



Técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra¹

Cellyneude de Souza Fernandes², Lea Chapaval³, Arturo Bernardo Selaive-Villarroel⁴, Francisco Selmo Fernandes Alves³, Francisca Geovania Canafístula de Sousa⁵, Isana Mara Aragão Frota⁶, Francisco Eden Paiva Fernandes²

¹Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada a UFC, Fortaleza, CE e pesquisa com apoio financeiro do CNPC.

²Doutorando (a) em Zootecnia, UFV, Viçosa, MG. cellyneudeolivindo@yahoo.com.br

³Pesquisador (a) da Embrapa Caprinos, Sobral, CE.

⁴Professor do Dep. De Zootecnia da UFC, Fortaleza, CE.

⁵Mestrando (a) em Zootecnia UFPB

⁶Mestrando (a) em Biotecnologia UFC

Resumo: O presente estudo foi realizado, com o objetivo de aplicar a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. Verificou-se vários *fingerprints* de todos os isolados coletados das diferentes fontes estudadas (mãos de ordenhador, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água). Observou-se comportamentos muito similares das bandas indicando que os isolados podem ser relatados como clones epidemiológicos. As mãos do ordenhador caracterizaram-se como ponto crítico de controle, pois se destaca como iniciador de contaminação nas amostras *Staphylococcus aureus*. A técnica demonstrou ser eficiente para a análise da similaridade entre indivíduos da espécie *Staphylococcus aureus*, sendo, portanto, uma ferramenta útil para investigação de falhas no manejo e na busca de um controle mais eficiente para minimizar a disseminação de microrganismos patogênicos causadores de sérias enfermidades em humanos e animais.

Palavras-chave: epidemiologia molecular, identidades genômicas, qualidade

Technique of REP-PCR in tracking of the quality of goat milk

Abstract: The present study was carried out, with the objective of applying the REP-PCR sequences in the monitoring of the quality of goat milk. Several fingerprints were verified of all collected isolates 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. Hands of the milking handlers were characterized as a critical point of control, because stands out as initial point of contamination in the *Staphylococcus aureus*. The technique demonstrated to be efficient for similarity analysis among individuals of *Staphylococcus aureus* species, being, therefore, an useful tool for investigation of fails on management and in search of more efficient control to minimize the spread of pathogenic microorganisms that cause serious illnesses in humans and animals.

Keywords: molecular epidemiology, *fingerprints*, quality

Introdução

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. A implementação do processo APPCC surge como uma alternativa dentro do ciclo de produção do leite de cabra apresentado, porém, questões ainda não referenciadas, como por exemplo, a falta de informações e dados, e as 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, como: o *Staphylococcus aureus*. Assim, métodos baseados em DNA estão surgindo como vias confiáveis, simples e acessíveis para identificar e classificar microrganismos (Rademaker & De Bruijin, 2003).

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* em amostras de mãos de ordenhador, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água, para o futuro estabelecimento e implantação do sistema APPCC.

Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido na Embrapa Caprinos, em Sobral-CE, na Região norte do Estado do Ceará, no período de agosto de 2005 a janeiro de 2006.

Para a obtenção das cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* 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 do ordenhador (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 térmica 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 (ágar Baird Paker OXOID[®], England), foram inoculadas em tubos tipo Falcon de 15 mL, em 5 mL de caldo cérebro coração (BHI) durante 18 horas a 37°C (dez colônias identificadas como características, para cada amostra semeada), priorizando a extração do DNA da população a ser estudada.

Para extração de DNA das cepas bacterianas utilizou-se o protocolo proposto por Chapaval et al. (2006). 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' descritas por De Bruijn (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 (Perkin 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. 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 [Na₂], 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. 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.

Resultados e Discussão

O comportamento das bandas maiores que 300pb até 10.000pb 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 de acordo com o dendograma gerado (Figura 1).

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. A REP-PCR foi uma ferramenta importante para a rápida identificação de cepas de *Staphylococcus aureus* no presente estudo, podendo assim ser recomendada para detectar esta espécie em outros estudos.

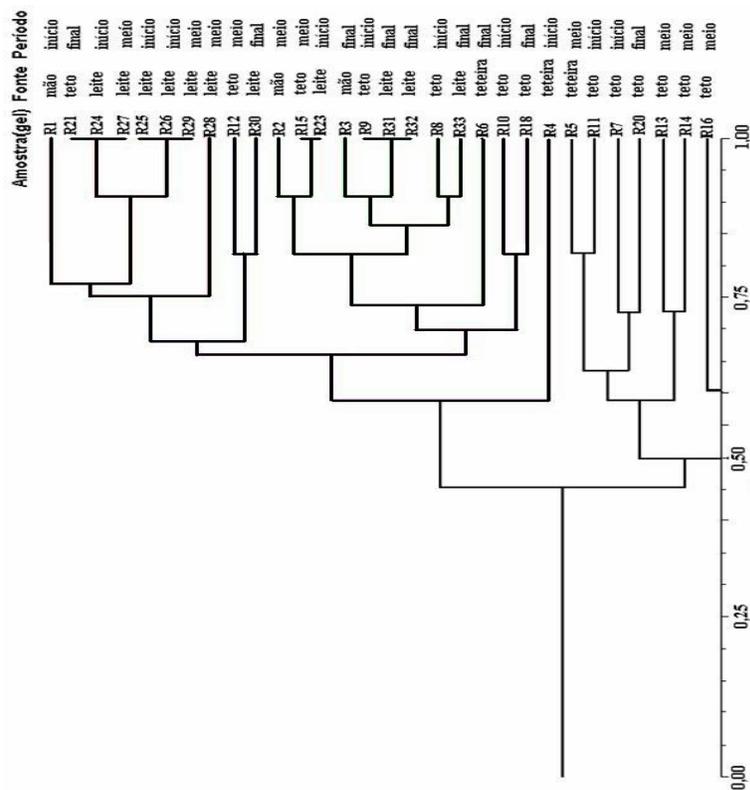


Figura 2. Dendrograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus aureus*. Os números do eixo x indicam o Coeficiente de Jaccard.

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 a técnica de REP-PCR para identificar cepas epidêmicas entre isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (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.

Conclusões

As mãos do ordenhador caracterizaram-se como ponto crítico de controle, pois se destacaram como iniciador de contaminação nas amostras *Staphylococcus aureus*. A técnica de REP-PCR caracterizou-se eficiente para a análise da similaridade entre indivíduos da espécie *Staphylococcus aureus*.

Literatura citada

CHAPAVAL, L.; MOON, D.H.; GOMES, J.E.; et al. 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, 2006.

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

DELVECCHIO, V.G., J. M. PETROZIELLO, M.J. GRESS, F.K. et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **Journal Clinical Microbiology**. v.33, n.8, p.2141-2144. 1995.

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

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