



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA**

ISABEL CAROLINA DE SOUSA ALVES OLIVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE *SASHIMIS* À BASE DE SALMÃO
PREPARADOS EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS EM CULINÁRIA
JAPONESA E COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE BRASÍLIA E REGIÃO**

**BRASÍLIA, DF
2016**

ISABEL CAROLINA DE SOUSA ALVES OLIVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SASHIMIS À BASE DE SALMÃO
PREPARADOS EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS EM CULINÁRIA
JAPONESA E COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE BRASÍLIA E REGIÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF
2016

ISABEL CAROLINA DE SOUSA ALVES OLIVEIRA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE *SASHIMIS* À BASE DE SALMÃO
PREPARADOS EM RESTAURANTES ESPECIALIZADOS EM CULINÁRIA
JAPONESA E COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE BRASÍLIA E REGIÃO**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF
2016

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me abençoou concedendo mais uma conquista e realização de um sonho de uma tão esperada graduação acadêmica em farmácia. Foram cinco anos de muita dedicação e aprendizado nessa trajetória que me tornou hoje uma pessoa com uma visão mais ampla, principalmente, no que se diz respeito no âmbito da saúde. Me sinto realizada e orgulhosa por isso. Devo agradecer imensamente a todos os docentes da Instituição da Faculdade de Ceilândia, especialmente, a minha orientadora Daniela Castilho Orsi e a co-orientadora Izabel Cristina Rodrigues da Silva, que tiveram toda paciência, empenho e dedicação para me ajudar na conclusão deste trabalho.

Agradeço a minha família, meu pai Bernardo, minha mãe Maria, meus irmãos Letícia e Mateus e o meu marido Max, que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado me dando apoio para que eu chegasse até aqui, pois sem eles nada disso seria possível.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de *sashimis*, levando em consideração o aumento do consumo desse tipo de alimento pela população brasileira, devido principalmente à popularização da culinária japonesa. Para a realização das análises microbiológicas, foram coletadas dez amostras de *sashimis* à base de salmão em diferentes restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Brasília e região, durante o período de abril a agosto de 2016. Os resultados mostraram que em relação à microbiota deteriorativa, 7 amostras apresentaram elevadas quantidades de bactérias totais. A contagem de bactérias mesófilas foi elevada na amostra 5, que apresentou valor acima de $1,0 \times 10^6$ UFC/g ($7,0 \times 10^6$ UFC/g). As contagens de bactérias psicrotóxicas foram elevadas nas amostras de *sashimis* 3 e 4, com valores de 1,4 a $1,7 \times 10^6$ UFC/g. A enumeração de coliformes totais ficou acima de $1,0 \times 10^2$ NMP/g em 60% das amostras e todas as amostras mostraram resultados positivos para a enumeração de coliformes termotolerantes. De acordo com a legislação brasileira, apenas a amostra de *sashimi* 4 estava imprópria para o consumo humano, pelo excesso de coliformes termotolerantes (enumeração de $1,1 \times 10^3$ NMP/g). Foi observado que 50% das amostras de *sashimis* apresentaram cepas de *S. aureus*, porém as contagens de $3,3 \times 10^1$ a $5,7 \times 10^2$ UFC/g estavam dentro dos limites permitidos pela legislação. A presença de bactérias *S. aureus* em cinco das 10 amostras de *sashimis* analisadas indicam condições higiênicas inapropriadas, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada. Os resultados desta pesquisa indicaram que a amostra 6 mostrou boa qualidade microbiológica, as amostras 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 e 10 (80% das amostras de *sashimis*) estavam em condições higiênico-sanitárias aceitáveis para o consumo e a amostra 4 estava imprópria para o consumo.

Palavras chave: *sashimi*, salmão, qualidade microbiológica, doenças transmitidas por alimentos, análise molecular.

ABSTRACT

This work was developed with the aim of evaluating the microbiological quality of *sashimis*, taking into account the increase in consumption of this type of food by the Brazilian population, mainly due to the popularization of Japanese cuisine. In order to carry out the microbiological analysis, ten samples of salmon *sashimis* were collected at different restaurants specializing in Japanese cuisine in the city of Brasília and region, during the period from April to August 2016. The results showed that in relation to the deteriorating microbiota, 7 samples presented high counts of total bacteria. The mesophilic bacteria count was high in sample 5, which presented a value above $1,0 \times 10^6$ CFU / g ($7,0 \times 10^6$ CFU / g). The counts of psychrotrophic bacteria were elevated in samples of *sashimis* 3 and 4, with values of $1,4$ to $1,7 \times 10^6$ CFU / g. The enumeration of total coliforms was above $1,0 \times 10^2$ MPN / g in 60% of the samples and all the samples showed positive results for the enumeration of thermotolerant coliforms. According to Brazilian legislation, only the sample 4 was unfit for human consumption, due to the excess of thermotolerant coliforms (enumeration of $1,1 \times 10^3$ MPN / g). It was observed that 50% of the *sashimis* samples had strains of *S. aureus*, but the counts from $3,3 \times 10^1$ to $5,7 \times 10^2$ UFC / g were within the limits allowed by the legislation. The presence of *S. aureus* bacteria in five of the 10 samples of *sashimis* analyzed indicates inappropriate hygienic conditions, because it is a bacterium from inadequate human manipulation. The results of this study indicated that sample 6 showed good microbiological quality, samples 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 and 10 (80% of *sashimis* samples) were in hygienic sanitary conditions acceptable for consumption and sample 4 was unfit for consumption.

Key words: *sashimi*, salmon, microbiological quality, foodborne diseases, molecular analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. O salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>) e o consumo de <i>sashimi</i> no Brasil.....	9
1.2. Fatores que influenciam a qualidade do pescado.....	10
1.3. Microbiota deteriorativa do pescado.....	12
1.4. O pescado como veículo transmissor de bactérias patogênicas ao homem.....	14
1.5. Métodos de controle de qualidade do pescado.....	17
1.6. Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. JUSTIFICATIVA.....	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1. Coleta e preparo das amostras.....	22
4.2. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas.....	22
4.3. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	23
4.4. Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i>	24
4.5. Contagem de <i>Staphylococcus sp.</i>	26
4.6. Análises moleculares e extração de DNA bacteriano.....	26
4.7. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR.....	28
4.8. PCR qualitativo.....	31
4.9. Eletroforese em gel de agarose.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas.....	32
5.2. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	33
5.3. Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i> nas amostras de <i>sashimis</i>	36
5.4. Contagem de <i>Staphylococcus sp.</i> nas amostras de <i>sashimis</i>	38
5.5. Análises moleculares.....	41
6. CONCLUSÕES.....	46
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	24
Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	30
Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	30
Tabela 4. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas nas amostras de sashimis.....	32
Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de <i>sashimis</i>	34
Tabela 6. Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i> nas amostras de <i>sashimis</i>	37
Tabela 7. Contagem de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras de <i>sashimis</i>	39
Tabela 8. Identificação por meio de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de <i>sashimis</i>	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.....	26
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene EutC de <i>E. coli</i>	42
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene entC de <i>S. aureus</i>	43
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do <i>invA</i> de <i>Salmonella enterica</i>	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Genoma completo de <i>E. coli</i>	58
Anexo 2. Sequência de Primer para <i>E. coli</i>	60
Anexo 3. Genoma completo de <i>S. aureus</i> precursor de enterotoxina C3.....	62
Anexo 4. Sequência de Primer para <i>S. aureus</i>	63
Anexo 5. Genoma completo de <i>Salmonella enterica</i>	65
Anexo 6. Sequência de Primer para <i>Salmonella enterica</i>	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. O salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e o consumo de *sashimi* no Brasil

O salmão (*Salmo salar*) é originário das águas frias das regiões temperadas e árticas do Atlântico Norte. O salmão selvagem pode ser encontrado em ambos os lados do Atlântico Norte, no lado europeu (de Portugal até Rússia) e no lado norte americano (dos Estados Unidos até Canadá). Também pode ser encontrado ao redor das ilhas do Atlântico Norte (Reino Unido, Islândia e Groelândia) (FAO, 2013).

O salmão do Atlântico foi excessivamente explorado pela indústria pesqueira e atualmente está ameaçado de extinção ou praticamente desapareceu de algumas regiões. Em virtude disso, a criação do salmão do Atlântico em cativeiro está atualmente em plena expansão e os principais produtores do salmão cultivado são: Noruega, Irlanda, América do Norte e em especial o Chile, que exporta grande parte de sua produção para o Brasil. O Brasil, um país de clima tropical, não possui as condições requeridas para o cultivo do salmão, sendo assim, todo o salmão consumido no Brasil é importado, sendo a maior parte proveniente de aquicultura (DASMACENO, 2010; FAO, 2013; SUZUKI, 2013).

O salmão possui uma alta demanda do mercado consumidor por sua carne rosada, muito saborosa, de textura macia, sabor delicado e alto valor nutritivo. A típica coloração da carne do salmão resulta da deposição natural dos pigmentos carotenoides astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-dieno) e cantaxantina (β,β -caroteno-4,4'-dieno) no músculo da carne. Esses pigmentos são provenientes da dieta dos salmões, composta por camarões, peixes e algas marinhas (JOHNSTON et al., 2006; SALÁN et al., 2006; TONIAL et al., 2010).

A descoberta de que o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados reduz o risco de doenças cardíacas tem contribuído para uma mudança nos perfis e hábitos alimentares, fazendo com que consumidores aumentem o consumo de carne de peixes como o salmão. Nesse contexto, nota-se que o Brasil também vem seguindo a tendência mundial de consumir alimentos mais saudáveis, aumentando o consumo de peixe. O crescente aumento do consumo de salmão no Brasil também está diretamente ligado à popularização da culinária japonesa, onde o

salmão cru é bastante utilizado em pratos como o *sushi* e o *sashimi* (DAMASCENO, 2009; LOTTENBERG, 2009).

Segundo HIRATA (2007), após 100 anos da chegada dos primeiros imigrantes japoneses, percebe-se um enraizamento muito grande de seus costumes alimentares no cotidiano brasileiro, levando em consideração tanto a proliferação de restaurantes especializados na culinária japonesa quanto se detectando a presença de alguns pratos típicos servidos em restaurantes não especializados. Nessa culinária, destaca-se o *sushi* (preparação que mistura alga marinha, peixe cru ou não e recheios adicionais variados) e o *sashimi* (peixe cru em fatias), que atualmente são vistos em restaurantes, lado a lado do churrasco ou da feijoada, incluindo-se até a modalidade de rodízio de *sushi* e *sashimi*.

O hábito de ingerir peixes, em especial crus, é de introdução recente no cardápio dos estabelecimentos de alimentos e ocorre principalmente nas grandes cidades brasileiras. Os restaurantes especializados em culinária japonesa, anteriormente restritos às regiões onde predominavam os imigrantes asiáticos, tornaram-se comuns nos bairros das classes mais elevadas, estando presentes em quase todos os *shoppings* dentro da categoria dos *fast food* e havendo até lojas especializadas em entregas a domicílio (HIRATA, 2007; GERMANO e GERMANO, 2008).

O Distrito Federal é um importante mercado consumidor de pescados, um dos maiores do Brasil. Em apenas quatro anos (2007 a 2011), o consumo anual médio de pescado por habitante em Brasília passou de 12,8 para 14 kg, bem acima da média nacional, que é de aproximadamente 9 kg per capita. A maior parte dos produtos pesqueiros consumidos em Brasília vem de outras regiões do Brasil e também importados de outros países, representando 86% do pescado total consumido e tendo um volume total de 31.316 toneladas no ano de 2009 (AMUSUH, 2012; BORGES, 2010).

1.2. Fatores que influenciam a qualidade do pescado

Os alimentos crus são inicialmente contaminados por uma variedade de micro-organismos, designados comumente por microbiota intrínseca, mas só uma parte destes consegue colonizar o alimento e multiplicar-se em elevado número. No caso do pescado aplica-se o mesmo princípio, em que uma fração da microbiota é

responsável pelo processo de deterioração, sendo dependente de fatores intrínsecos ou extrínsecos, nomeadamente a temperatura, pH, atividade da água (a_w), potencial redox (Eh), interações microbianas, entre outros fatores (GRAM & DALGAARD, 2002).

Dentre os produtos de origem animal, o pescado, de um modo geral, é um dos mais susceptíveis ao processo de deterioração, pois apresenta um pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, altos teores de lipídios insaturados e nutrientes facilmente utilizáveis por micro-organismos, rápida ação das enzimas autolíticas e alta atividade metabólica da microbiota natural (AUBOURG et al., 2007; FRANCO & LANDGRAF, 2008; RODRIGUES et al., 2012).

O manejo do peixe durante o período compreendido entre captura e processo, é essencial para a qualidade do produto final, devendo haver cuidados especiais de higiene em todas as etapas: desde a captura, transporte e armazenamento, até a chegada do produto ao consumidor final. A perda de qualidade do pescado fresco está relacionada com condições inadequadas de transporte e armazenamento, métodos incorretos de processamento e falhas na manutenção da cadeia do frio, essencial para a conservação do pescado (ALPARSLAN et al., 2012; ECHEVENGUA et al., 2008; POURASHOURI et al., 2013).

Após a captura do pescado, realiza-se a evisceração, lavagem e abaixamento da temperatura. Essas técnicas de manuseio favorecem a manutenção da qualidade do pescado. A evisceração tem a função de eliminar as bactérias contidas nos intestinos e também reduzir a autólise causada pelas enzimas digestivas. A lavagem do pescado com água limpa e tratada (pode ser usada água clorada a 5 ppm), após a evisceração, auxilia na redução da carga microbiana presente, pois diminui o muco da superfície da pele e elimina fragmentos de vísceras e outras sujidades que contribuem para o aumento da carga microbiana do pescado e aceleram sua deterioração (JOHNSTON et al., 2006; SIVERTSVIK et al., 2002).

Após o abate do pescado, a carne do peixe passa pelas fases de *pré-rigor mortis*, *rigor mortis* e *pós-rigor mortis*. Durante o *pré-rigor mortis*, os músculos ainda são flácidos e ocorre a glicólise anaeróbica com formação de ácido lático e diminuição do pH do músculo. Ainda nesta etapa, ocorre degradação do ATP, levando à formação irreversível do complexo actina-miosina, estabelecendo-se o *rigor mortis*. Este se caracteriza pelo enrijecimento da musculatura dos animais

durante certo período de tempo e no caso dos peixes, a duração do *rigor mortis* depende da espécie, fatores fisiológicos, condições de captura e temperatura de estocagem (KIESSLING et al., 2006; ECHEVENGUA et al., 2008).

O *rigor mortis* pode ser abreviado pelas condições de abate e fatores fisiológicos. Peixes mortos com agonia e em estado de exaustão mostram um baixo teor de glicogênio nos músculos, o que proporciona uma menor redução do pH muscular e também a fase de *rigor mortis* inicia-se rapidamente e tem curta duração. Já o peixe que é abatido rapidamente, o que diminui o estresse do animal, mantém uma maior reserva de glicogênio, o que retarda o início do rigor mortis e favorece maior acidificação do músculo (ECHEVENGUA et al., 2008).

Os fatores que influenciam no *rigor mortis* são importantes na conservação do pescado, pois a deterioração bacteriana do pescado não se inicia até o término do *rigor mortis*, uma vez que o músculo encontra-se acidificado, gerando uma maior proteção contra a ação das bactérias. Logo, quanto mais prolongada for a rigidez, maior será o tempo de conservação do pescado. Assim, uma vez entrando o pescado no *rigor mortis*, deve-se mantê-lo enrijecido por mais tempo, o que é possível fazer pelo abaixamento da temperatura com a manutenção do pescado em gelo ou câmaras de estocagem com baixa temperatura (EINEN et al., 2002; KIESSLING et al., 2006).

O abaixamento da temperatura por meio do resfriamento tem por objetivo retardar as reações enzimáticas e a multiplicação de micro-organismos envolvidos no processo de deterioração do peixe. O resfriamento é feito por meio do uso do gelo, que além de conservar o produto, lava e hidrata a superfície do peixe. O gelo utilizado deve ser totalmente triturado e de ótima procedência, pois pode ser motivo de contaminação. A quantidade deve ser suficiente para manter a temperatura do pescado por volta de 0 a 2°C. Peixes submetidos a esse método são denominados de peixe fresco ou peixe fresco resfriado (EINEN et al., 2002; GIAMPIETRO & REZENDE-LAGO, 2009; KIESSLING et al., 2006; SCHERER et al., 2004).

A inspeção sanitária é imprescindível no momento em que os barcos pesqueiros atracam. O desembarque do pescado e sua destinação devem ser avaliados pelos profissionais da inspeção, a fim de assegurar as boas condições de higiênico-sanitárias dos peixes capturados. É fundamental conhecer a procedência do pescado, se de pesca em alto mar ou costeira, em rios, lagos ou reservatórios,

pois a mesma está relacionada diretamente aos níveis de contaminação das águas (GERMANO & GERMANO, 2008).

Denomina-se *sashimi* qualquer pescado ou fruto do mar consumido cru, como peixes, mariscos e camarões. O pescado destinado à elaboração do *sashimi* deve ser fresco e não pode ser submetido ao congelamento, podendo apenas ser resfriado visando ao retardo do desenvolvimento microbiano. Por isso, sua captura, manipulação e conservação necessitam de atenção especial (MOURA FILHO et al., 2007). A falta de boas práticas de higiene no processo produtivo do pescado pode resultar na contaminação por bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (ICMSF, 2002). Assim, torna-se necessário garantir a qualidade e a segurança das características microbiológicas, bioquímicas e organolépticas do pescado a ser usado na elaboração do *sashimi* (GILBERT et al., 2000).

1.3. Microbiota deteriorativa do pescado

A perda inicial de qualidade do pescado fresco se deve as atividades autolíticas *post mortem* e aos processos de degradação bioquímica, como oxidação lipídica. Contudo, as alterações causadas pelo crescimento de bactérias são consideradas a principal causa de deterioração do pescado. A microbiota deteriorativa, responsável pela degradação do pescado (quando armazenado sob condições de aerobiose e temperatura de refrigeração, aproximadamente 4°C) é constituída na sua maioria de micro-organismos psicrótróficos (GRAM & DALGAARD, 2002).

Peixes capturados em águas limpas e muito frias carregam um número menor de micro-organismos que peixes capturados em águas mornas. Nos peixes vivos e recém-capturados, os micro-organismos estão presentes na pele, nas guelras e nos intestinos. Está bem documentado que as bactérias predominantes em águas frias são psicrótróficas, bactérias aeróbicas ou bactérias gram-negativas anaeróbicas facultativas, pertencendo aos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Photobacterium* e *Aeromonas* (ODOLI, 2009; SIVERTSVIK et al., 2002).

Alterações indesejadas no odor e sabor da carne de peixe podem ser produzidas pela ação de enzimas de micro-organismos proteolíticos e lipolíticos.

Espécies de bactérias proteolíticas são comuns entre os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* e *Proteus*. A carne de peixes de água fria como o salmão é rica em gorduras. A deterioração hidrolítica e oxidativa dos lipídios leva a modificações no odor e diminui a qualidade da carne. Os gêneros *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* e *Staphylococcus sp.* são altamente lipolíticos (DAMASCENO, 2009).

O crescimento de micro-organismos específicos no pescado durante a estocagem depende de vários fatores, sendo os mais importantes: a carga microbiana contaminante inicial, os métodos de processamento usados e o meio ambiente que cerca este pescado como a temperatura de estocagem (EINEN et al., 2002; KIESSLING et al., 2006; ODOLI, 2009; SCHERER et al., 2004).

Prevenir a contaminação do pescado pré-captura é muito difícil ou impossível. O ambiente natural não pode ser modificado facilmente e os agentes causadores de doenças que ocorrem naturalmente (algumas bactérias patogênicas e parasitas) estarão sempre presentes. Já a contaminação química e poluição fecal podem ser prevenidas através do monitoramento das áreas da pesca, com verificação da presença de algas tóxicas e de *Escherichia coli* (HUSS et al., 2000; REIJ & DEN AANTREKKER, 2004).

1.4. O pescado como veículo transmissor de bactérias patogênicas ao homem

Um alimento produzido ou manipulado com condições precárias de higiene pode oferecer risco à saúde de quem o ingere. Alguns micro-organismos que podem contaminar o alimento são patogênicos, causando doenças em seu hospedeiro. Outros não causam doenças nos seres humanos, mas são indicadores de condições higiênicas inadequadas (BASTI et al., 2006). As bactérias patogênicas muitas vezes não alteram a aparência, odor, nem sabor do alimento e nesses casos é impossível saber se o alimento oferece risco sem que se realize uma análise microbiológica, o que agrava os riscos de se consumir alimentos não seguros (GERMANO & GERMANO, 2008).

As Doenças Transmitidas por Alimentos – DTAS's são divididas em dois grupos: intoxicações e infecções. As intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas pré-formadas, produzidas por micro-

organismos como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Infecções alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de micro-organismos patogênicos. Estes se aderem à mucosa do intestino humano, onde proliferam, colonizando-o. No caso de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* invasora e *Yersinia enterocolítica*, a bactéria invade a mucosa e penetra nos tecidos. Enquanto que *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Campylobacter jejuni*, produzem toxinas dentro do trato gastrointestinal, o que altera o funcionamento normal das células epiteliais (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

O número de casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no âmbito dos pescados é geralmente baixo quando comparado às DTA's causadas por consumo de aves, laticínios e outras carnes. Entretanto, a importância do pescado como veiculador de patógenos depende de fatores como a dieta e a forma de preparo. No Japão, onde o peixe é importante parte da dieta, sendo muitas vezes consumido cru, a proporção de DTA's oriunda de pescados é maior (HUSS et al., 2000).

A legislação brasileira (BRASIL, 2001), que estabelece os parâmetros microbiológicos para alimentos prontos a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, *carpaccio*, *sushi*, *sashimi*), determina nesses alimentos a contagem de coliformes termotolerantes, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus* coagulase positivo (*S. aureus*) e a pesquisa de *Salmonella* em amostra de 25g.

Algumas bactérias patogênicas estão presentes naturalmente na água e no ambiente, como por exemplo, as espécies patogênicas do gênero *Vibrio*. Estes patógenos podem também ser encontrados em peixes vivos e em seus produtos crus (HUSS et al., 2000). Os surtos de *V. parahaemolyticus* têm sido frequentemente associados ao consumo do pescado cru no Japão. No Brasil, nos estudos de MOURA FILHO et al. (2007) e VALANDRO et al. (2011) não se detectou a presença de *V. parahaemolyticus* nas amostras de *sashimis* analisadas.

Para o controle de qualidade do pescado existem testes microbiológicos que avaliam a contaminação do ambiente e fecal através da enumeração de coliformes totais e termotolerantes, além da pesquisa de bactérias patogênicas. Os coliformes termotolerantes ou coliformes a 45°C são um subgrupo dos coliformes totais que possuem a capacidade de fermentar a lactose com a produção de gás, quando incubadas na temperatura de 44-45,5°C. Nessas condições 90% dos coliformes são

Escherichia coli. Sua ocorrência nos alimentos está relacionada com contaminação de origem fecal, indicando a possível presença de bactérias enteropatogênicas (FARIAS e FREITAS, 2008). A presença de coliformes termotolerantes no *sashimi* e similares crus é limitada a valores de $1,0 \times 10^2$ UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama) ou NMP/ g (Número Mais Provável por grama) (BRASIL, 2001).

A *Salmonella sp.* é outra bactéria que pode estar presente nos peixes criados em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes. A *Salmonella sp.* pertence à família *Enterobacteriaceae* e seu habitat principal é no trato intestinal de aves, reptéis e seres humanos. Essa bactéria não faz parte da microbiota natural dos peixes e caso esteja presente é proveniente de manipulação inadequada em qualquer etapa da cadeia produtiva ou consequência do contato com as águas contaminadas, que são consideradas uma importante via de transmissão desse patógeno (PARK et al., 2009). A legislação brasileira (BRASIL, 2001) determina que *Salmonella sp.* deve estar ausente nos alimentos prontos a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, *carpaccio*, *sushi*, *sashimi*).

No caso de *sashimis* que são preparados manualmente, além da contaminação do pescado, o contato direto do alimento com as mãos pode levar ao aumento da incidência de patógenos como *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes (JAY, 2005). Segundo MARTINS (2006) preparações muito manipuladas são consideradas de alto risco, especialmente quando elaboradas por pessoas que não possuem treinamento adequado. Além disso, preparações à base de pescados crus oferecem risco maior à saúde pelo fato de não serem submetidos a tratamentos bactericidas como cocção (HUSS et al., 2000).

Como consequência direta da manipulação inadequada, o *Staphylococcus aureus* encontrado nas mucosas e superfícies da pele de humanos pode se multiplicar no pescado (HUSS et al., 2000; BASTI et al., 2006). O *S. aureus* é de grande importância nos surtos de intoxicações alimentares. Habita a nasofaringe humana e assim tem grande acesso as mãos do hospedeiro para então contaminar os alimentos. A falta de higiene do manipulador infectado pode facilmente contaminar o pescado. O patógeno está presente em 30% da população humana, onde um a dois terços destes possuem cepas enterotoxigênicas produtoras de toxina proteica termoestável (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A contagem de estafilococos coagulase positiva (*S. aureus*) no *sashimi* é limitada a valores de $5,0 \times 10^3$ UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama) (BRASIL, 2001).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS), os alimentos preparados (como é o caso do *sashimi*) são um dos principais responsáveis por toxinfecções alimentares no país. Estas doenças, além de ocasionarem danos à saúde do consumidor, também podem prejudicar a credibilidade dos estabelecimentos, gerando gastos com indenizações, tratamentos médicos e, até mesmo, autuação e prisão dos responsáveis, entre outras penalidades (BENEVIDES & LOVATTI, 2004).

Dentre os fatores que contribuem para ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar, destaca-se: a falta de higiene pessoal, o contato do alimento com manipuladores, a contaminação cruzada, o processamento irregular do alimento, a limpeza inadequada dos utensílios e a utilização de alimentos insalubres (GERMANO & GERMANO, 2008).

1.5. Métodos de controle de qualidade do pescado

O pescado em geral apresenta uma carne saudável, com alto teor proteico e vem despertando cada vez mais o interesse dos consumidores. Mas o aproveitamento desse benefício só é possível quando os fatores de qualidade do alimento em relação à saúde pública e ausência de riscos aos consumidores forem garantidos (GERMANO e GERMANO, 2008; SOARES e GONÇALVES, 2012).

Faz parte da qualidade do pescado a aparência estética e o frescor. Devem-se associar também os aspectos de segurança como: ausência de bactérias patogênicas, parasitas e compostos químicos. A qualidade do pescado pode ser avaliada por testes sensoriais, químicos e microbiológicos. É de suma importância utilizar métodos de avaliação da qualidade do pescado durante todas as etapas de produção, processamento e comercialização para garantir sua segurança de consumo (GERMANO & GERMANO, 2008; SOARES & GONÇALVES, 2012).

A avaliação microbiológica é considerada um dos melhores métodos de controle da qualidade do pescado. Além da avaliação microbiológica temos também os testes sensoriais e físico-químicos. A determinação do pH da carne é um dos métodos físico-químicos utilizados para avaliar a qualidade do pescado, mas não deve ser usado como único indicador de frescor e seus resultados devem vir acompanhados das análises microbiológicas e sensoriais (TAVARES e GONÇALVES, 2011).

1.6. **Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas**

Atualmente um diagnóstico completo e preciso em casos de infecções alimentares é um desafio para que haja um controle adequado dos casos isolados e surtos. Diante de inovações tecnológicas disponíveis, hoje em dia já são utilizados sistemas moleculares que estão sendo empregados com a finalidade de triagem e confirmação para diagnóstico microbiológico de algumas espécies de micro-organismos causadores de toxinfecções (DICKEL et al., 2005).

Os métodos analíticos são imprescindíveis para a detecção de patógenos em alimentos. As técnicas que utilizam meios de cultura seletivos e não seletivos são as mais utilizadas ultimamente, associados aos testes bioquímicos diferenciais em conjunto com testes sorológicos (GANDRA et al., 2008). Estes métodos microbiológicos citados são considerados clássicos ou convencionais e mesmo sendo muito utilizados podem apresentar desvantagens como a liberação de lotes contaminados por amostras falso-negativas, interpretação inadequada pelo número limitado de testes, baixo poder discriminatório em micro-organismos com variabilidade genética e muito tempo para a obtenção dos resultados. Com isso, os métodos microbiológicos qualitativos foram inovados com intuito de diminuir ou eliminar os inconvenientes gerados pelos métodos convencionais (RODRIGUES, et al., 2011; DOWNES e ITO, 2001).

Uma alternativa foi a implantação de técnicas moleculares para a caracterização, identificação e detecção de bactérias patogênicas em alimentos. As técnicas moleculares utilizam-se da caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou até de um micro-organismo (POSTOLLEC et al., 2011). A reação em cadeia da polimerase – PCR vem ganhando destaque dentre as demais e tem como objetivo amplificar sequências de DNA, capaz de detectar até uma cópia de DNA de qualquer célula. Quando comparada com os métodos convencionais se mostra altamente sensível e específica, produzindo resultados em poucas horas e serve também como confirmação e esclarecimento, quando os resultados dos testes convencionais geram dúvidas (RODRIGUES et al., 2011). Também é uma forma de detectar as amostras falso-negativas e células consideradas viáveis, mas não cultiváveis (TEODORO et al., 2006).

A PCR possibilita amplificar um fragmento de DNA específico que está em um conjunto complexo, o genoma ou o material extra cromossomal da amostra. É baseado no uso de enzimas termotolerantes, as Tag polimerase, que tem a capacidade de copiar o material genético de uma cadeia pré-existente que serve como molde para a “nova fita” de DNA que será sintetizada (POWLEDGE, 2004). SENORANS et al. (2003) constataram que a implantação da PCR facilita o processo de identificação de patógenos e contaminantes nas amostras de alimentos, ajudando assim nos processos de validação da qualidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo realizar as análises microbiológicas de *sashimis* à base de salmão preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Brasília e região.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos micro-organismos mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* sp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

3. JUSTIFICATIVA

Hoje é frequente na cultura gastronômica brasileira o consumo de alimentos preparados à base de peixe cru resultante da recente popularidade de pratos tradicionais japoneses como o *sushi* e o *sashimi*. Dentre os produtos de origem animal, o pescado é um dos mais susceptíveis ao processo de deterioração, sendo as alterações causadas pelo crescimento de bactérias consideradas a principal causa de deterioração. O *sashimi* está sujeito à contaminação por vários microorganismos patogênicos, sendo um alimento com potencial risco de transmissão de doenças para o homem, devido ao fato de ser bastante manipulado na sua preparação e de ser consumido cru. As análises microbiológicas das amostras de *sashimis* à base de salmão coletados em diferentes restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Brasília e região tiveram como objetivo determinar a sua qualidade, de forma a verificar se esses alimentos prontos para consumo estão sendo comercializados com segurança alimentar para o consumidor.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e preparo das amostras

Foram coletadas dez amostras de *sashimis* à base de salmão em dez diferentes restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Brasília e região, DF, no período consecutivo de cinco meses, com início das coletas em abril e término em agosto de 2016.

As amostras coletadas foram levadas imediatamente para o laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ceilândia, UnB, não excedendo uma hora entre o período de coleta e o início das análises das mesmas. Todas as amostras encontravam-se em embalagens fechadas, dentro do prazo de validade e foram mantidas sob refrigeração até o início das análises.

Para o preparo das amostras, em condições de assepsia, foram pesadas 25g da amostra em 225 ml de água peptonada 0,1% (p/v) estéril e homogeneizado por 20 minutos, obtendo-se a primeira diluição (10^{-1}). A partir desta foram realizadas as demais diluições decimais, seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) até a diluição 10^{-5} .

As análises microbiológicas realizadas foram: contagem total dos micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão.

4.2. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas

Para contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas e a 7°C \pm 1°C por 7 dias para bactérias psicrotróficas. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente, e

expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

4.3. **Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes**

A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que estima a densidade de micro-organismos viáveis presentes em uma amostra. A determinação do NMP de micro-organismos é baseada no princípio de que, numa amostra líquida as bactérias podem ser separadas por agitação, resultando numa suspensão em que as células estejam uniformemente distribuídas. A comparação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos micro-organismos na amostra (FENG et al., 2002).

Para a determinação do NMP de coliformes, inoculou-se 1 ml de cada diluição em uma série de 3 tubos de ensaio contendo caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v) e tubos de Durham invertidos e a incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais (FENG et al., 2002).

Alíquotas dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas, simultaneamente, para caldo verde brilhante bile lactose 2% (para a confirmação de coliformes totais) e para caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e tubos de Durham invertidos foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo *Escherichia coli* e tubos de Durham invertidos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Através da Tabela 1 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g) (FENG et al., 2002).

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.

Tabela para 3 tubos, cada um com inóculo de 0.1, 0.01 e 0.001 ml, os NMPs por grama e os intervalos de confiança a 95%.											
Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

FONTE: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods>

4.4. Pesquisa de *Salmonella sp.*

Para a pesquisa de *Salmonella sp.*, a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 ml foram transferidas para caldo selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de

cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, placas de Petri contendo o meio Agar *Salmonella Shigella* (Agar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em Agar *Salmonella Shigella* para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo Agar TSI (três açúcares e ferro). Este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. A fermentação de carboidratos é indicada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo. Se o micro-organismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio (H₂S), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra (indicado pela cor preta na base do tubo) (ANVISA, 2010).

No Agar TSI, enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares do meio) tornando a base e a superfície do tubo de cor amarela e geralmente é possível detectar a presença de gás (CO₂) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Os micro-organismos degradam, preferencialmente, a glicose em primeiro lugar, mas como este substrato está presente em concentração mínima, a quantidade de ácido produzida é limitada e é rapidamente oxidada na superfície. Se houver produção de sulfeto de ferro a base do meio torna-se negra (Figura 1). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de H₂S como *Salmonella* (ANVISA, 2010). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

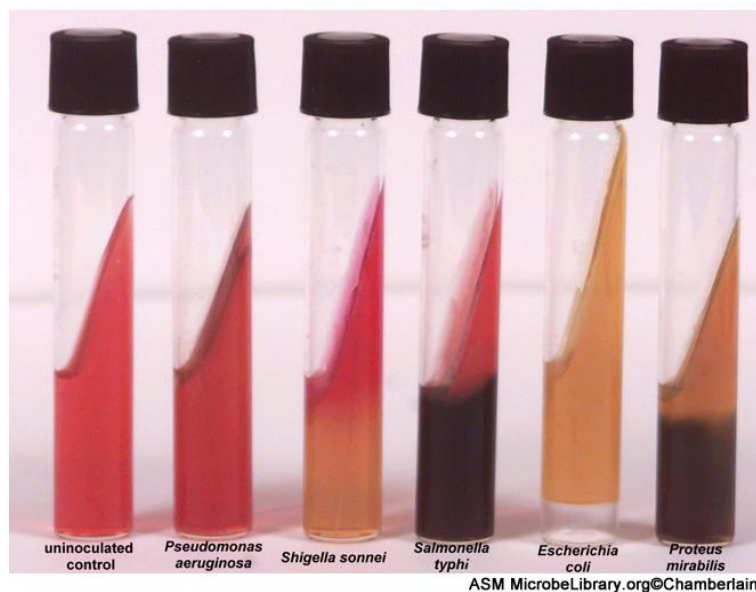


Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).

4.5. Contagem de *Staphylococcus sp.*

Para a contagem de *Staphylococcus sp.*, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar PCA suplementado com cloreto de sódio 7,5% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em Agar Sal Manitol e incubadas em 37°C por 48h. As colônias fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

4.6. Análises moleculares e extração de DNA bacteriano

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das soluções reagentes (o tampão AW foi colocado em banho-maria à 50°C), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de *sashimis* suspeitas de serem patogênicas e cultivadas por 12 h. em caldo LB.

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com adaptações, descritas a seguir:

Adicionou-se 9,0 mL da amostra (suspensão de células bacterianas em caldo LB) no tubo cônico tipo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o sedimento). Foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão CF (tampão de lise celular pré-aquecido a 65°C), encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos foram homogeneizados em “vortex”, até a completa homogeneização da solução. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 µL do tampão C4 (contém isotiocianato de guanidina), 300 µL de etanol 96%, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo da célula).

Na etapa seguinte, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica (fornecidos pelo kit), transferiu-se o sobrenadante para o filtro e após filtração centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 400 µL do tampão CQW e centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 700 µL do tampão C5, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtrado (os tampões CQW e C5 contêm isotiocianato de guanidina, em concentrações decrescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e a retirada das outras biomoléculas da amostra. Também contêm etanol, para facilitar a precipitação). Por fim, foi feita outra centrifugação com o tubo vazio, por 1 minuto a 15.000 rpm.

Após isto, o filtro contendo DNA foi trocado para um eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL do tampão Elution Buffer CE pré-aquecido a 70°C (este tampão favorece a eluição do DNA). Após uma pré-incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtro. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

4.7. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas a serem analisadas para *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella sp.* foi realizada conforme busca na literatura e optou-se por três regiões gênicas específicas, para os quais os oligonucleotídeos foram redesenhados no presente estudo.

- EutC: anotação descrita para o gene codante da Etanolamina amônia liase em *E.coli*

Esta enzima pertence as vias dependentes de vitamina B12 em bactérias. A utilização de etanolamina como fonte única de carbono e energia requer vitamina B12 para ambas as funções: indutor da via catabólica e cofator da enzima etanolamina amônia liase. Etanolamina amônia liase é a primeira enzima da via que converte etanolamina a acetaldeído e amônia; acetaldeído serve como fonte de carbono e energia ao ser convertido em acetil-coA e a amônia serve como fonte de nitrogênio. A etanolamina é facilmente encontrada na natureza, pois está presente nos fosfolipídios das membranas celulares como a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina (PAIVA, 2010). Nossa sequência é específica para detecção de *E. coli*, porém referenciado na literatura como região promotora do gene *malB* (sistema de maltose) por Wang e colaboradores em 1997 e adotado para identificar qualquer sorotipo desta espécie. Adotamos aqui a anotação fornecida pelo GeneBank em 2012.

- entC: anotação descrita para o gene codante que codifica enterotoxina C do *S. aureus*

O gene entC mostrou correlação forte com a produção de enterotoxina e foi proposto para estudo por Tamarapu e colaboradores em 2001.

As enterotoxinas estafilocócicas são consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais. O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigenicamente distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC. A enterotoxina C é heterogênea e apresenta

variações antigênicas e em sua sequência molecular, ocorrendo ainda, as variantes SEC bovina e SEC ovina, cuja classificação é baseada em diferenças antigênicas e no animal hospedeiro da qual foi isolada.

- *invA*: anotação descrita para o gene codante que codifica uma proteína de invasão da *Salmonella enterica*

As ilhas de patogenicidade de *Salmonella sp.* (*Salmonella Patogenicity Island*, SPI) são grandes regiões do cromossomo (10 a mais de 100 Kb) que codificam vários fatores de virulência. Estas ilhas estão ausentes em estirpes não patogênicas da mesma espécie, apresentam conteúdo de guanidina e citosina (G+C) diferente do restante do cromossomo e frequentemente estão localizadas adjacentes a genes que codificam RNA transportador. Ao todo já foram descritas 17 SPIs, algumas são conservadas para o gênero enquanto outras são específicas para determinados sorotipos, como exemplo, SPI-1 está presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies e sorotipos de *Salmonella enterica*. Já a ilha SPI-7 é específica para os sorovares *Typhi*, *Dublin* e *Paratyphi C*. Na SPI-1 estão localizados genes necessários para invasão, característica importante para virulência de *Salmonella enterica*. Dentre as ilhas de patogenicidade SPI – 1 é a melhor caracterizada. O operon *Inv* (*invasibility*) presente na SPI-1 é composto de sete genes *invABCDEFG*. O gene *invA* é o primeiro no operon, e desempenha função importante na invasão de células epiteliais. Sorotipos de *Salmonella enterica* que não possuem o gene *invA* são incapazes de expressar os genes *invABC*, tornando-os impossibilitados de invadir células de mamíferos. Por isso, o gene *invA* parece ser bastante conservado em todos os sorovares de *Salmonella*, sendo o gene utilizado para sua detecção pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (revisado por De Oliveira e colaboradores, 2013).

A partir da descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foram desenhados oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos primers estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
Tm do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	80 bases	600 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e [Símbolo]G de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

Oligonucleotídeo	Sequência (5´[Símbolo]3´)	Produto estimado	Espécie
entC_F	TTTTACACCCAACGTATTAGCAGA	401 pb	<i>S. aureus</i>
entC_R	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
EutC_F	TCTATGGGCTGTGACTGCTG	113 pb	<i>E. coli</i>
EutC_R	GGCATCCCCATGATGTAGTT		
invA_F	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	445 pb	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>
invA_R	CGACAAGACCATCACCAATG		

4.8. PCR qualitativo

Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 95°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o de 100pb ou de 50pb DNAI/HindIII (JENA®).

4.9. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no início foi usado a voltagem de 50 V e após começar a correr o gel, aumentou-se a voltagem para 100 V. Utilizou-se o marcador de 100 pB (pares de bases). Foi adicionado 3 µL de corante Bromophenol (que tem a função de fazer uma ligação na amostra de DNA e permitir a visualização da corrida no gel de agarose) em 7 µL de amostra. Para o preparo do gel foi utilizado TBE (Tris- Ácido Bórico), agarose e brometo de etídio (que tem função de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas

A contagem total de bactérias em placas é usada como um indicador de condições higiênico-sanitárias nos alimentos. A contagem elevada desses microorganismos pode indicar deterioração do alimento e conseqüente diminuição da sua vida de prateleira (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos - ICMSF (2002), as contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas são indicadores microbianos comumente utilizados para certificar a qualidade dos alimentos. A Tabela 4 apresenta a contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de *sashimis* e os resultados foram expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão.

Tabela 4. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de sashimis

Amostras de Sashimis	Bactérias mesófilas		Bactérias psicrotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	5,00x10 ⁵	5,30 ± 0,97	7,47x10 ⁵	5,61 ± 0,72
Amostra 2	*	-	1,67x10 ⁴	3,97 ± 0,56
Amostra 3	1,50x10 ⁵	5,13 ± 0,22	1,43x10 ⁶	6,15 ± 0,09
Amostra 4	4,00x10 ⁵	5,59 ± 0,11	1,67x10 ⁶	6,19 ± 0,21
Amostra 5	7,00x10 ⁶	6,71 ± 0,40	3,00x10 ⁴	4,46 ± 0,15
Amostra 6	3,00x10 ⁵	5,46 ± 0,15	ND	ND
Amostra 7	2,00x10 ³	3,26 ± 0,24	1,13x10 ⁴	4,05 ± 0,09
Amostra 8	9,90x10 ⁴	4,81 ± 0,54	3,43x10 ⁵	5,49 ± 0,27
Amostra 9	3,00x10 ⁴	4,46 ± 0,15	2,10x10 ⁴	4,17 ± 0,46
Amostra 10	1,60x10 ⁴	3,90 ± 0,78	7,80x10 ⁵	5,72 ± 0,56

* placas com quantidades incontáveis de colônias

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata

DP = desvio padrão

ND = não detectado

Neste estudo, foram detectadas nas amostras de *sashimis* contagens de bactérias mesófilas entre $2,00 \times 10^3$ e $7,00 \times 10^6$ UFC/g e contagens de bactérias psicotróficas entre $1,13 \times 10^4$ e $1,67 \times 10^6$ UFC/g. Embora, a legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabeleça um padrão para contagem total de bactérias totais nos alimentos, de acordo com JAY (2005), FORSYTHE (2002) e FRANCO e LANDGRAF (2008), contagens totais acima de $1,00 \times 10^6$ UFC/g indicam um produto com a qualidade comprometida, com início de deterioração. Neste estudo a amostra de *sashimi* 5 pode ser considerada um produto com a qualidade comprometida, pois apresentou contagens de mesófilos acima de $7,00 \times 10^6$ UFC/g.

As bactérias que crescem nos alimentos refrigerados são chamadas de psicotróficas e tem a capacidade de multiplicar-se em temperaturas baixas. Os micro-organismos psicotróficos em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira do pescado, por constituírem seus principais deterioradores (BARTOLOMEU et al., 2011). Neste estudo, as amostras de *sashimis* 3 e 4 apresentaram altas contagens de bactérias psicotróficas de $1,43 \times 10^6$ e $1,67 \times 10^6$, respectivamente, podendo ser consideradas produtos com a qualidade comprometida.

No estudo de SANTOS (2013 a), os resultados das análises de 27 amostras de *sashimis* à base de salmão mostraram resultados parecidos com este estudo, sendo que na contagem dos micro-organismos mesófilos obteve-se um valor médio de 5,21 log UFC/g e na contagem dos micro-organismos psicotróficos obteve-se um valor médio de 4,90 log UFC/g. Já no estudo de MUSCOLINO et al. (2014), as 12 amostras de *sashimis* analisadas mostraram altas contagens de micro-organismos mesófilos e psicotróficos, com valores entre 7,00 e $>8,00$ log UFC/g. Quando esses micro-organismos estão presentes em grandes quantidades nos alimentos perecíveis indicam abuso durante o armazenamento em relação ao tempo/temperatura, falhas na sanitização ou deficiência no processo (LIMA, 2012).

5.2. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes

Coliformes totais são bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, conhecidos por serem anaeróbios facultativos não esporulados, com capacidade de crescer em presença de sais biliares e principalmente, produzir

gás e ácidos a partir do processo de fermentação de lactose, em temperaturas de 35-37°C no período de 24-48 horas. Contagens elevadas de coliformes totais evidenciam possíveis problemas higiênicos no processamento, possíveis contaminações pós-sanitização ou pós-processo e provável presença de micro-organismos patogênicos entéricos (FRANCO e LANDGRAF, 2008; SOUSA, 2006).

Coliformes termotolerantes são considerados um subgrupo dos coliformes totais, os quais fermentam lactose também com produção de gás em temperaturas mais elevadas (44,5 a 45,5°C) no período de 24-48 horas (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A análise de coliformes termotolerantes tem o objetivo de indicar a presença de material fecal na amostra e a partir dos resultados também avaliar a presença de patógenos entéricos que ofereçam risco de toxinfecção alimentar (SANTOS, 2013 b). A tabela 5 apresenta os resultados deste estudo para a determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de *sashimis*.

Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de *sashimis*

Amostras de Sashimis	Coliformes totais		Coliformes termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g ± DP	NMP/g	Log NMP/g ± DP
Amostra 1	1,21x10 ²	2,07 ± 0,15	0,51x10 ¹	0,67 ± 0,27
Amostra 2	6,70x10 ¹	1,32 ± 0,19	0,57x10 ¹	0,67 ± 0,32
Amostra 3	3,83x10 ²	1,93 ± 0,96	0,59x10 ¹	0,69 ± 0,30
Amostra 4	1,10x10 ³	3,04 ± 0,00	1,10x10 ³	3,04 ± 0,00
Amostra 5	0,53x10 ¹	1,05 ± 0,54	0,99x10 ¹	0,80 ± 0,47
Amostra 6	2,10x10 ¹	1,32 ± 0,03	0,53x10 ¹	0,67 ± 0,26
Amostra 7	2,37x10 ²	2,03 ± 0,86	0,96x10 ¹	0,51 ± 0,05
Amostra 8	4,23x10 ²	2,18 ± 0,86	1,97x10 ¹	1,25 ± 0,25
Amostra 9	2,10x10 ¹	1,29 ± 0,22	1,19x10 ¹	0,96 ± 0,40
Amostra 10	1,02x10 ²	1,79 ± 0,53	1,05x10 ¹	1,00 ± 0,16

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata
DP = desvio padrão

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabelece limites de tolerância para o grupo dos coliformes totais no pescado “*in natura*” resfriado. Entretanto, a enumeração elevada de coliformes totais indica falhas higiênicas na cadeia produtiva (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Segundo GATTI JUNIOR (2011), a enumeração de coliformes totais acima de $1,0 \times 10^2$ NMP/g (como ocorreu em 60% das amostras deste estudo) já indica a necessidade de realizar um controle mais rígido das condições higiênico-sanitárias de cultivo, processamento e comercialização do pescado.

A contaminação dos *sashimis* por coliformes pode ocorrer tanto na captura e transporte da matéria prima, como durante o processamento nos restaurantes, sendo de grande importância o uso de técnicas corretas de manipulação (VALLANDRO et al., 2011). No estudo de VALLANDRO et al. (2011), a higiene deficiente dos utensílios e equipamentos foi um ponto frequentemente observado nos restaurantes analisados e o uso de panos não descartáveis pelos “*sushimen*” durante a manipulação dos *sashimis* foi observado em 100% dos restaurantes analisados. No estudo de BARTZ (2008), através da avaliação da contaminação microbiológica de panos não descartáveis utilizados em serviços de alimentação, verificou-se a presença de bactérias coliformes nesses panos e também se observou que estes panos foram capazes de transferir bactérias de forma significativa para as superfícies de trabalho. A ausência de cuidado em relação aos panos se torna mais um fator responsável pela contaminação cruzada no ambiente de manipulação.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001), estabelece limites de coliformes termotolerantes nos *sashimis* e similares crus a valores de no máximo $1,0 \times 10^2$ NMP/g. Neste estudo, todas as amostras apresentaram resultados positivos para a enumeração de coliformes termotolerantes, porém apenas a amostra 4 apresentou elevado número de coliformes termotolerantes ($1,10 \times 10^3$ NMP/g) e portanto estava imprópria para o consumo. No estudo de VALANDRO et al. (2011), vinte e cinco por cento (27 amostras) das 108 amostras de *sashimis* coletadas em restaurantes na cidade Porto Alegre apresentaram contagens de coliformes termotolerantes acima do limite estabelecido.

Alguns estudos realizados em diferentes cidades do Brasil (São Paulo, Brasília, Recife e Fortaleza), relataram contagens elevadas de coliformes termotolerantes em amostras de *sashimis*, com resultados de 25 a 50% das

amostras em desacordo com os parâmetros permitidos pela legislação brasileira, indicando que existem problemas de qualidade na matéria-prima, manipulação e conservação desses alimentos (LIMA et al., 2009; MARTINS, 2006; PINHEIRO et al., 2006; RESENDE et al., 2009).

5.3. Pesquisa de *Salmonella sp.* nas amostras de *sashimis*

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram negativos e bioquimicamente são lactose e sacarose negativos, porém tem a capacidade de fermentar a glicose e produzir gás (FRANCO e LANDGRAF, 2008). *Salmonella sp.* é considerada a principal bactéria que causa doença entérica de origem bacteriana no ser humano, sendo responsável por grandes surtos de origem alimentar (GATTI JUNIOR, 2011). Esse gênero é capaz de desencadear doenças como a febre tifoide, febre paratifoide e febres entéricas (D'AOUST, 2007). Seu habitat é no trato intestinal de animais e seres humanos. Sua principal via de transmissão é pelos alimentos que podem ser contaminados direta ou indiretamente pelas fezes dos animais portadores da bactéria, pelos utensílios utilizados no preparo do alimento, equipamentos e/ou pelo contato com águas poluídas (CARVALHO, 2006).

A tabela 6 apresenta os resultados da pesquisa de *Salmonella sp.* nas amostras de *sashimis*.

Tabela 6. Pesquisa de *Salmonella sp.* nas amostras de *sashimis*

Amostras de <i>Sashimis</i>	Agar SS* (Suspeita de <i>Salmonella sp.</i>)	Agar TSI** (Suspeita de <i>Salmonella sp.</i>)	PCR
Amostra 1	Suspeita	Negativo	---
Amostra 2	Suspeita	Negativo	---
Amostra 3	Suspeita	Suspeita	Negativo
Amostra 4	Negativo	---	---
Amostra 5	Suspeita	Negativo	---
Amostra 6	Negativo	---	---
Amostra 7	Suspeita	Negativo	---
Amostra 8	Suspeita	Negativo	---
Amostra 9	Suspeita	Negativo	---
Amostra 10	Suspeita	Negativo	---

* Amostras suspeitas de serem *Salmonella sp.* no Agar SS: colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro

** Amostras suspeitas de serem *Salmonella sp.* no Agar TSI: superfície do meio vermelha e a base negra

Neste estudo, a amostra 3 foi suspeita para *Salmonella sp.*, porém após análise molecular a amostra não foi geneticamente confirmada como *Salmonella enterica*. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) determina que *Salmonella sp.* deve estar ausente em 25g nesse tipo de alimento. No estudo de BRAGHINI et al. (2015), as análises de 15 amostras de *sashimis* coletadas de cinco restaurantes da cidade de Maringá, PR, revelaram que 3 amostras tiveram resultados positivos para *Salmonella sp.*, sendo consideradas inadequadas para o consumo. No estudo de MALAVOTA et al. (2009), pôde-se constatar a presença de *Salmonella sp.* em oito das 64 amostras de *sashimis* analisadas (12,5% das amostras coletadas de 2 restaurantes da cidade do Rio de Janeiro, RJ). No estudo de VIEIRA et al. (2007), foram isoladas 6 cepas de *Salmonella sp.* em amostras de *sashimis* de atum coletadas de 2 restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará.

A presença de bactéria *Salmonella sp.* no pescado cru evidencia problemas higiênico-sanitários no processos de produção, processamento e comercialização desse pescado, pois a bactéria *Salmonella sp.* não faz parte da microbiota natural do

peixe e sua presença pode ser justificada pela manipulação inadequada nas etapas da cadeia produtiva ou pelo contato do pescado com águas contaminadas com esgoto e material fecal, representando uma via de transmissão dessas bactérias (MARTINS et al., 2002; NOVOTNY et al 2004; SANTOS et al., 2008).

De acordo com SHABARIATH et al. (2007), a prevalência de *Salmonella sp.* nos frutos do mar e pescado é muito maior do que a relatada nas pesquisas em geral, e isso é justificado pela dificuldade de detecção desse gênero de bactérias, sendo que a validade dos resultados depende de meios de análise e técnicas de laboratório.

5.4. Contagem de *Staphylococcus sp.* nas amostras de *sashimis*

Pertencentes à família *Micrococcaceae*, bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem células esféricas, são Gram positivas imóveis não esporuladas e possuem um metabolismo fermentativo e respiratório (anaeróbias facultativas). Dentro deste gênero, *Staphylococcus aureus* é a espécie contaminante mais comum encontrada em alimentos, sendo um dos principais responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade destas bactérias em produzir e liberar enterotoxinas causadoras de intoxicações (LORENZON, 2009). A Tabela 7 apresenta os resultados das contagens de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de *sashimis* deste estudo.

Tabela 7. Contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de sashimis

Amostras de <i>Sashimis</i>	Agar Sal (Total de colônias)		*Agar sal manitol e coloração de gram (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	UFC/g	Log UFC/g \pm DP	UFC/g
Amostra 1	ND	ND	ND
Amostra 2	4,33x10 ²	2,63 \pm 0,06	3,00x10 ²
Amostra 3	2,40x10 ³	3,36 \pm 0,14	1,67x10 ²
Amostra 4	1,00x10 ⁴	2,67 \pm 2,35	ND
Amostra 5	6,67x10 ²	3,30 \pm 1,9	ND
Amostra 6	6,67x10 ¹	1,33 \pm 1,15	ND
Amostra 7	1,67x10 ²	2,16 \pm 0,28	ND
Amostra 8	1,33x10 ²	1,49 \pm 1,31	6,67x10 ¹
Amostra 9	1,53x10 ³	2,89 \pm 0,65	3,33x10 ¹
Amostra 10	9,33x10 ³	3,83 \pm 0,47	5,67x10 ²

* Colônias amarelas (fermentadoras de manitol) no agar sal manitol e cocos gram positivas com agrupamento de *Staphylococcus* sp. na coloração de gram
Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata
DP = desvio padrão
ND = não detectado

Os valores máximos aceitáveis para contagem de *Staphylococcus aureus* em amostras de *sashimis* na legislação brasileira (BRASIL, 2001) são de 5,0x10³ UFC/g. Foi possível observar nesse estudo que 50% das amostras de *sashimis* apresentaram cepas de *S. aureus*, porém as contagens que variaram de 3,33x10¹ a 5,67x10² UFC/g estavam dentro dos limites permitidos pela legislação.

A presença de bactérias *S. aureus* em cinco das 10 amostras de *sashimis* analisadas neste estudo indicam condições higiênicas inapropriadas e/ou processamentos deficientes, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada. O *sashimi* sofre intensa manipulação durante seu preparo, assim, a manipulação é o principal fator que determina a presença de *S. aureus* nesse tipo de alimento, uma vez que esta bactéria pode estar presente nas

mãos e mucosas oro-nasal do manipulador (SIMON e SANJEEV, 2007; VALANDRO et al., 2011).

No caso da presença de bactérias *S. aureus* nos alimentos, um fator de extrema importância diz respeito aos manipuladores, pois muitas vezes eles são responsáveis pela contaminação do alimento. Todo manipulador pode transferir patógenos a qualquer tipo de alimento, mas isso pode ser evitado através de higiene pessoal e manipulação adequada (OPAS, 2005). Hábitos de higiene pessoal durante a manipulação e comercialização, tais com a lavagem das mãos, uso de máscaras e ausência de objetos de adorno são medidas que podem contribuir para a obtenção de produtos de melhor qualidade microbiológica (GERMANO e GERMANO, 2008).

O risco da presença de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos da culinária japonesa servidos em nosso país já foi demonstrado pela detecção de amostras com contagens de *S. aureus* acima do permitido na legislação em alguns estudos (MARTINS, 2006; VIEIRA et al., 2007). No estudo de MARTINS (2006), 20 amostras de *sashimis* coletadas de diferentes estabelecimentos da cidade de São Paulo foram analisadas e 15% das amostras, ou seja, 3 amostras apresentaram contagens de *S. aureus* acima do permitido. VIEIRA et al. (2007) avaliaram 32 amostras de *sushi* e *sashimis* coletadas em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. Os resultados detectaram que 28,1% das amostras de *sushi* e 15,6% das amostras de *sashimi* estavam com contagens de *S. aureus* acima do permitido. Nesses estudos, foram analisadas amostras provenientes de restaurantes não especializados em culinária japonesa ou de preparações servidas em bufê, o que proporcionou manipulação errada, contaminação cruzada e a proliferação de bactérias por estocagem em temperaturas abusivas.

No presente estudo, apenas restaurantes especializados em culinária japonesa foram incluídos e as amostras foram coletadas logo após os *sashimis* terem sido preparados, uma vez que, normalmente, nesses restaurantes os *sashimis* são preparados à medida que o cliente solicita. De acordo com VALANDRO et al. (2011), o treinamento dos manipuladores observado em seu estudo corroborou com a baixa contagem de estafilococos encontrada nos *sashimis*, provavelmente por reflexo de uma higiene pessoal apropriada.

5.5 Análises moleculares

No presente estudo, algumas colônias suspeitas de serem *E. coli* provenientes das amostras de *sashimis* 1, 4, 5 e 8 foram analisadas e essas amostras foram geneticamente confirmadas como *E. coli* (Figura 2). As colônias suspeitas de serem *S. aureus* provenientes das amostras de *sashimis* 2, 3, 8, 9 e 10 foram geneticamente confirmadas como *S. aureus* produtora de enterotoxina C, (Figura 3). Além disto, uma colônia de bactérias isolada suspeita de ser *Salmonella* sp. proveniente da amostra de *sashimi* 3 foi testada e após análise molecular a amostra não foi geneticamente confirmada como *Salmonella enterica* (Figura 4). A tabela 8 apresenta a identificação das colônias isoladas por meio de PCR e as amostras de *sashimis* de onde essas bactérias foram isoladas.

Tabela 8. Identificação por meio de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de *sashimis*

Número da colônia	Amostra	Resultado molecular	Figura
BEL36	<i>sashimi</i> 4	<i>Escherichia coli</i> +	2
BEL40	<i>sashimi</i> 1	<i>Escherichia coli</i> +	
BEL42	<i>sashimi</i> 5	<i>Escherichia coli</i> +	
BEL43	<i>sashimi</i> 5	<i>Escherichia coli</i> +	
BEL70	<i>sashimi</i> 8	<i>Escherichia coli</i> +	
CP	<i>E. coli</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> +	
CN	Controle negativo	<i>Escherichia coli</i> -	
CN	Controle negativo	<i>S. aureus</i> -	3
CP1	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> +	
CP2	<i>S. aureus</i> de amostra vegetal	<i>S. aureus</i> +	
CP3	<i>S. aureus</i> de amostra vegetal	<i>S. aureus</i> +	
BEL9	<i>sashimi</i> 3	<i>S. aureus</i> +	
BEL11	<i>sashimi</i> 2	<i>S. aureus</i> +	
BEL72	<i>sashimi</i> 8	<i>S. aureus</i> +	
BEL73	<i>sashimi</i> 10	<i>S. aureus</i> +	
BEL74	<i>sashimi</i> 9	<i>S. aureus</i> +	
CN	Controle negativo	<i>Salmonella enterica</i> -	
CP1	Controle positivo (ATCC 14028)	<i>Salmonella enterica</i> +	
CP2	<i>Salmonella</i> de amostra vegetal	<i>Salmonella enterica</i> +	
BEL 3	<i>sashimi</i> 3	<i>Salmonella enterica</i> -	

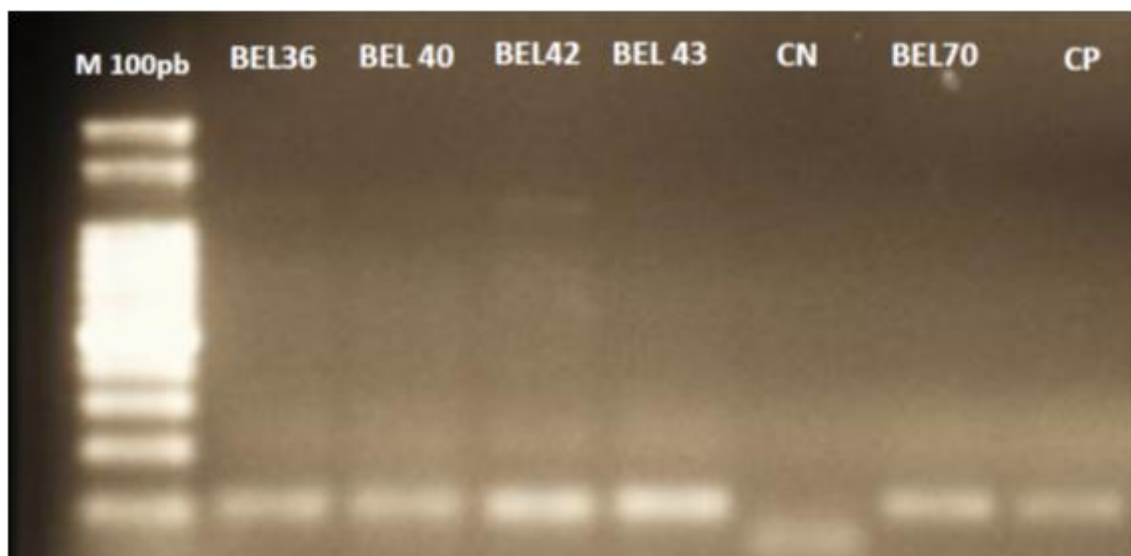


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *EutC* de *E. coli*. 100pb = marcador de 100 pb; BEL36 a BEL70 = amostras deste estudo com amplicons de *EutC* (113 pb); CN = Controle Negativo; CP= Controle positivo ATCC 29213.

A amostra de *sashimi* 4 que já havia sido reprovada pela presença de coliformes termotolerantes acima dos valores permitidos pela legislação brasileira ($1,10 \times 10^3$ NMP/g), teve a confirmação da presença de bactérias *Escherichia coli*, um patógeno entérico importante em doenças de origem alimentar. A transmissão de *Escherichia coli* se dá através dos alimentos contaminados, principalmente produtos de origem animal como carnes cruas ou mal cozidas, mas pode também ser disseminada através de água não clorada. O principal reservatório é o trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente e a bactéria se encontra nas fezes.

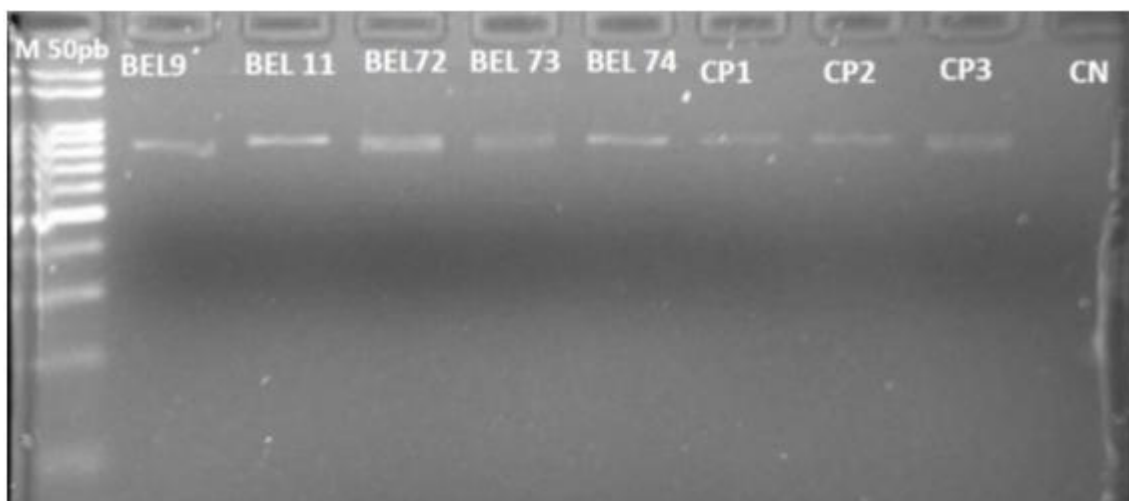


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *entC* de *S. aureus*. 50pb = marcador de 50 pb; BEL9 a BEL74 = amostras deste estudo com amplicons de *entC* (401 pb); CP= controle positivo ATCC 33862 e outros; CN= Controle Negativo.

A figura 3 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *entC*, identificando as colônias *S. aureus*. Todas as amostras suspeitas tiveram a amplificação bem sucedida, sendo confirmada a presença de *S. aureus* nas amostras de *sashimis* 2, 3, 8, 9 e 10 (50% das amostras), o que refletiu a falta de higiene em algum momento do processo e/ou de manipulação do pescado.

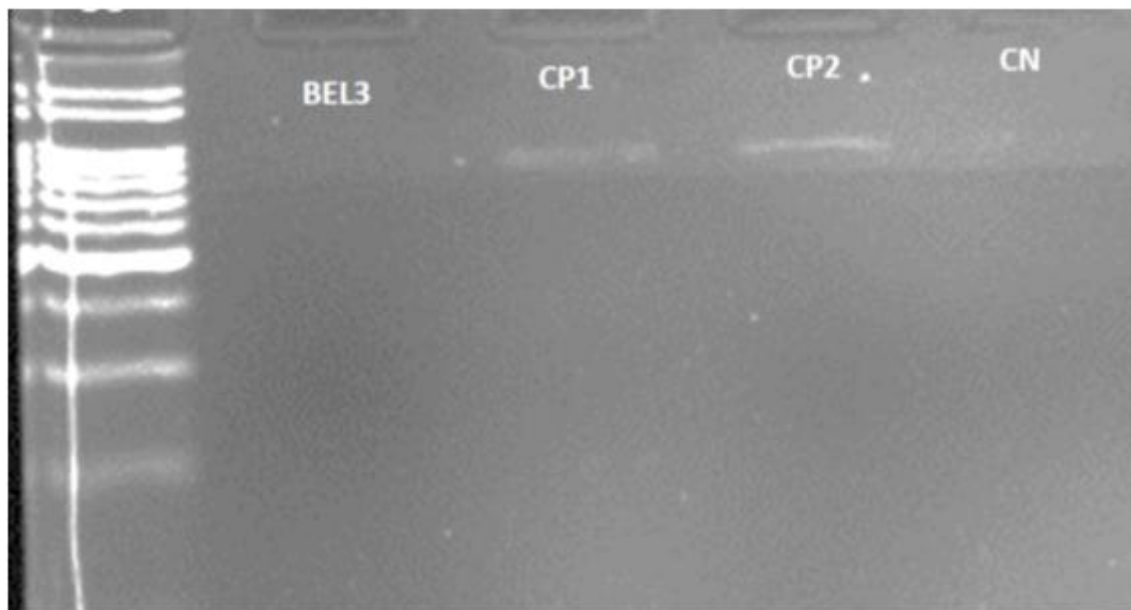


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella enterica*. M = marcador de 100 pb; BEL3= amostra deste estudo com amplicons de *invA* (445 pb); CP= controle positivo ATCC 14028 e outro; CN= Controle Negativo.

A eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella enterica* indicou que para a amostra 3 não tinha contaminação por essa espécie de bactéria.

6. CONCLUSÕES

Cada vez mais está a introduzir-se nos hábitos dos brasileiros o consumo de *sashimis* e desta forma observa-se um aumento do número de restaurantes e de estabelecimentos por todo o território nacional que oferecem este tipo de alimento. O pescado fresco apresenta uma grande variedade de micro-organismos e o aumento do consumo de alimentos sem tratamento térmico, como o *sashimi*, aumenta o risco de DTA's, podendo ocorrer infeções e intoxicações de origem alimentar com consequências na saúde da população.

No presente trabalho, das dez diferentes amostras de *sashimis* à base de salmão analisadas, uma amostra estava inadequada para o consumo humano, não atendendo aos padrões de qualidade microbiológica estabelecidos pela legislação brasileira. A amostra 4 apresentou valores de coliformes termotolerantes acima do limite estabelecido pela legislação brasileira ($>1,0 \times 10^2$ NMP/ g).

Foi observado que cinco amostras de *sashimis* apresentaram cepas de *S. aureus*, porém as contagens estavam dentro dos limites permitidos pela legislação. A presença de bactérias *S. aureus* em 50% das amostras de *sashimis* analisadas indicam condições higiênicas inapropriadas, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada.

Em relação à microbiota deteriorativa, sete amostras apresentaram quantidades elevadas de bactérias. A contagem de bactérias mesófilas foi elevada na amostra 5, que apresentou valor $7,0 \times 10^6$ UFC/g e as contagens de bactérias psicotróficas foram elevadas nas amostras 3 e 4, com valores de 1,4 a $1,7 \times 10^6$ UFC/g. A enumeração de coliformes totais ficou acima de $1,0 \times 10^2$ NMP/g em 60% das amostras e todas as amostras mostraram resultados positivos para a enumeração de coliformes termotolerantes. Assim, os resultados desta pesquisa indicaram que a amostra 6 mostrou boa qualidade microbiológica, as amostras 1, 2, 3 5, 7, 8, 9 e 10 (80% das amostras de *sashimis*) estavam em condições higiênico-sanitárias aceitáveis para o consumo e a amostra 4 estava imprópria para o consumo.

A contaminação microbiana dessas amostras pode ser proveniente da microbiota original, adquirida no meio aquático ou de contaminação adquirida durante o processo de preparo dos *sashimis* à base de salmão. Outra provável causa para as elevadas concentrações de bactérias observadas é a temperatura de

armazenamento inadequada nos restaurantes, assim como em qualquer outra etapa do processo. Outro ponto possível do aumento na carga bacteriana é o excessivo tempo de armazenamento desse pescado ou, ainda, pela contaminação cruzada dos vegetais que acompanham os pratos.

Apesar da maioria das amostras de *sashimis* deste estudo estar em condições aceitáveis de consumo, os resultados obtidos neste estudo mostram que é necessário ter algumas preocupações com relação à presença de bactérias patogênicas no *sashimi* e, portanto, os restaurantes e manipuladores devem estar atentos as Boas Práticas de Fabricação de forma a garantir aos consumidores que seus produtos estejam seguros e sem contaminantes que possam prejudicar a saúde do consumidor.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPARSLAN, Y; GÜREL, Ç; METIN, C; HASANHOCAOĞLU, H; BAYGAR, T., Determination of sensory and quality changes at treated sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during cold-storage. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 3, n. 10, p. 1-5, 2012.

AMUSUH - DF quer produzir mais peixe. 2012. Disponível em: http://amusuh.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=153:df-quer-produzir-mais-peixe&catid=37:noticias&Itemid=60. Acesso em 21 de Setembro de 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Manual de Microbiologia Clínica para Serviços de Saúde**, Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, Módulo IV, Brasília, 2010.

AUBOURG, S. P. et al., Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage, **Food Chemistry**, v. 104, p. 369–375, 2007.

BARTOLOMEU, D. A. F. S.; DALLABONA, B. R.; MACEDO, R. E. F.; KIRSCHNIK, P. G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.1, p. 21-30, 2011.

BARTZ S. **Contaminação microbiológica e avaliação de métodos de higienização de panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS); 2008.

BASTI, A.A.; MISAGHI, A.; SALEHI, T.Z.; KAMKAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, v.17, p.183-188, 2006.

BENEVIDES CMJ, LOVATTI RCC. **Segurança alimentar em estabelecimentos processadores de alimentos**. Revista higiene alimentar. São Paulo, v.18, n.125, p. 24-27, 2004.

BORGES, A. M. **O mercado do pescado em Brasília**, 109 p., INFOPECA. 2010. Disponível em: www.infopesca.org/sites/.../Informe-Brasilia.pdf. Acessado em: 15/09/2016.

BRAGHINI, F. et al. **Análise microbiológica de sashimis a base de salmão, comercializados na cidade de Maringá-PR quanto a presença de coliformes totais e termotolerantes**, Anais Eletrônico IX EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, n. 9, p. 4-8, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 12 de 02 de janeiro de 2001, **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, DF, 2001.

CARVALHO, V. M. **Colibacilose e salmonelose**. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Orgs.). Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca, p. 742-750, 2006.

DAMASCENO, A. **Qualidade (sensorial, microbiológica, físico-química e parasitológica) de salmão (*Salmo salar*, Linnaeus, 1778) resfriado, comercializado em Belo Horizonte – MG**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

D' Aoust, J. Y. Current foodborne pathogens: *Salmonella*. Food Safety Handbook: **Microbiological Challenges**, p. 128-141, 2007.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Salmonella enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade, **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v.9, n.16, p. 1947-1972, 2013.

DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; VALLE, S. F.; PILLOTO, F.; RODEMBUSH, C.; WALD, V. B.; CANAL, C. W.; NASCIMENTO, V. P. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteridis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

DOWNES, F. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th. Washington, DC: **American Public Health Association**, 2001, 676 p.

ECHEVENGUA, M. M. et al. Qualidade da polpa da carpa Húngara transportada viva ou no gelo. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 2004-2010, 2008.

EINEN, O.; GUERIN, T.; FJAERA, S. O., SKJERVOLD, P. O. Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon, **Aquaculture**, v. 212, p. 129–140, 2002.

FAO - Fisheries and Aquaculture Department, ***Salmo salar* (Linnaeus, 1758)**, 2013, Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en. Acesso em 20 de setembro de 2016.

FARIAS, M. C. A.; FREITAS, J. A. Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias paraenses. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 113-117, 2008.

FENG, P; WEAGENT, SD; GRANT, MA. **Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em: www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web_root/collection/available/etd04102005-213953/unrestricted/etd.pdf. Acesso em 10 de setembro de 2016.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

GANDRA, E. A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S. G. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GATTI JUNIOR, P. **Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes de cultivo, comercializadas no varejo**. 47 p. Tese de Mestrado, UNESP, Campus de Jaboticabal, 2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GIAMPIETRO, A.; REZENDE-LAGO, N. C. M. Qualidade do gelo utilizado na conservação de pescado fresco. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.76, n. 3, p. 505-508, 2009.

GILBERT, R. J., LOUVOIS, J., DONOVAN, T., LITTLE, C., RIBEIRO, C. D., RICHARDS, J., ROBERTS, D., BOLTON, F. J. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point for sale. **Communicable Disease and Public Health**, v. 3, p. 163 – 167, 2000.

GRAM, L.; DALGAARD, P., Fish spoilage bacteria – problems and solutions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 262-266, 2002.

HIRATA, M. **Influência da imigração japonesa na cozinha brasileira**. Disponível em: http://www.ipk.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=61&Itemid=70>. Acesso em: 10 nov. 2007.

HUSS HH, REILLY A, EMBAREK PKB. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control** 2000; 11:149-156.

ICMSF – Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOHNSTON, I. A. et al., Muscle and flesh quality traits in wild and farmed Atlantic salmon, **Aquaculture**, v. 256, p. 323–336, 2006.

KIESSLING, A.; STIEN, L. H.; TORSLETT, Ø.; SUONTAMA, J.; SLINDE, E. Effect of pre- and post-mortem temperature on rigor in Atlantic salmon muscle as measured by four different techniques, **Aquaculture**, v. 259, p. 390–402, 2006.

LIMA, M. G.; REIS, R. B. Incidência de *Salmonella* spp. e comparação entre metodologias de detecção em amostras de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) de rio e cultivado comercializadas no município de Curitiba – MT. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p.43-49, 2002.

LIMA, R. M. T. et al. **Avaliação microbiológica de sushis e sashimis comercializados na cidade do Recife-PE**. Pernambuco, 2009. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0620-1.pdf>. Acesso em: 21/09/16.

LORENZON, C. S. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do estado de São Paulo. 2009. 52 f. Dissertação de Mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP, Campos de Jaboticabal, São Paulo, 2009.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular, **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

MARTINS, F. O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São**

Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2006.

MARTINS, C. V. B.; VAZ S. K., MINOZZO, M. G. Aspectos sanitários de pescados comercializados em “pesque-pagues” de Toledo (PR). **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 98, p. 51-56, 2002.

MOURA FILHO, L. G. M. et al. Enumeração e pesquisa de *Vibrio* spp. e coliformes totais e termotolerantes em sashimis de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco, **Acta Scientiarum Technology**, v. 29, n. 1, p. 85-90, 2007.

MUSCOLINO, D. et al. Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy. **Italian Journal of Food Safety**, v. 3, n. 1701, p. 134-136, 2014.

NOVOTNY, L. et al. Fish: a potencial source of bacterial pathogens for human beings. **Veterinary Medicine**, v. 49, n. 9, p. 343-358, 2004.

ODOLI, C. O. **Optimal storage conditions for fresh farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets.** 84 p. Masters in Science Department of Food Science and Nutrition, University of Iceland, 2009.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. HACCP: **Ferramentas Essenciais para Inocuidade dos Alimentos.** Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPPAZ; 2005.

PAIVA, J. B. **Infecção de aves por mutantes de *Salmonella* sorotipos *gallinarum*, *pullorum* e *enteritidis* com deleção nos genes *cobS* e *cbiA*.** 2010. 96 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

PARK, S. H. et al. Identification of *Salmonella enteric* subspecies I, *Salmonella enterica* serovars *typhimurium*, *enteritidis* and *typhi* using multiplex PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 301, p. 137-146, 2009.

PINHEIRO, H. M. C. et al. *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes em *sushi* e *sashimi* comercializados na cidade de Fortaleza- Ceará. **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, v. 1, n. 1, p. 23-31, 2006.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

POWLEDGE, T. M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education**, v. 28, p. 44-50, 2004.

POURASHOURI, P.; CHAPELA, M. J.; ATANASSOVA, M.; CABADO, A. G.; VIEITES, J. M.; AUBOURG, S. P., Quality loss assessment in fish-based ready-to-eat foods during refrigerated storage, **Grasas y Aceites**, v. 64, n. 1, p. 22-29, 2013.

REIJ MW, DEN AANTREKKER ED. Recontamination as a source of pathogens in precessed foods. **International Journal of Food Microbiology** 2004; 91:1-11.

RESENDE, A.; SOUZA, J. R.; OLIVEIRA, Y. S. Analise microbiológica de *sushis* e *sashimis* comercializados em restaurantes de Brasília no período de 2001 a 2004. **Revista Higiene Alimentar**, v. 23, p. 164-70, 2009.

RODRIGUES, B. L. et al., Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de *sushis* e *sashimis* de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, 2012.

RODRIGUES, M. X.; BITTENCOURT, J. V. M.; MATOS, E. A. S. A. de; REIS, D. R. R. Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. **LAJBM**, v. 2, n. 2, p. 54-81, 2011.

SALÁN, E. O.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. Use of smoking to add value to the salmoned trout. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.1, p.57-62, 2006.

SANTOS, C. I. C. **Avaliação microbiológica de sashimi (microbiota deteriorativa e patogênica)**. 90 p., Tese de Mestrado, Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Portugal, 2013 a.

SANTOS, E. C. B. **Métodos de abate e qualidade da tilápia do Nilo**. 97 p., Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP, 2013 b.

SANTOS, T. M. et al. Inspeção visual e avaliações bacteriológicas e físico-químicas da carne de piramutaba (*Brachyplatistoma vaillanti*) congelada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1538-1545, 2008.

SENRANS, F. J., IBANEZ, E., CIFUENTES, A. New Trends in food processing. **Food Science and Nutrition**, Inglaterra, v. 43, n. 5, p. 507-526, 2003.

SHABARINATH, S. H. et al. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 227-233, 2007.

SCHERER, R.; AUGUSTI, P.R. LAZZARRI, R.; LIMA, R. L.; NETO, J. R. Efeito do gelo corado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 24, n. 4, 2004.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, n. 12, p. 1565-1568, 2007.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W.; ROSNES, T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 37, 2002.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para o estudo da vida útil de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis*

niloticus) sem pele, armazenados em gelo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2289-2300, 2012.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v.9, n.1, p. 83-88, 2006.

SUZUKI, F. **Salmão de Chile prioriza o mercado brasileiro**, 2013, Disponível em: http://brasileconomico.ig.com.br/noticias/salmon-de-chile-prioriza-o-mercado-brasileiro_127318.html, Acesso em 28 de setembro de 2016.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

TAVARES, M.; GONÇALVES, A. A. Aspectos físico-químicos do pescado. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Editora Atheneu, p. 10-20, 2011.

TEODORO, V. A. M.; PINTO, M. C. D.; VANETTI, P. D.; BEVILACQUA, M. P.; PINTO, M. S. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, 9-14, 2006.

TONIAL, I. B.; OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Caracterização físico-química e perfil lipídico do salmão (*Salmo salar* L.). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 1, p. 91-96, 2010.

VALANDRO et al. Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 144-150, 2011.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em *sushi* e *sashimi* preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará, **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, v. 15, n. 1, p. 9-14, 2007.

WANG, R.-F.; CAO, W.-W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727-736, 1997.

Nucleotide

GenBank

i Showing 308 bp region from base 3347690 to 3347997.

Escherichia coli strain Ecol_732, complete genome

GenBank: CP015138.1

[FASTA](#) [Graphics](#)
Go to:

LOCUS CP015138 308 bp DNA linear BCT 08-APR-2016
 DEFINITION Escherichia coli strain Ecol_732, complete genome.
 ACCESSION [CP015138](#) REGION: 3347690..3347997
 VERSION CP015138.1 GI:1016298593
 DBLINK BioProject: [PRJNA316786](#)
 BioSample: [SAMN04621897](#)

KEYWORDS .
 SOURCE Escherichia coli
 ORGANISM [Escherichia coli](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
 Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 308)
 AUTHORS Stoesser,N., Sheppard,A., Peirano,G., Sebra,R., Lynch,T., Anson,L.,
 Kasarskis,A., Motyl,M., Kazmierczak,K., Crook,D. and Pitout,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-APR-2016) Department of Microbiology (Research), John
 Radcliffe Hospital, University of Oxford, Headley Way, Oxford OX3
 9DU, United Kingdom

COMMENT Bacteria available from Johann Pitout, University of Calgary
 Laboratory Services, Calgary, Alberta, Canada, or Nicole Stoesser,
 Department of Microbiology, John Radcliffe Hospital, Headley Way,
 Oxford, UK.
 Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation
 Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be
 found here: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/

##Genome-Assembly-Data-START##
 Assembly Method :: HGAP v. 2.2.0
 Genome Coverage :: 1x
 Sequencing Technology :: PacBio
 ##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##
 Annotation Provider :: NCBI
 Annotation Date :: 04/08/2016 11:05:46
 Annotation Pipeline :: NCBI Prokaryotic Genome
 Annotation Pipeline
 Annotation Method :: Best-placed reference protein
 set; GeneMarkS+
 Annotation Software revision :: 3.1
 Features Annotated :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA;
 repeat_region
 Genes (total) :: 5,476
 CDS (total) :: 5,363
 Genes (coding) :: 5,243
 CDS (coding) :: 5,243
 Genes (RNA) :: 113
 rRNAs :: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
 complete rRNAs :: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
 tRNAs :: 86
 ncRNAs :: 5
 Pseudo Genes (total) :: 120
 Pseudo Genes (ambiguous residues) :: 0 of 120
 Pseudo Genes (frameshifted) :: 52 of 120
 Pseudo Genes (incomplete) :: 63 of 120
 Pseudo Genes (internal stop) :: 19 of 120
 Pseudo Genes (multiple problems) :: 12 of 120
 ##Genome-Annotation-Data-END##

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..308
 /organism="Escherichia coli"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="Ecol_732"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:562"
 /country="Thailand: Bangkok"
 /lat_lon="13.76 N 100.50 E"
 /collection_date="2012"
 /collected_by="Merck Study for Monitoring of Antimicrobial
 Resistance Trends (SMART)"
 gene <1..>308
 /locus_tag="A4X18_16425"
 CDS <1..>308

```

/locus_tag="A4X18_16425"
/inference="EXISTENCE: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_000769998.1"
/note="with EutC catalyzes the formation of acetaldehyde
and ammonia from ethanolamine; Derived by automated
computational analysis using gene prediction method:
Protein Homology."
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ethanolamine ammonia-lyase"
/protein_id="AMX14968.1"
/db_xref="GI:1016301601"
/translation="MKLKTTLFGNVYQFKDVKEVLAKANELRSGDVLGVAASSQER
VAAKQVLESEMTVADIRNNPVIAYEDDCVTRLIQDDVNETAYNQIKNWSISELREYVLS
DETSVDDIAFTRKGLTSEVVAAVAKICSNADLIYGAKKMPVIKKANTTIGIPGTF SAR
LQPNDRDDVQSIAAQIYEGLSFGVGDVIGVNPVTDDVENLSRVLDTIYGVIDKFNI
PTQGCILAHVTTQIEAIRRGAPGGLIFQSGSEKGLKEFGVELAMLDEARAVGAEFN
RIAGENCYFETGQGSALSAGANFGADQVTMEARNYGLARHYDPFIVNTVVGF IGPEY
LYNDRQIIRAGLEDHFMGKLSGISMGDCCYTNHADADQNLNENLMILLATAGCNYIM
GMP LGDDIMLNYQTTFHDTATVRQLLNLRPSPEFERWLESMGIMANGRLTKRAGDPS
LFF"

```

ORIGIN

```

1 tatctctaca acgaccgcca gattatccgc gcaggcttag aagatcactt tatgggcaaa
61 ctgagcggca tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca accacgctga cgctgaccag
121 aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc gccaccgag gctgcaacta catcatgggg
181 atgccgctgg gcgatgacat catgctcaac tatcagacca ccgcattcca cgacactgcc
241 actgtgcgtc agttactgaa tctgcgcccg tcaccggagt ttgaacgctg gctggaaagc
301 atgggcat

```

//

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#)
[Help](#)
[About](#)
[Source Code](#)

WARNING: Numbers in input sequence were deleted.

< Back

Pair 1:

Left Primer 1:

Sequence:

Start: 73 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0

Right Primer 1:

Sequence:

Start: 185 Length: 20 bp Tm: 59.6 °C GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0

Product Size: 113 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 0.0

```

1      tatctctaca  acgaccgcca  gattatccgc  gcaggcttag  aagatcactt
51     tatgggcaaa  ctgagcggca  tctctatggg  ctgtgactgc  tgctacacca
101    accacgctga  cgctgaccag  aacctcaacg  aaaacctgat  gatcctgctc
151    gccaccgag  gctgcaacta  catcatgggg  atgcccgctgg  gcgatgacat
201    catgctcaac  tatcagacca  ccgcattcca  cgacactgcc  actgtgcgctc
251    agttactgaa  tctgcgccc  tcaccggagt  ttgaacgctg  gctggaagc
301    atgggcat

```

Select all Primers

Pair 2:

Left Primer 2:

Sequence:

Start: 73 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0

Right Primer 2:

Sequence:

Start: 181 Length: 20 bp Tm: 59.5 °C GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0

Product Size: 109 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 3.0

Pair 3:

Left Primer 3:

Sequence:

Start: 29 Length: 20 bp Tm: 60.1 °C GC: 55.0 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 3:

Sequence:

Start: 136 Length: 20 bp Tm: 59.6 °C GC: 50.0 % ANY: 2.0 SELF: 0.0

Product Size: 108 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 2.0

Pair 4:

Left Primer 4:

Sequence:

Start: 79 Length: 20 bp Tm: 59.7 °C GC: 60.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0

Right Primer 4:

Sequence:

Start: 185 Length: 20 bp Tm: 59.6 °C GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0

Product Size: 107 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 2.0

Send to Primer3Manager Reset Form

Pair 5:

Left Primer 5:

Sequence:

Start: 29 Length: 20 bp Tm: 60.1 °C GC: 55.0 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 5:

Sequence:

Start: 148 Length: 20 bp Tm: 60.6 °C GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0

Product Size: 120 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 3.0

Send to Primer3Manager Reset Form

Statistics:

Left Primer:	considered 1720, low tm 247, high tm 1119, high end compl 4,high 3' stability 41, ok 309
--------------	--

Right Primer:	considered 1704, low tm 173, high tm 1242,high 3' stability 42, ok 247
---------------	--

Primer Pair:	considered 323, unacceptable product size 297, high end compl 11, ok 15
--------------	---

More about [Primer3Plus...](#)

Nucleotide ▾

GenBank

Staphylococcus aureus strain SAI48 staphylococcal enterotoxin C variant v4 (sec) gene, complete cds

GenBank: KX168615.1

[FASTA](#) [Graphics](#)
[Go to:](#)

LOCUS KX168615 801 bp DNA linear BCT 08-JUN-2016
 DEFINITION Staphylococcus aureus strain SAI48 staphylococcal enterotoxin C variant v4 (sec) gene, complete cds.

ACCESSION KX168615
 VERSION KX168615.1

KEYWORDS .

SOURCE Staphylococcus aureus

ORGANISM [Staphylococcus aureus](#)
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae;
 Staphylococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 801)

AUTHORS Johler,S., Sihto,H.M., Macori,G. and Stephan,R.
 TITLE Sequence Variability in Staphylococcal Enterotoxin Genes seb, sec,
 and sed

JOURNAL Toxins (Basel) 8 (6) (2016)

PUBMED [27258311](#)

REMARK Publication Status: Online-Only

REFERENCE 2 (bases 1 to 801)

AUTHORS Johler,S., Sihto,H.-M., Macori,G. and Stephan,R.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-MAY-2016) Institute for Food Safety and Hygiene,
 University of Zurich, Winterthurerstrasse 272, Zurich, Zurich 8057,
 Switzerland

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..801
 /organism="Staphylococcus aureus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="SAI48"
 /isolation_source="human (infection)"
 /db_xref="taxon:1280"
 /country="Switzerland"
 /collection_date="2010"

[gene](#)

1..801
 /gene="sec"

[CDS](#)

1..801
 /gene="sec"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="staphylococcal enterotoxin C variant v4"
 /protein_id="ANJ16442.1"
 /translation="MNKSRFISCVILIFALILVLFPTNVLAEQPDPTDELHKSSEF
 TGTGMNMYLYDDHYVSATKVMVDKFLAHDLIYINISDKKLNKVDKVKTELLNEDLAK
 KYKDEVVDVYGSNYVNCYFSSKDNVGVKVTGGKTCMYGGITKHEGNHFDNGNLQNVLI
 RYVENKRNITISFEVQTDKKSQVTAQELDIKARNFLINKNLYEFNSSPYETGYIKFIEN
 NGNTFWYDMMPPAGDKFDQSKYLMYNDNKTVDKSKSVKIEVHLTTKNG"

ORIGIN

```

1 atgaataaga gtcgatttat ttcatgcgta attttgatat tcgcacttat actagttcctt
61 ttacaccca acgtatttagc agagagccaa ccagacccta cgccagatga gttgcacaaa
121 tcaagtgagt ttactggtac gatgggtaat atgaaatatt tatatgatga tcattatgta
181 tcagcaacta aagttatgtc tgtagataaa tttttggcac atgatttaat ttataacatt
241 agtgataaaa aactaaaaaa ttatgacaaa gtgaaaacag agttattaaa tgaagattta
301 gcaaagaagt acaaagatga agtagttgat gtgtatggat caaattacta tgtaaaactgc
361 tatttttcat ccaaagataa tgtaggtaaa gttacaggtg gtaaaacttg tatgtatgga
421 ggaataacaa aacatgaagg aaaccacttt gataatggga acttacaaaa tgtacttata
481 agagtttatg aaaataaaag aaacacaatt tcttttgaag tgcaaaactga taagaaaagt
541 gtaacagctc aagaactaga cataaaagct aggaattttt taattataaa aaaaaatttg
601 tatgagttta acagttcacc atatgaaaca ggatatataa aattttattga aaataacggc
661 aatacttttt ggtatgatat gatgcctgca ccaggcgata agtttgacca atctaaatat
721 ttaatgatgt acaacgacaa taaaacagtt gattctaaaa gtgtgaagat agaagtccac
781 cttacaacaa agaatggata a

```

//

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#)
[Help](#)
[About](#)
[Source Code](#)

Unrecognized base in input sequence

< Back

Pair 1:

Left Primer 1:

Sequence:

Start: 60 Length: 24 bp Tm: 60.0 °C GC: 37.5 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 1:

Sequence:

Start: 460 Length: 22 bp Tm: 60.1 °C GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 401 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 1.0

```

1      atgaataaga  gtcgatttat  ttcgatgcgta  attttgatat  tcgcacttat
51     actagttcct  tttacacca  acgtattagc  agagagccaa  ccagacccta
101    cgccagatga  gttgcacaaa  tcaagtgagt  ttactggtac  gatgggtaat
151    atgaaatatt  tataatgatg  tcattatgta  tcagcaacta  aagttatgtc
201    tgtagataaa  tttttggcac  atgatttaat  ttataacatt  agtgataaaa
251    aactaaaaaa  ttatgacaaa  gtgaaaacag  agttattaaa  tgaagattta
301    gcaaagaagt  acaaatgatg  agtagttgat  gtgtatggat  caaattacta
351    tgtaaactgc  tatttttcat  ccaaagataa  tgtaggtaaa  gttacaggtg
401    gtaaaacttg  tatgtatgga  ggaataacaa  aacatgaagg  aaaccacttt
451    gataatggga  acttacaaaa  tgtacttata  agagtttatg  aaaataaaag
501    aaacacaatt  tcttttgaag  tgcaaactga  taagaaaagt  gtaacagctc
551    aagaactaga  cataaaagct  aggaattttt  taattaataa  aaaaaatttg
601    tatgagttta  acagttcacc  atatgaaaca  ggatatataa  aatttatgta
651    aaataacggc  aatacttttt  ggtatgatat  gatgcctgca  ccaggcgata
701    agtttgacca  atctaatat  ttaatgatgt  acaacgacaa  taaaacagtt
751    gattctaaaa  gtgtgaagat  agaagtcac  cttacaacaa  agaatggata
801    a//

```

Select all Primers

Pair 2:

Left Primer 2:

Sequence:

Start: 61 Length: 23 bp Tm: 58.8 °C GC: 39.1 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 2:

Sequence:

Start: 460 Length: 22 bp Tm: 60.1 °C GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 400 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 1.0

Pair 3:

Left Primer 3:

Sequence:

Start: 59 Length: 23 bp Tm: 58.7 °C GC: 34.8 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 3:

Sequence:

Start: 460 Length: 22 bp Tm: 60.1 °C GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 402 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 1.0

Pair 4:

Left Primer 4:

Sequence:

Start: 61 Length: 24 bp Tm: 59.6 °C GC: 41.7 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 4:

Sequence:

Start: 460 Length: 22 bp Tm: 60.1 °C GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 400 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 1.0

Pair 5:

Left Primer 5:

Sequence:

Start: 58 Length: 24 bp Tm: 59.5 °C GC: 37.5 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 5:

Sequence:

Start: 460 Length: 22 bp Tm: 60.1 °C GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 403 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 1.0

Statistics:	
Left Primer:	considered 3852, GC content failed 492, low tm 2537, high tm 209, long poly-x seq 15,high 3' stability 21, ok 578
Right Primer:	considered 3865, too many Ns 10, GC content failed 667, low tm 2293, high tm 207, high end compl 2, long poly-x seq 16,high 3' stability 14, ok 656
Primer Pair:	considered 8846, unacceptable product size 8834, ok 12

More about [Primer3Plus...](#)

Nucleotide

GenBank

Showing 1.00kb region from base 1006000 to 1006999.

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Java strain NCTC5706 genome assembly, chromosome: 1

GenBank: LT571437.1

[FASTA](#) [Graphics](#)
Go to:

LOCUS LT571437 1000 bp DNA linear BCT 19-MAY-2016
 DEFINITION Salmonella enterica subsp. enterica serovar Java strain NCTC5706 genome assembly, chromosome: 1.
 ACCESSION [LT571437](#) REGION: 1006000..1006999
 VERSION LT571437.1 GI:1030305712
 DBLINK BioProject: [PRJEB6403](#)
 BioSample: [SAMEA3468845](#)

KEYWORDS .
 SOURCE Salmonella enterica subsp. enterica serovar Java
 ORGANISM [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Java](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
 Enterobacteriaceae; Salmonella.

REFERENCE 1
 CONSRM Pathogen Informatics
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-MAY-2016) WTSI, Pathogen Informatics, Wellcome Trust Sanger Institute, CB10 1SA, United Kingdom

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1000
 /organism="Salmonella enterica subsp. enterica serovar Java"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="NCTC5706"
 /db_xref="taxon:224729"
 /chromosome="1"
 gene
 <1..>1000
 /gene="invA"
 /locus_tag="SAMEA3468845_00989"
 CDS
 <1..>1000
 /gene="invA"
 /locus_tag="SAMEA3468845_00989"
 /inference="ab initio prediction:Prodigal:2.60"
 /inference="similar to AA sequence:RefSeq:YP_004731336.1"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="virulence associated secretory protein"
 /protein_id="SBL14848_1"
 /db_xref="GI:1030306644"
 /translation="MLLSLLNSARLRPELLILVLMVMIISMFIPLPTYLVDFLIALN
 IVLAILVFMGSFYDIRILSFSTFPVAVLLITTLFRLALSISTSRLILIEADAGEIIATF
 GQFVIGDSLAVGFVVFISIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDGMGPKQMSIDADLK
 AGIIDADAARERRSVLERESQLYGSFDGAMKFIKGDIAIGIIIFVNFIGGISVGMTR
 HGMDLSALSTYMTLTIGDGLVAQIPALLIAISAGFIVTRVNGSDNMGRIIMTQLLN
 NPFVLVVTAILTISMGTLPGFPLPVFVILSVL SVLFYFKFREAKRSAAPKTSKGEQ
 PLSTEEKEGSSGLIGDLKDVSTETVPLILLVPKSRREDLEKAQLAERLRSQFFIDYQ
 VRLPEVLLRDGEGLDNNSIVLLINEIRVEQFTVYFDLMRVVNYSDVVSFGINPTIHQ
 QGSSQYFWVTHEEKLRELGYVLRNALDELHYCLA VTLARNVNEYFGI QETKHM L DQ
 LEAKFPDLLKEVLRHATVQRISEVLQRLLSERVSVRNMKLIMEALALWAPREKDVINL
 VEHIRGAMARYICHKFANGGELRAVMVSAEVEDVIRKGI RQTSGSTFLSLDPEASANL
 MDLITLKLDDLLIAHKDLVLLTSDVRRRFIKKMI EGRFPDLEVL SFGEIADSKSVNVI
 KTI"

ORIGIN
 1 ttgattgaag ctgatgccgg tgaattatc gccacgttc ggcaattcgt tattggcgat
 61 agcctggcgg tgggttttgt tgtcttctct attgtcaccg tgggccagtt tatcgttatt
 121 accaaaggtt cagaacgcgt cgcggaagtc gcggcccgat tttctctgga tggtatgccc
 181 ggtaaacaga tgagtattga tgccgatttg aaggccggtt ttattgatgc ggatgccgcg
 241 cgcgaacggc gaagcgtact gaaaagagaa agccagcttt acggttcctt tgacggtgcg
 301 atgaagttaa tcaaaggatga cgctattgcc ggcatcatta tcatctttgt gaactttatt
 361 ggcggtattt cggtggggat gaccgcat ggtatggatt tgcctccgc cctgtctact
 421 tataccatgc tgaccattgg tgatggtcct gtcgccaga tccccgatt gttgattgcg
 481 attagtccg gttttatcgt gactcgcgta aatggcgata gcgataat gggacggaat
 541 atcatgacgc agctgttgaa caaccattt gtattggttg ttacggctat tttgaccatt
 601 tcaatgggaa ctctgccggg attcccgcct ccggtttttg ttattttatc ggtggtttta
 661 agcgtactct tctattttaa attccgtgaa gcaaaacgta gtgccgcaa acctaaaacc
 721 agcaaaggcg agcagcgcct cagtattgag gaaaaagaag ggtcgtcgtt aggactgatt
 781 ggcgatctcg ataaagcttc tacagagacc gtaccgttga tattacttgt gccgaagagc
 841 cggcgtgaag atctggaaaa agctcaactt cggagcgtc tacgtagtca gttctttatt
 901 gattatggcg tgcgcctgcc ggaagtatt ttacgcgat gcgaggcct ggacgataac
 961 agcatcgtat tgttgattaa tgagatcctg gttgaacaat

//



Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#)
[Help](#)
[About](#)
[Source Code](#)

WARNING: Numbers in input sequence were deleted.

[< Back](#)

Pair 1:

<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1:	<input type="text" value="Primer_F"/>				
Sequence:	<input type="text" value="gctgatgccgggaaattat"/>				
Start: 10	Length: 20 bp	Tm: 59.9 °C	GC: 45.0 %	ANY: 4.0	SELF: 3.0
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1:	<input type="text" value="Primer_R"/>				
Sequence:	<input type="text" value="cgacaagaccatcaccaatg"/>				
Start: 454	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 3.0	SELF: 3.0
Product Size: 445 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 1.0			

[Send to Primer3Manager](#)
[Reset Form](#)

```

1      ttgattgaag ctgatgccgg tgaattatc gccacgttcg ggcaattcgt
51     tattggcgat agcctggcgg tgggttttgt tgtcttctct attgtcaccg
101    tgggccagtt tatcgttatt accaaagggt cagaacgcgt cgcggaagtc
151    gcggcccgat tttctctgga tggatgccc ggtaaacaga tgagtattga
201    tgccgatttg aaggccggta ttattgatgc ggatgccgcg cggaacggc
251    gaagcgtact gaaagagaa agccagcttt acggttcctt tgacggtgcg
301    atgaagttta tcaaaggatg cgctattgcc ggcatcatta tcatctttgt
351    gaactttatt ggcggtattt cgggtgggat gaccgccat ggtatggatt
401    tgtctccgc cctgtctact tataccatgc tgaccattgg tgatggtcct
451    gtcgcccaga tccccgcatt gttgattgcg attagtgcg gttttatcgt
501    gactcgcgta aatggcgata gcgataatat gggacggaat atcatgacgc
551    agctggtgaa caaccattt gtattggttg ttacggctat tttgaccatt
601    tcaatgggaa ctctgccggg attcccgctg cgggtttttg ttattttatc
651    ggtggtttta agcgtactct tctattttaa attccgtgaa gcaaacgta
701    gtgccgcaa acctaaaacc agcaaaggcg agcagccgct cagtattgag
751    gaaaaagaag ggtcgtcgtt aggactgatt ggcgatctcg ataaagtctc
801    tacagagacc gtaccgttga tattacttgt gccgaagagc cggcgtgaag
851    atctggaaaa agctcaactt gcggagcgtc tacgtagtca gttctttatt
901    gattatggcg tgcgcctgcc ggaagtattg ttacgcgatg gcgagggcct
951    gacgataac agcatcgtat tgttgattaa tgagatccgt gttgaacaat

```

 Select all Primers

Pair 2:

<input type="checkbox"/> Left Primer 2:	<input type="text" value="Primer_1_F"/>				
Sequence:	<input type="text" value="gcaagcgtactgaaagag"/>				
Start: 249	Length: 20 bp	Tm: 60.2 °C	GC: 55.0 %	ANY: 4.0	SELF: 0.0
<input type="checkbox"/> Right Primer 2:	<input type="text" value="Primer_1_R"/>				
Sequence:	<input type="text" value="ctgccttgcgttttag"/>				
Start: 732	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 2.0	SELF: 0.0
Product Size: 484 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0			

[Send to Primer3Manager](#)
[Reset Form](#)

Pair 3:

<input type="checkbox"/> Left Primer 3:	<input type="text" value="Primer_2_F"/>				
Sequence:	<input type="text" value="ggtgaaattatgccacgtt"/>				
Start: 19	Length: 20 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 45.0 %	ANY: 6.0	SELF: 2.0
<input type="checkbox"/> Right Primer 3:	<input type="text" value="Primer_2_R"/>				
Sequence:	<input type="text" value="gtcacgataaacggcact"/>				
Start: 503	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 4.0	SELF: 1.0
Product Size: 485 bp	Pair Any: 6.0	Pair End: 2.0			

[Send to Primer3Manager](#)
[Reset Form](#)

Pair 4:

<input type="checkbox"/> Left Primer 4:	Primer_3_F				
Sequence:	cgatttgaaggccgtatta				
Start: 204	Length: 20 bp	Tm: 59.9 °C	GC: 45.0 %	ANY: 4.0	SELF: 3.0
<input type="checkbox"/> Right Primer 4:	Primer_3_R				
Sequence:	cgtttgcttcacggaatt				
Start: 698	Length: 20 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 40.0 %	ANY: 4.0	SELF: 3.0
Product Size: 495 bp		Pair Any: 5.0	Pair End: 1.0		

Pair 5:

<input type="checkbox"/> Left Primer 5:	Primer_4_F				
Sequence:	gccggcatcattatcatctt				
Start: 328	Length: 20 bp	Tm: 59.9 °C	GC: 45.0 %	ANY: 6.0	SELF: 2.0
<input type="checkbox"/> Right Primer 5:	Primer_4_R				
Sequence:	atcgccaatcagtcctaacg				
Start: 786	Length: 20 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 50.0 %	ANY: 3.0	SELF: 2.0
Product Size: 459 bp		Pair Any: 3.0	Pair End: 1.0		

Statistics:

Left Primer:	considered 4875, GC content failed 18, low tm 1026, high tm 2654, high end compl 7,high 3' stability 121, ok 1049
Right Primer:	considered 4967, GC content failed 3, low tm 1426, high tm 2270,high 3' stability 117, ok 1151
Primer Pair:	considered 202, unacceptable product size 188, high end compl 1, ok 13

More about [Primer3Plus...](#)