAS PALINDRÔMICAS EXTRAGÊNICAS  
REPETIDAS (REP-PCR) NO MONITORAMENTO DA  
QUALIDADE DO LEITE DE CABRA EM SALA DE ORDENHA**

**FORTALEZA-CE  
2007**

**CELLYNEUDE DE SOUZA OLIVINDO**

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS UTILIZANDO A TÉCNICA  
DE PCR EM SEQÜÊNCIAS PALINDRÔMICAS EXTRAGÊNICAS  
REPETIDAS (REP-PCR) NO MONITORAMENTO DA  
QUALIDADE DO LEITE DE CABRA EM SALA DE ORDENHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em zootecnia.

**Orientador**  
**Prof. Dr. Arturo B. Selaive Villarroel**

**FORTALEZA-CE**  
**2007**

O54d Olivindo , Cellyneude de Souza

Detecção de microrganismos utilizando a técnica de PCR em seqüências palindrônicas extragênicas repetidas (REP-PCR) no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha / Cellyneude de Souza Olivindo.

64f., il. color., enc.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Área de Concentração : Produção e Nutrição Animal

Orientador: Prof. Dr. Arturo Bernardo Selaive Villarroel

Co-Orientadora : Dra. Lea Chapaval

1. Bactérias 2. Epidemiologia molecular 3. Identidades genômicas 4. Leite de cabra

I. Villarroel, Arturo Bernardo Selaive (orient.) II. Chapaval, Lea (co-orient.)

III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Zootecnia III. Título

CDD 636.08

**Dedico**

À minha família porto seguro de minha vida

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de realização do curso.

À Embrapa Caprinos pelo apoio financeiro, através do projeto e cedendo os animais e laboratórios, o que tornou possível a realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo .

Ao professor Dr. Selaive por confiar em mim e no meu trabalho, pelo apoio, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis, meu reconhecimento.

À Dra. Lea Chapaval pela confiança, dedicação, paciência, amizade, incentivo em todos os momentos, não só à pesquisa, mas também aos ensinamentos que me ajudaram a crescer. Minha eterna gratidão.

Aos professores do Curso de pós-graduação em zootecnia, por todos os conhecimentos transmitidos em especial à professora Dra. Socorro Carneiro pelas conversas, conselhos, críticas que com certeza muito contribuíram para minha formação.

À banca examinadora pelas sugestões.

Aos funcionários da Embrapa Caprinos que contribuíram para realização das coletas e análises laboratoriais, em especial (Lino, Alex, Diniz, Chiquinho, Zequinha, Augusto, Rafael, Zé Maria, Weligton, Helena, Osmarilda, João Ricardo, Nóbrega).

Aos Pesquisadores Dr. Selmo Alves, Dra. Andréa Oliveira pela atenção e colaboração nos momentos em que precisei.

Aos colegas que pelos caminhos do destino e da trajetória final de mestrado acabaram se distanciando, deixando lembranças dos momentos de troca e alegria.

Aos estagiários do Setor de ovinocaprinocultura da UFC pelo apoio.

Aos companheiros de Setor, Luci, Nunes, Ludmila, Patrícia, Jamile, Marcílio e em especial meus parceiros de sala Ivan e Tatiana que juntos passamos e dividimos momentos inesquecíveis meu sincero agradecimento, pois cada um foi importante num determinado momento.

À Geovânia meu “braço direito” sem a qual em muito teria dificultado a execução desse trabalho, o meu sincero obrigado pela ajuda com as análises, digitação, atenção, solidariedade, apoio, conversas e principalmente amizade.

À Isana que mesmo a distancia continuou me incentivando e apoiando.

Aos irmãos de república e de coração Celina, Valéria, Jaime, Tatiana, Socorro, Cissa e Zoim pelo carinho, respeito e principalmente amizade.

À família Fernandes por todo apoio.

Ao Eden, meu companheiro de todas as horas, com todo amor.

À Deus e todos os santos que juntos comigo fizeram essa caminhada.

# DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR EM SEQUÊNCIAS PALINDRÔMICAS EXTRAGÊNICAS REPETIDAS (REP-PCR) NO MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE DE CABRA EM SALA DE ORDENHA

## RESUMO

O presente estudo foi realizado, com o objetivo de aplicar a técnica de PCR em sequências palindrômicas extragênicas repetidas (REP-PCR) no monitoramento da qualidade do leite de cabra, através da detecção de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus spp.*, em amostras de mãos de ordenhadores, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água, para o futuro estabelecimento e implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Verificou-se vários *fingerprints* de todos os isolados coletados das diferentes fontes estudadas (mãos de ordenhadores, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água). Observou-se comportamentos muito similares das bandas indicando que os isolados podem ser relatados como clones epidemiológicos. A água sem tratamento, utilizada para a lavagem das mãos dos ordenhadores, caracterizou-se como um ponto crítico de controle (PCC), pois se destaca como iniciador de contaminação nas amostras *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outro PCC seria as mãos do ordenhador, pois nas amostras de *Staphylococcus aureus*, aparece também como indicador de contaminação. A técnica demonstrou ser eficiente para a análise de similaridade entre indivíduos da mesma espécie, no caso, do *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo, portanto, uma ferramenta útil para investigação de falhas no manejo e conseqüentemente, na busca de um controle mais eficiente para evitar ou minimizar a disseminação de microrganismos patogênicos causadores de sérias enfermidades em humanos e animais, que muitas vezes podem ser transmitidas através de produtos como o leite e seus derivados.

**Termos para indexação:** Bactérias, epidemiologia molecular, identidades genômicas,  
Leite de cabra

# DETENTION OF MICROORGANISMS USING THE TECHNIQUE OF PCR IN REPETITIVE EXTRAGENIC PALINDROMIC (REP-PCR) SEQUENCES IN TRACKING OF THE QUALITY OF GOAT MILK IN MILKING ROOM

## ABSTRACT

The present study was carried out, with the objective of applying the PCR technique in repetitive extragenic palindromic (REP-PCR) sequences in the monitoring of the quality of goat milk, through the detection of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus* spp., in samples of milking handlers, goats teats, milk, milk machine and water, for the future establishment and implantation of the system of Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP). Several fingerprints was verified of all the isolates collected of the different studied sources (milking handlers, goats teats, milk, milk machine and water). It was observed very similar behaviors of the bands indicating that the isolates can be related as epidemic clones. The water without treatment, used for the wash milking handlers, it was characterized as a critical point of control (PCC), because stands out as starter contamination in the *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* samples. Another PCC would be the hands of the milking handlers, because in the *Staphylococcus aureus* samples, it is also appears as initial point of contamination. The technique demonstrated to be efficient for the similarity analysis among individuals of the same species, in case, of the *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, being, therefore, an useful tool for investigation of fails on management and consequently, in the search of more efficient control to avoid or to minimize the spread of pathogenic microorganisms that cause serious illnesses in humans and animals, and can be transmitted through products as the milk and your products.

**Index terms:** Bacterias, molecular epidemiology, *fingerprints*, goat milk.

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> , fonte, período de coleta e agrupamentos (cluster) correspondentes em leite de cabra.....	36
Tabela 2. Amostras de <i>Streptococcus spp.</i> , fonte, período de coleta e agrupamentos (cluster) correspondentes em leite de cabra.....	41
Tabela 3. Amostras de <i>Escherichia coli</i> , fonte, período de coleta e agrupamentos (cluster) correspondentes em leite de cabra.....	45
Tabela 4. Amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , fonte, período de coleta e agrupamentos (cluster) correspondentes em leite de cabra.....	50

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Placas de Petry com meios de cultura seletivos para cada bactéria estudada: ágar Baird Parker (BP) para <i>Staphylococcus aureus</i> , ágar Mac Conkey (MC) para <i>Escherichia coli</i> , ágar sangue + suplemento para <i>Streptococcus spp.</i> e ágar Pseudomonas + suplemento (PS) para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
Figura 2. Sistema de identificação de gêneros e espécies bacterianas API bioMérieux (bioMérieux Vitec, Inc. USA).....	31
Figura 3. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> e M = marcador molecular (1 Kb).....	35
Figura 4. Dendograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> . Os números do eixo <i>x</i> indicam o Coeficiente de Jaccard.....	37
Figura 5. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de <i>Streptococcus spp.</i> e M = marcador molecular (1 Kb)..	40
Figura 6. Dendograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Streptococcus spp.</i> , . Os números do eixo <i>x</i> indicam o Coeficiente de Jaccard.....	42
Figura 7. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de <i>Escherichia coli</i> e M = marcador molecular (1 Kb).....	44
Figura 8. Dendograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Escherichia coli</i> . Os números do eixo <i>x</i> indicam o Coeficiente de Jaccard.....	46
Figura 9. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e M = marcador molecular (1 Kb).....	49
Figura 10. Dendograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Os números do eixo <i>x</i> indicam o Coeficiente de Jaccard.....	51

## SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Lista de Tabelas.....	9
Lista de Figuras.....	10
1. Introdução.....	12
2. Revisão de Literatura.....	15
2.1. Produção de leite de cabra.....	15
2.2. Contaminação bacteriana.....	16
2.3. Qualidade do leite.....	17
2.4. Boas práticas agropecuárias (BPA) e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) como ferramentas para controle da qualidade na produção de leite de cabra.....	22
2.5. Análise de agrupamentos e tipagem epidemiológicas.....	24
3. Material e Métodos.....	30
4. Resultados e Discussão.....	35
5. Conclusão.....	53
6. Referências Bibliográficas.....	54

## 1. Introdução

O desenvolvimento econômico de um país, além dos determinantes sociais, culturais e políticos, é favorecido e sustentado pelo conhecimento. Dentro deste contexto de desenvolvimento, a sociedade brasileira convive com muitos problemas graves, entre eles, o de estabelecer e assegurar uma política nacional voltada para a segurança alimentar e nutricional. No entanto, atualmente, registra-se a existência de doenças associadas à pobreza e a desnutrição, e aquelas vinculadas a hábitos alimentares que afetam geralmente as populações mais pobres, e que também atingem duramente todas as parcelas da sociedade com expressividade epidemiológica (NARDIN et al., 1997; BRASIL, 2000).

Os problemas alimentares e nutricionais que atingem os países em desenvolvimento são muitos graves, se caracterizando de difícil solução, principalmente em países, como o Brasil. Cada vez mais, necessita-se de ações eficazes, alternativas que atinjam os alvos e que diminuam a fome. Diante do exposto, acredita-se que a caprinocultura leiteira, modelada em planos estratégicos, visa conseqüentemente o seu fortalecimento e sua ampla expansão, onde apresentar-se-á como um instrumento capaz de contribuir de forma significativa, a alcançar os objetivos das políticas de segurança alimentar e nutricional no Brasil (QUEIROGA, 2007).

O sistema APPCC (análise de perigos e pontos críticos de controle) tem sido um instrumento útil, para avaliar os riscos de perigos e estabelecer mecanismos ou medidas de controle que visem minimizar os riscos de contaminação física, química ou microbiológica (HEESCHEN et al., 1997). Entretanto, pode ajudar na tarefa de inspeção pelas autoridades competentes e promover o comércio internacional, porque funciona como uma ferramenta útil, onde aumenta a confiança do mercado em termos de segurança alimentar (FAO, 1999).

Os problemas relacionados à saúde de rebanhos leiteiros e à produção de leite seguro e de qualidade para a saúde do consumidor e de qualidade demandam informações representativas do universo da cadeia de produção. Para isso, são necessários estudos epidemiológicos que visem a compreensão do papel da epidemiologia aplicada à saúde animal. A implementação do processo APPCC surge como uma alternativa dentro do ciclo de produção do leite de cabra apresentado, entretanto, uma série de questões ainda não referenciadas. Uma destas questões refere-se a falta de informações e dados, outras nas

dificuldades de seleção dos Pontos Críticos de Controle (PCCs) para um número de perigos biológicos encontrados nas fazendas; onde há a impossibilidade de erradicar ou controlar a maior parte dos patógenos, especialmente aqueles que causam problemas clínicos em animais e que também podem causar danos à saúde humana, tais como: *Escherichia coli* 0157:H7, *Staphylococcus aureus.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros.

Assim, técnicas baseadas no uso de primers com fins de tipagem epidemiológica, tais como RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), REP (Seqüências Palindrômicas Extragênicas Repetidas), ERIC (Seqüências Consenso intergênica Repetidas Enterobacterianas), e BOX-PCR (Elemento Box), estão sendo cada vez mais utilizadas para investigação de surtos, podendo confirmar e delimitar o comportamento da transmissão de um ou mais clones de microrganismos epidêmicos, para testar hipóteses sobre fontes e veículos de transmissão destes clones e, por conseguinte monitorar os reservatórios de organismos epidêmicos. A tipagem também contribui para a sobrevivência epidemiológica e avaliação de medidas de controle, através da documentação da prevalência e circulação de organismos epidêmicos em populações infectadas (MASLOW & MULLIGAN, 1996; STRUELENS, 1998).

A implementação de programas que visem melhorar a qualidade e a segurança do leite deve estar fundamentada em informações obtidas de forma científica, a partir de amostragem adequada e sempre usando métodos epidemiológicos laboratoriais de confiança. As políticas dos governos com relação à fiscalização dos alimentos certamente continuarão a existir, mas a tendência é de cada vez mais se associar a processos de gestão, como o Boas práticas agropecuárias (BPA), Boas práticas de fabricação (BPF) e APPCC, que garantam a qualidade e segurança do alimento ao longo de toda a cadeia produtiva, de modo que não se faça uma inspeção apenas nos produtos finais, com os prejuízos já conhecidos. Dessa forma, as indústrias, e primeiramente os produtores deverão incorporar cada vez mais mecanismos de manuseio adequado do produto que permitam a prevenção e controle, das possíveis fontes de contaminação.

O presente estudo foi realizado, com o objetivo de aplicar a técnica de PCR em seqüências palindrômicas extragênicas repetidas (REP-PCR) no monitoramento da qualidade do leite de cabra, através da detecção de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

*coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus spp.*, em amostras de mãos de ordenhadores, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água, para o futuro estabelecimento e implantação do sistema APPCC.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2. 1. Produção de leite de cabra**

A produção nacional diária de leite de cabra está estimada em torno de 22.000 litros. O potencial de demanda, mesmo se considerando que clientela para o leite de cabra é formada por um público diferenciado é, com certeza, o dobro destes valores de produção, havendo, portanto, um déficit de oferta de 22.000 litros de leite por dia. Entretanto, a região Nordeste produz diariamente 10.000 litros de leite de cabra, onde corresponde à 45.4% de toda a produção nacional. O Estado do Rio Grande do Norte vem se destacando como o principal produtor, com 8.500 litros de leite por dia, onde no Estado do Ceará, a produção de leite diária chega aos 1.000 litros, sendo que a região norte do Estado apresenta um potencial de produção de 400 litros de leite por dia. Porém, a produção do Sudeste é de 12.000 litros, o que corresponde a 54.6% de todo o leite de cabra que é produzido no País, e por apresentar uma cadeia produtiva organizada, em termos de processamento industrial e conseqüentemente na garantia de comercialização do leite e de seus derivados com uma melhor qualidade, o que garante a evolução do setor como um todo (COSTA, 2007).

A produção e o consumo de alimentos de origem animal vem aumentando desde a década de 1970 e a previsão é que, especialmente nos países em desenvolvimento, essa tendência continue a crescer até 2020, a qual, entre outras conseqüências, poderá aumentar os riscos à saúde humana em razão do maior consumo de produtos de origem animal (WHO, 1999). A OMS estima que até 30% da população dos países industrializados são susceptíveis as intoxicações e infecções alimentares, estimando-se a ocorrência de 76 milhões de surtos, com aproximadamente 325.000 hospitalizações e entre 5.000 e 9.000 óbitos, por ano, especialmente nos Estados Unidos, onde muitos surtos envolvem mais de um país e alguns, mais de um continente (WHO, 1999).

Os alimentos possuem potencial para veicularem microrganismos patogênicos (e, ou suas toxinas), em parte porque existem muitos pontos de perigos ao longo da cadeia alimentar em que a segurança do alimento pode estar devidamente comprometida (CULLOR, 1997). Assim, os cuidados com a segurança alimentar devem começar,

principalmente, na fase de produção, até a chegada do alimento incluindo na mesa do consumidor.

## 2. 2. Contaminação bacteriana

Algumas das bactérias, de interesse do ponto de vista da segurança alimentar, encontram no ambiente de produção de leite excelente meio de disseminação, podendo ser encontradas nos animais, no úbere das fêmeas e no ambiente. Dentre essas, podemos citar *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Esses microrganismos são muito pequenos e não podem ser vistos a olho nu. Tais bactérias, com relação à contaminação, podem ser classificadas em microrganismos contagiosos, ambientais, oportunistas e outros (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

Os *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos que tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva, sendo amplamente distribuídos na natureza, também fazendo parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. Esse gênero é formado, atualmente, por 32 espécies, dentre estas, o *Staphylococcus* é o mais relacionado a casos e surto de intoxicação alimentar, devido à capacidade da maioria de suas cepas de produzir enterotoxinas. Na literatura, são descritos inúmeros surtos de intoxicação alimentar causados geralmente pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas. Em função do risco à saúde pública sua presença representa em alimentos, e em diversos países, a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração, como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais (SILVA, 2004).

Segundo LISBOA (1997), ao trabalhar com bactérias Gram negativas e *Staphylococcus aureus* em serviço de alimentação hospitalar foi relatado que 39% dos manipuladores, 31,3% dos utensílios e 92% das superfícies de processamento apresentaram contagens de bactérias Gram negativas acima das especificações de contagem padrão recomendada, onde a contaminação por *S. aureus* também esteve acima das recomendações, em 83,3% dos manipuladores, em 50% dos utensílios e em 38,3% das superfícies de contato analisados.

Os *Streptococcus* são cocos Gram-positivos, sendo de maior importância em medicina humana e animal (TRABULSI, 2002). A bactéria *Streptococcus uberis* é

atualmente um dos principais agentes que causam impactos diretos sobre qualidade do leite. Esta bactéria pode ser encontrada em diversos locais do corpo do animal, como por exemplo, na superfície da pele, trato genital, e no solo, dejetos e ambiente onde o animal permanece (DOGAN & BOOR, 2004). A espécie *Streptococcus agalactiae* por muito tempo foi reconhecida como uma das principais causadoras de mastite em animais e que causa meningites e pneumonias em neonatos e septicemias em humanos.

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*. Entretanto, a única espécie de maior importância prática é a *Escherichia coli*. Esta bactéria tem sua origem no animal que chega à sala de ordenha vindo de ambiente contaminado. Estes microrganismos estão presentes no esterco, água sem tratamento, solo e materiais usados para cama dos animais. Essa bactéria pode causar infecções intestinais, infecções urinárias septicemias, meningites e outros tipos de infecções (TRABULSI, 2002).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria tipicamente oportunista, podendo causar várias doenças. As infecções localizadas, em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras, podem resultar em bacteremias severas e fibrose cística. Essa bactéria normalmente habita os solos, água, vegetais e pode ser encontrada em equipamentos de ordenha com processo de sanificação ineficiente e soluções de desinfecção adequadas para tetos contaminadas, onde a mesma pode ser encontrada na pele e tem sido isolada das fezes e garganta de 3% a 5% dos indivíduos normais (TRABULSI, 2002). Tal como os coliformes, estes microrganismos produzem uma endotoxina que resulta em toxemia com aumento da temperatura corpórea.

### **2. 3. Qualidade do leite**

Segundo a Instrução Normativa nº 37 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) entende-se por leite de cabra, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprinos sadios, bem, alimentados e descansados. Desde que o animal seja saudável, o leite ao ser sintetizado e secretado nos alvéolos do úbere é considerado estéril. Logo após sua retirada, manuseio e armazenamento, o leite poderá se contaminar pela presença de microrganismos

provenientes do ambiente, da pele do animal, mãos de ordenhadores e utensílios utilizados na ordenha. Por ser um ótimo meio de cultura para os microrganismos é que todos os cuidados higiênicos devem ser tomados para que esse alimento mantenha suas características intrínsecas preservadas (CHAPAVAL & PIEKARSKI, 2000).

O leite, contudo, é um produto altamente perecível, tendo as suas características físicas, químicas e biológicas facilmente alteradas pela ação de microrganismos e pela manipulação a que é submetido. Mais grave ainda é a condição de veículo de doenças que o leite pode vir a desempenhar, caso não haja um conjunto de ações preventivas antes de seu consumo (DÜRR, 2004).

A qualidade microbiológica vem se destacando por constituir-se um indicativo da salubridade da glândula mamária da fêmea em lactação, e de um modo geral das práticas higiênicas adotadas dentro do manejo da propriedade. Esta qualidade pode ser enfocada sob dois diferentes aspectos: a qualidade industrial e principalmente o risco à saúde pública. Do ponto de vista industrial seria a questão do pagamento do leite quanto a sua qualidade. Tão ou mais importante que o pagamento pela composição é considerar a qualidade higiênica do leite como determinante do preço para o recebimento do produto. As exigências nesse aspecto são cada vez maiores, já que a tecnologia disponível, tanto do ponto de vista do equipamento de ordenha e materiais, como o dos elementos para desinfecção, permitem que o leite recebido nas fábricas tenha cada vez uma menor incidência de bactérias. Uma boa qualidade do leite do ponto de vista bacteriológico é essencial para se obter produtos de excelente qualidade, tanto organoléptica como nutricional. Em alguns casos, como de leites ácidos e queijos, esse aspecto adquire ainda mais relevância (IBARRA, 2004). Com relação à saúde pública, se destacam os casos de intoxicações alimentares ocasionadas muitas vezes por ingestão de alimentos crus ou processados, contaminados por microrganismos através das mãos de manipuladores, superfícies e equipamentos inadequados (ALMEIDA, 2003).

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos caprinos leiteiros do mundo, e aquela que proporciona as maiores perdas econômicas na exploração da atividade como um todo. Para o controle da doença, é importante que exista um programa voltado para o diagnóstico e monitoramento constante dentro da propriedade rural. (CHAPAVAL & PIEKARSKI, 2000).

Alguns fatores devem ser observados para que o leite não se contamine pela ação de microorganismos que podem prejudicar a qualidade do leite e seus derivados, como, por exemplo: ordem de ordenha, retirada dos primeiros jatos, lavagem dos tetos, desinfecção dos tetos antes da ordenha, secagem dos tetos, colocação das teteiras, desinfecção dos tetos após a ordenha e manejo pós-ordenha, higiene do ordenhador, diagnóstico de mastite subclínica e tratamento na secagem (PHILPOT E NICKERSON, 1991; LARANJA, 1995abc).

Existem alguns testes que podem ser utilizados como teste de triagem da saúde da glândula mamária caprina, tais como, o CMT (California Mastitis Test) que poderá ser utilizado, no entanto, para evitar resultados falso-positivos, devido à fisiologia da glândula mamária desta espécie. Esse teste deve estar associado ao exame microbiológico do leite. Em caprinos, o processo de secreção do tipo autócrino resulta em um elevado número de partículas citoplasmáticas e células epiteliais no leite, que são constituintes do processo fisiológico normal dos animais. Além da mastite, diversos fatores influenciam a CCS (Contagem de Células Somáticas) do leite caprino, como raça do animal, condições climáticas, número de partos, fase da lactação, número diário de ordenhas e produção individual de leite. Ao contrário da mastite bovina, há dificuldade em estabelecer um valor padrão da CCS para o diagnóstico da mastite caprina, razão pela qual deva existir a associação de exames diagnósticos (HINCKLEY, 1983; SANTOS, 1990; SHEARER & HARRIS, 2004).

Os animais ao serem conduzidos à sala de ordenha devem ser organizados de modo que as fêmeas sadias e, principalmente os animais primíparos sejam ordenhados primeiramente seguidos das fêmeas múltiparas, fêmeas sadias, que já tiveram mastite e por último as fêmeas doentes. Esse procedimento é realizado com o intuito, de evitar a contaminação cruzada, onde os animais em fase colostrar deverão ser ordenhados antes dos animais doentes ou, se possível em unidades separadas ou manualmente (CHAPAVAL et al., 2006a).

Com relação ao procedimento de retirada dos primeiros jatos (3-4 jatos), este deverá ser feito em uma caneca telada ou de fundo preto. Essa prática auxilia a diagnosticar a mastite clínica, estimular a “descida” do leite e a retirada dos primeiros jatos de leite que

apresentam uma maior concentração microbiana. (CHAPAVAL & PIEKARSKI 2000; CHAPAVAL et al, 2006a).

A prática da lavagem dos tetos em água corrente deverá ser evitada sempre que possível, a mesma deve ser utilizada nos casos em que as cabras chegam na sala de ordenha com as tetas sujas, visualmente, de forma evidente (placas de esterco, barro etc). Caso contrário recomenda-se que não seja utilizada água na preparação da cabra para ordenha.

A imersão dos tetos em solução desinfetante, também conhecida como *pré-dipping*, é uma prática relativamente recente. Os estudos apontam que essa medida possibilita uma redução de até 50% na taxa de novas infecções da glândula mamária, causada por patógenos ambientais, onde deve-se fazer a imersão completa dos tetos. Os produtos mais tradicionais utilizados são: hipoclorito de Sódio 2% e solução de Iodo a 0.3% do princípio ativo (BAGLEY, 1997; CHAPAVAL & PIEKARSKI, 2000).

A secagem completa dos tetos com papel toalha descartável é importante devido ao risco de contaminação do leite pelo uso de desinfetantes sendo a boa secagem dos tetos responsável pela não ocorrência de deslizamento de teteiras, que é um dos principais fenômenos determinantes de novas infecções intramamárias. As pesquisas demonstram que a utilização de toalhas descartáveis proporcionaram uma redução de 75% no número de bactérias que colonizam o teto após a secagem dos mesmos. Um aspecto importante a destacar-se neste ponto é que somente se deve executar a secagem dos tetos depois de decorridos 30 segundos da aplicação do desinfetante, pois esse é o tempo de ação exigido pela maioria dos produtos fornecidos (BAGLEY, 1997).

Com relação as teteiras estas devem ser colocadas no máximo 1 min 30 seg após a retirada dos primeiros jatos (massagem dos tetos). Dessa forma, otimiza-se a ação da ocitocina, o que proporciona uma ordenha mais rápida e completa.

As teteiras devem ser colocadas permitindo-se a menor entrada de ar possível, o que é obtido, abrindo-se o registro de vácuo somente quando já estiver com o conjunto de teteiras embaixo da cabra. Logo cesse o fluxo de leite, deve-se proceder à retirada das teteiras. Para tal é essencial que seja fechado o registro de vácuo, pois caso contrário há uma grande predisposição à ocorrência de lesões nos tetos e no esfíncter. Muitos ordenhadores têm por hábito fazer massagem no úbere e pressionar o conjunto de teteiras para baixo no final da ordenha, com a finalidade de fazer uma esgota mais completa. Nesse

caso, a massagem é desnecessária e a pressão do conjunto pode ser executada desde que de forma suave e por apenas alguns segundos (CHAPAVAL & PIEKARSKI 2000; CHAPAVAL et al, 2006a).

A prática isolada mais importante de controle de novas infecções intramamárias é a desinfecção dos tetos ao final da ordenha. A imersão dos tetos deve ser completa, isto é, pelo menos 2/3 dos tetos devem ser imersos completamente na solução desinfetante aplicada. Dessa forma, o melhor método de aplicação é através do uso de canecas para imersão de tetos, especialmente as do modelo sem retorno (“*one way*”), que impedem o retorno da solução após a aplicação. O uso de spray geralmente está associado a uma cobertura incompleta dos tetos com a solução desinfetante (CHAPAVAL & PIEKARSKI 2000; CHAPAVAL et al, 2006a).

A duração em que uma cabra permanece no período seco influi de forma significativa sobre sua próxima lactação, seja pelo rendimento obtido na lactação subsequente, sobre o crescimento e desenvolvimento do feto no teço final da gestação. O período de descanso, quase sempre recomendado, é em torno de 60 dias antes da parição, tanto para cabras quanto para vacas, porém alguns estudos demonstram que um período em torno de 45 dias poderá ser recomendado para as cabras.

Existem vários métodos para secagem das cabras, os quais dependem da produção individual de cada animal, e dos diferentes manejos de cada propriedade em questão. A secagem dos animais deverá começar em torno de 10 semanas antes do parto, devendo a cabra estar completamente seca em torno de 8 semanas antes do parto ou quando apresentar produção inferior a 400g de leite por dia, em dois controles leiteiros. (ALVES & COX, 1998; SILVA et al., 2001).

#### **2. 4. Boas práticas agropecuárias (BPA) e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) como ferramentas para o controle da qualidade na produção de leite de cabra**

Atualmente, aceita-se que qualquer iniciativa que tenha por finalidade garantir a inocuidade e melhoria da qualidade dos alimentos deve estar focalizada no controle dos perigos potenciais de contaminação, e nos alimentos que proporcionam maior risco a saúde

individual e coletiva. Porém, os métodos atuais de inspeção não são satisfatórios, eles foram concebidos com o objetivo de identificar problemas decorrentes de décadas passadas, mas que, nos dias de hoje, deixaram de ser os perigos mais sérios relacionados com os alimentos. No entanto, é chegada a hora dos pecuaristas começarem a tomar medidas concretas de controle, visando eliminar os microorganismos patogênicos da cadeia alimentar. Com isso, é necessário dar ênfase ao desenvolvimento e implementação de medidas preventivas para o controle desses riscos potenciais, através da colaboração entre as autoridades governamentais e os setores responsáveis da indústria de alimentos. Estas medidas de controle são as Boas Práticas Agropecuárias (BPA), que antecedem a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC ou HACCP (da sigla em inglês para Hazard Analysis Critical Control Points), um processo científico que representa o que há de mais moderno na atualidade, e que tem por finalidade construir a inocuidade nos processos de produção, manipulação, transporte, distribuição e consumo dos alimentos. No entanto, os países desenvolvidos começaram a aplicar as BPA e o sistema HACCP, sempre com o intuito de assegurar a inocuidade de pescados, carnes e derivados e, em um futuro muito breve, esse sistema deverá se estender a todos os alimentos hortifrutigranjeiros (ALMEIDA, 2004).

Para que as boas práticas na produção de leite de cabra sejam implantadas na propriedade, os animais precisam ser saudáveis e está em condições aceitáveis. Para atingir esta meta, produtores de leite de cabra precisam aplicar as Boas Práticas Agropecuárias nas seguintes áreas: saúde animal, higiene da produção de leite, alimentação animal incluindo a água, bem-estar animal, instalações, meio ambiente e um acompanhamento técnico (CHAPAVAL & ALVES, 2006b).

O APPCC é um sistema preventivo, que busca a produção de alimentos inócuos e com melhores características competitivas. Esse sistema está embasado na aplicação de princípios técnicos e científicos na produção e manejo dos alimentos, desde o campo até a mesa do consumidor. Os princípios do APPCC são aplicáveis a todas as fases da produção de alimentos, incluindo a agricultura básica, a pecuária, a industrialização e manipulação dos alimentos, os serviços de alimentação coletiva, os sistemas de distribuição e manejo e a utilização do alimento pelo consumidor (SPEXOTO, 2003).

Uma definição prática de APPCC deve destacar que este conceito engloba todo tipo de fatores de risco ou perigos potenciais à inocuidade dos alimentos - biológicos, químicos e físicos - sejam os que ocorrem de forma natural no alimento, no ambiente ou sejam aqueles decorrentes de erros no processo de fabricação. Enquanto os perigos químicos são os mais temidos pelos consumidores (agrotóxicos) e os perigos físicos os mais comumente identificados (pêlos, fragmentos de osso ou de metal, material estranho), os perigos biológicos sem destacam como os mais sérios, do ponto de vista de saúde pública.

O sistema APPCC é um enfoque sistemático para a inocuidade dos alimentos, que é constituído basicamente de sete princípios ativos (ALMEIDA, 2004):

1. Identificar os perigos, estimar os riscos e estabelecer medidas para controlá-los.
2. Identificar os pontos onde o controle é crítico para o manejo da inocuidade do alimento.
3. Estabelecer critérios de controle (Limites Críticos) a cumprir nesses pontos críticos.
4. Estabelecer procedimentos para vigiar mediante a monitorização o cumprimento dos critérios de controle.
5. Definir os corretivos a aplicar quando a vigilância indica que não se satisfazem os critérios de controle.
6. Manter um sistema de registros e documentação sobre o sistema.
7. Estabelecer procedimentos para verificar o correto funcionamento do sistema.

A análise de Perigos serve para definir as medidas preventivas que controlarão os perigos identificados, para proceder a um eventual redesenho do processo e para determinar os pontos críticos de controle (PCC). Os PCC definidos na análise serão aqueles pontos do processo onde a aplicação de uma medida de controle elimina ou reduz o perigo a um nível aceitável, ou seja, onde não signifique um problema de saúde para o consumidor. Uma boa análise de perigos nos facilitará determinar as etapas realmente críticas para a inocuidade do produto, já que na prática o ideal é mantê-los em um mínimo, de forma que possa dar a máxima atenção às medidas preventivas essenciais para a inocuidade (ALMEIDA, 2004).

## **2. 5. Análise de agrupamentos e tipagem epidemiológica**

Os fenômenos naturais são estreitamente influenciados e associados a diversos efeitos. Deste modo, sua mensuração e expressão, devem ser concordantes com este

paradigma. Técnicas como o agrupamento (*cluster analysis*) apresenta a vantagem de reduzirem o espaço multidimensional a uma medida de distância entre os objetos, representando esta em um espaço bidimensional, muito mais simplificado do que o espaço multidimensional (CORMACK, 1971; MARDIA, KENT & BIBBY, 1995). Esta capacidade de sumarização é o grande atrativo desta técnica multivariada, o que lhe confere grande aplicabilidade e difusão em diversos ramos da ciência (EVERITT, 1979; MANLY, 1994).

Como resultado da análise de agrupamento, tem-se o dendograma, que representa o arranjo entre os objetos em uma escala de distância. Este arranjo indica apenas afinidade entre os grupos, não definindo nenhuma ordenação entre estes. O caráter heurístico do resultado da análise de agrupamento é indicado pelas inferências cabíveis: (i) esclarecimento de um dado fenômeno avaliado, (ii) geração de novas hipóteses, (iii) planejamento e organização de uma estrutura, baseada na disposição dos objetos e (iv) confecção de uma lista de categorias ou objetos afins (CORMACK, 1971).

A técnica de agrupamento em si apresenta um apelo visual significativo; deste modo, a apresentação gráfica de similaridade ou dissimilaridade entre os objetos e mais especificamente de grupos de objetos afins mais polarizados, o que contribui como forte critério de decisão (LEBART, MORINEAU & WARWICK, 1984; KRUSKAL & LANDWEHF, 1993).

Mesmo com este caráter heurístico e profundamente subjetivo, três características, baseadas no procedimento fenético, são requeridas para a execução de uma análise de agrupamento efetiva e consistente (SNEATH & SOKAL, 1973), a saber: (i) objetividade, através da qual experimentador subsequente deve obter as mesmas conclusões de um experimentador original, (ii) estabilidade, através da qual a análise subsequente deve refletir as mesmas conclusões ou padrões da análise original, dada a inclusão de uma nova variável ou caracter e (iii) preditibilidade, que promove inalteração do padrão ou conclusão iniciais, em uma análise subsequente, dada a inclusão de uma nova características são cumpridas na íntegra, categoria. De modo geral, estas características são cumpridas na íntegra, garantindo a determinação da estrutura latente de um fenômeno, onde comportamento deste, o que é a base do pensamento científico atual (DOLBY, 1982).

A análise de agrupamento situa-se como uma técnica indivíduo-dependente, na qual valores de distâncias, sob a forma de matrizes, entre os objetos são arrançados. A estimação de parâmetro não é requerida, neste caso, o que lhe ratifica o caráter não-probabilístico (CHATFIEL & COLLINS, 1986). O fracionamento de um conjunto de dados, de unidades de observação ou casos em subconjuntos ou grupos homogêneos é objetivo principal desta análise, definido-se, assim, uma maior homogeneidade dentro do subconjunto e maior heterogeneidade em relação a outros subconjuntos (FISHER, 1958; MARDIA, KENT & BIBBY, 1995). Desta forma, agrupamento é a disposição não necessariamente ordenada entre os objetos, os subconjuntos formados não tributam nenhuma informação a não ser afinidade latente (CORMACK, 1971; EVERITT, 1981).

Na técnica de agrupamento as distâncias são medidas utilizadas para a representação dos pontos na estrutura de similaridade. Dentre os níveis de mensuração das variáveis mais comumente utilizados, têm-se os nominais, para os quais o atributo é um carácter que pode ser codificado de modo binário, assinalando (0) para a ausência e (1) para a presença.

De modo geral, as distâncias nominais recebem a denominação de coeficientes ou índices, já que estas não satisfazem a desigualdade triangular, o que não lhes confere a legitimidade de distâncias (ORLOCI, 1966).

Dada a exclusividade, o caráter extrínseco refere-se a uma separação inicial das categorias de objetos, como objetivo de determinar quais as afinidades e diferenças dos objetos previamente selecionados. Estudos epidemiológicos, utilizando a estrutura a caso controle, assinalam este caráter.

Sistemas de tipagem epidemiológica podem ser usados para investigações de surtos, para confirmar e delinear comportamentos de transmissão de um ou mais clones epidêmicos, para testar hipóteses sobre fontes e veículos de transmissão destes clones e para monitorar reservatórios de organismos epidêmicos (STRUELENS, 1998). A tipagem também contribui para a vigilância epidemiológica e avaliação de medidas de controle, através da documentação da prevalência através do tempo e circulação de clones epidêmicos em populações infectadas. Diferentes demandas serão necessárias para aplicações distintas (MASLOW & MULLIGAN, 1996; STRUELENS et al., 1996).

A premissa básica para a tipagem epidemiológica é que isolados (agentes infecciosos) que são parte da mesma cadeia de transmissão são relatados como clones, que

são a progênie da mesma célula ancestral. Existem extensas diversidades genotípicas e fenotípicas entre a mesma espécie de populações de patógenos microbianos. Esta diversidade reflete a divergência evolucionária originada das mutações e do fluxo gênico. (STRUELENS, 1998). Isolados relatados como clones, significativamente, exibem muitos caracteres similares que aqueles não relatados. Estes caracteres distintos, chamados marcadores epidemiológicos, são registrados através de sistemas de tipagem os quais são desenhados para otimizar a discriminação entre isolados de interesse patogênicos epidemiologicamente relatados ou não (MASLOW & MULLIGAN, 1996; STRUELENS et al., 1996). O limiar do marcador de similaridade de um clone deve ser ajustado para a espécie em estudo, o sistema de tipagem usado, a pressão de seleção do ambiente e o tempo e a extensão espacial do estudo (STRUELENS et al., 1996).

DNA repetitivos, os quais ocorrem em grandes quantidades em células eucarióticas, têm sido identificados de forma crescente em procariotos. Em genomas eucarióticos, este DNA repetitivo é frequentemente associado com regiões codificadoras e conseqüentemente são localizados, primariamente, em regiões extragênicas. DNA repetitivo consiste em regiões homopoliméricas simples de um mesmo tipo de nucleotídeo [poly(A), poly(G), poly(C), poly(T)], ou de um pequeno ou grande número de muitas classes multiméricas repetidas. Estas repetições multiméricas são construídas de unidades idênticas (repetições homogêneas), unidades misturadas (repetições heterogêneas), ou seqüências degeneradas de repetições. Seqüências pequenas repetitivas ocorrem em muitas dos milhões de cópias dispersas através do genoma de muitos, senão todos, eucariotos (RADEMAKER & DE BRUJIN, 2003). Estas seqüências de elementos mostram hipervariabilidade entre indivíduos, separadamente, e o mapeamento genético pode ser usado para preparar “impressões digitais” que são específicas para um indivíduo (RADEMAKER & DE BRUJIN, 2003). Contudo estas seqüências foram inicialmente definidas como microsátélites de DNA, consistindo de pequenas seqüências repetitivas (SSRs) ou seqüências próximas repetitivas (STRs) (NAKAMURA et al., 1987; NAKAMURA et al., 1988; RADEMAKER & DE BRUJIN, 2003). Em células eucarióticas, SSRs estão associadas com funções regulatórias. Desde que DNA repetitivos apareceram, inexplicavelmente, em abundância em genomas de células procarióticas (VOGT, 1990; NADIR et al., 1996), a identificação e a análise funcional do DNA repetitivo em

procariotos é tema de estudos experimentais. A presença de SSRs procarióticas é bem documentada, e algumas SSRs mostram polimorfismos extensos.

A identificação e classificação de bactérias são de crucial importância no ambiente, na indústria, na medicina, na microbiologia da agricultura e na ecologia microbiana. Um número de diferentes métodos genotípicos e fenotípicos estão sendo empregados para identificação e classificação microbiana (LOUWS et al., 1996). Cada um destes métodos permite um certo nível de classificação filogenética, para gênero, espécies e biovar de uma cepa. Todavia, cada método tem suas vantagens e desvantagens, em consideração a facilidade de aplicação, reprodutibilidade, requerimentos de equipamentos e nível de resolução (AKKERMANS et al., 1995).

Geralmente, métodos baseados em DNA estão surgindo como vias confiáveis, simples e acessíveis para identificar e classificar microrganismos (RADEMARKER & DE BRUIJN, 2003). De fato, a designação de gênero/espécies tem sido baseada, tradicionalmente, em métodos de hibridização DNA-DNA (WAYNE et al., 1987) e a filogenia moderna são substancialmente baseadas na análise da seqüência do 16S (WOESE, 1987). O método referido como REP-PCR, “impressão digital” do genoma, uma técnica baseada na amplificação do DNA, é tida como uma técnica extremamente confiável, reprodutível, rápida e altamente discriminatória (VERSALOVIC et al., 1994; LOUWS et al., 1996).

Esta técnica de “impressão digital” do genoma faz uso de primers de DNA complementares àqueles de ocorrência natural, altamente conservado, com seqüências repetitivas de DNA, presente em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias gram negativas e em muitas bactérias gram positivas (LUPSKI & WEINSTOCK, 1992). Três famílias de seqüências repetitivas têm sido identificadas, incluindo seqüências repetitivas extragênicas palindrômicas (repetitive extragenic palindromic sequence – REP) com 35-40bp, seqüências consenso intergênica repetitivas enterobacterianas com 124-127bp e elemento BOX com 154bp (VERSALOVIC et al., 1994). Estas seqüências parecem estar locadas em diferentes, posições intergênicas ao redor do genoma. Os elementos repetitivos podem estar presentes em ambas as orientações e primers de oligonucleotídeos têm sido desenhados para priorizar a síntese externa de DNA de repetições inversas de REP, ERIC e da subunidade boxA de BOX, na reação em cadeia do polimerase (PCR) (VERSALOVIC

et al., 1994). O uso destes primers e a PCR leva a amplificação seletiva de regiões genômicas distintas localizadas entre os elementos REP, ERIC e BOX. Os protocolos correspondentes são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR ou BOX-PCR *fingerprint* (“impressão digital”) genômico; e para o *fingerprint* genômico é chamado, de forma geral, de Rep-PCR *fingerprinting* genômico (VERSALOVIC et al., 1991; 1994). Os fragmentos amplificados podem ser visualizados em gel de agarose, produzindo um perfil referido como Rep-PCR *fingerprinting* (“impressão digital”, identidade) genômico (VERSALOVIC et al., 1994). As identidades genômicas geradas pelas técnicas de Rep-PCR permitem a diferenciação em nível de espécies, subespécies e cepa (RADEMAKER et al., 2003).

Diversos trabalhos têm relatado a composição da microbiota humana. Dentre os microrganismos Gram positivos, os *Staphylococcus* destacam-se como importante grupo, cuja presença se faz observar, sobretudo na pele e mucosas do homem estendendo-se, de forma generalizada, a animais de sangue quente (KLOOS & MUSSELWHITE, 1975; KLOSS et al., 1976; KLOOS, 1980; KLOOS & SCHLEIFER, 1986). Ainda que possa colonizar-se em diferentes regiões do organismo, existe um consenso de que os maiores reservatórios para *S. aureus* sejam as fossas nasais. A presença na mão e outras superfícies resulta de vínculo epidemiológico decorrente de disseminação a partir dos principais sítios (MUNCH-PETERSEN, 1961; WILLIAMS, 1963; MALAKI et al., 1973; CARDOSO et al., 1988, RADDI et al., 1988).

Fato a se ressaltar é a natureza ubiqüitária dos *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus*, que, a partir do homem, torna-se facilmente disseminável até aos alimentos, distribuindo-se também no ambiente e podendo ser localizados no ar, poeira e águas de esgoto e, aí, virem a constituir problemas.

Assim o portador de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, enquanto manipulador de alimentos, trabalhador de sala de ordenha, representa indiscutível elo na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar (BRYAN, 1978; BRYAN, 1980; BERGDOLL, 1989; CRUICKSHANK, 1990; IARIA et al., 1976; TRANTER, 1990).

É de conhecimento comum que animais podem desenvolver infecções estafilocócicas e, também, muitos carregam o microrganismo nas narinas e outros sítios anatômicos. Estudos a respeito da enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* estão limitados a algumas poucas espécies animais e portadores são considerados menos importantes, uma

vez que a maior causa de intoxicação alimentar é decorrente de contaminação por manipuladores (PEREIRA, 1996). Isto pode ser explicado pelo fato de que os surtos são resultantes de contaminação e crescimento do microrganismo no alimento, após este ter-se submetido a tratamento térmico, propiciando aí, com a redução ou eliminação da microbiota presente, a produção de enterotoxinas. Assim, leite e carnes cruas encontram-se freqüentemente contaminadas com *Staphylococcus*, mas estes são destruídos pelo tratamento térmico e, se porventura este é aplicado de maneira ineficaz, a própria microbiota acompanhante é na maioria das vezes capaz de impedir, como fracos competidores que são o desenvolvimento de *Staphylococcus* presentes (BERGDOLL, 1989).

### 3. Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido na Embrapa Caprinos, em Sobral-CE, na Região norte do Estado do Ceará a 66m de altitude, 3°41'10" latitude Sul e 40° 20'90" longitude Oeste com temperatura média de 29°C (IPECE, 2003), no período de agosto de 2005 a janeiro de 2006.

Para a obtenção das cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste estudo utilizou-se 15 fêmeas caprinas da raça Saanen, em início de lactação, as quais foram ordenhadas duas vezes ao dia, utilizando-se a ordenha mecânica, sendo submetidos à higienização do úbere, pré e pós-ordenha, com solução iodada. Foram coletadas 40 amostras na primeira ordenha às 7:30h, sendo estas divididas da seguinte maneira: amostras de leite (n = 15), swab das teteiras (n = 3), swabs das mãos dos ordenhadores (n = 3) e swabs dos tetos dos animais (n = 15) coletadas no início, no meio e no final da ordenha. As amostras da água utilizada para a lavagem das mãos dos ordenhadores (n = 4) foram coletadas antes do tratamento com água sanitária, e após o tratamento da água, no início, meio e final da ordenha. A coleta foi realizada utilizando técnicas assépticas e conforme protocolos padrão (NMC, 1990) e as amostras foram encaminhadas em caixa térmicas para o Laboratório de Bacteriologia da Embrapa Caprinos.

O material coletado foi semeado e as culturas que se mostraram positivas (presença de colônias características) em meios de cultura seletivos para cada bactéria em questão (ágar Baird Paker para *Staphylococcus aureus*, ágar Sangue acrescido de suplemento para *Streptococcus spp.*, ágar Mac Conkey para *Escherichia coli* e ágar Base *Pseudomonas* acrescido de suplemento CFC para *Pseudomonas aeruginosa* - OXOID®, England) (Figura 1), foram inoculadas em tubos tipo Falcon de 15 mL, em 5 mL de caldo cérebro coração (BHI) durante 18 horas a 37°C (cinco colônias identificadas como características, para cada amostra semeada) - (Figura 2), priorizando a extração do DNA da população a ser estudada.



Figura 1. Placas de Petry com meios de cultura seletivos para cada bactéria estudada: ágar Baird Parker (BP) para *Staphylococcus aureus*, ágar Mac Conkey (MC) para *Escherichia coli*, ágar sangue + suplemento para *Streptococcus spp.* e ágar Pseudomonas + suplemento (PS) para *Pseudomonas aeruginosa*.

Todas as cepas foram testadas para morfologia através do teste de Gram e bioquimicamente para função através do kit comercial API Staph, API Strep, API 20NE e API 20E (bioMérieux®) Figura 2.



Figura 2. Sistema de identificação de gêneros e espécies bacterianas api bioMérieux (bioMérieux Vitec, Inc. USA).

Para extração de DNA das cepas bacterianas utilizou-se o protocolo proposto por CHAPAVAL et al.(2006c), onde uma quantidade de 2,5 ml de cultura da população bacteriana (para cada amostra semeada foram escolhidas 10 colônias típicas, como já descrito no item anterior) crescida em meio BHI por 18 horas a 37°C foram precipitados em tubos de microcentrifuga com 1,7 ml através de um pulso de centrifugação a 14.000 rpm. O sobrenadante foi eliminado e este processo foi repetido até que todo o volume (2,5 ml) fosse precipitado. Ao pellet obtido foram adicionados 700µl de tampão de extração (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20mM EDTA, pH8,0; PVP-40 1%; CTAB 2%; Proteinase K, 20mg/ml; β-Mercaptoetanol 0,2%). A solução foi misturada em vórtex e incubada por 30 minutos a 65°C em banho-maria, sendo misturada gentilmente a cada 10 minutos. Foram acrescentados 650 µl de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1), a solução foi homogeneizada até formar uma emulsão e centrifugada a 14.000 rpm durante 7 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionados 200µl de tampão de extração sem Proteinase K, homogeneizado, e adicionados então 650 µl de clorofórmio:álcool-ísoamílico (24:1), homogeneizada novamente e centrifugada a 14.000 rpm por 7 minutos. O processo com 650 µl de clorofórmio:álcool-ísoamílico (24:1) foi repetido por mais duas vezes até que a fase aquosa adquirisse aparência translúcida. O DNA foi precipitado com 1 volume de Isopropanol conservado em temperatura ambiente, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm durante 7 minutos. O sobrenadante foi então removido e a superfície do precipitado foi lavada por duas vezes com 70 µl de Etanol 70%, preparado um pouco antes do uso. A cada lavagem o precipitado foi centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm. Em seguida o pellet foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspenso em 40 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0 + 10 µg/ml de RNase) e deixado em banho-maria à 37°C por 30 minutos.

A síntese de oligonucleotídeos foi elaborada pela Bio Global Com. Ltda., Curitiba, Paraná, Brasil. As seqüências utilizadas foram as seguintes REP-PCR (REP – 1: 5' NNN NCG NCG NAC TCC NGG C 3' ; REP – 2: 5' NCG NCT TAT CNG GCC TAC TAC 3'e ERIC – 1: 5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C ERIC 3` – 2: 5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC C 3` e BOX (BOX – 3':5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G) descritas por DE BRUIJIN (1992).

Sequencialmente o PCR (Reação em cadeia de polimerase) foi realizado com 25 µl do volume total incluindo 5 µl do DNA alvo (20 a 90 ng/µl). Os componentes do master mix (GIBCO BRL - Life Technologies, Inc., MD, U.S.A.) foram utilizados conforme as instruções do fabricante. Os DNA alvo (máximo de 5 µl) foram amplificados em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Perkim Elmer) com os seguintes ciclos: para REP, desnaturação inicial 95°C por 6 minutos seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 40°C por 1 minuto, polimerização a 65°C por 8 minutos), terminando com a polimerização final a 65°C por 7 minutos; para ERIC desnaturação inicial 95°C por 7 minutos seguida por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto, polimerização a 65°C por 8 minutos), terminando com a polimerização final a 65°C por 7 minutos. Para o elemento BOX, desnaturação inicial 95°C por 6 minutos seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto, polimerização a 65°C por 8 minutos), terminando com a polimerização final a 65°C por 7 minutos

Com o intuito de realizar detecção dos produtos de PCR, 8µl do produto amplificado pela reação de PCR e observado através da eletroforese em gel de agarose 2% (GIBCO BRL - Life Technologies, Inc., MD, U.S.A.) em TAE 1x (para 50 X, 242 g Tris; 37,2 g EDTA [Na<sub>2</sub>], 800 ml de água MilliQ autoclavada, 57% de ácido acético, pH 8,1) e um padrão molecular 1kb DNA (GIBCO BRL - Life Technologies, Inc., MD, U.S.A.) foi usado como marcador molecular. A eletroforese foi realizada em cuba eletroforética Pharmacia Biotech (max submarine unit HE 99 X), com fonte Pharmacia Biotech (EPS 300) nas condições de 70 V por 2 horas.

A análise das similaridades entre as cepas foi baseada na presença ou ausência de bandas específicas na análise da reação de PCR, onde diferenças e similaridades entre as cepas foram analisadas visualmente de acordo com o comportamento de migração das bandas dos produtos da reação de PCR. Os perfis das 11 primeiras bandas foram considerados altamente similares quando todas as bandas visíveis dos isolados possuíam a mesma distância aparente de migração. Quando não houve possibilidade de comparação entre migração de bandas semelhantes, os isolados foram considerados diferentes. Uma

matriz de similaridade foi obtida através de comparações usando um coeficiente simples de similaridade (coeficiente de Jaccard). Para esta análise o programa utilizado foi o NTSYS – Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versão NTSYSpc 2.0. Um dendograma foi construído através da obtenção das médias aritméticas de grupos em pares de dados combinados (UP-GMA).

Após a análise computacional dos dados de similaridade genética, o estudo da filogenia foi realizado. Organismos considerados geneticamente iguais, ou semelhantes, foram considerados clones epidemiológicos e, portanto de mesma ancestralidade e origem.

#### **4. Resultados e Discussão**

Os géis de agarose obtidos para as análises da similaridade genética estão representados pela Figuras 3, 5, 7, 9 onde, observa-se os produtos da tipagem obtidos

através do uso da técnica de REP-PCR com primers REP para os isolados de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, e primers ERIC para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. O primer referente ao elemento BOX foi testado, porém não reproduziu um comportamento de bandas satisfatório para a análise de similaridade neste estudo. Em geral, os modelos das bandas dos isolados das diferentes fontes (leite, teto, teteira, mão do ordenhador e água) foram similares, para algumas bactérias em questão, inferindo que os isolados são estreitamente relacionados. Foram similares, porém nem sempre idênticos.

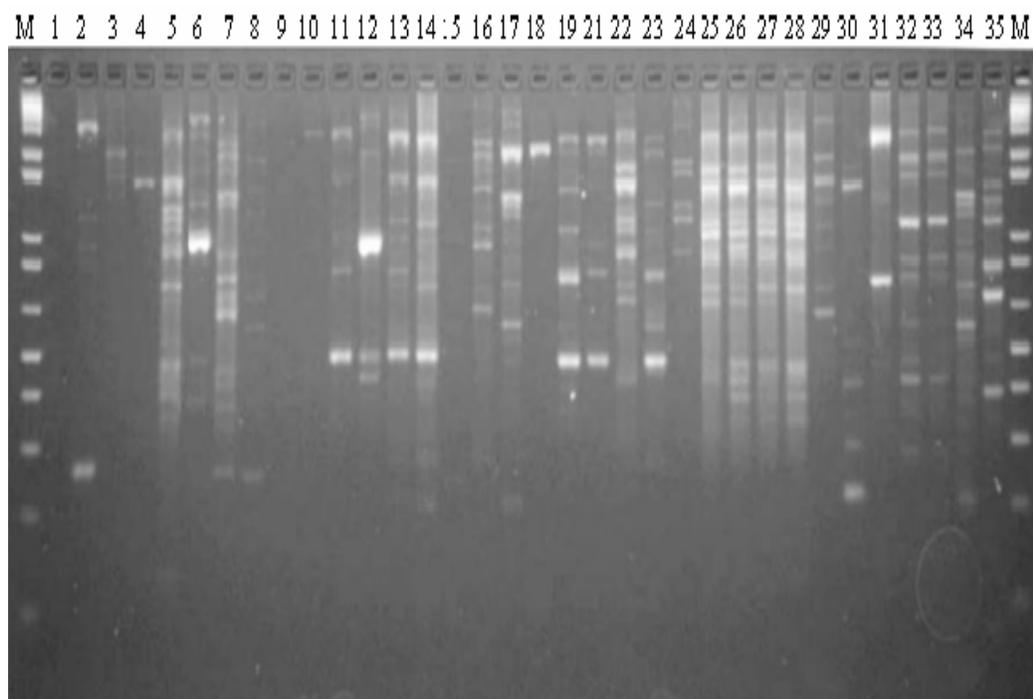


Figura 3. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de *Staphylococcus aureus* e M = marcador molecular (1 Kb).

O comportamento das bandas maiores que 300pb até 10.000pb obtidas através do uso de primer REP da Figura 3 para *Staphylococcus aureus* demonstrou similaridade em aproximadamente um quarto das bandas que foram comuns a 80% dos isolados, podendo diferenciar as cepas dentro de cinco agrupamentos (*clusters*) distintos Tabela 1 de acordo com o dendograma gerado (Figura 4).

Tabela 1. Amostras de *Staphylococcus aureus*, fonte, período de coleta e agrupamentos (cluster) correspondentes.

Amostra	Fonte	Período	Agrupamento (cluster)
R1	MÃO	INÍCIO	
R21	TETO	FINAL	
R24	LEITE	INÍCIO	
R27	LEITE	MEIO	1
R25	LEITE	INÍCIO	
R26	LEITE	INÍCIO	
R29	LEITE	MEIO	
R28	LEITE	MEIO	
R12	TETO	MEIO	2
R30	LEITE	FINAL	
R2	MÃO	MEIO	
R15	TETO	MEIO	
R23	LEITE	INÍCIO	
R3	MÃO	FINAL	
R9	TETO	INÍCIO	3
R31	LEITE	FINAL	
R32	LEITE	FINAL	
R8	TETO	INÍCIO	
R33	LEITE	FINAL	
R6	TETEIRA	FINAL	
R10	TETO	INÍCIO	
R18	TETO	FINAL	4
R4	TETEIRA	INÍCIO	
R5	TETEIRA	MEIO	
R11	TETO	INÍCIO	
R7	TETO	INÍCIO	
R20	TETO	FINAL	5
R13	TETO	MEIO	
R14	TETO	MEIO	
R16	TETO	MEIO	

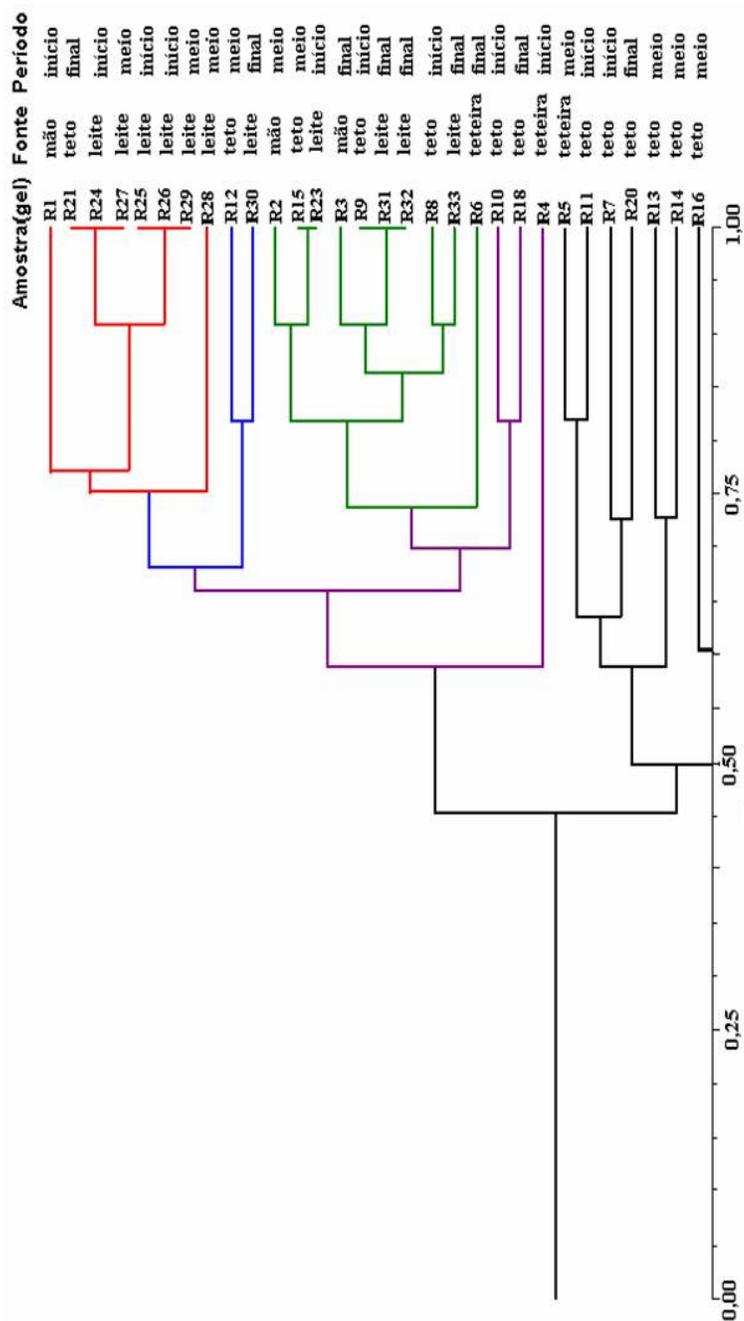


Figura 4. Dendrograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus aureus*. Os números do eixo *x* indicam o Coeficiente de Jaccard.

Verificou-se no *cluster* 1, similaridades que variavam entre 75 e 100%. A amostra R1 que corresponde mão ordenhador no início do procedimento de ordenha mostrou-se, em aproximadamente 80% similar às amostras R21 (teto final), R24 (leite início) e R27 (leite

meio) que por sua vez são idênticas entre si (100% de similaridade) e 90% similares às amostras R25 (leite início), R26 (leite início) e R29 (leite meio), também 100% similares entre si. Nesta situação, observou-se a presença de vários clones (100% de similaridade) e pode-se inferir através da similaridade genética, que provavelmente o leite inicialmente contaminado passa para mão do ordenhador, e o mesmo torna-se fonte de contaminação para as amostras presentes no mesmo *cluster*.

Verificou-se no *cluster 2*, similaridade de aproximadamente 85% entre as amostras de swab de teto coletada no meio da ordenha (R12) e amostra de leite coletada no final da ordenha (R30).

No *cluster 3*, observou-se similaridades entre as amostras que variaram de 75 a 100%, a amostra R2 (swab da mão do ordenhador coletado no meio da ordenha) possui similaridade de aproximadamente 95% para com as amostras R15 (teto do meio) e R23 (leite do início da ordenha), que por sua vez são 100% similares entre si. Ainda no *cluster 3*, as amostras R9 (swab do teto do início), R31 e R32 (amostras de leite do final da ordenha, respectivamente) que se mostraram 100% similares entre si, indicando contaminação no momento inicial da ordenha sendo transmitida até o final da mesma, conforme situação relatada anteriormente no *cluster 1*. Com relação as amostras R8 (swab de teto coletadas no início da ordenha e R33 (de leite coletada no final da ordenha) o índice de similaridade foi de aproximadamente 90%.

Observou-se no *cluster 4*, que as amostras R10 (swab de tetos do início da ordenha) e R18 (swab de tetos final da ordenha) , possuem aproximadamente 85% de similaridade entre si. No entanto, o *cluster 5* da Tabela 1, apresentou um índice de similaridade variando entre 60 e 75%, onde o mesmo reúne amostras de tetos do início, meio e final da ordenha e uma amostra de swab da teteira. Com exceção do *cluster 5*, os demais *clusters* não demonstraram grandes variações nos índices de similaridade .

Os índices de similaridade observados neste estudo podem ser justificados pelo fato de que o *Staphylococcus aureus* têm sido apontado como bactéria contagiosa, ou seja, que pode ser transmitida durante as ordenhas e que fossas nasais, garganta, equipamento de ordenha (principalmente teteiras), pele dos tetos e humana são considerados importantes reservatórios destes organismos.

Segundo Wieser & Busse (2000), a REP-PCR é uma excelente ferramenta para a rápida identificação de cepas de *Staphylococcus epidermidis*, em nível de espécie; concordando com os relatos de Struelens, 1998; Van Der Zee et al., 1999; Niedbach, 2000 e Nascimento et al., 2005 que afirmaram que esta técnica gera perfis moleculares com alto grau de similaridade e alta resolução e que podem ser obtidos em torno de 48 horas a partir de isolados de cultura microbiológica. Portanto verificamos que os resultados encontrados no presente estudo estão coerentes com os relatados na literatura.

Nascimento et al. (2005), em um estudo com 21 isolados de *S. aureus* produtores de bacteriocinas provenientes de diferentes fontes (alimentos, pacientes, gado saudáveis e animais envolvidos em casos de mastite bovina), reportaram o uso da técnica de REP-PCR para a localização de cepas transmissoras (verticais) de plasmídeos codificadores de bacteriocinas. Van Der Zee et al. (1999) concluíram que a genotipagem através e REP-PCR pode ser um método fácil e rápido para monitorar infecções de *S. aureus* devido ao seu alto poder de resolução e de fácil execução, sendo, portanto uma técnica rápida de diagnóstico, gerando alta reprodutibilidade e comportamentos discriminatórios. A técnica mostrou-se reprodutível, gerando comportamentos discriminatórios de alta qualidade, tipabilidade e estabilidade para que em tempo hábil, falhas no manejo sejam detectadas e corrigidas.

Segundo Struelens (1996) e Maslow & Mulligan (1996) a análise de similaridade molecular contribuem para vigilância epidemiológica uma vez que é possível a documentação dos clones epidêmicos através do tempo e, a circulação destes em populações infectadas. Del Vecchio et al. (1995), utilizaram à técnica de REP-PCR para identificar cepas epidêmicas entre isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA), afirmando ser de crucial importância o desenvolvimento de metodologias de tipagem moleculares rápidas e precisas, na identificação da fonte de contaminação e disseminação de doenças infecciosas. Reafirmando assim, a importância de estudos como este.

O comportamento das bandas entre 300pb e 10.000bp obtidas através do uso do primer REP da Figura 5 para *Streptococcus spp.* demonstrou similaridade entre 85% dos isolados diferenciando-se as cepas dentro de cinco clusters distintos conforme Tabela 2 e dendograma gerado na Figura 6.

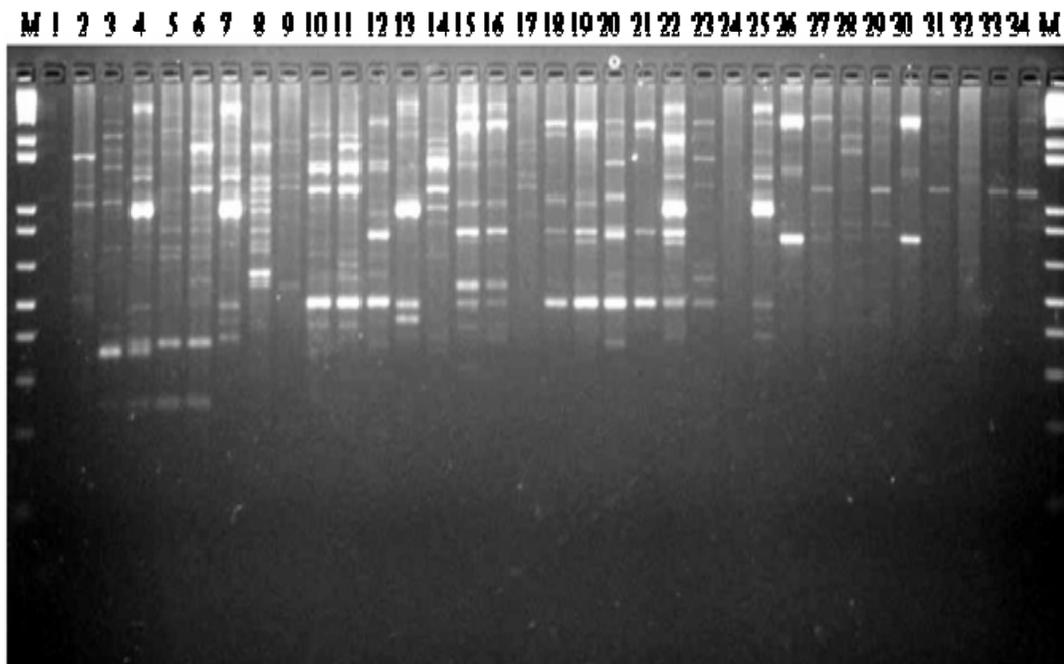


Figura 5. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de *Streptococcus spp.* e M = marcador molecular (1 Kb).

No *cluster 1*, a amostra R1 (água sem tratamento) utilizada para a lavagem das mãos do ordenhador mostrou-se aproximadamente 90% similar as amostras R8 (swab de teto) e R23 (leite do início da ordenha respectivamente) que por sua vez demonstraram similaridade de 85% com a amostra R16 (swab de teto coletada no meio da ordenha). Pode-se inferir, neste caso, que água (sem tratamento) utilizada para a lavagem das mãos do ordenhador no início da ordenha foi possivelmente a fonte de contaminação para as demais amostras deste *cluster*. Sendo por tanto necessário rever a idoneidade da procedência dessa variável.

No *cluster 2*, as amostras R3 (swab teteira meio de ordenha), R22 (swab teto final de ordenha), são 100% similares e com a amostra R4 (teteira final de ordenha) podem ser indicadas como fontes de contaminação ao longo do processo. As amostras R26 (leite início de ordenha), R31, R32 e R33 (leite final de ordenha respectivamente), R28 (leite meio de

Tabela 2. Amostras de *Streptococcus spp.*, fonte, período de coleta e agrupamentos (cluster) correspondentes.

Amostra	Fonte	Período	Agrupamento (cluster)
R1	ÁGUA	INÍCIO	1
R8	TETO	INÍCIO	
R23	LEITE	INÍCIO	
R16	TETO	MEIO	
R3	TETEIRA	MEIO	2
R22	TETO	FINAL	
R30	LEITE	MEIO	
R19	TETO	FINAL	
R26	LEITE	INÍCIO	
R33	LEITE	FINAL	
R31	LEITE	FINAL	
R32	LEITE	FINAL	
R28	LEITE	MEIO	
R27	LEITE	INÍCIO	
R7	MÃO	FINAL	
R25	LEITE	INÍCIO	
R29	LEITE	MEIO	
R4	TETEIRA	FINAL	
R2	TETEIRA	INÍCIO	3
R24	LEITE	INÍCIO	
R12	TETO	INÍCIO	
R13	TETO	MEIO	4
R6	MÃO	MEIO	
R11	TETO	INÍCIO	
R17	TETO	MEIO	
R18	TETO	FINAL	5
R10	TETO	INÍCIO	
R14	TETO	MEIO	
R15	TETO	MEIO	
R5	MÃO	INÍCIO	

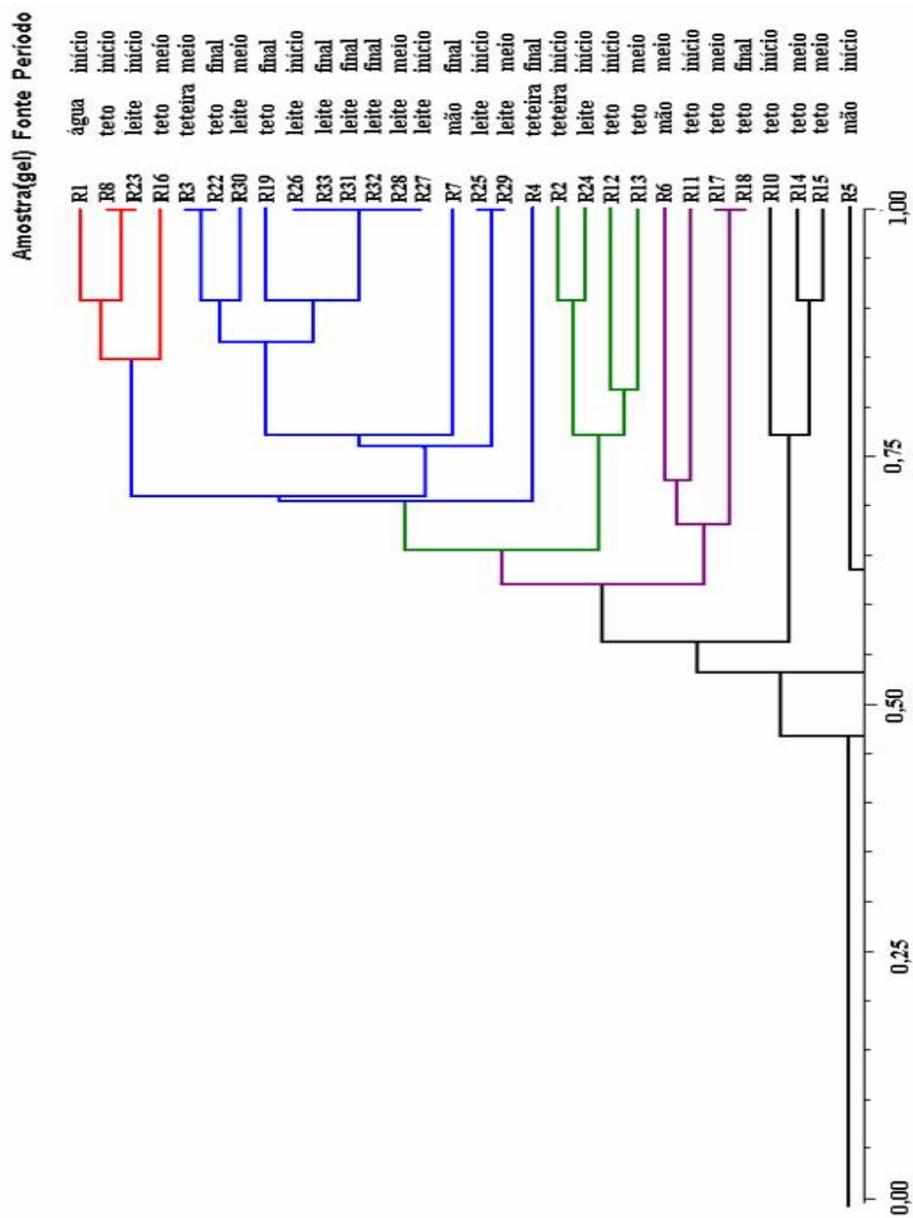


Figura 6. Dendrograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Streptococcus spp.* Os números do eixo  $x$  indicam o Coeficiente de Jaccard.

ordenha), R27 (leite início de ordenha), R25 (leite início) e R29 (leite meio de ordenha), também mostraram-se 100% similares.

Observou-se no *cluster* 3 que as amostras R2 (teteira início de ordenha), R24 leite início de ordenha), R12 e R13 (swab de tetos início e meio de ordenha respectivamente) apresentaram similaridades variando entre aproximadamente 80 e 95%.

Verificou-se no *cluster* 4 que as amostras R17 e R18 (swab teto início e final de ordenha, respectivamente) são 100% similares entre si.

Com relação ao *cluster* 5 composto pelas R10, R14, R15 (swab teto início, meio e final de ordenha) e R5 (swab das mãos do ordenhador) a similaridade variou de aproximadamente 60 a 95%. Diante dos resultados obtidos foi possível verificar caráter de transmissibilidade nos presentes clusters.

Métodos tais como REP-PCR tem sido testados e a habilidade deste método para diferenciar cepas de *Streptococcus* vêm sendo investigados (RAJASBEKARA et al., 1998; VAN BELKUN et al., 1996; VERSALOVIC et al., 1991).

Al-Ghamdi et al. (2000) revelaram, através de REP-PCR, que isolados de *Streptococcus equi* com mesma fonte geográfica não possuíam um mesmo sub-tipo, na ocasião somente um clone epidemiológico foi encontrado durante o surto da doença. Relatos como esses reforçam a importância da eficiência da técnica para estudos com bactérias do gênero *Streptococcus ssp.*

No estudo de Alam et al., (1999) foi verificado que métodos que não utilizam à reação de PCR são demorados e demandam técnicos com treinamento, especialmente no que diz respeito à análise de polimorfismos através de restrição de fragmentos que resultam em perfis de fragmentos de DNA de difícil interpretação com um grande número de bandas.

Com relação ao comportamento das bandas geradas a partir do uso do primer ERIC teve abrangência de bandas entre 200pb e, aproximadamente, 6.000pb. Estes primers foram utilizados para tipagem de *Escherichia coli*.

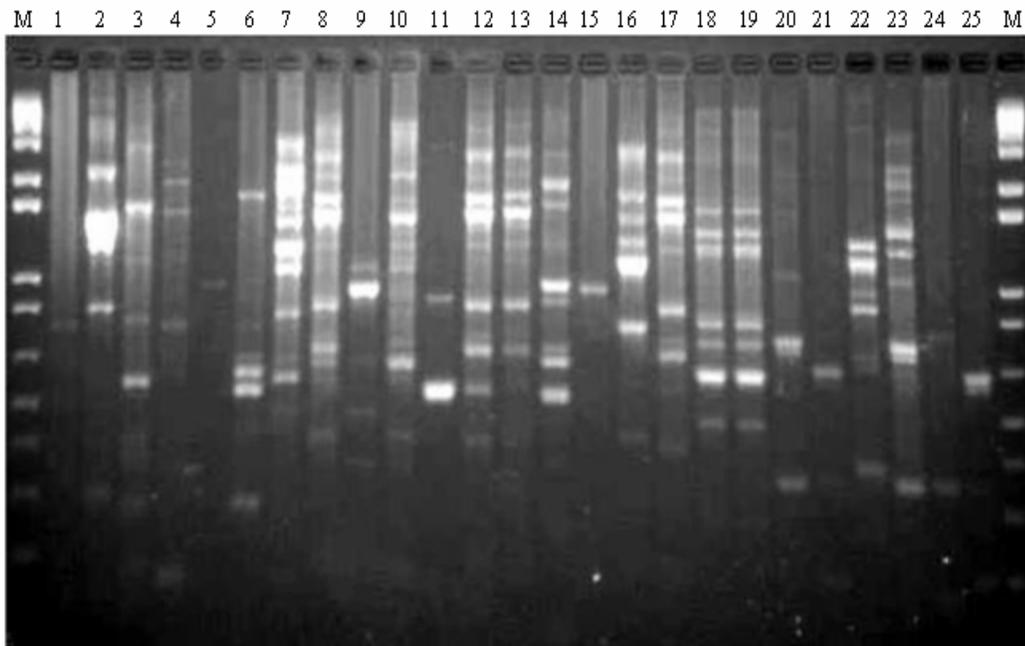


Figura 7. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de *Escherichia coli* e M = marcador molecular (1 Kb).

Na tipagem de *Escherichia coli*, foi obtida uma similaridade em torno de 75% para a maioria dos isolados Figura 7, gerando 5 grupos Tabela 3, representado pelo dendograma na Figura 8.

A amostra R1 (água para a lavagem das mãos dos ordenhadores, sem tratamento) aparece com similaridade de aproximadamente 85% em relação à amostra R7 (swab de teteira coletada no meio da ordenha) que por sua vez demonstra similaridade de aproximadamente 75% em relação à amostra R16 (swab de teto coletada no final da ordenha). Neste *cluster* temos exemplo de transmissibilidade vertical bem típico, reunindo uma amostra inicial (R1) e clones epidemiológicos desta amostra no meio e final da ordenha.

Verificou-se no *cluster 2* que as amostras R11 (swab de teto do início da ordenha) e R12 (swab de teto do meio da ordenha), demonstram similaridade de 100%, sendo que a amostra R6 (swab de teteira coletada no início da ordenha) mostra similaridade de aproximadamente 95% em relação a estas amostras.

Tabela 3. Amostras de *Escherichia coli*, fonte, período de coleta e agrupamentos (cluster) correspondentes.

Amostra	Fonte	Período	Agrupamento (cluster)
R1	ÁGUA	INÍCIO	1
R7	TETEIRA	MEIO	
R16	TETO	FINAL	
R6	TETEIRA	INÍCIO	2
R11	TETO	INÍCIO	
R12	TETO	MEIO	
R15	TETO	MEIO	
R22	LEITE	MEIO	
R9	TETO	INÍCIO	
R2	ÁGUA	FINAL	3
R3	MÃO	INÍCIO	
R4	MÃO	INÍCIO	
R19	LEITE	INÍCIO	
R23	LEITE	FINAL	
R8	TETEIRA	FINAL	
R14	TETO	MEIO	
R20	LEITE	MEIO	
R24	LEITE	FINAL	
R10	TETO	INÍCIO	
R17	TETO	FINAL	
R18	TETO	FINAL	4
R21	LEITE	MEIO	5
R5	MÃO	FINAL	
R13	TETO	MEIO	

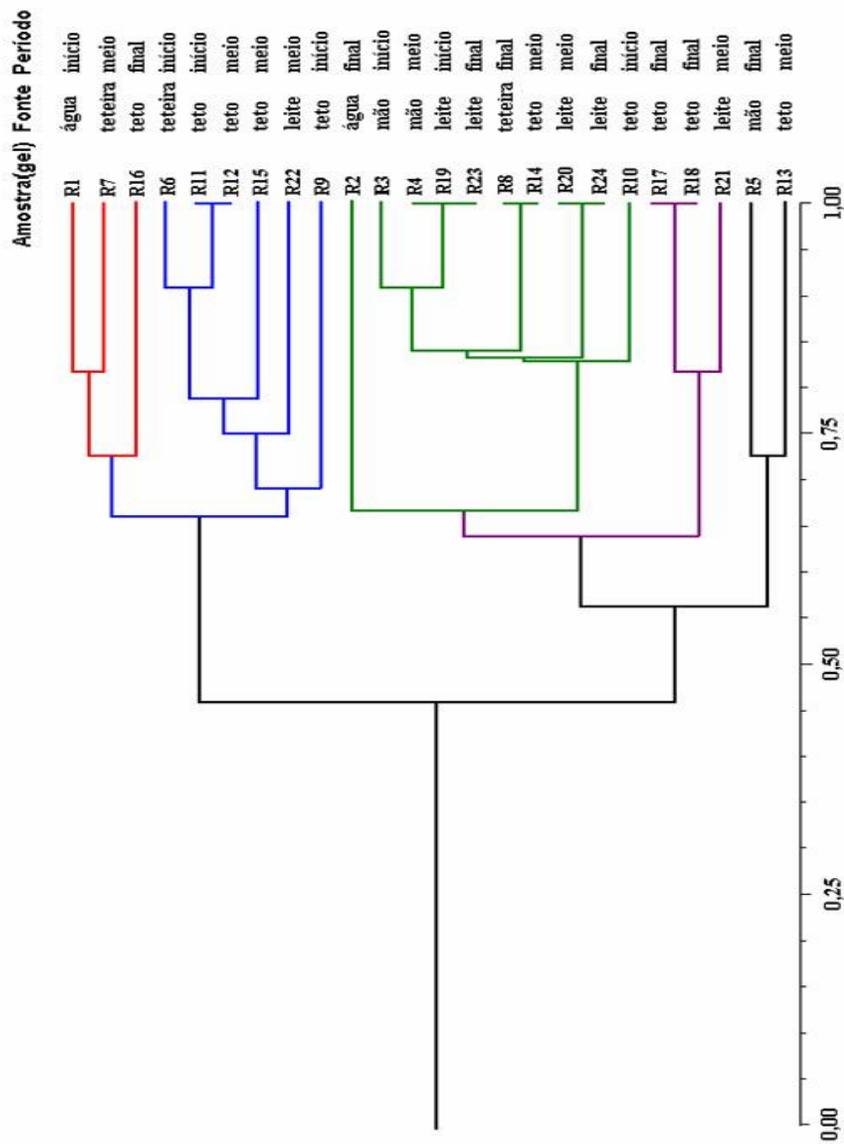


Figura 8. Dendrograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Escherichia coli*. Os números do eixo  $x$  indicam o Coeficiente de Jaccard.

Observou-se no *cluster 3* que a amostra R3, (swab da mão do ordenhador coletada no início da ordenha) demonstra similaridade em torno de aproximadamente 95% em

relação às amostras R4 (swab da mão do meio), R19 e R23 (leite do início e leite do final da ordenha coletadas respectivamente) 100% similares. Ainda no *cluster* 3 temos 100% de similaridade entre as amostras R8 (swab de teteira coletado no final da ordenha) e R14 (swab de teto coletado no meio da ordenha). Estas amostras foram aproximadamente 85% similares às amostras R3 (swab mão início de ordenha), R4 (swab mão meio de ordenha), R19 (leite meio de ordenha) e R23 (leite final de ordenha) R20 (leite meio de ordenha) e R24 (leite final de ordenha) também 100% similares entre si. A amostra R10 (swab de teto coletado no início da ordenha) se mostrou cerca de 80% similar em relação a todas as amostras do cluster 3 citadas anteriormente.

O aparecimento de *E. coli* no leite normalmente é observada em períodos de secagem de animais e de parição. A contaminação do leite por *Escherichia coli* resulta do aparecimento desta bactéria no rebanho, oriunda de tratamentos de secagem dos animais ineficientes, animais em ambiente sujo durante o período seco, parição em local não adequado (sujo) e a não ordenha do animal logo após a parição. Porém essas situações não foram observadas neste estudo, logo podemos inferir que a presença de *Escherichia coli* nas amostras de leite teve possivelmente origem na água sem tratamento utilizada para lavar as mãos do ordenhador e o equipamento teteira.

Kagkli et al. (2006) ao analisarem as relações de similaridade, através das técnicas de PFGE e REP-PCR, de 156 *Enterococcus* e 362 *Lactobacillus* isolados de fezes bovinas, tetos de vacas, leite cru, equipamento de ordenha e ambiente de ordenha de uma fazenda, relataram que a maior fonte de contaminação destas bactérias foi o equipamento de ordenha.

O *cluster* 4 composto pelas amostras R17 e R18 (swab tetos final de ordenha), R21 (leite meio de ordenha) e o *cluster* 5 composto pelas amostras R5 (swab mão final de ordenha), R13 (swab teto meio de ordenha) demonstram também caráter de transmissibilidade entre os clones epidemiológicos.

No presente estudo a técnica de REP-PCR demonstrou ser reprodutível, gerando comportamentos discriminatórios de alta qualidade, tipabilidade e estabilidade. Porém Costa et al., (2006) verificaram em seus estudos a ineficiência na discriminação dos isolados de *Escherichia coli*.

Dombek et al., (2000), Guan et al., (2002) e Parveen et al., (1999) relataram que métodos de impressão digital do DNA (*fingerprint*) e perfis de resistência a antibióticos (WIGGINS, 1996; HARWOOD et al., 2000) tem sido reportados como os métodos mais consistentes para caracterizar isolados de *Escherichia coli* fecal no que diz respeito à fonte destas bactérias. Exemplos de procedimentos baseados em DNA considerados promissores para rastreamento de fontes bacterianas incluem a eletroforese de campo pulsado (pulse-field gel electrophoresis – PFGE) (KARIUKI et al., 1999), ribotipagem (CARSON, et al., 2001; PARVEEN et al., 1999; REGNAULT et al., 1997), heterogeneidade de DNA ribossomal (BERNHARD et al., 2000) e PCR de seqüências palindrômicas extragênicas (REP-PCR) (DOMBEK et al., 2000), sendo essa última utilizada no presente estudo.

Gelsomino et al. (2001) isolaram *Enterococcus* durante os processos de fabricação e maturação de queijo tipo Cheddar, do leite usado para fabricação deste queijo, das fezes dos indivíduos envolvidos no processo de fabricação e das fezes das vacas leiteiras presentes na fazenda. Em adição, foram isoladas cepas do ambiente e do equipamento de ordenha e dos tetos dos animais. Neste estudo utilizou-se a identificação das espécies através da técnica de amplificação aleatória de DNA polimórfico (random amplified polymorphic DNA – RAPD), porém esta técnica não foi sensível suficiente para relatar clones entre as cepas estudadas.

Gelsomino et al. (2001) utilizaram a técnica de PFGE para determinar as origens de *Enterococcus* no queijo tipo Cheddar comparando cepas isoladas do leite cru com amostras isoladas de fezes humanas, do equipamento de ordenha e do ambiente. Os autores relataram, através da análise de clones, que a contaminação humana poderia ser considerada como possível fonte de *Enterococcus* no queijo. Neste estudo, o leite teria sido infectado através de bactérias que sobrevivem em cantos do equipamento de ordenha de difícil acesso para limpeza.

O comportamento das bandas geradas a partir do uso do primer ERIC teve abrangência de bandas entre 200pb e, aproximadamente, 6.000pb. Estes primers foram utilizados para tipagem de *Pseudomonas aeruginosa* e são mostrados na Figura 9.

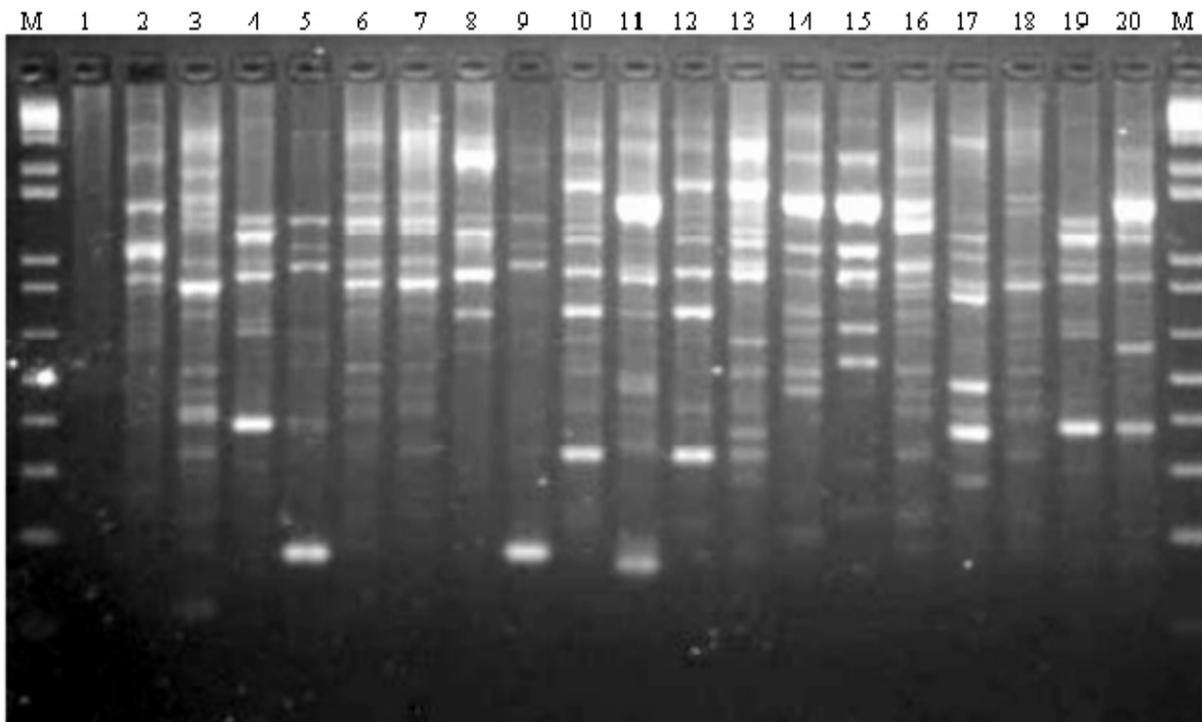


Figura 9. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e M = marcador molecular (1 Kb).

No gel obtido para *Pseudomonas aeruginosa* a similaridade alcançada foi de aproximadamente 65% entre os isolados, diferenciando as cepas em 3 grupos distintos Tabela 4 e gerando o dendograma representando pela Figura 10.

Verificou-se no *cluster 1* similaridade de aproximadamente 85% da amostra R1 (água sem tratamento) utilizada para lavar as mãos do ordenhador, em relação as amostras R7 e R14 (swab de teteira e teto final de ordenha). As amostras de R13 (swab de teto do meio do procedimento de ordenha) e R10 (swab de teto início do procedimento de ordenha) mostraram similaridade de aproximadamente 65 e 80%, respectivamente.

Observou-se no *cluster 2* similaridade de 100% entre R5 e R6 (swab teteira de início e meio da ordenha, respectivamente) e R9 e R11 (teto do início e meio da ordenha, respectivamente). O índice de similaridade da amostra R2 (swab de mão coletada no início da ordenha) em relação à amostra R15 (swab de teto coletada no final da ordenha) foi de aproximadamente 85%. Assim, estas amostras demonstram similaridade de aproximadamente 75% em relação a amostra R17 (leite coletada no início da ordenha).

Tabela 4. Amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, fonte, período de coleta e agrupamentos (cluster) correspondentes.

Amostra	Fonte	Período	Agrupamento (cluster)
R1	ÁGUA	INÍCIO	
R7	TETEIRA	FINAL	
R14	TETO	FINAL	1
R13	TETO	MEIO	
R10	TETO	INÍCIO	
R2	MÃO	INÍCIO	
R15	TETO	FINAL	
R17	LEITE	INÍCIO	
R5	TETEIRA	INÍCIO	2
R6	TETEIRA	MEIO	
R9	TETO	INÍCIO	
R11	TETO	MEIO	
R3	MÃO	MEIO	
R4	MÃO	FINAL	
R8	TETO	INÍCIO	
R16	TETO	FINAL	3
R18	LEITE	MEIO	
R19	LEITE	FINAL	
R12	TETO	MEIO	



Com relação ao *cluster* 3, (R3,R4, R8, R16, R18, R19, R12) esse reuniu amostras com similaridades variando entre 50 e 95%. Mostra, porém caráter de transmissibilidade uma vez que possui amostras de meio, final e início da ordenha relacionadas entre si.

Segundo Olive (1999), a tipagem de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por métodos tradicionais fenotípicos é uma parte importante da sobrevivência epidemiológica, porém deve existir poder discriminatório e estabilidade na metodologia usada. Técnicas moleculares oferecem uma melhoria considerável e podem complementar dados fenotípicos para obtenção de melhor entendimento sobre diversidade bacteriana.

A técnica de eletrofose de campo pulsado (PFGE) é comumente empregada e tem sido reconhecidamente difundida como “método de eleição” para tipagem de DNA de *P. aeruginosa* (DOUGLAS et al., 2001; BERTRAND et al., 2001; BREITENSTEIN et al., 1997; GRUNDMANN et al., 1995; SPENCKER et al., 2000). Todavia, Olive (1999), relatou que este é um método limitado pela complexidade da técnica e turnos de trabalho longos para obtenção de resultados. Assim a REP-PCR tem se mostrado uma ferramenta potencial para a tipagem de DNA em laboratório (LAU et al., 1995, OLIVE, 1999).

Para a minimização da contaminação do leite em sala de ordenha e com base nos resultados obtidos, sugere-se para aplicação de programa de Boas Práticas Agropecuárias na sala de ordenha e para o ambiente estudado que corra o tratamento de toda e qualquer água utilizada em sala de ordenha (limpeza de equipamentos, mãos de ordenhadores, lavagem de tetos etc.), limpeza e sanificação adequadas da sala de ordenha e da ordenhadeira, adoção de linha de ordenha, exame dos primeiros jatos de leite (caneca telada ou de fundo escuro), lavagem dos tetos (uso mínimo de água com baixa pressão), desinfecção dos tetos antes da ordenha, secagem dos tetos com papel toalha descartável e desinfecção dos tetos após a ordenha.

## **5. Conclusões**

A água ainda sem tratamento, utilizada para a lavagem das mãos dos ordenhadores, caracterizou-se um ponto crítico de controle (PCC), pois aparece como iniciador de contaminação nas amostras de *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outro PCC seria as mãos do ordenhador, pois nas amostras de *Staphylococcus aureus* aparece como indicador de contaminação.

A técnica de REP-PCR também aparece como uma ferramenta útil na produção animal para a rápida identificação de pontos de contaminação bacteriana horizontal durante o manejo de ordenha, permitindo a reavaliação de procedimentos de higienização de equipamentos, higiene pessoal do trabalhador da sala de ordenha bem como da rotina de limpeza de tetos e eficácia dos desinfetantes utilizados para que em tempo hábil, falhas no manejo sejam detectadas e corrigidas.

## **6. Referências bibliográficas**

AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; de BRUIJN, F. J. **Molecular Ecology Manual**. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands, p. 1-488, 1995.

ALAM, S., S. R. BRAILSFORD, R. A. WHILEY, AND D. BEIGHTON. PCR-based methods for genotyping viridans group streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 2772-2776, 1999.

AL-GHAMDI, G. M.; KAPUR, V.; AMES, T. R.; TIMONEY, J. F.; LOVE, D. N.; MELLENCAMP, M. A. Use of repetitive sequence-based polymerase chain reaction for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus equi* subspecies *equi*. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.6, p. 699-705. 2000.

ALMEIDA, C. R. O sistema HACCP como instrumento para garantir a inocuidade dos alimentos. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF\\_HACCP.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_HACCP.htm)>. Acesso em 26 jul.2004.

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e coliformes fecais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n.111. p. 79-85. Ago. 2003.

ALVES, F.S. F.; COX, M. Aspectos sanitários na ovinocaprinocultura. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1. Fortaleza: SNPA, 06 a 11 de dezembro 1998, Anais... p.15-29.

BAGLEY, C. V. Mastitis Prevention Program. Eletronic Publishing. Utah State University Extension. 1997.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, 1989. p.463-523.

BERNHARD, A. E.; FIELD, K. G. A PCR assay to discriminate human and animal feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p.:4571-4574, 2000.

BERTRAND, X.; THOUVEREZ, M.; TALON, D.;BOILLOT, A.; CAPELLIER, G.; FLORIOT, C.; HELIAS, J. P. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. **Intensive Care Medicine**. v. 27, p.1263–1268,2001.

BREITENSTEIN, S.; WALTER, S.; BOSSHAMMER, J.; ROMLING, U.; TUMMLER, B. Direct sputum analysis of *Pseudomonas aeruginosa* macrorestriction fragment genotypes in patients with cystic fibrosis. **Medical Microbiology Immunology** (Berl) v. 186, p. 93–99, 1997.

BRASIL – Ministério da Saúde/Secretaria de Políticas da Saúde/Departamento de Formulações de Políticas De Saúde. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília, 47 p. 2000.

BRYAN, F. L. Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. **Journal of Food Protection**. Local de publicação, v.41, p.816-827, 1978.

BRYAN, F. L. Foodborne disasesin the United State associate with meat and poultry. **Journal of Food Protection**. Lugar de publicação, v. 43, p. 140-150, 1980.

CARDOSO, H. F. T.; SILVA, N.; SENA, M. J.; CARMO, L. S. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. v. 29, p. 347-349. 1999.

CARSON, C. A.; SHEAR, B. L.; ELLERSIECK, M. R.; ASFAW, A. Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p.1503-1507, 2001.

CHAPAVAL, L. Qualidade do leite. In: SANTANA, A. M. O. de (Org.). **Manual do produtor de cabras leiteiras**. Viçosa, MG: editora Aprenda fácil, 2006a. Cap. 7 , P. 157-212.

\_\_\_\_\_ ALVES, F. S. F. Boas Práticas de produção de leite de cabra na agricultura familiar. In: NASCIMENTO NETO, F. do (Org.). **Recomendações básicas para a aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006b. Cap. 10. p.183-193.

\_\_\_\_\_ MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. Aplicação da técnica de Rep-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha para o monitoramento da qualidade do leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 43, n. 3, p.309-320, 2006c.

\_\_\_\_\_ PIEKARSKI, P. R. Tecnologia dos produtos de origem animal e qualidade do leite. In: ASSIS VIEIRA, E. de (Org.). **Leite de qualidade: manejos reprodutivos, nutricionais e sanitários**. Vicosa, MG: Aprenda Fácil, 2000. Cap. 8. p.115 – 175.

CHATFIELD, C.; COLLINS, A. J. **Introduction to multivariate analysis**. London: Chapman & Hall, 1986. 246p.

COMARCK, R. M. A Review of classification. **Journal of Royal Statístical Society, Serie A**, London, v. 134, n. 3, p.321-367, Nov., 1971.

COSTA, M. M. da.; SILVA, M. S. e.; SPRICIGO, D. A. et al. Epidemiology, molecular characterization and resistance to antimicrobials of *Escherichia coli* isolated from South-Brazilian pig herds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**., Jan./Mar. 2006, vol.26, no.1, p.5-8. ISSN 0100-736X.

COSTA, A. L. da. Leite caprino: um enfoque de pesquisa. Disponível em: <www.portaldogronegocio.com.br>. Acesso em: 15 jan. 2007.

CRUICKSHANK, J.G. Food handlers and food poisoning. Training programmes are the best. **British Medical Journal**, v.300, n. 6719, p.207-208, 1990.

CULLOR, J. S. HACCP (hazard analysis of critical control points): is it coming to the dairy? **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 3449-3452, 1997.

De BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterocaterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomos of *Rizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58, p. 2180-2187, 1992.

DELVECCHIO, V. G., J. M. PETROZIELLO, M. J. GRESS, F. K. MCCLESKY, G. P. MELCHER, H. K. CROUCH, AND J. R. LUPSKI. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive- sequence PCR. **Journal Clinical Microbiology**. v.33, n.8, p.2141–2144. 1995.

DIJKSHOORN, L.; AUCKEN, H. M.; GERNER-SMIDT, P.; KAUFMANN, M. E.; URSING, J.; PITT, T. L. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31, p.702-705, 1993.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Growth chacteristic of *Streptococcus uberis* in UHT-Treated Milk. **Journal do Dairy Science**, v. 87, p. 813-815, 2004.

DOLBY, G. H. The role of statistics in methodology in life sciense. **Biometrics**. Washington, v. 38, n. 4, p.1069-1083, dez. 1982.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWISKY, M. J. Use os repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Applied of Environmental Microbiology**. v. 66, n. 6, p. 2572-2577, 2000.

DOUGLAS, M. W.; MULHOLLAND, K.; DENYER, V.; GOTTLIEB, T. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burns unit – an infection control study. **Journal of the International Society for Burns Injuries**. v. 27, p. 131–135, 2001.

DÜRR, J. W., Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do leite uma oportunidade única. In: DURR, J. W; CARVALHO, M. P. de; SANTOS, M. V. dos. (Org). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo, RS: Universidade de Passo Fundo, 2004. Cap. 2, p. 38-55.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 1989. **Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos 1982-1986**. Sobral, CE: EMBRAPA-CNPC. 284p.

EVERITT, B. S. **Cluster Analysis**. 2. Ed. London: Social Science Research Council/Halsted Press, 1981.136p.

EVERITT, B. S. Unresolved problems in cluster analysis. **Biometrics**, Washington, v. 35, n. 1, p. 169-181, Mar., 1979.

FAO, Roma. Codex Alimentarius Commission / WHO. Proposed draft code of hygienic practice for milk and milk products (at step 3 of the procedure). In: JOINT FAO/WHO STANDARDS PROGRAMME. CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE, 32., 1999, Washington. Washington, 1999.

FAO. Food and Agriculture of United Nations Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 30 set. 2004

FISHER, W. D. On grouping for maximum homogeneity. **Journal of the American Statistical Association**. Washington, v.53, n. 3, p. 789-798, oct., 1958.

GAPS. Good Agricultural Practices .Disponível em: <[www.jifsan.umd.edu/gaps.html](http://www.jifsan.umd.edu/gaps.html)>. Acesso 17 jan. 2007.

GELLI, D. S.; DESTRO, M. T. Aplicação do Sistema HACCP. Apostila do curso promovido por ILSI- Brasil, Profiqua e SBCTA, Instituto Adolfo Lutz, 1998.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, J.; CONGAN, T. M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type c. cheesemaking factory. **Journal of Food Microbiology**. v. 71, p. 177-178, 2001.

GRUNDMANN, H., SCHNEIDER, C., HARTUNG, D., DASCHNER, F. D. & PITT, T. L. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Clinical Microbiology** v. 33, p. 528-534, 1995.

GUAN, S.; XU, R.; CHEN, S.; ODUMERU, J.; GYLES, C. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animals and human sources. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 2690-2698, 2002.

HARRINGTON, S. M.; STOCK, F.; KOMINSKI, A. L.; CAMPBELL, J. D.; HORMAZABAL, J. C.; LIVIO, S.; RAO, L.; KOTIOFF, K. L.; SOW, S. O; MURRAY, P. R. Genotypic Analysis of invasive *Streptococcus pneumoniae* from Mali, Africa Using Semi-automated rep-PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=abs...>>. Acesso em: 17 jan. 2007

HARRIS, C. Meeting and learning from food safety issues around the world. Meat Processing Global, Set/Out, 2005, p.6-7. Watt Publishing Co., Mount Morris, Illinois, EUA.

HARWOOD, V. J.; WHITLOCK, J.; WITHINGTON, V. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the

source of fecal contamination in tropical waters. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 3698-3704, 2000.

HEESCHEN, W.; REICHMUTH, J.; SUHREN, G. Quality milk production - potential hazards, critical control points and the application of risk analysis. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING. **Albuquerque**, v. 36, p. 4-18, 1997.

HIGGINS, C. F.; AMES, G. F. L.; BARNES, W. M.; CLEMENT, J. M.; HOFNUG, M. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature** v. 298, p. 760-762. 1982.

HINCKLEY, L. S. Somatic cell count in relation to caprine mastitis. *AgriPractice*, p.1267-1271, 1983.

HUTCHISON, M. L.; Govan, J. R. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**. v. 1, p. 1005-1014, 1999.

IARIA, S. T.; FURLANETO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais. **Revista Saúde Pública**. São Paulo, v. 14, p. 93-100, 1976.

IBARRA, A. A. Sistema de pagamento do leite por qualidade – visão global. In: DURR, J. W; CARVALHO, M. P. de; SANTOS, M. V. dos. (Org). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo, RS. Universidade de Passo Fundo, 2004, Cap. 4, p. 72-86.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ (IPECE). Disponível em : <  
[http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/anuario\\_2003/anuario\\_2002\\_2003/fisiografia/tabelas/01%20%20Posi%E7%E3o%20e%20Extens%E3o%20do%20Territ%F3rio/1.05.xls](http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/anuario_2003/anuario_2002_2003/fisiografia/tabelas/01%20%20Posi%E7%E3o%20e%20Extens%E3o%20do%20Territ%F3rio/1.05.xls) >  
 Acesso em: 28 fev. 2007.

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**. 2006.

KARIUKI, S., GILKS, C.; KIMARI, J.; OLANDA, A.; MUYODI, F.; WAIYAKI, P.; Hart, C.A. Genotype analysis of *Escherichia coli* Escherichia coli strains isolated from children and chickens living in close contact. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 472-476, 1999.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL (Nom. cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1985, 153). In: Berguey's Manual of Systematic Bacteriology, v. 2, (ed). Baltimore, Williams & Williams, 1986.

KLOOS, W. E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual review of microbiology**. v. 34, p. 559-592, 1980.

KLOOS, W. E.; MUSSELWHITE, M. S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria in human skin. **Applied Microbiology**. Local de publicação, v. 30, n. 3, p. 381-395, 1975.

KLOSS, W. E.; SCHLEIFER, K. H.; SMITH, R. F. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Local de publicação, v. 26, n. 1, p. 22-37, 1976.

KORHONEN, H. Criteria for high quality milk - customer and industry demands. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM - PROFESSIONAL MILK EXTRACTION, 1997*, Vantaa. Proceedings... Vantaa: Oy Alfa Laval Agri Scand./ Alfa Laval Agri AB, 1997. Editado por J. Virtaniemi e K. Kavander. p. 13-24.

KOZAI, K., D. S. WANG, H. J. SANDHAM, AND H. I. PHILLIPS. Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chlorhexidine varnish. **Journal of Dental Research**. v. 70, p. 1252-1257. 1991.

KREULEN, C. M., H. J. De-SOET, R. HOGVEEN; J. S. VEERKAMP. Streptococcus mutans in children using nursing bottles. **Journal of dentistry for children**, v. 64, p. 107-111, 1997.

KRUSKAL, J. B.; LANDWEHF, J. M. Icicleplots: Better displays for hierarchial clustering. **The American Statistician**. Washington. v. 37, n. 2, p. 162-168, May, 1983.

LARANJA, L. F. Programa de Controle de Mastite. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 1995. 3p. cap. 1, 4, 5. 3p.

LAU, Y. J.; LIU, P. Y.; HU, B. S.; SHYR, J. M.; SHI, Z. Y.; TSAI, W. S.; LIN, Y. H.; TSENG, C. Y. DNA fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis. **The Journal of Hospital Infection** . v. 31, p. 61-66, 1995.

LEBART, L.; MORINEAU, A.; WARWICK, K. M., Multivariate Descriptive Statistical Analysis: Correspondence Analysis and Related Techniques for Large Matrices. New York: J. Wiley & Sons, 1984.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **Journal of Dental Research**.v. 74, p. 681-685, 1995.

LISBOA, S. C. Bactérias Gram negativas e *Staphylococcus aureus* em serviço de alimentação hospitalar. Viçosa, 1997. 39p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

LOUWS, F. J.; SCHNEIDER, M.; de BRUJIN, F. J. In.: TORANZOS, G. (ed), Nucleic Acid Amplification Methods for the Analisis of Environmental Samples. Technomic Publ. Co., p.63-94, 1996.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in procaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**. Local de publicação, v. 174, p. 4525-4529, 1992.

MALAKI, M.; KOHNEHSHAHRI, M.; GHARAGOZLOO, R. Bacteriophage typing of staphylococci isolated from foodstuffs and food handlers in Tehran. **Journal of Milk and Food Technology**. ,v. 36, n. 5, p. 262-271, 1973.

MANLY, B.F.J. *Multivariate statistical methods: a primer*. 2. Ed. London: Chapman & Hall, 1994. 215p.

MAPA. Instrução Normativa nº 37 de 2000. Anexo: Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Disponível em:<[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em 20 Out. 2004. Publicada do DOU em 08 de novembro de 2000, Seção 1, pág. 23.

MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**. London: Academic Press, 1995. 518p.

MARSDEN, T.; FLYNN, A.; HARRISON, M. *Consuming interests. The social provision of foods*. London: UCL Press, 2000. 220 p.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. Epidemiologic typing systems. **Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America**, v. 17, p.595-604,1996.

MCLELLAN, S. L.; DANIELS, A. D.; SALMORE, A.K. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution using DNA fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 2587-2594, 2003.

MUNCH-PETERSON, *Staphylococcus carriage in man. An Attempt at a Quantitative Survey* Bulletin of World Health Organization. v. 24, p. 761-769. 1961.

N. M. C. National Mastitis Council. In: *Current Concepts of Bovine Mastitis*, National Mastitis Council Inc., Madison, WI, 4 ed, 64p, 1996.

NADIR, E.; MARGALI, H.; GALLILY, T.; BEN-SASSON, S. S. Microsatellite spreading in the human genome:evolutionary mechanisms and structural implications. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**. v. 93, p. 6470-6475, 1996.

NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M.; MARTIN, C.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIN, E. ; WHITE, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**. v. 235, p.1616-1622. 1987.

NAKAMURA, Y.; CARLSON, M. ; KRAPCHO, K.; KANAMORI, M.; WHITE, R. New approach for isolation of VNTR markers. **American journal of human genetics**. v. 43, p. 854-859. 1988.

NARDIN, M. S.; SILVA, M. V. da; OETTERER, M. Segurança Alimentar: Uma Necessidade Brasileira. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL. Campinas, v. 31, n. 1, p. 68-76, jan./jun, 1997.

NASCIMENTO, S. B.; SOUSA, R. B.; MARTINS, M. J.; SOUZA, G. A.; SOUZA, M. H.; GUERRANT, R. L.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Glutamine depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by carrageenan or Clostridium difficile toxin A in rats. **Journal of Immunology**. v. 116, n.3, p. 328-36. Nov. 2005.

NIEDBACH, J.; BALDY-CHUDZIC, K.; STOSIK, M. Rep-PCR fingerprinting as a tool for the analysis of genomic diversity of *Escherichia coli* strains isolated from a water environment. **Cellular and Molecular Biology Letters**. p. 309, 2000.

OLIVE, P. B. D. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal Clinical Microbiology**. v. 37, p. 1661–1669, 1999.

ORLOCI, L. Geometric models in ecology I. The theory and applications of some ordination methods. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 54, p. 193-215, 1966.

PARVEEN, S.; Portier, K. M.; Robinson, K.; Edminston, L.; Tamplin, M. L. Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 3142-3147, 1999.

PEREIRA, M. J.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J. et al. Enterotoxin H staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, v.59, n. 5, p. 559-561, 1996.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Mastitis Counter Attack, Ed. Babson Bros. Cap.3, p. 15-Co., 1991.

QUEIROGA, R. C. R. E. do. A caprinocultura leiteira no contexto da segurança alimentar e nutricional. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>> Acesso em: 15 jan. 2007.

RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**. v. 22, n. 1, p.36-40, 1988.

RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUJIN, F. J. Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprint and computer-assisted pattern analysis. Disponível em:< <http://www.msu.edu/asci/debrujin/dna.htm>>. Acesso em: 28 fev. 2003.

RAJASHEKARA, G., T.; KOEUTH, S.; NEVILE, A; BACK, K. V.; NAGARAJA, J. R. LUPSKI, V. KAPUR. SERE, a widely dispersed bacterial repetitive DNA element. **Journal Clinical Microbiology**. v. 47, p. 489-498, 1998.

REGNAULT, B.; GRIMONT, F.; RIMONT, P. A. D. Universal ribotyping method using chemically labeled oligonucleotide probe mixture. **Research in Microbiology**. v. 148, p. 649-659, 1997.

RICHARD, P.; AMADOR DEL VALLE, G.; MOREAU, P.; MILPIED, N.; FELICE, T. DAESCHLER, M. P.; HAROUSSEAU, J. L.; RICHET, H. Viridans streptococcal bacteraemia in patients with neutropenia. **Lancet** v. 345, p. 1607-1609, 1995.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **Journal Dairy Science**. v. 77, p. 3354-3364, 1994.

SAARELA, M.; HANNULA, J.; MATTO, J.; ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, D. S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Archives of Oral Biology**. v. 41, p. 821-826, 1996.

SANTOS, L. F. L. Mastite Caprina. I. etiologia e sensibilidade dos microrganismos frente aos antimicrobianos. II. Avaliação das provas “Califórnia Mastitis Test” e “Whiteside Modificado” como método de triagem. 1990. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 1990.

SHEARER, J. K.; HARRIS Jr, B. Mastitis in Dairy Goats. Disponível em: <<http://edis.ufl.edu>>, acesso em: 08 maio, 2004.

SILVA, E. R. da ; VIEIRA, L. da S.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; COSTA, A. L.; CAVALCANTE, A. C. R. Caprinos e Ovinos: Guia de Saúde. Embrapa Caprinos. Sobral-CE. 2001.

SILVA, W. P, da.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: Patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene alimentar. São Paulo** - v. 18, n. 122, p.32-40, 2004.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1973. 573p.

SPENCKER, F. B.; HAUPT, S.; CLAROS, M. C.; WALTER, S.; LIETZ, T.; SCHILLE, R.; RODLOFF, A. C. Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. **Clinical Microbiology and Infection** v. 6, p. 600–607, 2000.

SPEXOTO, A. A. Aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em propriedades leiteiras. 2003. 160p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) - Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2003.

STRUELENS, M. J. et al. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clinical microbiology and infection**. v. 2, p. 2-11, 1996.

STRUELENS, M. J. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, n. 5, p. 581-585, 1998.

SWARTZ, R.; JOOSTE, P. J.; NOVELLO, J. C. Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Bloemfontein dairy herds. **Journal of the South African Veterinary Association**. v. 56, p. 69-73, 1985.

TRABULSI, L.R. et al. Microbiologia. 3 ed. São Paulo, Atheneu, 1999, 586p.

TRANTER, H. S. Food borne illness. Foodborne staphylococcal illness. **Lancet.**, v. 27, p.1044-1046, 1990.

VAN BELKUM, A.; SLUIJTER, M.; De GROOT, R.; VERBRUGH, H.; HERMANS, P. W. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. **Journal Clinical Microbiology**. v. 34. p1176-1179, 1996. VAN DER ZEE, A.; VERBAKEL, H.; VAN ZON, J. C.; FRENAY, I.; VAN BELKUM, A.; PEETERS, M. ; BUITING, A.; BERGMANS, A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. **Journal Clinical Microbiology**. v. 37, n. 2, p.342-349. 1999.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J. M.; HUARD, C.; PEPIN, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**. v. 96, p. 69–79, 2003.

VERSALOVIC, J.; 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.

VERSALOVICK, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Quality control for bacterial inhibition assays: DNA fingerprinting of microorganisms by rep-PCR. **Screening**. v. 1, p. 175-183, 1992.

VERSALOVICK, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUJIN, F.J.; LUPSKI, J.R. **Methods of Cellular and Molecular Biology**, v. 5, p.25-40, 1994.

VOGT, P. Potencial genetic functions of tandemly repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a high conserved “chromatin foldin code”. **Human genetics**. v. 84, p. 301-336, 1990.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P.A. D.; KANDLER, O. KRICHEVSKY, M. L.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.;

STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P .; TRÜPER. H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International journal of systematic bacteriology**. v. 37, p. 463-464. 1987.

WIESER, M.; BUSSE, H. J. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. v. 50, p.1087-1093. 2000.

WIGGINS, B. A. 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p. 3997-4002, 1996.

WILLIAMS, The role of biochemist in operation the artificial kidney. *Canadian Journal of Medicine Technology*. v. 25, p. 109-114. 1963.

WOESE C.R. **Bacterial evolution. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 51, n. 2, p. 221-71. Jun.1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety. Report by the Director-General. Washington: WHO, 1999. 9 p.