

Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha

Lea Chapaval^{1*}, Cellyneude de Souza Olivindo^{2,3}, Francisca Geovânia Canafístula de Souza³, Francisco Selmo Fernandes Alves¹, Isana Mara Aragão Frota⁴

¹Embrapa Caprinos, Sobral, CE, Brasil. *Autor correspondente, e-mail: lea@cnpq.embrapa.br

²Doutorando em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

³Doutorando em Zootecnia Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, Brasil

⁴Mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Resumo

O presente estudo foi realizado com o objetivo de aplicar a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra, através da detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, em amostras de mãos de ordenhador, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água, para o futuro estabelecimento e implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. Verificaram-se vários *fingerprints* de todos os isolados coletados das diferentes fontes estudadas (mãos de ordenhador, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água). Observaram-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 de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A técnica demonstrou ser eficiente para a análise da similaridade entre indivíduos das espécies estudadas, 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.

Palavras-chave: microrganismos ambientais, epidemiologia molecular, qualidade do leite.

Detection of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using REP-PCR monitoring goat's milk quality in milking room

Abstract

The present study was carried out with the objective of applying the REP-PCR sequences on the monitoring of goat milk quality, through the detection of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, in samples of milking handlers, goat teats, milk, milk machine and water, for the future establishment and implantation of the system of Hazard Analysis Critical Control Points. Several fingerprints were verified of all isolates collected of the different studied sources (milking handlers, goat 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 they stand out as initial point of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* contamination. The technique demonstrated to be efficient for the similarity analysis among individuals of the *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* species, 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 such as milk and your products.

Key words: environmental microorganisms, molecular epidemiology, milk 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 medidas de controle que visem minimizar os riscos de contaminação física, química ou microbiológica (Heeschen et al., 1997). A implementação do processo APPCC para o ciclo de produção do leite de cabra apresenta, questões ainda não referenciadas, como por exemplo, as dificuldades de seleção dos Pontos Críticos de Controle (PCCs) para um número de perigos biológicos encontrados nas fazendas. Isso ocorre pela 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 *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O gênero Enterobacteriaceae ou Enterobactérias, são uma família de bacilos Gram-negativos, com muitas propriedades em comum, embora possam ser encontradas amplamente na natureza, onde a maioria habita os intestinos do homem e dos animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção (Trabulsi, 2004). O gênero compreende um grande número de espécies (mais de 100), normalmente diferenciado por meio de provas bioquímicas, testes de sensibilidade a antibióticos e formação de pigmentos.

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*. Dentre estas espécies, *E. coli* é a que apresenta maior importância médica, podendo causar infecções intestinais, infecções urinárias, septicemias, meningites e outros tipos de infecções (Trabulsi, 2004). Sua presença na sala de ordenha resulta da introdução de animais oriundos de ambiente contaminado, já que essas bactérias estão presentes no esterco, água sem tratamento, solo e materiais usados para cama dos animais.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria tipicamente oportunista que pode 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 o solo, água, vegetais e é comumente encontrada em equipamentos de ordenha mal sanitizados e até mesmo em soluções de desinfecção para tetos, podendo estar presente na pele, fezes e garganta de 3% a 5% dos indivíduos normais (Trabulsi, 2004). Tal como os coliformes, estes microrganismos produzem uma endotoxina que resulta em toxemia com aumento da temperatura corpórea. Fagundes (2006), ao trabalhar com microrganismos psicrófilos no leite cru recém obtido, relatou que 67,8% das cepas foram oriundas de propriedades

com higiene inadequada, sendo que 15% de espécie *Pseudomonas aeruginosa* é altamente patogênica. Philpot & Nickerson (1991), afirmam que *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas, a partir de soluções de desinfecção, como soluções à base de quaternário de amônia e clorexidine.

Técnicas de tipagem epidemiológica são utilizadas 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 técnica de Rep-PCR 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 intergênicas repetitivas enterobacterianas com 124-127bp e elemento BOX com 154bp (Versalovick et al., 1994). Os fragmentos amplificados podem ser visualizados em gel de agarose, produzindo um perfil referido como Rep-PCR. As identidades genômicas geradas pelas técnicas de Rep-PCR permitem a diferenciação em nível de espécies, subespécies e cepa. Assim, métodos baseados em DNA estão surgindo como vias confiáveis, simples e acessíveis para identificar e classificar microrganismos (Rademaker & De Bruijn, 2003).

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de aplicar a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em seqüências palindrômicas extragênicas repetidas (REP-PCR) no monitoramento da qualidade do leite de cabra, através da detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de mãos de ordenhador, tetos das cabras, leite, ordenhadeira e água.

Material e Métodos

Para a obtenção das cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste estudo utilizou-se 15 fêmeas caprinas da raça Saanen, em início de lactação, as quais foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia e submetidas à higienização do úbere, pré e pós-ordenha, com solução iodada. Foram coletadas 40 amostras na primeira ordenha às 07h30min, 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 fim 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 fim da ordenha. A coleta foi realizada utilizando técnicas assépticas e conforme protocolos padrão (NMC, 1996) e as amostras encaminhadas em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável para o Laboratório de Bacteriologia da Embrapa Caprinos e Ovinos.

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 Mac Conkey para *Escherichia coli* e ágar Base *Pseudomonas* acrescido de suplemento CFC para *Pseudomonas aeruginosa* - 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 (cinco colônias identificadas como características, para cada amostra semeada), priorizando a extração do DNA da população a ser estudada. Todas as cepas foram testadas para morfologia através do teste de Gram e bioquimicamente para função através do kit comercial API 20NE e API 20E (bioMérieux®).

Posteriormente para extração de DNA das cepas bacterianas utilizou-se o protocolo proposto por Chapaval et al. (2008), onde uma quantidade de 2,5 mL de cultura da população bacteriana, para cada amostra semeada, crescida em meio BHI por 18 horas a 37°C foram precipitados em tubos de microcentrífuga 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 700 µL de tampão de extração (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; PVP-40 1%; CTAB 2%; Proteinase K, 20 mg/mL; β-Mercaptoetanol 0,2%). A solução foi misturada em vórtex e incubada por 30 minutos a 65°C em banho-maria, sendo misturada a cada 10 minutos com o cuidado de não se fazer movimentos bruscos. 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 adicionado 200 µL de tampão de extração sem Proteinase K. Após homogeneizados foram adicionados 650 µL de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1), homogeneizada novamente e centrifugada a 14.000 rpm por 7 minutos. O processo com 650 µL de clorofórmio: álcool-isoamílico (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, aguardou-se a secagem do *pellet* 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) o qual permaneceu em banho-maria à 37°C por 30 minutos.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Bio Global Com. Ltda., Curitiba, Paraná, Brasil. As seqüências utilizadas foram as seguintes: REP-PCR (ERIC - 1: 5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C e ERIC - 2: 3' - 2: 5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC C 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, 8 µL 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 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 dendrograma 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

Os géis de agarose obtidos para as análises da similaridade genética estão representados pelas Figuras 1 e 2, onde, observa-se os produtos da tipagem obtidos através do uso da técnica de REP-PCR com primers ERIC para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

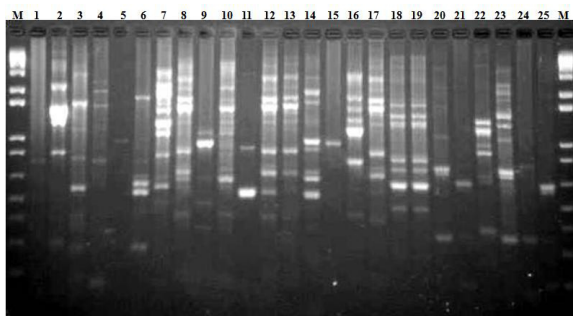


Figura 1. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de *Escherichia coli* e M = marcador molecular (1 Kb). Os números de 1-25 correspondem às amostras de leite, teto, teteira e mão do ordenhador do início, meio e fim da ordenha.

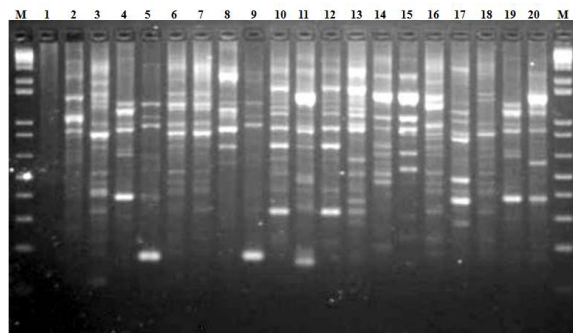


Figura 2. Gel de agarose com os produtos de REP-PCR gerados a partir de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e M = marcador molecular (1 Kb). Os números de 1-20 correspondem às amostras de leite, teto, teteira e mão do ordenhador do início, meio e fim da ordenha.

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

O comportamento das bandas maiores que 200pb até, aproximadamente, 6.000pb

obtidas através do uso de primer ERIC da figura 1 para *Escherichia coli* demonstrou similaridade em aproximadamente um quarto das bandas que foram comuns a 75% dos isolados, podendo diferenciar as cepas dentro de cinco agrupamentos (*clusters*) distintos de acordo com o dendograma gerado (Figura 3).

A amostra R1 (água para a lavagem das mãos dos ordenhadores, sem tratamento) aparece com similaridade de 80% em relação à amostra R7 (swab de teteira coletada no meio da ordenha) que por sua vez demonstra similaridade de 75% em relação à amostra R16 (swab de teto coletada no fim da ordenha). Neste *cluster* temos exemplo de transmissibilidade vertical bem típico, reunindo uma amostra inicial (R1) e clones epidemiológicos desta amostra no meio e fim 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 90% em relação a estas amostras.

Observou-se no *cluster 3* que a amostra R3, (swab da mão do ordenhador coletada no início da ordenha) demonstra similaridade em torno de 90% em relação às amostras R4 (swab da mão coletado durante a ordenha - meio), R19 e R23 (leite do início e leite do fim da ordenha coletadas respectivamente) 100% similares. Ainda no *cluster 3* temos 100% de similaridade entre as amostras R8 (swab de teteira coletado no fim da ordenha) e R14 (swab de teto coletado no meio da ordenha). Estas amostras foram 85% similares às amostras R3 (swab mão início de ordenha), R4 (swab mão meio de ordenha), R19 (leite meio da ordenha) e R23 (leite do fim da ordenha) R20 (leite do meio da ordenha) e R24 (leite do fim de ordenha) também 100% similares entre si. A amostra R10 (swab de teto coletada 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 observado 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 inadequado (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. (2007) ao analisarem as relações de similaridade, através das técnicas de PFGE e REP-PCR, de 156 *Enterococcus* e 362

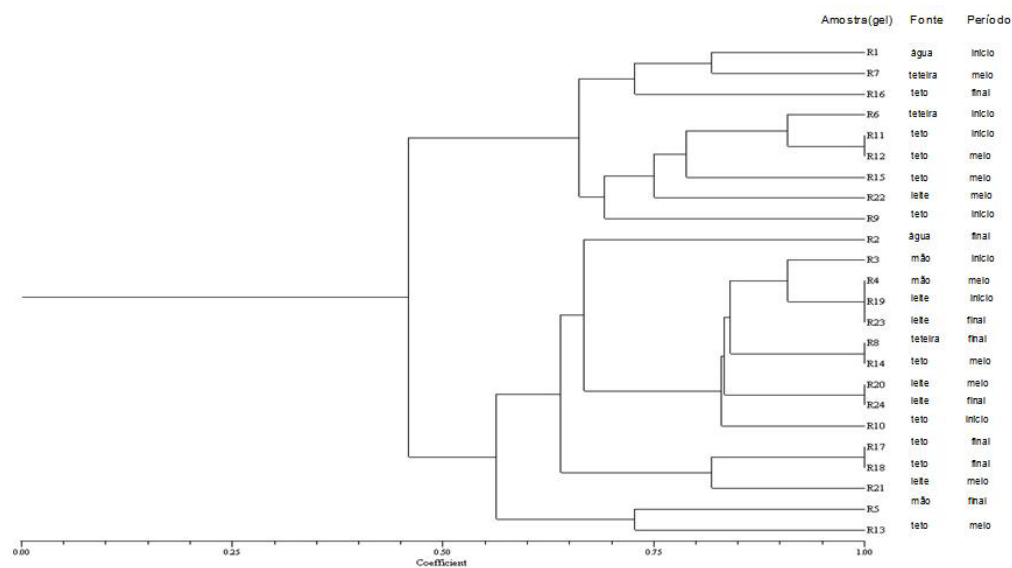


Figura 3. Dendrograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Escherichia coli*. Os números do eixo x indicam o Coeficiente de Jaccard.

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 fim de ordenha), R21 (leite meio de ordenha) e o cluster 5 composto pelas amostras R5 (swab mão fim 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 reproduzível, gerando comportamentos discriminatórios de alta qualidade, tipabilidade e estabilidade. Porém Costa (2007) verificou em seus estudos a ineficiência na discriminação dos isolados de *Escherichia coli*.

Parveen et al. (1999), Dombek et al. (2000) e Guan et al. (2002) 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 (Regnault et al., 1997; Parveen et al., 1999; Carson et al., 2001), heterogeneidade de DNA ribossomal (Bernhard & Field, 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.

No gel obtido para *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 2), a similaridade alcançada foi de aproximadamente 65% entre os isolados, diferenciando as cepas em três agrupamentos (*clusters*) grupos distintos e gerando o dendrograma representando pela Figura 4.

Verificou-se no cluster 1 similaridade de 80% 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 fim 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 60 e 75%, 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).

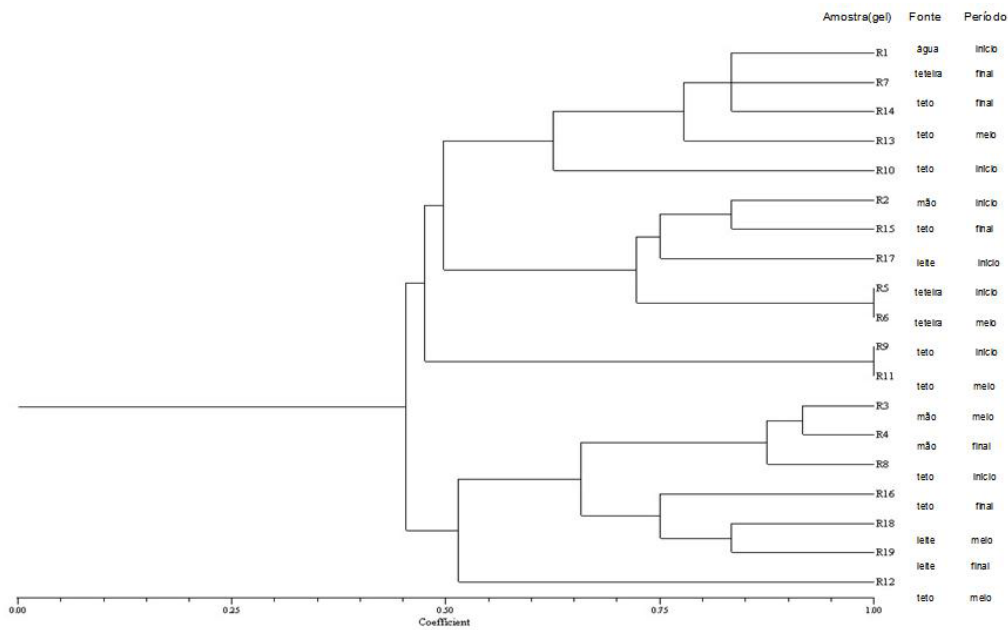


Figura 4. Dendrograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Pseudomonas aeruginosa*. Os números do eixo x indicam o Coeficiente de Jaccard.

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 fim da ordenha) foi de 85%. Por conseguinte, estas amostras demonstram similaridade de aproximadamente 75% em relação à amostra R17 (leite coletada no início da ordenha).

Com relação ao *cluster* 3, (R3,R4, R8, R16, R18, R19, R12) esse reúne amostras com similaridades variando entre 50 e 95%. Evidencia, porém caráter de transmissibilidade uma vez que possui amostras do meio, fim 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.

Para a minimização da contaminação do leite na sala de ordenha e com base nos resultados obtidos, sugere-se para aplicação do programa de Boas Práticas Agropecuárias na sala de ordenha e no ambiente estudado, que ocorra 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), desinfecção dos tetos após a ordenha, 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.

A REP-PCR foi uma ferramenta importante para a rápida identificação de cepas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* nesta avaliação, podendo assim ser recomendada para detectar estes patógenos em estudos similares. De acordo com Nascimento et al. (2005) essa 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.

Segundo Struelens et al. (1996) e Maslow & Mulligan (1996) a análise de similaridade molecular contribui para vigilância epidemiológica, uma vez que é possível a documentação dos clones epidêmicos através do tempo e, a circulação destes em populações infectadas.

Conclusão

Considerando os resultados obtidos neste trabalho pode-se inferir que para os microrganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* a técnica de REP-PCR demonstrou ser reprodutível, gerou comportamentos discriminatórios de alta qualidade, tipabilidade e estabilidade para que em tempo hábil, falhas no manejo sejam detectadas e corrigidas.

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, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

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.

Referências

- Bernhard, A.E., Field, K.G.A. 2000. PCR assay to discriminate human and animal feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella*. *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4571-4574.
- Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R., Asfaw, A. 2001. Identification of fecal *E. coli* from humans and animals by Ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1503-1507.
- Chapaval, L., Moon, D.H., Gomes, J.E., Duarte, F.R., Tsai, S.M. 2008. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60: 299-306.
- Costa, A.L. Leite caprino: um enfoque de pesquisa. <http://www.portaldoagronegocio.com.br> <Acesso em 15 Jan. 2007>
- De Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterocatalytic repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2180-2187.
- Dombek, P.E., Johson, L.K., Zimmerley, S.T., Sadowisky, M.J. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2572-2577.
- Fagundes, C.M. 2006. Presença de microrganismos psicrotóxicos, em especial *Pseudomonas spp*, em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural* 36: 568-572.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J., Congan, T.M. 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type *c. cheesemaking* factory. *Journal of Food Microbiology* 71: 177-178.
- Guan, S., Xu, R., Chen, S., Odumeru, J., Gyles, C. 2002. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animals and human sources. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2690-2698.
- Harwood, V.J., Whitlock, J., Withington, V. 2000. 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* 66: 3698-3704.
- Heeschen, W., Reichmuth, J., Suhren, G. Quality milk production - potential hazards, critical control points and the application of risk analysis. *National Mastitis Council Annual Meeting* 36: 4-18, 1997.
- Kagkli, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T.M. 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology* 114: 243-251.
- Kariuki, S., Gilks, C., Kimari, J., Olanda, A., Muyodi, F., Waiyaki, P., Hart, C.A. 1999. Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 472-476.
- Lupski, J.R., Weinstock, G.M.S., 1992. Interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology* 174: 4525-4529.
- Maslow, J., Mulligan, M.E. 1996. Epidemiologic typing systems. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 17: 595-604.
- National Mastitis Council - NMC. 1996. *Current Concepts of Bovine Mastitis* (ed.4). National Mastitis Council, Madison, USA. 64p.
- Olive, P.B.D. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal Clinical Microbiology* 37: 1661-1669.
- 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. 2005. Glutamine depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by carrageenan or *Clostridium difficile* toxin A in rats. *Journal of Immunology* 116: 328-36.

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

Philpot, W.N., Nickerson, S.C. 1991. *Mastitis Counter Attack: A strategy to combat mastitis*. Babson Bros, Naperville, Estados Unidos. 150 p.

Rademaker, J.L.W., De Bruijn, F.J. Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprint and computer-assisted pattern analysis. 2003. <http://www.msu.edu/asci/debruijn/dna.htm> <Acesso em 28 Fev. 2003>

Regnault, B., Grimont, F., Rimont, P.A.D. 1997. Universal ribotyping method using chemically labeled oligonucleotide probe mixture. *Research in Microbiology* 148: 649-659.

Struelens, M.J., Bauernfeind, A., van Belkum, A., Blanc, D., Cookson, B.D., Dijkshoorn, L., El Solh, N., Etienne, J., Garaizar, J., Gerner-Smidt, P., Legakis, N., De Lencastre, H., Nicolas, M.H., Pitt, T.L., Romling, U., Rosdahl, V., Witte, W. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial typing systems. *Clinical Microbiology Infectology* 2: 2-11.

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

Trabulsi, L.R. 2004. *Microbiologia*. 4 ed. Atheneu, São Paulo, Brasil. 720 p.

Versalovick, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods of Cellular and Molecular Biology* 5: 25-40.

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* 62: 3997-4002.