



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**MONITORAMENTO E INVESTIGAÇÃO ECOEPIDEMIOLÓGICA DA**  
**CONTAMINAÇÃO POR *Staphylococcus* spp. NO BENEFICIAMENTO DO LEITE**  
**DE CABRA**

**CANDICE MARIA CARDOSO GOMES DE LEON**

**AREIA - PB**  
**FEVEREIRO – 2014**

**CANDICE MARIA CARDOSO GOMES DE LEON**

**MONITORAMENTO E INVESTIGAÇÃO ECOEPIDEMIOLÓGICA DA  
CONTAMINAÇÃO POR *Staphylococcus* spp. NO BENEFICIAMENTO DO LEITE  
DE CABRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira – Orientador Principal

Prof. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez

Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira

**AREIA - PB**

**FEVEREIRO – 2014**

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da  
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

L563m Leon, Candice Maria Cardoso Gomes de.  
Monitoramento e investigação ecoepidemiológica da contaminação por  
Staphylococcus spp. no beneficiamento do leite de cabra / Candice Maria Cardoso  
Gomes de Leon. - Areia: UFPB/CCA, 2014.  
51 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade  
Federal da Paraíba, Areia, 2014.

Bibliografia.  
Orientador: Celso José Bruno de Oliveira.

1. Leite de cabra – Cariri paraibano 2. Leite caprino – Contaminação  
microbiológica 3. Segurança alimentar – Staphylococcus I. Oliveira, Celso José Bruno  
de (Orientador) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 637.17(043.3)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

**TÍTULO:** “Monitoramento e investigação ecoepidemiológica da contaminação por *Staphylococcus* spp. no beneficiamento do leite de cabra”


**AUTORA:** Candice Maria Cardoso Gomes de Leon

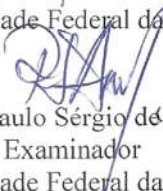
**ORIENTADORA:** Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira


#### JULGAMENTO

**CONCEITO:** APROVADO

**EXAMINADORES:**

  
Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira  
Presidente  
Universidade Federal da Paraíba

  
Prof. Dr. Paulo Sérgio de Azevedo  
Examinador  
Universidade Federal da Paraíba

  
Profa. Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho  
Examinadora  
Universidade Federal de Campina Grande

Areia, 24 de fevereiro de 2014

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

CANDICE MARIA CARDOSO GOMES DE LEON – ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba no ano de 2007, sendo bolsista de iniciação científica do CNPq de 2010 a 2011 no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal. Diplomando-se em 2011, realizou trabalho de conclusão de curso intitulado “Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* associados à mastite caprina”, sob a orientação do professor Dr. Celso José Bruno de Oliveira. No ano de 2012 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba na área de concentração Produção animal, tendo como linha de pesquisa Avaliação de Produtos de origem animal e como orientador principal o professor supracitado.

*"O importante não é vencer todos os dias, mas lutar sempre."*

*(Santo Agostinho)*

À amiga Francisca Geovânia Canafístula de Sousa,  
por toda amizade e confiança dividida.

O amor e a humildade espalhada por ti durante  
estes anos vividos entre nós prevalecerão para sempre.

***DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

À Deus, força suprema em minha vida, que me encoraja e me faz ir em frente sempre. Pela confiança e amor constante, mesmo em meio a minha ausência.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade concedida e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos professores Celso José Bruno de Oliveira e Patrícia Naves Givisiez pela orientação, credibilidade e amizade. Obrigada por todo o incentivo e pelas palavras de entusiasmo sempre me mostrando que eu podia ir mais além, e buscar cada vez mais meu espaço.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, bem como a todos os funcionários da Pós-graduação pelo respeito e carinho.

À minha mãe Maria de Fátima, minha irmã Nelma e sobrinho Juan Pablo – minha família, por todo o incentivo, amor e atenção, acreditando sempre em mim.

Ao meu namorado Neiton por toda paciência e ajuda. Diante de um pensamento comum de um futuro melhor, seu amor e companheirismo me renovaram a cada obstáculo.

À equipe de trabalho do Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA): Geovânia, Iácome, Élcio, Camila, Alexandre, Heraldo, Mauro, Silvana, Gysleidy, Angélica, Andréia, Jéssica, Magda, Denis e demais.

À Iara Nunes de Siqueira pela colaboração na colheita e envio de amostras para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos de turma: Alexandre Lemos, Ana Jaqueline Muniz, Cristina Lima, Heraldo Bezerra, Higor Fábio, Danilo Cavalcante, Clariana Santos, Ana Barros, Ana Paula, Flávio Gomes, Flávio Soares, Beatriz Dantas, Ricardo Martins... Aqueles que esqueci de citar.

Aos amigos: Manuel, Juliana, Gizelda, Adriele, Tysson, Aline, Darlan, Bruno, Luana, Bruna Gonçalves e seus pais Damião e Nalva, Guilherme Jardim e Mércia Serafim, Padre Ednaldo, Flávia e William, Clarissiane Serafim, entre outros. Apesar da correria do dia-a-dia pude sentir a torcida e a energia positiva de vocês.

À todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais uma etapa em minha vida. OBRIGADA!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1. O Cariri paraibano e a produção de leite de cabra.....	15
2.2. Contaminação microbiológica do leite caprino.....	16
2.2.1. Gênero <i>Staphylococcus</i> .....	18
2.3. Tipificação de <i>Staphylococcus</i> spp. por REP-PCR.....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1. Amostragem.....	23
3.2. Análises microbiológicas.....	25
3.2.1. Enumeração de <i>Staphylococcus</i> spp.....	25
3.2.2. Genotipagem por REP-PCR.....	26
3.2.2.1. Seleção dos isolados.....	26
3.2.2.2. Extração do DNA genômico.....	26
3.2.2.3. Amplificação.....	27
3.3. Análises dos dados.....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. submetidos a genotipagem por REP-PCR no estudo.....	26
<b>Tabela 2.</b> Valores médios da contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de leite de cabra cru de oito diferentes usinas de beneficiamento no Cariri Paraibano, no período de janeiro a maio de 2012.....	29
<b>Tabela 3.</b> Valores médios da contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de superfície interna de diferentes pontos do processamento do leite de cabra pasteurizado no Cariri Paraibano de oito diferentes usinas de beneficiamento no Cariri Paraibano, no período de janeiro a maio de 2012.....	30
<b>Tabela 4.</b> Valores médios da contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de leite de cabra pasteurizado de oito diferentes usinas de beneficiamento no Cariri Paraibano, no período de janeiro a maio de 2012.....	33

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Fluxograma de beneficiamento do leite caprino pasteurizado em usinas do Cariri Paraibano.....	23
<b>Figura 2.</b> Procedimentos de colheita em diferentes pontos do fluxograma do leite caprino pasteurizado em usinas do Cariri Paraibano.....	24
<b>Figura 3.</b> Colônias típicas de bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i> .....	25
<b>Figura 4.</b> Gel de agarose com produtos de REP-PCR gerados a partir de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de diferentes pontos em usinas de processamento do leite de cabra pasteurizado no Cariri Paraibano.....	34
<b>Figura 5.</b> Dendogramas gerados a partir dos dados de tipagem de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de diferentes pontos do processamento do leite de cabra pasteurizado em diferentes usinas no Cariri Paraibano, no período de janeiro a maio de 2012.....	38
<b>Figura 6.</b> Dendogramas gerados a partir dos dados de tipagem de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de diferentes pontos do processamento do leite de cabra pasteurizado em diferentes usinas no Cariri Paraibano, no período de janeiro a maio de 2012.....	39

## **MONITORAMENTO E INVESTIGAÇÃO ECOEPIDEMIOLÓGICA DA CONTAMINAÇÃO POR *Staphylococcus* spp. NO BENEFICIAMENTO DO LEITE DE CABRA**

**RESUMO** - O presente estudo teve como objetivo monitorar a contaminação por *Staphylococcus* spp. em usinas de beneficiamento do leite caprino no Cariri Paraibano através de uma análise microbiológica quantitativa e por genotipagem dos isolados através do método REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequences* - Sequências palindrômicas extragênicas). Para tanto, considerando o fluxograma de beneficiamento do leite caprino pasteurizado nas usinas, foram realizadas colheitas de amostras de leite cru e pasteurizado, suabes de superfície interna de equipamentos (tanque recepção, tanque pré-pasteurização, tanque pulmão, embaladeira), paredes e mãos de manipuladores. A análise quantitativa foi realizada pela enumeração de *Staphylococcus* spp., da qual foram direcionados 114 isolados deste micro-organismo para a extração de DNA e reação de amplificação para REP-PCR utilizando o *primer* RW3A. Foi observada contagem média de *Staphylococcus* spp. entre usinas de 5,18 log UFC/mL para leite de cabra cru. Os pontos de superfície anteriores a pasteurização apresentaram contagens médias de 0,65 e 1,55 log UFC/cm<sup>2</sup> para tanque recepção e tanque pré-pasteurização, respectivamente. Para os pontos de superfície posteriores à pasteurização, foram observadas contagens de 0,94 e 1,65 log UFC/cm<sup>2</sup> para tanque pulmão e embaladeira, respectivamente. Mãos de manipuladores revelaram contagem média de *Staphylococcus* spp. entre usinas de 0,88 log UFC/mão. Ainda, superfícies de paredes apresentaram contagem média de 1,08 log UFC/cm<sup>2</sup>. Para leite pasteurizado, foi observada contagem média de *Staphylococcus* spp. entre usinas de 2,85 log UFC/mL. Na análise molecular foram observados perfis genotípicos indistinguíveis, bem como, perfis genotípicos com elevada similaridade de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes do leite pasteurizado que apresentaram perfil genotípico similar a isolados de equipamentos e de mãos de manipuladores nas usinas investigadas, que, a partir de análise individualizada em cada usina, foi permitido a identificação de possíveis vias de contaminação do leite durante seu processamento, os quais reforçaram a análise quantitativa previamente realizada. A elevada contaminação por *Staphylococcus* spp., e a estreita relação genotípica entre os isolados deste micro-organismo em amostras de leite, equipamentos e mãos de manipuladores,

revelam a presença de contaminação residual e cruzada nas usinas do Cariri Paraibano, tornando-se necessário reavaliação em suas Boas Práticas de Fabricação.

**Palavras-chave:** patógenos, REP-PCR, segurança alimentar

**MONITORING AND ECO-EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF  
CONTAMINATION BY *Staphylococcus* spp. IN THE PROCESSING OF GOAT  
MILK**

**ABSTRACT** – The present study had as objective to monitor the contamination by *Staphylococcus* spp. in small-scale milk processing plants in Cariri of Paraíba through a quantitative microbiological analysis and by genotyping of the isolates by REP-PCR method (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequences*). For both, considering the flow chart of processing of pasteurized goat milk in plants, sampling of raw and pasteurized milk, swabs of the inner surface of equipment (reception tank, pre-pasteurization tank, post-pasteurization tank, package machine), walls and handlers hands. Quantitative analysis was performed by enumeration of *Staphylococcus* spp., which were targeted 114 isolates of this microorganism for ADN extraction and reaction of amplification for REP-PCR using the primer RW3A. Were observed package machine average counts of *Staphylococcus* spp. between plants of 5.18 CFU/mL for raw goat milk. The previous points of surface to pasteurization showed average counts of 0.65 and 1.55 log CFU/cm<sup>2</sup> for reception tank and pre-pasteurization tank, respectively. For the points of surface after to the pasteurization, was observed counts of 0.94 and 1.65 log CFU/cm<sup>2</sup> for lung tank and the package machine, respectively. Handlers hands showed average count of *Staphylococcus* spp. between plants of 0.88 log.CFU/hand. Still, wall surfaces showed an average count of 1.08 log CFU/cm<sup>2</sup>. For pasteurized milk, average count of *Staphylococcus* spp between 2.85 log CFU/mL was observed plants. In molecular analysis were observed indistinguishable genotypic profiles, as well as, genotypic profiles with high similarity of isolates of *Staphylococcus* spp. From pasteurized milk showed a genotypic profile similar to isolates of equipments and of handlers hand in the investigated plants, which, from individualized analysis in each plant, was allowed the identification of possible ways of milk contamination during your processing, which reinforced the quantitative analysis previously performed. The high contamination by *Staphylococcus* spp., and the close genotype relationship between the isolates of this microorganism in milk samples, equipments and handlers hands, reveals the presence of residual contamination and in plants of Cariri in state Paraíba, making it necessary to review in its Good Manufacturing Practices.

**Keywords:** pathogens, REP-PCR, food security

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, não são raros os episódios de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) que acometem um grande número de pessoas em todo o mundo. Entre 2000 e 2011, 1.863 surtos de DTA foram registrados no Brasil, afetando 163.425 mil pessoas e causando 112 mortes, com relatos mais frequentes nas regiões sul e sudeste, as áreas mais povoadas do país (Brasil, 2013). É muito provável que este número seja superior, uma vez que muitos casos não são notificados e o agente etiológico é identificado em apenas 50% dos surtos registrados.

O leite e seus derivados estão entre os alimentos mais comumente envolvidos em surtos de DTA. Em função de suas características de composição e disponibilidade de nutrientes, o leite, a partir do momento de sua obtenção está sujeito a uma série de contaminações, principalmente de origem bacteriana, que passam a representar riscos a sua conservação e a saúde do consumidor. O gênero *Staphylococcus* está entre os principais causadores de surtos de intoxicação alimentar envolvendo leite e seus derivados (Olivindo, 2009).

Sabe-se que a pasteurização é um método eficaz para a eliminação de patógenos de origem alimentar e outras bactérias do leite. No entanto, o crescente número de relatos em leite fluido e em produtos lácteos indica claramente que a pasteurização por si só não é solução final para o controle desses patógenos nestes produtos (Nero et al., 2004). A contaminação pós-pasteurização está geralmente associada à limpeza inadequada dos equipamentos, à embalagem ou contaminações cruzadas por manipuladores (Fonseca, 2001).

Desta forma, é necessário dar ênfase ao desenvolvimento e implementação de medidas preventivas para o controle desses riscos potenciais, através de uma boa análise de perigos, empregando amostragem e métodos epidemiológicos adequados, determinando as etapas realmente críticas para a inocuidade do alimento. Hoje, a caracterização fenotípica e genotípica dos isolados envolvidos nos casos de contaminação é base fundamental em estudos epidemiológicos, podendo confirmar e delimitar o comportamento da transmissão dos agentes patogênicos, alicerçando estratégias e protocolos de profilaxia e controle (Santos et al., 2003).

Métodos baseados na amplificação do DNA para tipagem epidemiológica estão sendo cada vez mais utilizados, devido a sua simplicidade e rapidez para a caracterização e

diferenciação de micro-organismos. Dentre tais métodos, a técnica REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequences* - Sequências palindrômicas extragênicas repetidas) é considerado o menos oneroso, porém sendo reprodutível em um período relativamente curto, e com alto poder discriminatório para muitos organismos bacterianos (Sabat et al., 2006; Wilson et al., 2009).

Neste contexto, a região nordeste do Brasil detém o maior rebanho caprino leiteiro, e a região do Cariri Paraibano representa o principal pólo de produção de leite caprino no país. Porém, investigações recentes nesta região indicam a necessidade de melhoria na obtenção higiênica do leite cru e do processo de beneficiamento, em função de elevados níveis de contaminação, principalmente por micro-organismos do gênero *Staphylococcus* spp. (Beltrão Filho et al., 2008; Lopes Júnior, 2009; Oliveira et al., 2011; Mororó et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi monitorar a contaminação por *Staphylococcus* spp. em usinas de beneficiamento do leite caprino no Cariri Paraibano através de análise microbiológica quantitativa e genotipagem dos isolados por REP-PCR.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. O Cariri paraibano e a produção de leite de cabra**

A caprinocultura leiteira no Brasil tem aumentado, de forma bastante significativa, sua participação no cenário agropecuário brasileiro, superando o constante desafio de conquistar e manter novos mercados para o leite de cabra e seus derivados. De acordo com dados da FAO (2011), o Brasil possui rebanho caprino com 9.386.316 milhões de cabeças e produz anualmente 148.149 milhões de litros de leite de cabra, tornando o país o 17º maior rebanho caprino do mundo.

O mercado nacional de leite de cabra ainda está em desenvolvimento e ultimamente tem crescido devido à demanda dos consumidores e da inserção do leite na merenda escolar, especialmente no Nordeste (Martins et al., 2007). Nessa região, concentra-se mais de 80% do rebanho caprino brasileiro e a produção de leite de cabra representa importante atividade econômica (Beltrão Filho et al., 2008), porém, ainda assim, a produção apresenta baixos níveis de desempenho.

A base econômica das propriedades produtoras de leite de cabra é a agricultura familiar, de tal forma que 83% dos estabelecimentos são considerados familiares. Os produtores da região são em sua maioria proprietários de pequenas propriedades rurais e de pequenos rebanhos constituídos por cerca de 20 a 30 animais, que são em sua maioria, mestiços com raças exóticas de origem européia.

A região do Cariri Paraibano destaca-se na exploração da caprinovinocultura, onde se encontra a melhor área de mercado do país pela sua localização geográfica, pela maior densidade de caprinos e ovinos do continente e principalmente por possuir raças que possuem aptidão tanto para leite como para carne. Apesar destas características favoráveis esta atividade ainda encontra-se em processo de desenvolvimento, com crescimento e melhorias a cada ano, através de incentivos e programas governamentais e do setor privado, gerando associações e cooperativas de produtores, direcionando a atividade à frequente expansão e melhoria na qualidade do seu produto (Bandeira et al., 2007).

Dentre os programas de maior relevância, o “Programa Leite da Paraíba”, do Governo da Paraíba, garante ao pequeno produtor da região a entrega de sua produção em usinas de leite de cabra, nas quais o mesmo é pasteurizado, envasado, refrigerado e transportado aos pontos de distribuição. Existem, atualmente, oito usinas de leite de cabra, distribuídas nas cidades de Amparo, Cabaceiras, Gurjão, Monteiro, Prata, Sumé, São

Sebastião do Umbuzeiro e Zabelê. A instalação das usinas de pasteurização significou para o programa a porta de entrada para a construção de um negócio que, somente no ano de 2002, injetou R\$ 1,5 milhão de reais na região, com a compra governamental do leite caprino para os programas sociais do governo do Estado (Rodrigues & Quintans, 2003).

A industrialização do leite e seus derivados requerem instalações e equipamentos apropriados, com realização efetiva de Boas Práticas de Fabricação, para credenciamento junto aos serviços de inspeção sanitária (Cordeiro & Cordeiro, 2009). À vista disso, a transformação da produção de leite caprino em agronegócio rentável para a região é desafiador para os envolvidos nesta cadeia, com produtores e manipuladores modificando hábitos e conhecimentos passados por seus ancestrais.

A obtenção higiênica e o beneficiamento adequado do leite são etapas cruciais para garantir um produto de ótima qualidade, rentabilidade para derivados lácteos e segurança alimentar aos consumidores. Portanto, devido a sua participação na caprinocultura leiteira no Brasil, é de valiosa importância a realização de estudos e pesquisas que visem à melhoria do leite caprino na região do Cariri Paraibano, promovendo alicerce para sua perseverança e entrada no agronegócio. Há necessidade de se obter informações precisas sobre a contaminação microbiológica do leite, pois é a base de possíveis medidas de intervenção e programas de gerenciamento de qualidade que devem ser implementados em futuro próximo, tais como o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

## **2.2. Contaminação microbiológica do leite caprino**

A presença de taxas suficientemente altas de certos micro-organismos em alimentos constituem as causas mais frequentes de problemas sanitários, além de grandes perdas econômicas. Os procedimentos higiênicos realizados durante a obtenção e manutenção do leite, bem como durante seu beneficiamento no estabelecimento, determinam o tipo e a quantidade desses contaminantes. É inexistente uma barreira entre profilaxia e higiene, pois a profilaxia é a ciência que trata dos meios de impedir a eclosão e a transmissão de doenças; e a higiene é a primeira medida a ser adotada ao se fazer profilaxia (Garcia et al., 2000).

A contaminação do leite inicia-se na fazenda, durante ou após a ordenha devido à ineficiência de higienização de utensílios e do homem, além de doenças do rebanho. Não se deve esquecer que as dificuldades de transporte, falhas no processo de beneficiamento e

a estocagem podem interferir diretamente sobre a qualidade do leite. Dessa forma, para que esta seja mantida é preciso produzi-lo, pasteurizá-lo e comercializá-lo de maneira correta, de acordo com os parâmetros técnicos estabelecidos pela legislação (Garcia et al., 2000). A pasteurização do leite tem se constituído em valiosa arma na prevenção de zoonoses disseminadas por esse alimento. Porém, mesmo quando eficiente na destruição de agentes patogênicos, a pasteurização não é capaz de eliminar todos os micro-organismos presentes no produto. Do mesmo modo, o leite pasteurizado está sujeito a recontaminação pós-pasteurização (Ajzental et al., 1996).

Além da limpeza e da desinfecção de superfícies e equipamentos, que deve ser avaliada periodicamente de forma a garantir a produção de alimentos seguros, a higienização das mãos se destaca para a garantia de um cuidado seguro. As mãos dos profissionais e pessoas que transitam no setor alimentício constituem importante meio de disseminação de patógenos entre o produto, profissionais e consumidores (OMS, 2009). A microbiota composta por micro-organismos presentes na camada mais superficial da pele são frequentemente removidos durante a lavagem das mãos. Geralmente, esta microbiota não se multiplica na pele, mas pode sobreviver, sendo facilmente transferida para diferentes locais (Tortora, 2005).

Normalmente, a microbiota contaminante do leite é composta por bactérias, enquanto que as leveduras e fungos são mais raros de serem encontrados. Dentre os contaminantes estão as bactérias psicrotróficas, coliformes, aeróbios mesófilos, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, esporos de *Clostridium* e bastonetes gram negativos (Jay, 1998).

De acordo com a Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000 (MAPA), que regulamenta a qualidade do leite de cabra pasteurizado, o leite de cabra cru não deve ter uma carga de mesófilos superior a  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Quando pasteurizado, este produto na indústria deve portar uma carga de  $1 \times 10^4$  até  $5 \times 10^4$  UFC/mL. No que diz respeito à presença de coliformes 30/35°C admite-se uma carga máxima quando pasteurizado de 4 NMP/mL, já para os coliformes 45°C este limite cai para apenas 1 NMP/mL, não havendo menção a respeito da quantidade de coliformes no leite cru. Finalmente, o leite pasteurizado não deve apresentar contagens de *Salmonella* spp.

### 2.2.1. Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* apresenta as espécies patogênicas mais comumente responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, por serem normalmente transmitidos aos alimentos por meio de manipuladores (portadores assintomáticos), por meio dos animais como o portador de mastite, e por sua versatilidade nutricional e capacidade de crescimento em condições ambientais (Stamford et al., 2006). As enterotoxinas estafilocócicas (EE) são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e têm sido relatadas em vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos (Cardoso et al., 1985).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, isolados ou agrupados em cachos, pares e tétrades. São anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias, não esporogênicas, produtoras usuais de catalase e imóveis. São bactérias mesófilas cuja temperatura de crescimento está na faixa de 7° C a 45° C, mas suas enterotoxinas são produzidas entre 10° C a 46° C, sendo a produção máxima entre 40° C a 45° C. São comumente encontrados na natureza, incluindo alimentos de origem animal ou naqueles diretamente manipulados (Jay, 2005).

Os *Staphylococcus* encontram-se amplamente distribuídos no ambiente e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de pessoas saudáveis, com importante relevância na cavidade nasal, como armazenadora e disseminadora. Áreas como o conduto nasal, olhos, garganta, trato gastrointestinal, superfície da pele, principalmente mãos, braços, rostos e feridas, destacam-se como reservatórios patogênicos (Rapini et al., 2005). Podem ser também encontrados frequentemente no ar, alimentos, esgotos e fezes (Costa, 2008). Assim, a contaminação dos alimentos pode ocorrer em função da contaminação primária, no local de produção; e de forma cruzada, durante a manipulação, em decorrência de higiene deficiente.

Existem cerca de 50 espécies e subespécies registradas do gênero *Staphylococcus* (Pyörälä et al., 2009), sendo que algumas são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista em humanos e animais. Entre elas se destacam as espécies: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*. Tradicionalmente, os *Staphylococcus* são divididos em duas categorias: coagulase positivos e negativos. A produção de coagulase desta espécie está ligada à sua virulência, e entre os coagulase positivos o *S. aureus* representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas (Silva e Gandra, 2004).

Das intoxicações alimentares causadas por *Staphylococcus* spp. relatadas aos órgãos públicos, predomina a linhagem coagulase positivo. Atualmente, a inspeção de produtos de origem animal no Brasil é coordenada pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e exige somente a pesquisa desta categoria de *Staphylococcus*, não fazendo referência aos *Staphylococcus* coagulase negativos. No entanto, já se tem vários relatos de casos de intoxicação alimentar, no qual se implica a presença de *Staphylococcus* coagulase negativo enterotoxigênico (Lamaita et al., 2005; Stamford et al., 2006; Mariano et al., 2007; Ângelo, 2010; Lyra et al., 2013; Meira, 2012).

Além desses fatores de virulência mencionados o gênero ainda possui outros fatores, como toxinas citolíticas (hemolisinas), toxina Síndrome do Choque Tóxico, enzimas (proteases, lipases, catalase, nucleases, penicilinases, entre outras), estruturas de superfície (cápsula de polissacarídeo, proteínas extracelulares, adesinas) e mecanismos de resistência a antibióticos e sanitizantes, bem como produção de biofilme, entre outros (Tortora, 2005).

A contagem de *Staphylococcus* em alimentos é feita com a finalidade de relacionar este micro-organismo à saúde pública, para confirmação no envolvimento com intoxicações alimentares, e controlar a qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, relacionando-se com contaminações pós-processamento ou das condições de sanificação inadequada de superfícies destinadas ao contato com alimentos (Takizawa et al., 2005).

A contaminação estafilocócica no leite é frequente, uma vez que este apresenta aporte nutricional suficiente para o crescimento bacteriano, assim como manipulação frequente. A ausência de padrões de contagem para *Staphylococcus* spp. na Instrução Normativa nº 37 que consta do regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra no Brasil, bem como no regulamento destinado para leite bovino no país, caracteriza uma situação ainda mais agravante, uma vez que leite e derivados estão entre os principais alimentos envolvidos com DTAs. Portanto, faz-se necessário a produção de informações sobre a contaminação estafilocócica em leite no Brasil, dando suporte para a implementação de medidas de correção em sua obtenção e processamento industrial, evitando riscos à saúde pública.

### **2.3. Tipificação de *Staphylococcus* spp. por REP-PCR**

Sistemas de tipagem tradicionais, como a identificação fenotípica, são baseados na avaliação da expressão de características geneticamente codificadas por isolados

bacterianos; e incluem, por exemplo, morfologia, características de crescimento, capacidade de metabolizar substratos, resistência antimicrobiana, e outras funções que resultam da expressão de DNA, mas que não são baseados na detecção do DNA bacteriano. Pode existir uma variabilidade na expressão de características fenotípicas por isolados pertencentes à mesma espécie (Heikens et al., 2005) e, por essa razão, diferentes métodos fenotípicos podem ser utilizados na subtipagem de isolados. Por outro lado, os métodos fenotípicos apresentam características que limitam sua aplicação como ferramenta de subtipagem para finalidade epidemiológica, uma vez que a interpretação dos testes fenotípicos pode ser subjetiva (Carretto et al., 2005). A variabilidade na expressão e interpretação das características fenotípicas limita a reprodutibilidade dos ensaios, ou seja, a capacidade de gerar os mesmos resultados cada vez que os testes são usados (Zadocks & Watts, 2009).

Os métodos de avaliação da similaridade entre micro-organismos através da investigação de características de seu material genético revolucionaram a capacidade de distinguir tipos bacterianos (ou subtipos), uma vez que se referem à caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um micro-organismo, características estas relativamente estáveis (Destro, 1995). Sistemas moleculares de tipagem epidemiológica podem ser usados para a investigação 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 avaliando-se tempo e circulação de clones epidêmicos em populações infectadas (Struelens, 1998). A premissa básica para a tipagem epidemiológica é que isolados (agentes infecciosos), que são parte da mesma cadeia de transmissão, são relatados como clones, ou seja, resultam da progênie da mesma célula ancestral (Siripommongkolchain et al., 2002).

Nas últimas décadas, verificou-se um aumento significativo no desenvolvimento e aplicação de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas. A escolha de um método adequado de tipagem molecular (ou métodos) depende significativamente do problema a ser resolvido e, o contexto epidemiológico em que o método vai ser usado, bem como o tempo e a escala geográfica (Sabat et al., 2013). Estes precisam ter excelente especificidade para serem capazes de tipificar os isolados analisados com alto poder discriminatório. Ao mesmo tempo, devem

ser rápidos, de baixo custo e altamente reprodutíveis, com fácil execução e interpretação (Van Belkum et al., 2007).

Dentre os testes moleculares, aqueles baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) constituem modo simples e rápido de caracterizar e diferenciar micro-organismos. Para a análise de similaridade entre isolados bacterianos, destaca-se o *Repetitive Extragenic Palindromic Sequences* (REP), apresentando-se como o mais barato entre os demais métodos, reprodutível em um período relativamente curto, e com alto poder discriminatório para muitos organismos bacterianos (Sabat et al., 2006; Wilson et al., 2009).

A REP-PCR é baseada em padrões de impressões digitais (*fingerprinting*) genômicas para classificar os isolados em análise. Os oligonucleotídeos iniciadores para estas sequências são chamados de *primers* “de consenso”, que amplificam sequências repetitivas distribuídas por todo o genoma (Winn Jr et al., 2008). Esse método permite a avaliação da similaridade entre cepas, pois o tamanho da sequência é específico para cada organismo (Neela et al., 2005).

DNA repetitivos, os quais ocorrem em grandes quantidades em células eucarióticas e frequentemente associados com regiões codificadoras, consiste em regiões homopoliméricas simples de um mesmo tipo de nucleotídeo, ou de um pequeno número de muitas classes multiméricas repetidas. Estas sequências 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 & Brujin, 1998). Em procariontes, inexplicavelmente, começaram a prevalecer em abundância, e desde então sua identificação e análise funcional têm sido estudados. Dados recentes sugerem que alguns desses elementos repetidos podem estar envolvidos na síntese ou catabolismo de DNA e RNA (Tobes & Ramos, 2005), ou para ser o mediador do genoma evolução (Schmidt & Anderson, 2006).

Entre os iniciadores complementares às regiões entre os genes, de sequências altamente conservadas e repetitivas, presentes na maioria das bactérias Gram negativas e em muitas Gram positivas (Lupski & Weinstok, 1992), há três famílias de sequências repetitivas identificadas: a sequência REP de 25 a 40pb, a *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) de 124 a 127pb, e o elemento BOX de 154 pb (Rademaker & Brujin, 1998).

Os fragmentos de DNA podem ser separados por eletroforeses em gel (Winn Jr et al., 2008) e o método *Unweighted pair-group* (UPGMA) é frequentemente utilizado para a análise do perfil de bandas, o qual utiliza médias aritméticas com pesos iguais para cada amostra. Amostras semelhantes são agrupadas (*clusters*) e os agrupamentos são representados graficamente por um dendograma. No dendograma, para cada agrupamento de espécies similares é apresentado o percentual de similaridade entre as amostras, com o respectivo intervalo de confiança, conferindo um modo prático para a análise de relação clonal (Rademaker & Brujin, 1998).

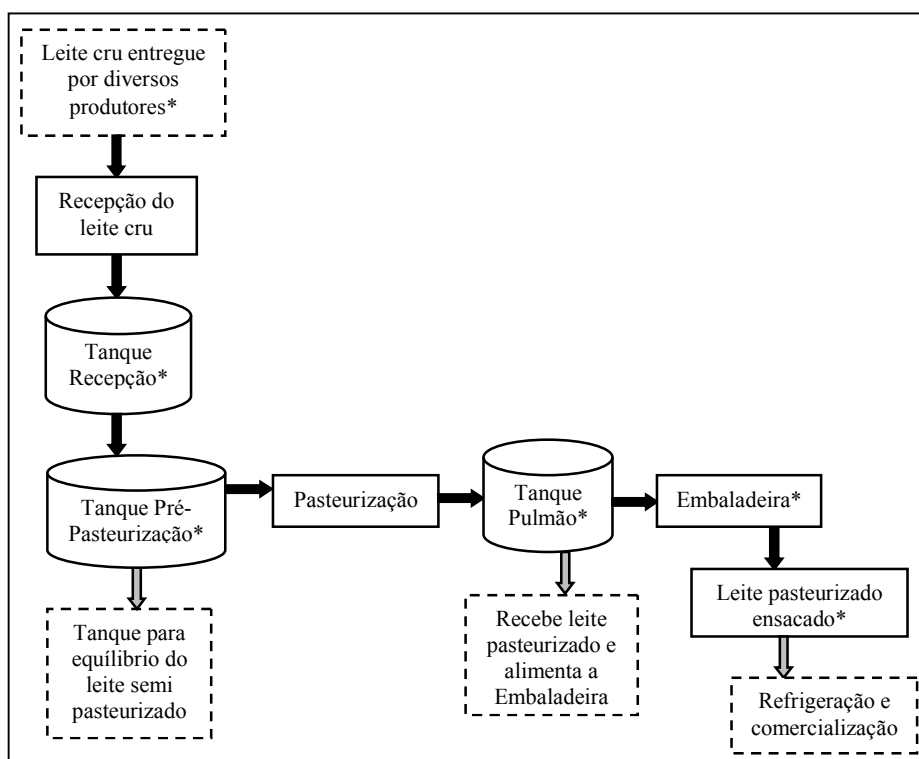
Para a interpretação do percentual da similaridade entre as amostras agrupadas em dendogramas, utiliza-se a definição filogenética de espécies. Nessa definição para agrupar como uma espécie considera-se cepas com aproximadamente 70% ou mais de similaridade em comparação do DNA (Wayne et al., 1987).

A utilização de elementos repetitivos para a análise de genomas bacterianos tem provado ser uma ferramenta poderosa para estudos de ecologia microbiana, microbiologia ambiental, diagnóstico molecular, microbiologia médica e análises epidemiológicas (Ishii & Sadowsky, 2009). Assim sendo, torna-se relevante a aplicação de tipagem molecular em estudos epidemiológicos em casos de elevada contaminação e surtos de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* spp., por sua natureza ubiqüitária, com disseminação facilmente ocorrida entre alimentos, animais, homem, ambiente; para identificação dos fatores de risco e determinação das estratégias de intervenção e planejamento para o controle da sua disseminação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Amostragem

O estudo foi realizado em oito estabelecimentos de beneficiamento de leite credenciados e fiscalizados pela Secretaria Estadual de Agricultura e/ou pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), localizados nos municípios de Amparo, Cabaceiras, Gurjão, Monteiro, Prata, Sumé, São Sebastião do Umbuzeiro e Zabelê, identificadas aleatoriamente (usinas A, B, C, D, E, F, G, H). Considerando o fluxograma de beneficiamento do leite caprino pasteurizado nas usinas (Figura 1), foram colhidas amostras de leite cru em frascos estéreis (50 mL), de leite pasteurizado em sua embalagem e suabes de superfície interna de equipamentos (tanque de recepção, tanque pré-pasteurização, tanque pulmão e embaladeira), suabes de paredes e mãos de manipuladores.



**Figura 1.** Fluxograma de beneficiamento do leite caprino pasteurizado em usinas do Cariri Paraibano.

\* Pontos de coleta do estudo.

Para representação das amostras de superfície, moldes estéreis de 25 cm<sup>2</sup>, serviram para determinar a área a ser amostrada, e com suabes previamente umedecidos em água peptonada tamponada a 0,1%, foram realizadas fricções ao longo deste plano. Para as mãos

dos manipuladores os suabes foram friccionados por toda a superfície das mãos. Posteriormente, os suabes utilizados foram hidratados através de imersão em frascos estéreis contendo 10 mL de água peptonada tamponada (0,1%). Todas as amostras de superfícies foram colhidas antes do processamento do leite iniciar nas usinas. A Figura 2 ilustra os procedimentos de colheita em alguns desses pontos.

O período amostral foi realizado após a realização de cursos breves de reciclagem abordando as Boas Práticas de Fabricação para funcionários em todas as usinas e cinco colheitas mensais (Janeiro a Maio de 2012) em cada uma das usinas, totalizando 40 amostras por estabelecimento e 320 amostras no total.

Todas as amostras foram mantidas em refrigeração e levadas ao Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (LAPOA/CCA/UFPB) para a realização das análises de enumeração de *Staphylococcus* spp. e genotipagem dos isolados por REP-PCR.



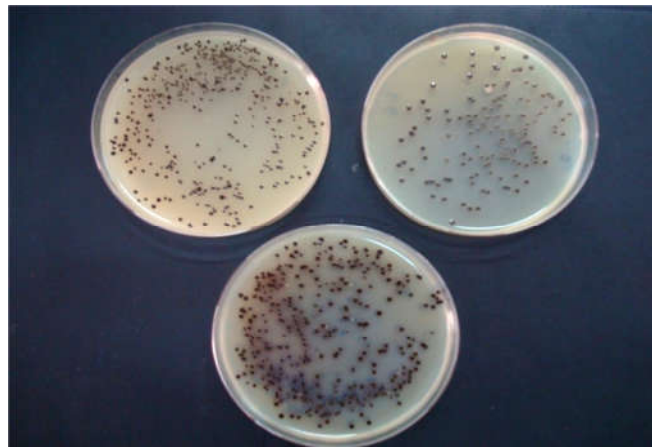
**Figura 2.** Procedimentos de colheita em diferentes pontos do fluxograma do leite caprino pasteurizado em usinas do Cariri Paraibano.

### 3.2. Análises microbiológicas

#### 3.2.1. Enumeração de *Staphylococcus* spp.

A enumeração de *Staphylococcus* foi realizada segundo Bennett e Lancette (2001). As amostras foram homogeneizadas e foram realizadas diluições seriadas (1:10) em água peptonada a 0,1%. Aliquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Baird Parker (BP) (Acumedia<sup>®</sup>, EUA) suplementado com telurito de potássio e gema de ovo, com incubação a 35° C por 24 horas. Colônias típicas do gênero *Staphylococcus* (circulares, negras ou cinzas, brilhantes, convexas com bordas perfeitas, rodeados por zona opaca e/ou halo transparente) (Figura 3) foram quantificadas com auxílio de contador de colônias (Phoenix Lufércio, CP 600). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mL de leite (UFC/mL) para amostras de leite, em unidades formadoras de colônias por cm<sup>2</sup> (UFC/cm<sup>2</sup>) para amostras de superfície e em unidades formadoras de colônias por mão (UFC/mão) para amostras de mãos de manipuladores.

As colônias sugestivas de *Staphylococcus* foram transferidas para ágar BHI e submetidas à verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram, teste da catalase e coagulase em tubo. Amostras com características confirmadas para o gênero foram armazenadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) com 20% de glicerol (Acumedia<sup>®</sup>, EUA) em freezer -80° C para posteriores análises.



**Figura 3.** Colônias típicas de bactérias do gênero *Staphylococcus*.

Fotos: Arquivo pessoal do autor.

### 3.2.2. Genotipagem por REP-PCR

#### 3.2.2.1. Seleção dos isolados

Objetivou-se realizar a genotipagem de pelo menos um isolado de todas as amostras positivas para *Staphylococcus* em cada colheita realizada, sendo assim, foram selecionados 114 isolados, como pode ser visualizado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* spp. submetidos a genotipagem por REP-PCR no estudo.

	Usinas de beneficiamento															
	A		B		C		D		E		F		G		H	
	<i>n</i> <sup>1</sup>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>n</i>	<i>c</i>
<b>LC</b> <sup>2</sup>	1	C3	4	C1 C2 C3 C5	4	C2 C5	5	2 C1 C3 C4 C5	0	-	5	2 C1 C2 C3 C5	0	-	0	-
<b>LP</b>	3	C1 C2 C3	3	C1 2 C3	3	C1 C3 C5	5	C1 C2 2 C4 C5	2	C3 C5	4	C1 C3 C4 C5	3	C2 C4 C5	6	2 C1 C2 C3 C4 C5
<b>TR</b>	0	-	1	C1	0	-	2	C1 C2	0	-	1	C1	1	C3	1	C2
<b>TPP</b>	1	C5	3	C1 C2 C3	2	C1 C2	1	C1	1	C1	1	C2	2	C1 C4	3	C2 C3 C4
<b>TPL</b>	0	-	1	C1	1	C1	2	C1 C3	0	-	0	-	2	C1 C4	0	-
<b>E</b>	4	C1 C2 C3 C4	1	C4	2	C1 C2	3	C1 C2 C3	1	C5	3	C1 C3 C4	2	C1 C3	2	C1 C2
<b>P</b>	2	C1 C3	2	C1 C3	2	C2 C3	1	C1	1	C2	1	C2	1	C2	1	C1
<b>M</b>	2	C1 C5	1	C1	0	-	1	C3	2	C2 C3	1	C5	2	C1 C3	2	C2 C3
<b>Total</b>	13		16		14		20		7		16		13		15	

<sup>1</sup> *n* = quantidade de isolados selecionados por ponto, *c* = ordem da colheita (C1 = Janeiro, C2 = Fevereiro, C3 = Março, C4 = Abril e C5 = Maio);

<sup>2</sup> LC = Leite cru, LP = Leite Pasteurizado, TR = Tanque Recepção, TPP = Tanque Pré-Pasteurização, TPL = Tanque Pulmão, E = Embaladeira, P = Paredes e M = Mão manipulador

#### 3.2.2.2. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada por fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), descrito por Sambrook et al. (1989), com modificações. Culturas bacterianas (1,4 mL) crescidas em caldo infusão de cérebro e

coração (BHI) foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* obtido foram adicionados 500 µL de tampão TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8, 1mM de EDTA), 10 µL de lisozima (10 mg/mL) (USB Corporation, EUA) e 10 µL de proteinase K (5 mg/mL) (BioLabs<sup>®</sup>, EUA), para lise da parede celular. A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada a 60° C *overnight*.

Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão STE (2,5% SDS, 10mM Tris-HCl, pH 8, 0,25M EDTA) com incubação a 60° C por 15 minutos, para solubilização dos lipídios. A solução foi mantida em repouso a temperatura ambiente e em gelo durante 5 minutos (cada). Adicionou-se 130 µL de acetato de amônio (7,5 M) (Amresco<sup>®</sup>, EUA), com incubação em gelo por 15 minutos, neutralizando a reação.

Sequencialmente, a solução foi centrifugada em rotação supracitada por 5 minutos, com sobrenadante ( $\pm$  700µL) transferido para novo tubo (1,5 mL) e a este adicionado volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Sigma-Aldrich, EUA), sendo novamente centrifugado por 5 minutos. O fenol:clorofórmio precipita as proteínas, revelando-as na interface entre as fases orgânica e aquosa.

O sobrenadante ou fase aquosa (onde se encontra os ácidos nucléicos) ( $\pm$ 400 µL) foi transferido para um novo tubo (1,5 mL, livre de RNase e DNase) e a este adicionado 420 µL de Etanol absoluto gelado (Amresco<sup>®</sup>, EUA), com incubação a -20° C por 24 horas para precipitação do DNA extraído.

Após 24 horas, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante descartado. O pellet (translúcido) foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspendido em 30 µL de água (deionizada e autoclavada), com incubação a -20° C por 24 horas. Por fim, o DNA genômico extraído foi avaliado qualitativa e quantitativamente por espectrofotometria, através do uso de biofotômetro (Biophotometer Plus, Eppendorf<sup>®</sup>, Alemanha).

Admitiram-se limites de quantidades de DNA acima de 300 ng/µL e absorbâncias ( $A_{260/280}$ ) entre 1,7 a 1,9. Para realização das análises moleculares seguintes foi realizada uma padronização de DNA para 50 ng/µL em 40 µL de água (destilada, deionizada e autoclavada).

### **3.2.2.3. Amplificação**

A reação de amplificação para a REP-PCR foi realizada segundo protocolo descrito por Van Der Zee et al. (1999), com modificações. Preparou-se reação com volume total de

25 µL, contendo tampão (x1), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), dNTPs (200 µM de cada), primer RW3A (5'-TCG CTC AAA ACA ACG ACA CC-3') (1 pmol), *Taq* DNA polimerase (1U), água (deionizada, destilada e autoclavada) e DNA alvo.

A mistura reacional foi incubada em Termociclador (TPersonal Thermocycler, Biometra<sup>®</sup>, Alemanha) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 50° C por 1 minuto e polimerização a 72° C por 2 minutos) e extensão final a 72° C por 5 minutos.

Os *amplicons* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Gel Red (Biotium, EUA) e visualizados com auxílio de transiluminador em UV (Carestream Molecular Imaging Software - Version 5.0, ©Carestream Health, Inc, EUA). O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por comparação com um padrão de massa molecular de 100 pb e 1 kb (Ludwig Biotec, Brasil). Como controle positivo foi utilizado cepa padrão ATCC 25923 *S. aureus*.

### 3.3. Análise dos dados

Os dados microbiológicos foram logaritmicamente (log<sub>10</sub>) transformados e analisados utilizando-se estatística descritiva convencional através da qual foram determinados valores médios e desvio padrão, com o uso de planilha eletrônica (Microsoft Excel<sup>®</sup>).

Com relação à genotipagem, a similaridade entre as cepas de *Staphylococcus* spp. foi determinada com base na presença e ausência de bandas no gel, com imagens processadas pelo software BioNumerics<sup>®</sup> (Versão 7.1, Applied Maths, Bélgica). Para expressão da similaridade entre os diferentes genótipos, utilizou-se coeficiente de Dice (2% de tolerância) e construção de dendograma através da obtenção das médias aritméticas de grupos em pares de dados combinados (UPGMA), onde diferentes *clusters* foram determinados automaticamente pelo software utilizando coeficiente de Correlação Ponto Bisseriado. Controles internos foram utilizados: isolados de infecções nosocomiais de humanos (secreção de pele) (n=1) e isolado de nasal suíno (n=1).

Adicionalmente, o poder discriminatório da REP-PCR foi avaliado pelo cálculo do valor *D*, conforme previamente descrito por Hunter e Gaston (1988).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da contagem média de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de cabra cru de diferentes usinas do Cariri Paraibano. Para amostras de leite cru as contagens de *Staphylococcus* spp. variaram de 3,94 a 5,93 log UFC/mL, com valor médio entre as usinas de 5,18 log UFC/mL ( $> 10^5$  UFC/mL). Valores similares foram encontrados por Oliveira et al. (2011<sup>a</sup>), Sousa et al. (2009) e Monte et al. (2009) na mesma região, relatando contagens médias que variaram entre 5 a 7 log UFC/mL.

Em outras regiões brasileiras (Picoli et al., 2006; Gottardi et al., 2008; Sobrinho et al., 2012) assim como em outros países (Muehlherr et al., 2003; Cupáková et al., 2012; Suguna et al., 2012) pode-se verificar níveis de contaminação estafilocócica em leite de cabra cru inferiores aos encontrados neste estudo, sendo relatadas contagens menores que 4 log UFC/mL. Para tanto, em leite bovino na mesma região avaliada foram encontradas contagens médias de *Staphylococcus* spp. de 3,99 log UFC/mL (Oliveira et al., 2011<sup>b</sup>).

Os valores elevados de *Staphylococcus* spp. encontrados em leite cru neste estudo podem estar relacionados aos seguintes fatores: condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dos locais de ordenha, maus hábitos dos ordenhadores ou ainda com a ocorrência de mastite nos rebanhos, bem como o transporte do leite até a usina de beneficiamento, levando a uma maior ou menor contaminação do leite por micro-organismo.

**Tabela 2.** Valores médios da contagem de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de cabra cru de oito diferentes usinas de beneficiamento no Cariri Paraibano, no período de janeiro a maio de 2012.

Ponto de coleta <sup>1</sup>	Usinas de beneficiamento								Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	
Leite cru	5,60	5,93	3,94	5,73	NHC <sup>2</sup>	4,68	NHC	NHC	5,18
		±0,38	±2,56	±0,45		±1,11			±0,69

<sup>1</sup> Dados expressos em log UFC/mL com valor de desvio padrão (±). Na usina A o desvio padrão não foi reportado devido à presença de apenas uma coleta.

<sup>2</sup> NHC: não houve coleta por falta de matéria prima no momento da coleta.

As contagens médias de *Staphylococcus* spp. em amostras de superfície de diferentes pontos do processamento do leite caprino estão expressos na Tabela 3. Considerando os pontos de superfície anteriores a pasteurização não se obteve detecção de *Staphylococcus* spp. nas amostras de tanque recepção em três usinas (A, C e E) durante as cinco colheitas

realizadas, mostrando a eficiência dos procedimentos de limpeza e desinfecção realizados nessas usinas, apesar do tanque recepção receber leite cru com alta contaminação. Logo, a menor média de contaminação (0,65 log UFC/cm<sup>2</sup>) por *Staphylococcus* spp. entre os pontos de superfície investigados foi no tanque recepção. Os valores reportados no presente estudo são ainda inferiores a 8,23 log UFC/cm<sup>2</sup>, valor registrado em tanque de recepção de leite bovino no Sul do país (Guido et al., 2010).

Por outro lado, a maior contaminação observada (1,93 log UFC/cm<sup>2</sup>) em tanque recepção deu-se na usina D, sendo a segunda maior contagem de *Staphylococcus* spp. nesta usina, podendo vir a ter alguma importância como via de contaminação no produto final. Assim sendo, enquanto que em geral as usinas apresentaram baixa contaminação no tanque recepção, isso não foi observado em algumas usinas, sugerindo haver fatores intrínsecos a cada usina que determinam o perfil de contaminação por *Staphylococcus* spp. em seus equipamentos.

**Tabela 3.** Valores médios da contagem de *Staphylococcus* spp. em amostras de superfície interna de diferentes pontos do processamento do leite de cabra pasteurizado no Cariri Paraibano de oito diferentes usinas de beneficiamento no Cariri Paraibano, no período de janeiro a maio de 2012.

Ponto de coleta <sup>1</sup>	Usinas de beneficiamento								Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	
<b>Tanque Recepção</b>	0	0,65	0	1,93	0	0,83	0,80	1	0,65
		±0,98		±1,28		±1,10	±1,28	±1,50	±0,49
<b>Tanque Pré-Pasteurização</b>	1,31	2,29	1,24	0,97	0,93	1	2,30	2,35	1,55
	±2,10	±1,83	±1,48	±1,54	±1,49	±1,50	±2,76	±1,88	±0,57
<b>Tanque Pulmão</b>	0	1,56	1,13	2,49	0	0	2,33	0	0,94
		±1,56	±1,69	±2,99			±1,86		±0,94
<b>Embaladeira</b>	2,60	1	1,36	1,38	0,46	2,70	1,83	1,89	1,65
	±1,16	±1,50	±1,63	±1,10	±0,74	±1,35	±2,19	±2,27	±0,60
<b>Mão Manipulador</b>	1,22	0,69	0	0,40	1,22	0,90	1,39	1,20	0,88
	±1,47	±1,04		±0,64	±1,47	±1,43	±1,67	±1,44	±0,39
<b>Paredes</b>	1,70	0,96	1,20	0,69	1	0,80	0,40	1,86	1,08
	±2,04	±1,15	±1,44	±1,11	±1,50	±1,28	±0,64	±1,49	±0,38

<sup>1</sup> Dados expressos em log UFC/cm<sup>2</sup> com valor de desvio padrão (±), exceto amostras referentes ao ponto Mão Manipulador, sendo expressas em log UFC/mão.

O tanque pré-pasteurização por sua vez, apresentou a segunda maior média de contagens de *Staphylococcus* spp. (1,55 log UFC/cm<sup>2</sup>) entre os pontos de superfície

investigados, mostrando deficiências no processo de higienização nas usinas, possivelmente devido a concepções equivocadas em relação a sua importância.

Nos pontos de superfície após a realização da pasteurização, o tanque pulmão apresentou a menor contaminação por *Staphylococcus* spp. (0,94 log UFC/cm<sup>2</sup>), sendo observada a ausência de contagens em quatro (50%) usinas durante todas as colheitas. Porém, as contaminações obtidas nas usinas B, C, D e G foram elevadas (1,13 a 2,49 log UFC/cm<sup>2</sup>), sugerindo haver diferenças entre os procedimentos de limpeza e desinfecção no tanque pós-pasteurização entre as usinas estudadas. Em vista disso, assim como observado em outros pontos supracitados, fatores individuais em cada usina contribuem para que ocorram diferenças nos perfis de contaminação durante o beneficiamento do leite caprino.

Elevada contaminação por *Staphylococcus* spp. foi observada em embaladeira de todas as usinas, correspondendo a maior média (1,65 log UFC/cm<sup>2</sup>) dentre todos os pontos de superfície investigados. Nas usinas A, E e H onde o ponto que antecede a embaladeira apresenta ausência de contaminação por *Staphylococcus* spp., e nas usinas C e F onde embaladeira apresentou contagens superiores em relação aos demais pontos, verifica-se que a contaminação residual neste equipamento pode representar um fator chave na recontaminação do leite pasteurizado por micro-organismos do gênero *Staphylococcus*. De forma similar, Guido et al. (2010) relataram a embaladeira como o principal foco de contaminação do leite bovino pasteurizado.

A dificuldade de higienização em embaladeiras nas usinas pode ser uma possível explicação para a elevada contaminação por *Staphylococcus* spp. nas usinas investigadas, uma vez que o equipamento por não possuir fácil acesso, permite a retenção de resíduos orgânicos e incrustações, podendo haver retenção e proliferação de micro-organismos. Ainda, é possível que a formação de biofilmes por parte desses micro-organismos esteja ocorrendo nas usinas, aumentando assim as chances de contaminação cruzada e dificultando o processo de limpeza. Segundo Aarnisalo et al. (2006), uma causa comum de problemas de higiene em equipamentos se refere ao mal planejamento de seus componentes em termos de facilidade de limpeza e desinfecção.

Exceto na usina C, amostras positivas dos manipuladores para *Staphylococcus* spp. foram detectadas em todas as usinas, apresentando contagem média de 0,88 log UFC/mão. Desta forma, como as médias representam cinco colheitas realizadas em períodos diferentes e bactérias do gênero *Staphylococcus* são comumente encontradas nas mãos de

humanos, é importante salientar que os resultados indicam elevada higiene pessoal por parte dos funcionários nessa usina. Em contrapartida, nas usinas A, E, G e H foram observadas contagens elevadas de *Staphylococcus* spp. em mãos de manipuladores, representando importante fonte de disseminação de micro-organismos deste gênero no ambiente de beneficiamento do leite de cabra através de contaminações cruzadas. Conforme Pereira et al. (1999) contaminações estafilocócicas em alimentos por manipuladores representam eminente risco ao consumidor, evidenciando a atenção para a higiene pessoal e lavagem de suas mãos antes da manipulação.

Todas as usinas apresentaram contagens elevadas de *Staphylococcus* spp. em amostras de superfície de paredes, representando a terceira maior contagem média (1,08 log UFC/cm<sup>2</sup>) entre os pontos investigados. Os resultados revelam possíveis deficiências ou mesmo ausência de limpeza da infraestrutura nas usinas, possivelmente devido a concepções errôneas de sua importância no fluxo do beneficiamento do leite.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da contagem média de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de cabra pasteurizado de diferentes usinas do Cariri Paraibano. No leite pasteurizado as contagens médias de *Staphylococcus* spp. entre as usinas foi de 2,85 log UFC/mL, assinalando o efeito da pasteurização, capaz de reduzir a população de micro-organismos presente. Porém, apesar da redução nas contagens de *Staphylococcus* spp., através de uma análise individualizada é possível observar cinco (62,5%) usinas que apresentaram contagens maiores que 3 log UFC/mL (>10<sup>3</sup> UFC/mL). As contagens de *Staphylococcus* spp. em leite caprino pasteurizado foram elevadas na região, conforme já descrito por Sousa et al. (2009) e Monte et al. (2009). A elevada carga de *Staphylococcus* spp. encontrada no leite pasteurizado pode estar relacionada a uma também elevada carga microbiana no leite cru, revelando contagens de *Staphylococcus* spp. ainda significantes no produto pós-tratamento térmico. Segundo Feniman (2003) quando a carga microbiana inicial do leite é elevada, os processos de beneficiamento e industrialização, geralmente, não são eficientes para a destruição dos micro-organismos deteriorantes e patogênicos.

Os valores reportados no presente estudo são superiores aqueles descritos em outras regiões do Brasil (Picoli et al., 2006; Vittori et al., 2008; Santos et al., 2012), e ainda maiores aos encontrados em leite bovino pasteurizado (Borges et al., 2008; Salvador et al., 2012). Embora a legislação brasileira em vigor que qualifica o leite de cabra cru ou pasteurizado (IN nº37) não estabeleça valores de referência para contagens de

*Staphylococcus* spp., verifica-se que os valores encontrados são excessivos em relação a outros países (Cupáková et al., 2012).

**Tabela 4.** Valores médios da contagem de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de cabra pasteurizado de oito diferentes usinas de beneficiamento no Cariri Paraibano, no período de janeiro a maio de 2012.

Ponto de coleta <sup>1</sup>	Usinas de beneficiamento								Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	
<b>Leite pasteurizado</b>	3,05	1,76	3,36	3,35	1,52	3,45	2,17	4,17	2,85
	±1,47	±0,98	±1,34	±1,34	±0,76	±1,02	±1,79	±0,33	±0,78

<sup>1</sup> Dados expressos em log UFC/mL com valor de desvio padrão (±).

Sabe-se que o gênero *Staphylococcus* é bastante sensível às temperaturas de pasteurização (Nader Filho, 1994), no entanto, é observado que os valores deste micro-organismo em amostras de leite pasteurizado permaneceram elevados. Em especial, a usina C apresentou diferença irrelevante (0,58 log UFC/mL) entre as contagens de *Staphylococcus* spp. em leite cru e leite pasteurizado.

Logo, investigando o processo de pasteurização nas usinas estudadas foi possível observar ineficiência no processo de pasteurização por aplicação incorreta do binômio tempo-temperatura em cinco usinas (62,5%) (usinas B, C, F, G e H), com ocorrência de pelo menos uma vez durante as cinco colheitas realizadas. Apesar disso, não houve relação entre a presença da negligência à maior contagem de *Staphylococcus* spp. no leite pasteurizado, implicando dizer que possivelmente ocorreu uma contaminação após o tratamento térmico. De forma similar, Silva et al. (2010) não encontraram associação entre falhas na pasteurização e parâmetros microbiológicos do leite bovino pasteurizado, evidenciando a contaminação residual e contaminação cruzada nos processos pós-pasteurização a contribuir para a elevação das contagens de *Staphylococcus* spp. no leite após o tratamento térmico.

De acordo com Breurec et al. (2010), a qualidade insatisfatória de leite pasteurizado é consequência da má qualidade do leite cru utilizado e/ou um alto nível de recontaminação nos processos após o tratamento térmico, basicamente, através de equipamentos com deficiente sanificação.

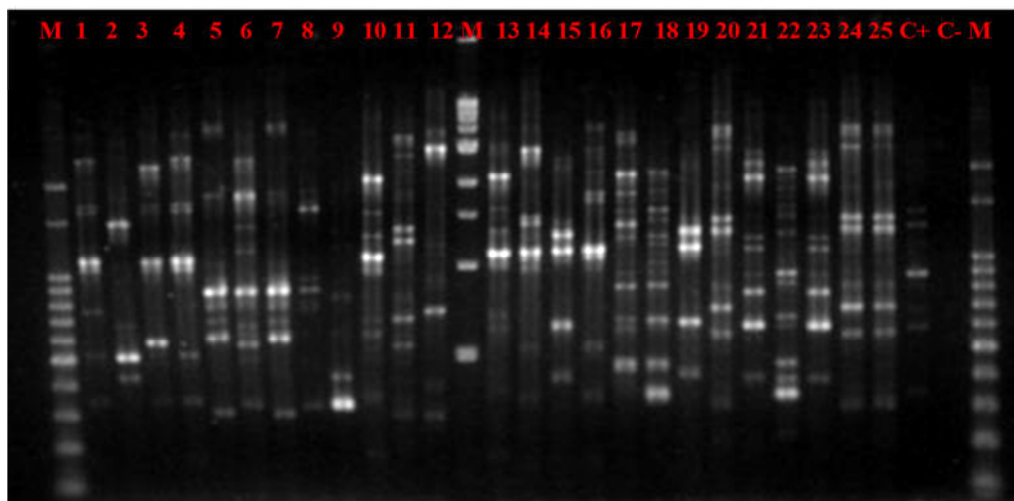
A presença de *Staphylococcus* em alimentos é de grande importância, principalmente os de coagulase positivo (SCP), que a partir de contagens de  $10^5$  UFC/mL ou g (5 log UFC/mL ou g) nos alimentos, podem produzir enterotoxinas termoestáveis (Cardoso et al., 1985). No entanto, no presente estudo uma grande parcela de colônias típicas e atípicas

foi confirmada como *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), sendo as SCP oriundas apenas de amostras de leite.

Para SCP foram positivas seis (24% de 25 amostras totais colhidas) amostras provenientes de leite cru e quatro (10% de 40 amostras totais colhidas) de leite pasteurizado. Esse resultado pode estar relacionado com o fato de serem os SCN os agentes mais encontrados na glândula mamária dos caprinos (Contreras et al., 1997; Murici et al., 2002). Porém, esta prevalência de SCN em amostras de leite pasteurizado, aquele destinado ao consumo, bem como em sua linha de produção pode representar um risco em potencial de produção de enterotoxinas, uma vez que, estes podem ser capazes de produzir enterotoxinas (Lyra et al., 2013).

A Figura 4 ilustra alguns perfis genotípicos de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos através da REP-PCR no presente estudo. Utilizando o *primer* RW3A, a REP-PCR gerou produtos de amplificação que variaram de 200 a 4.000 pares de bases (pb). O método apresentou elevado poder discriminatório ( $D = 0,99$ ) para *Staphylococcus* spp., corroborando estudos já realizados com esse método (Reinoso et al., 2007; Reinoso et al., 2008; Babouee et al., 2011; Giarola et al., 2012).

Os dendogramas gerados a partir da análise de similaridade genética de *Staphylococcus* spp. isolados de diferentes pontos do processamento do leite caprino pasteurizado nas usinas investigadas, em diferentes períodos são apresentados nas Figuras 5 e 6.



**Figura 4.** Gel de agarose com produtos de REP-PCR gerados a partir de *Staphylococcus* spp. isolados de diferentes pontos em usinas de processamento do leite de cabra pasteurizado no Cariri Paraibano. (M: marcador molecular; 1 a 25: amostras; C+ e C-: controle positivo – ATCC 25923 *S. aureus* e controle negativo).

De maneira geral, *Staphylococcus* spp. provenientes do leite pasteurizado apresentaram perfil genotípico similar a isolados de equipamentos e de mãos de manipuladores nas usinas investigadas. Contudo, a análise individualizada por usinas permitiu a identificação de possíveis vias de contaminação do leite durante seu processamento e, que de fato, os resultados da avaliação molecular reforçaram as hipóteses de contaminação levantadas na análise microbiológica quantitativa.

Foi observado perfil genotípico idêntico de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos isolados de embaladeira e do leite pasteurizado na usina F (Figura 6), em períodos diferentes de colheita, demonstrando a importância da contaminação residual, uma vez que não havia sido detectado *Staphylococcus* spp. em equipamento anterior (Tabela 3). Em paralelo, na usina A (Figura 5), *Staphylococcus* spp. isolados da embaladeira apresentaram perfis genotípicos indistinguíveis em diferentes colheitas. Esse resultado ressalta a presença de contaminação residual nesse equipamento na usina A, corroborando elevada contagem de *Staphylococcus* spp. na embaladeira nesta mesma usina (Tabela 3), onde não havia sido detectado este micro-organismo no tanque após a pasteurização (tanque pulmão).

Elevada similaridade genotípica de *Staphylococcus* spp. obtidos da embaladeira e de outros equipamentos foram observados na maioria das usinas. Na usina C (Figura 5) e na usina G (Figura 6), foram detectados perfis indistinguíveis entre *Staphylococcus* spp. isolados de tanque pulmão e da embaladeira, indicando possível contaminação deste último ponto por micro-organismos presentes nos equipamentos que antecedem o processo. Da mesma forma, a presença de perfis genotípicos idênticos também foi observada entre *Staphylococcus* spp. isolados do tanque pré-pasteurização e da embaladeira (usina H).

Na usina G, a qual havia apresentado elevada contaminação estafilocócica residual no tanque pré-pasteurização, pode-se observar *Staphylococcus* spp. de genótipos indistinguíveis oriundos desse mesmo tanque e do leite pasteurizado, em mesma coleta. Esta situação reforça que a contaminação residual possa representar, efetivamente, um problema-chave na qualidade do leite beneficiado nas usinas do Cariri Paraibano. Kells e Gilmour (2004) enfatizam a provável produção de biofilmes pelos micro-organismos presentes no ambiente do laticínio, uma vez que, estes podem ser protegidos por sólidos de leite, com permanência e proliferação durante as etapas do processamento do leite. Neste sentido, estudos com o objetivo de avaliar a sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados no ambiente de beneficiamento do leite frente à sanificantes utilizados nas usinas

investigadas faz-se necessário, bem como, apresentar substâncias alternativas para o processo de desinfecção.

Inversamente a avaliação quantitativa, os resultados de genotipagem indicam que os problemas de qualidade do leite podem estar associados a falhas no processo de pasteurização, como observado nas usinas C e D (Figura 5), onde *Staphylococcus* spp. isolados de leite pasteurizado apresentaram 100% de similaridade genética com isolados de *Staphylococcus* spp. de leite cru.

Além da importância da contaminação residual, os resultados da genotipagem também indicam que a higiene do manipulador desempenha papel importante na qualidade e na segurança do leite beneficiado nas usinas, uma vez, que perfis genotípicos indistinguíveis foram observados entre *Staphylococcus* spp. coagulase negativos do leite pasteurizado e da mão de manipulador na usina H (Figura 6). Porém, considerando que durante o processamento, o leite não é manipulado diretamente pelos funcionários, é possível que, nessa usina, condições deficientes de higiene pessoal possam contribuir para a contaminação do produto através de equipamentos. De fato, nessa mesma usina, foram obtidos genótipos indistinguíveis de *Staphylococcus* spp. colhidos da mão de manipuladores e do tanque de recepção (Figura 6).

Similarmente, genótipos indistinguíveis de *Staphylococcus* spp. colhidos da mão de manipuladores, da embaladeira e das paredes foram observados na usina A (Figura 5) e na usina G (Figura 6). Além disso, um resultado mais relevante e que reforça ainda mais a importância da higiene do manipulador é o fato de ter sido identificada elevada similaridade genotípica entre *Staphylococcus* spp. isolados da embaladeira (usinas A e D) ou mesmo do leite (usina B) com cepa de *Staphylococcus* spp. colhida de lesão de pele em humanos obtida de isolamento clínico em hospital do Estado.

Em síntese, os resultados do presente estudo demonstraram haver elevada similaridade entre *Staphylococcus* spp. colhidos em leite pasteurizado e aqueles obtidos de equipamentos e mãos de manipuladores nas usinas investigadas, o que corrobora os resultados obtidos através da microbiologia convencional e demonstra a importância dos procedimentos de higiene no beneficiamento de leite caprino em usinas na região do Cariri Paraibano. A forma de higienizar os equipamentos na indústria de alimentos é também fundamental, favorecendo a contaminação cruzada entre funcionários e equipamentos, dado que, Santana et al. (2001) observaram elevadas contagens de mesófilos em amostras de superfície de tanques de expansão em propriedades em que a higienização era realizada

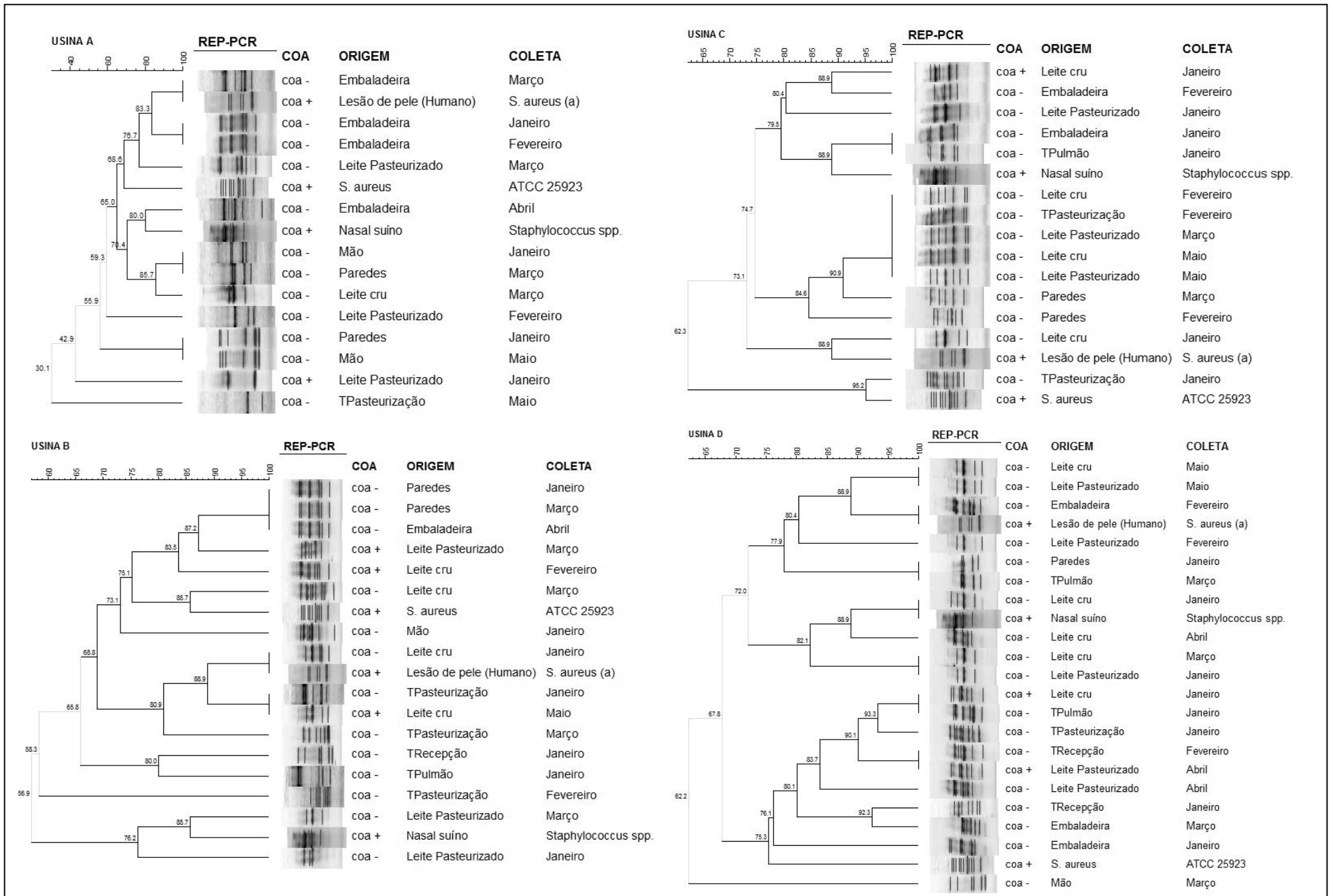
manualmente e não automatizada. A água residual em equipamentos proveniente da higienização torna-se também de importância relevante, criando ambiente favorável para o crescimento de micro-organismos deteriorantes. Conforme Bramley e McKinnon (1990), pelo menos 10% do total de bactérias do leite são oriundas da água residual dos equipamentos.

É evidente que os cuidados para garantir um produto final de qualidade e de segurança devem ser tomados de forma integrada, desde a obtenção da matéria prima, durante o processamento industrial até sua distribuição e comercialização (Forsythe, 2002). Faz-se necessário, portanto, a reavaliação nas Boas Práticas de Fabricação (BPF) desde a obtenção da matéria prima até o produto final nas usinas no Cariri Paraibano, a fim de definir um planejamento de ações corretivas, como orientação dos manipuladores, adoção de protocolos de higienização, bem como, estudos sobre substâncias sanificantes alternativas.

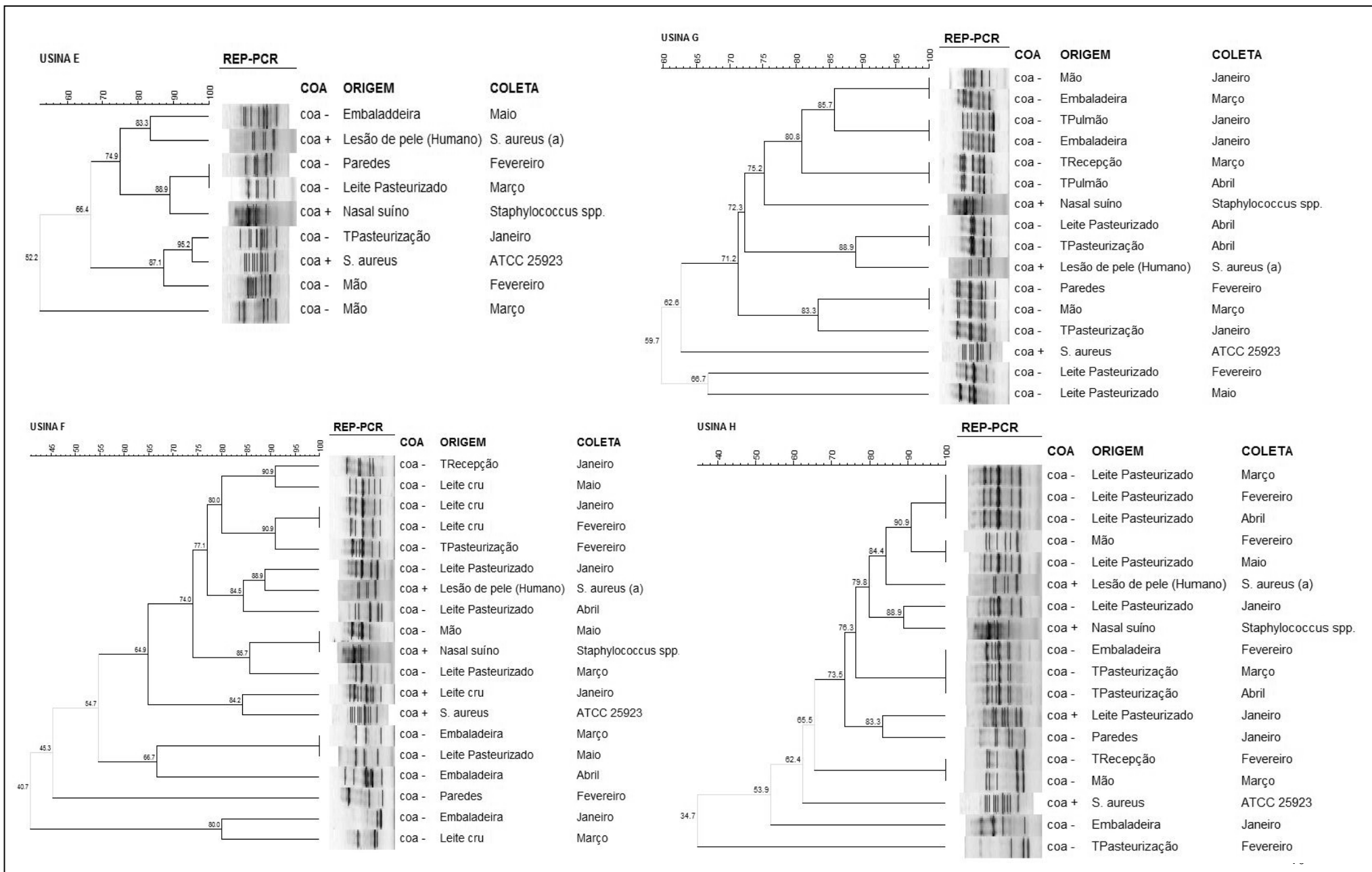
Para tanto, é imprescindível o comprometimento da direção e funcionários nessas usinas com propósito de melhorar a qualidade do leite de cabra pasteurizado garantindo segurança alimentar ao consumidor. Uma vez que, o leite é destinado à diminuição da desnutrição, com prioridade ao atendimento de crianças de 6 a 36 meses de idade, pertencentes a famílias com renda baixa no Estado da Paraíba, torna-se ainda mais pertinente a transformação da situação encontrada no presente estudo.

Por fim, o poder discriminatório da REP-PCR, a rapidez e seu baixo custo, demonstraram que o método pode ser útil na avaliação epidemiológica da contaminação estafilocócica em usinas de leite. Conclusão semelhante havia sido reportada por Olivindo et al. (2009), utilizando a técnica REP-PCR no monitoramento da contaminação por *Staphylococcus aureus* em diferentes pontos do processo de ordenha.

Na literatura, diversos autores (Deplano et al., 2000; Amorim et al., 2002; Chapaval et al., 2006; Reinoso et al., 2008; Olivindo et al., 2009; Babouee et al., 2011; Giarola et al., 2012; Mørk et al., 2012; Sabat et al. 2013) fazendo uso da técnica de REP-PCR entre outras técnicas de tipagem molecular para identificar cepas epidêmicas entre isolados do gênero *Staphylococcus* relatam a importância da aplicação e desenvolvimento de metodologias de tipagem moleculares rápidas e precisas na identificação da fonte de contaminação e disseminação de doenças infecciosas.



**Figura 5.** Dendrogramas gerados a partir dos dados de tipagem de *Staphylococcus* spp. isolados de diferentes pontos do processamento do leite de cabra pasteurizado em diferentes usinas no Cariri Paraibano. Os números no eixo *x* indicam a similaridade genética gerada a partir do coeficiente de Dice (2% de tolerância).



**Figura 6.** Dendrogramas gerados a partir dos dados de tipagem de *Staphylococcus* spp. isolados de diferentes pontos do processamento do leite de cabra pasteurizado em diferentes usinas no Cariri Paraibano. Os números no eixo x indicam a similaridade genética gerada a partir do coeficiente de Dice (2% de tolerância).

## 5. CONCLUSÕES

O leite caprino produzido na região, o qual é entregue às usinas investigadas para processamento, apresentam elevada contaminação por *Staphylococcus* spp., havendo a necessidade de conscientização de produtores no momento da ordenha e transporte até o estabelecimento processador.

Do mesmo modo, o leite de cabra após o tratamento térmico apresentou ainda contagens significantes de *Staphylococcus* spp., mostrando a comercialização de produtos com qualidade indesejada na região, evidenciando falhas no processamento do leite pasteurizado nas usinas, procedentes de negligências na realização da pasteurização e/ou recontaminação pós-pasteurização.

As usinas de beneficiamento de leite caprino no Cariri Paraibano apresentam elevado índice de contaminação por *Staphylococcus* spp., difundida em todo o ambiente da usina nos equipamentos durante o processamento do leite pasteurizado e mãos de manipuladores, determinando focos de contaminação durante o processamento do leite.

A análise de similaridade através da técnica REP-PCR de isolados de *Staphylococcus* spp. de diferentes pontos do processamento do leite de cabra nas usinas revelou genótipos de isolados de amostras de leite e equipamentos, bem como de mãos de manipuladores, estreitamente relacionados entre si. Esses resultados asseguram a incidência de contaminação residual e cruzada nas usinas do Cariri Paraibano.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante do que foi exposto, torna-se necessário a reavaliação na execução de Boas Práticas de Fabricação nas usinas de beneficiamento, retificando procedimentos de limpeza e desinfecção de equipamentos e ambiente de trabalho, com orientação adequada de manipuladores e funcionários.

Estudos futuros são indispensáveis para que haja elucidação do potencial patogênico de *Staphylococcus* spp. isolados neste estudo, dando suporte para o planejamento de ações eficazes na prevenção e controle de patógenos zoonóticos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARNISALO, K.; TALLAVAARA, K.; WIRTANEN, G.; MAIJALA, R.; RAASKA, L.  
The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. **Journal Food Control**, v. 17, p. 1001–1011, 2006.
- AJZENTAL, A.; RICCETTI, R. V.; KRUTMAN, F. K. Influência da taxa de contaminação inicial do leite sobre o resultado da pasteurização. **Revista Leite e Derivados**, v. 5, n. 29, p. 41-54, 1996.
- AMORIM, M. L.; SOUSA, M. A.; SANCHES, I. S.; SÁ-LEÃO, R.; CABEDA, J. M.; AMORIM, J. M.; LENCASTRE, H. Clonal and Antibiotic Resistance Profiles of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from a Portuguese Hospital over Time. **Journal Microbial Drug Resistance**, v. 8, n. 4, 2002.
- ÂNGELO, F. F. **Detecção de genes de exotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru refrigerado e de leite de vacas com mastite**. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.
- BABOUEE, B.; FREI, R.; SCHULTHEISS, E.; WIDMER, A. F.; GOLDENBERGER, D. Comparison of the DiversiLab Repetitive Element PCR system with *spa*Typing and Pulsed-Field Gel electrophoresis for clonal characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1549-1555, 2011.
- BANDEIRA, D. A. *et al.* Características de produção da caprinocultura leiteira na região do cariri na Paraíba. **Revista Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 10, n. 1, p. 29-35, 2007.
- BELTRÃO FILHO, E. M.; COSTA, R. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MEDEIROS, A. N.; OLIVEIRA, C. J. B.; ROCHA, J. K. P.; SANTOS, J. G. Avaliação higiênico-sanitária do leite de cabra comercializado no estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.4, p. 672-679, 2008.
- BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: Food drug administration. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Gaithersburg: FDA, cap.12, p.12.1-12, 2001.
- BORGES, M. F.; NASSAU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das

- condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Revista Ciência Rural**, v. 38, n. 5, 2008.
- BRAMLEY, A.J.; McKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. **In:** ROBINSON, R.K. Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk - 2.ed. Elsevier Science Ltda, p.163-207, 1990.
- BRASIL, 2013. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em: <[www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)>. Acesso em, 26 de agosto de 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa N°37 de 31 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 de novembro de 2000.
- BREUREC, S.C.; POUEME, R.; FALL, C.; TALL, A.; DIAWARA, A.; BADA-ALAMBEDJI, R.; BROUTIN, C.; LECLERCQ, A.; GARIN, B. Microbiological Quality of Milk from Small Processing Units in Senegal. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 5, 2010.
- CARDOSO, V.M.; SILVA, G.G.; CANO, V. Contagem de microorganismos. **In:** Análise Microbiológica de Alimentos. Rio de Janeiro, Quimitra, p. 20-27. 1985.
- CARRETTO, E.; BARBARINI, D.; COUTO, I.; DE VITIS, D.; MARONE, P.; VERHOEF, J.; DE LENCASTRE, H.; BRISSE, S. Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 177-184, 2005.
- 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. **Brazil Journal Veterinary Research animal Science** , v. 43, n. 3, p. 309-320, 2006.
- CONTRERAS, A. et al. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 11, p. 2815-2819, 1997.
- CORDEIRO, P .R.C.; CORDEIRO, A.G .P .C. A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu mercado. Leite de Cabra no Brasil, seu mercado, comercialização e produção. In: X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Media Mogiana Espírito Santo do Pinhal. **Anais...** Minas Gerais, 2009.
- COSTA, C. D. R. S. **Importância de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas em alimentos**. 34 f. Monografia – Especialização em Microbiologia (Pós-graduação

- em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.
- CUPÁKOVÁ, Š.; POSPÍŠILOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R.; JANŠTOVÁ, B.; VORLOVÁ, L. Microbiological quality and safety of goat's milk from one farm. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 4, n. 6, 2012.
- DEPLANO, A.; SCHUERMANS, A.; VAN ELDERE, J.; WITTE, W.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; GRUNDMANN, H. et al. Multicenter Evaluation of Epidemiological Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains by Repetitive-Element PCR Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, 2000.
- DESTRO, M. T. **Listeria monocytogenes em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado**. 142 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1995.
- FAOSTAT – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO [2011]. FAOSTAT – FAO Statistics Division/ProdSTAT: livestock (primary and processed) Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/569/Desktopdefault.aspx?pageID=569>> Acesso em: 02/08/2013.
- FENIMAN, C.M.; PASINI, G.; MUCELIN, C.A. Avaliação Microbiológica do Leite Pasteurizado Tipo “C”, Comercializado no município de Medianeira, PR. **Higiene Alimentar**, v.17, n.10, p.77-86, 2003.
- FONSECA, L. F. L. **Qualidade do leite e controle de mastite**. 2ª edição. São Paulo: Lemos Editorial, p.175, 2001.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: ArtMed Editora, p. 424, 2002.
- GARCIA, C. A.; SILVA, N. R.; LUQUETTI, B. C.; MARTINS, I. P.; SILVA, R. T.; VIEIRA, R. C. Influencia do ozônio sobre a microbiota do leite “in natura”. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11, n. 70, p. 36-50, 2000.
- GIAROLA, L. B.; SANTOS, R. R.; TOGNIM, M. C. B.; BORELLI, S. D.; BEDENDO, J. Carriage frequency, phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in Northern Paraná. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 923-930, 2012.

- GOTTARDI, C. P. T.; MURICY, R. F.; CARDOSO, M.; SCHMIDT, V. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e *Staphylococcus*. **Revista Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 743-748, 2008.
- GUIDO, E. S.; SILVA, E. D. P.; SILVA, M. C.; TAKEUCHI, K. P.; DANESI, E. D. G. Uma abordagem da extensão universitária na melhoria da qualidade do leite na cadeia produtiva do município de Barbosa Ferraz (Paraná). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (B. CEPPA)**, v. 28, n. 2, p. 303-312, 2010.
- HEIKENS, E.; FLEER, A.; PAAUW, A.; FLORIJN, A.; FLUIT, A.C. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 43, n.7, p. 2286-2290, 2005.
- HOLANDA JUNIOR, E. V.; MEDEIROS, H. R.; DAL MONTE, H. L. B. *et al.* Custo de produção de leite de cabra na região Nordeste . In: ZOOTEC 2008. **Anais...** João Pessoa, 2008.
- HUNTER, P. R. and GASTON, M. A. Numeral index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n.11, p. 2465-2466, 1988.
- ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. Department of Applied Biological Chemist Minireview: Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 733-740, 2009.
- JAY, J. M. Gastreenterite estafilocócica. In: Jay J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 471-89, 2005.
- JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6ª edição. Gaithersburg: Aspen Publishers, p. 661, 1998.
- KELLS, J., GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 167-174, 2004.
- LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, S. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

- LOPES JUNIOR, W. D. **Investigação da qualidade e fatores de risco do leite produzido no cariri oriental do estado da Paraíba.** 55 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.
- LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in procaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4525-4529, 1992.
- LYRA, D. G.; SOUSA, F. G.; BORGES, M. F.; GIVISIEZ, P. E.; QUEIROGA, R. C.; SOUZA, E. L.; GEBREYES, W. A.; OLIVEIRA, C. J. Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus* spp. from bulk goat milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p.126-130, 2013.
- MARIANO, F. A.; FOLLY, M. M.; TEIXEIRA, G. N.; CARMO, L. S.; VIEIRA-DA-MOTA, O. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, p. 105-110, 2007.
- MARTINS, E. C. et al. O mercado e as potencialidades do leite de cabra na cidade de Sobral: a visão do consumidor. In: Congresso Brasileiro de sistemas de produção. **Anais...** Fortaleza, 2007.
- MEIRA, A. N. **Similaridade genética, resistência antimicrobiana e perfil enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de conjunto.** 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2012.
- MONTE, D. F. M.; OLIVEIRA, C. J. B.; LOPES JÚNIOR, W. D.; MOURA, J. F. P.; SOUSA, F. G. C.; MENEZES, L. M. Enumeração de *Staphylococcus aureus* em leite caprino cru e pasteurizado. In: Congresso ZOOTEC 2009. **Anais...** Águas de Lindóia, 2009.
- MØRK, T.; JØRGENSEN, H. J.; SUNDE, M.; KVITLÉ, B.; SVILAND, S.; WAAGEB, S.; TOLLERSRUD, T. Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder. **Veterinary Microbiology**, n. 159, p. 171–180, 2012.
- MORORÓ, A. M.; CHAPAVAL, L.; MAGALHÃES, D. C. T.; AGUIAR, V. M. P.; SOUSA, A. P. B.; MIRANDA, K. P.; BENEVIDES, S. D.; VASCONCELOS, A. M. Aspecto bacteriológico do leite caprino no Estado da Paraíba: Estudo de casos. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA. **Anais...** Cuiabá, 2012.
- MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; CORTI, S.; BLANCO, J. E.; STEPHAN, D. R. Microbiological Quality of Raw Goat's and Ewe's Bulk-Tank Milk in Switzerland. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3849–3856, 2003.

- MURICI, R. F.; SELLA, A.; SILVA, L. E.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. I. Identificação de pontos de contaminação do leite produzido em uma propriedade de caprinos no município de Viamão-RS. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 11-117, 2002.
- NADER FILHO, A. Eficiência do processo de pasteurização lenta do leite previamente envasado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.6, p.729-36, 1994.
- NEELA, V.; MARIANA, N. S.; RADU, S.; ZAMBERIL, S.; RAHA, A. R.; ROSLI, R. Use of RAPD to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Malaysian hospitals. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p. 245-251, 2005.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 211-215, 2004.
- OLIVEIRA, C. J. B.; HISRICH, E. R.; MOURA, J. F. P.; GIVISIEZ, P. E. N.; COSTA, R. G.; GEBREYES, W. A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 98, p. 64-69, 2011<sup>a</sup>.
- OLIVEIRA, C. J. B.; LOPES JÚNIRO, W. D.; QUEIROGA, R. C. R. E. ; GIVISIEZ, P. E. N.; AZEVEDO, P. S.; PEREIRA, W. E. GEBREYES, W. A. Risk factors associated with selected indicators of milk quality in semiarid northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 3166-3175, 2011<sup>b</sup>.
- OLIVINDO, C. S.; CHAPAVEL, L.; VILLARROEL, A. B. S.; ALVES, F. S. F.; SOUSA, F. G. C.; FERNANDES, F. E. P. Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1317-1321, 2009.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. World Alliance for patient Safety. Who guidelines on hand hygiene in health care. First global patient safety challenge clean care is safer care. Geneva, 2009. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597906\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597906_eng.pdf)> Acesso em: 12/09/2013.

- PEREIRA, M. L. et al. *Staphylococcus* e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 66/67, p. 48-55, 1999.
- PICOLLI, S. U.; BESSA, M. C.; CASTAGNA, S. M. F.; GOTTARDI, C. P. T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Revista Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 26, p. 64-69, 2006.
- PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 1-27, 2009.
- RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2096-2104, 1998.
- RAPINI, L.,S.; CERQUEIRA, M.,M.,O.,P.; CARMO,L.,S.; VERAS,J.,F.; SOUZA, M.,R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em 32 manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n.6, 2005.
- REINOSO, E. B.; EL-SAYED, A.; LAMMLER, C.; BOGNI, C.; ZSCHOCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, v. 163, p. 314-322, 2008.
- REINOSO, E.; BETTERA, S.; ODIERNO, L.; BOGNI, C. rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. **Brazil Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 44, p. 115-121, 2007.
- RODRIGUES, A.; QUINTANS, L. J. Produção e Beneficiamento do Leite de Cabra na Paraíba. Simpósio Internacional sobre caprinos e ovinos de corte. Simpósio Internacional sobre caprinos e ovinos do corte. Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira. **Anais...** João Pessoa, 2003.
- SABAT, A. J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J. M.; LAURENT, F.; et al. On behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveill**, v. 18, 2013.

- SABAT, A.; MALACHOWA, N.; MIEDZOBRODZKI, J.; HRYNIEWICZ, W. Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, 2006.
- SALVADOR, F. C.; BURIN, A. S.; FRIAS, A. A. T.; OLIVEIRA, F. S.; FAILA, N. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. **Revista Eletrônica F@pciência**, v.9, n. 5, p. 30-41, 2012.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor laboratory, New York, v.3, p. 235, 1989.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p. 145-154, 2001.
- SANTOS, D. C.; MARTINS, J. N.; OLIVEIRA, E. N. A.; FALCÃO, L. V. Caracterização de leite caprino comercializado na região do vale do Jaguaribe, Ceará. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p 289-295, 2012.
- SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.
- SCHMIDT, A.L.; ANDERSON, L.M. Repetitive DNA elements as mediators of genomic change in response to environmental cues. **Biological Reviews**, v. 81, p. 531–543, 2006.
- SILVA, V. A. M.; RIVAS, P. M.; ZANELA, M. B.; PINTO, A. T.; RIBEIRO, A. E. R.; SILVA, F. F. P.; MACHADO, M. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma Granja leiteira no RS. **Acta Science Veterinary (online)**, v. 38, p. 51-57, 2010.
- SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. *Staphylococcus* coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 32-40, 2004.
- SIRIPOMMONGCOLCHAIN, T.; CHOMVARIN, C.; CHAICUMPAR, K.; LIMPAIBOON, T.; WONGKHUN, C. Evolution of different primers for detecting *mecA* genes by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Southeast Asian. **International Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 33, p. 758-63, 2002.

- SOBRINHO, P. S. C.; FARIA, C. A. M.; PINHEIRO, J. S.; ALMEIDA, H. G.; PIRES, C. V.; SANTOS, A. S. Bacteriological Quality of Raw Milk Used for Production of a Brazilian Farmstead Raw Milk Cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 2, 2012.
- SOUSA, F. G. C.; OLIVEIRA, C. J. B.; CHAPAVAL, L.; ALVES, F. S. F.; MOURA, J. F. P.; LOPES JÚNIOR, W. D. Avaliação do processo de pasteurização em mini-usinas de processamento do leite caprino no Nordeste. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Anais...** Pernambuco, 2009.
- STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.
- STRUELENS, M. J. et al. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, p. 2-12, 1998.
- SUGUNA, M.; RAJEEV B.; WAN NADIAH, W. A. Microbiological quality evaluation of goat milk collected from small-scale dairy farms in Penang Island, Malaysia. **International Food Research Journal**, v. 19, p. 1241-1245, 2012.
- TAKIZAWA, Y.; TANEIKE, I.; NAKAGAWA, S. OISHI, T.; NITAHARA, Y.; IWAKURA, N.; OZAKI, K.; TAKANO, M.; NAKAYAMA, T.; YAMAMOTO, T. A Panton-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3356-3363, 2005.
- TOBES, R.; RAMOS, J.L. REP code: defining bacterial identity in extragenic space. **Environmental Microbiology**, v. 17, p. 225-228, 2005.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª edição. Porto Alegre: Artmed, p. 894, 2005.
- VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13 p. 1-46, 2007.
- VAN DER ZEE, A.; VERBAKEL, H.; VAN ZON, J. C.; FRENAY, I.; VAN BELKUM, A.; 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 of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 342-349, 1999.
- VITTORI, J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; POIATTI, M. L.; PIGATTO, C. P.; CHIODA, T. P.; RIBEIRO, C. A. M.; GARCIA, G. R.; RAGAZANI, A. V. F. Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Revista Ciência Rural**, v. 38, n. 3, 2008.
- WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. L.; MORRE, L. H.; MORRE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRUPER, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. **International Journal of systematic bacteriology**, v. 37, p. 463-464, 1987.
- WILSON, M. K.; LANE, A. B.; LAW, B. F.; MILLER, W. G.; JOENS, L. A.; KONKEL, M. E.; et al. Analysis of the pan genome of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from poultry by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST), and repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities. **Microbial Ecology**, v. 58, 2009.
- WINN JR, W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 183, 2008.
- ZADOCKS, R. N.; WATTS, J. L. Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. **Veterinary Microbiology Journal**, n. 134, p. 20-28, 2009.