

Epidemiologia Molecular no Controle de Qualidade da Produção de Leite de Cabra

Lea Chapaval¹
Francisco Selmo Fernandes Alves²
Cellyneude de Souza Olivindo³

Introdução

A qualidade do leite de cabra tem sido um tema amplamente discutido na última década, principalmente, quanto à segurança alimentar. Garantir a qualidade de vida da população vem sendo debatido em diversos setores do agronegócio, gerando uma grande demanda para a pesquisa científica. O desenvolvimento de metodologias de pesquisa que mostrem rapidez, eficácia e segurança na obtenção dos resultados é um desafio para os pesquisadores. Com a disponibilidade de métodos moleculares sensíveis tais como a técnica de REP-PCR, abrem-se novas perspectivas na detecção de microorganismos presentes no leite e seus produtos, bem como o estabelecimento dos pontos críticos de controle (PCC) para o estabelecimento de boas práticas agropecuárias (BPA), conferindo qualidade ao produto final. Com o objetivo de disponibilizar a metodologia de REP-PCR para aplicação na produção animal, a técnica foi utilizada na determinação de pontos de controle e obtenção de um fluxograma para a linha de ordenha de cabras leiteiras, objetivando a aplicação das Boas Práticas.

Qualidade do Leite

A qualidade microbiológica se destaca por constituir-se num indicativo da saúde da glândula mamária da fêmea em lactação e, de modo geral, das práticas higiênicas adotadas no manejo da propriedade. O momento de ordenhar o animal é muito importante, interferindo diretamente na qualidade do leite. A higiene na hora da ordenha auxilia na prevenção de doenças que acometem rebanhos leiteiros, bem como na obtenção de uma matéria-prima de melhor qualidade. Uma vez comprometida a matéria-prima inicial, não se pode obter um produto de boa qualidade. Alguns fatores devem ser observados para que o leite não se contamine com microorganismos que podem prejudicar a qualidade do leite e seus derivados, como, por exemplo: ordem de ordenha, eliminação dos primeiros jatos, lavagem e desinfecção dos tetos antes da ordenha, secagem dos tetos, colocação das teteiras, desinfecção dos tetos após a ordenha e manejo pós-ordenha e higiene do ordenhador.

¹Med. Vet., D. Sc., Embrapa Caprinos. Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145, CEP 62010-970 - Sobral/CE. lea@cnpic.embrapa.br

²Med. Vet., Ph. D., Embrapa Caprinos. E-mail: selmo@cnpic.embrapa.br

³Zootec., Mestranda da UFC. E-mail: cellyneudeolivindo@yahoo.com.br

Tipagem Epidemiológica

Os 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. 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. 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.

Geralmente, métodos baseados em DNA estão surgindo com maior confiabilidade, simples e acessíveis para identificar e classificar microorganismos. O método referido como REP-PCR, "impressão digital" do genoma, uma técnica baseada na amplificação do DNA, é tida como uma técnica extremamente confiável, reproduzível, rápida e altamente discriminatória em termos de similaridade genética.

A 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. Os fragmentos amplificados podem ser visualizados em gel de agarose (Fig. 1), produzindo um perfil referido como Rep-PCR *fingerprinting* ("impressão digital", identidade) genômico.

Análise de Agrupamentos

Após a obtenção do perfil epidemiológico dos isolados em questão, a técnica de agrupamento é aplicada para a obtenção da similaridade entre os indivíduos. Técnicas como o agrupamento (*cluster analysis*) apresentam 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. 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 arranjados. 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.

Como resultado da análise de agrupamento, tem-se o dendograma, que representa o arranjo entre os objetos em uma escala de distância. Esse arranjo indica apenas afinidade entre os grupos, não definindo nenhuma ordenação entre estes.

Resultados e Discussão

Através do dendograma obtido (Figura 2), é possível desenvolver um sistema de monitoramento da qualidade do leite em sala de ordenha. Modelos de identidades, "fingerprints", foram obtidos para isolados de *Staphylococcus aureus* através da utilização da REP-PCR.

Fig. 1 - Gel de agarose com os produtos de REP-PCR (REP) gerados a partir de amostras de *Staphylococcus aureus*. Amostras de 1 a 35 (diferentes origens, ver Figura 2 - dendograma) e M = marcador molecular (1 Kb).

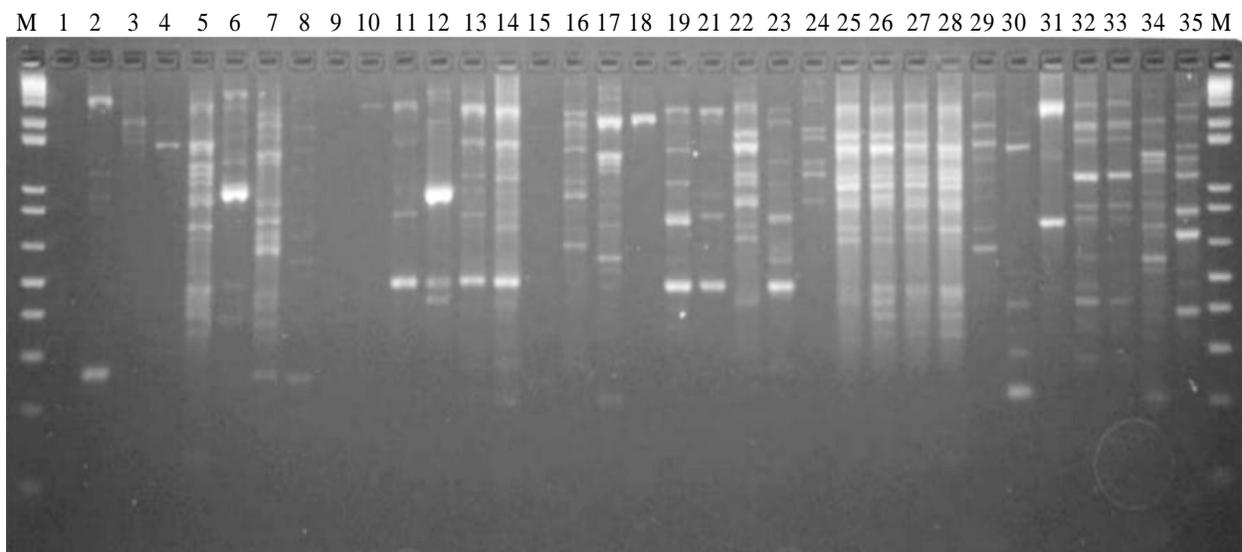
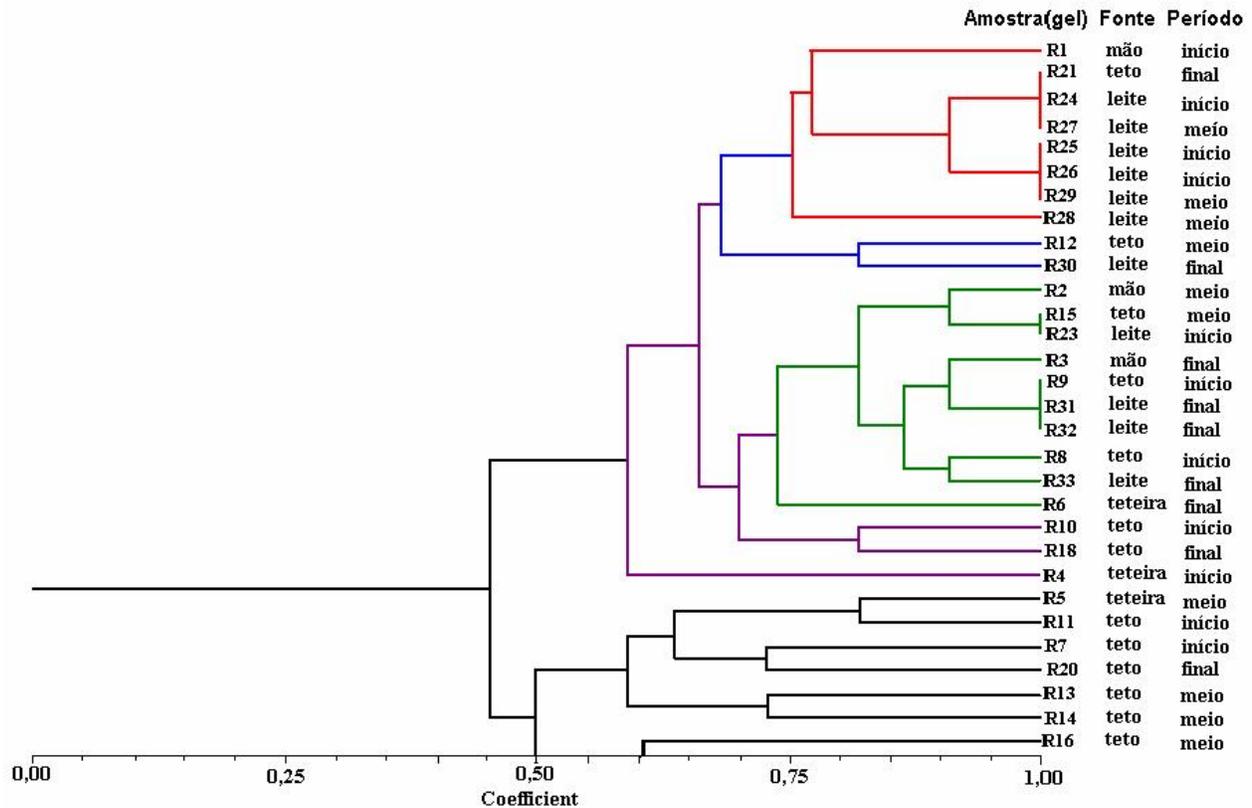


Fig. 2 - Dendograma gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus aureus*. Os números do eixo y indicam o Coeficiente de Jaccard



Em geral, os modelos das bandas dos isolados das diferentes fontes (humana e animal, bem como do maquinário) foram muito similares e os dados indicam que os isolados estão estreitamente relacionados. Foram similares, porém nem sempre idênticos. Após a inspeção visual (os dados foram assinalados manualmente), são submetidos ao programa computacional NTSYSpc 2.0 e coeficientes de similaridade de Jaccard são calculados para as identidades geradas e para grupos de dados combinados. Segundo a escala de Jaccard, quanto mais próximo do valor 1,00, mais similares são as amostras, possuindo, provavelmente, a mesma origem genética (clones). Para *Staphylococcus aureus* foram obtidos 5 clusters: O cluster 1 mostrou similaridades que variavam entre 75% e 100%. A amostra R1 que corresponde à água do início do procedimento de ordenha, sem tratamento com água sanitária, utilizado para a lavagem da mão dos ordenhadores, mostrou ser, em aproximadamente 80% similar as amostras R21, R24 e R27 que, por sua vez, são idênticas (100% de similaridade) e 90% similares às amostras R25, R26 e R29, também 100% similares entre si, de acordo com o dendograma gerado. Ao verificar as origens de tais amostras, encontrou-se leite coletado no início e meio da ordenha e uma amostra coletada do teto do animal no final da ordenha. A análise cluster 1 mostra que

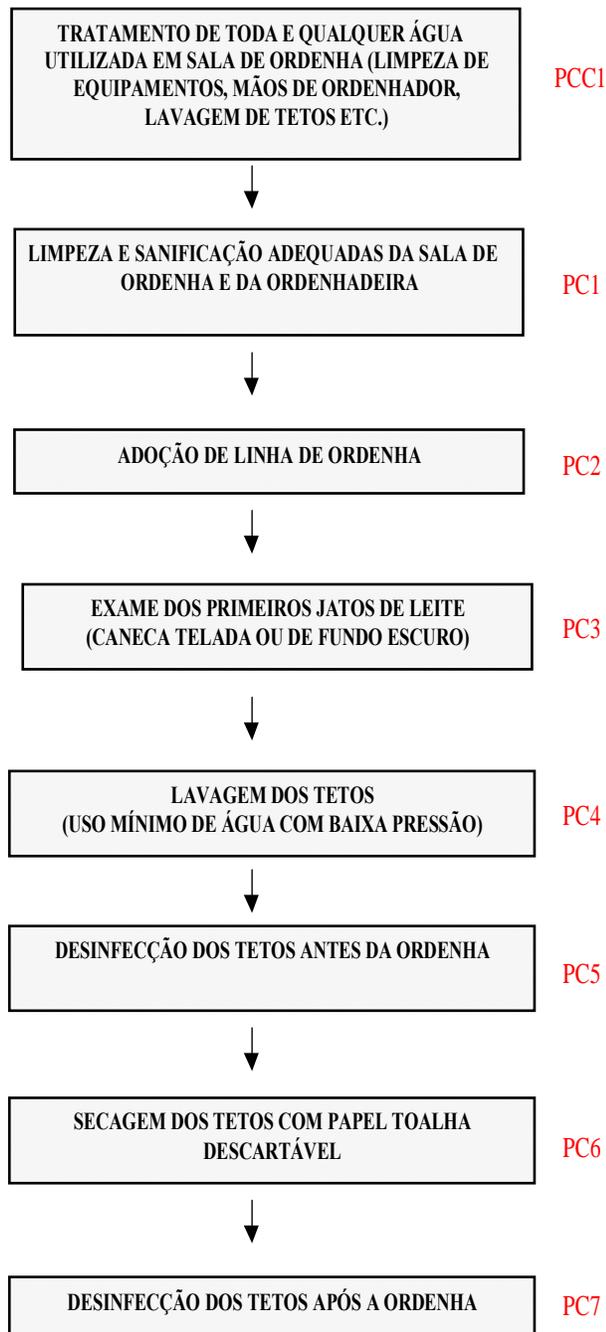
mesmo após o tratamento da água utilizada para lavagem das mãos do ordenhador, esta foi uma possível fonte de contaminação para as amostras presentes no mesmo cluster.

A análise do cluster 2 mostra similaridades que variam de 80% a 100% entre elas e aponta para uma observação importante: a amostra R2 (swab da mão do ordenhador coletado no meio da ordenha) possui similaridade de 90% com as amostras R15 e R22; amostras coletadas do meio e do início da ordenha que, por sua vez, são 100% similares entre si. No cluster 3 as similaridades variaram entre 75% e 100% entre as amostras e possuem elementos importantes entre eles, as amostras R9, R31 e R32 (swab do início, e duas amostras do final da ordenha, respectivamente) que se mostraram 100% similares entre si, indicando contaminação no momento inicial da ordenha sendo transmitida ao final da ordenha. No cluster 4, encontram-se amostras de swab de tetos do início e final da ordenha, R6 e R10, respectivamente, com cerca de 80% de similaridade entre si. Uma amostra de swab da teteira coletada no início da ordenha também está presente. O cluster 5 reúne amostras de tetos do início, meio e final da ordenha e uma amostra de swab da teteira, com similaridades variando entre 60 e 85%.

Construção do fluxograma

Após a avaliação do dendograma, o fluxograma é construído (Figura 3) e os procedimentos para a ordenha são assinalados como pontos críticos de controle (PCC), ou seja, os pontos que devem ser atentamente monitorados e pontos de controle (PC) nos quais as Boas Práticas podem, e devem, ser aplicadas para garantir a qualidade do produto.

Fig. 3 - Fluxograma de Boas Práticas Agropecuárias para a ordenha.



Considerações finais

A implementação de programas para melhoria da qualidade e segurança do leite deve ser fundamentada em informações obtidas de forma científica e a partir de amostragem adequada, sendo que métodos epidemiológicos e laboratoriais de confiança são uma alternativa útil para que falhas no manejo sejam detectadas em tempo hábil. As políticas dos governos com relação à fiscalização dos alimentos, certamente continuarão a existir, mas a tendência é de cada vez mais se associar processos de gestão, como o BPA, BPF e APPCC, que garantam a qualidade e segurança do alimento ao longo de toda a cadeia agroalimentar, de modo que a inspeção seja apenas no produto final. Dessa forma, as indústrias e, especialmente os produtores deverão incorporar cada vez mais mecanismos que permitam a prevenção e controle, das possíveis fontes de contaminação.

Bibliografia consultada

CHAPAVAL, L.; 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, 2006.

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

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.

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.

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.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis Counter Attack** Naperville: Babson Bros, 1991. p. 150.

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.

**Comunicado
Técnico, 65
On Line**



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 Caixa Postal 145, CEP 62010-970 Sobral, CE

Fone: (0xx88) 3677-7000

Fax: (0xx88) 3677-7055

Home-page: www.cnpc.embrapa.br

E-mail: www.cnpc.embrapa.br/sac.htm

1ª edição *On line* (dez./2006)

**Comitê de
publicações**

Presidente: Diônes Oliveira dos Santos

Secretária-Executiva: Ana Clara R. Cavalcante

Membros: Alexandre César Silva Marinho

José Ubiraci Alves

Marcelo Renato Alves Araújo

Tânia Maria Chaves Campêlo

Expediente

Supervisor editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisão de texto: José Carlos Mendes Vasconcelos

Editoração eletrônica: Alexandre César Silva Marinho