

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

**ERIKA DA SILVA MONTEIRO**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO**  
**DISTRITO FEDERAL**

**BRASÍLIA, DF**

**2018**

ERIKA DA SILVA MONTEIRO

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO  
DISTRITO FEDERAL**

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

2018

ERIKA DA SILVA MONTEIRO

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO  
DISTRITO FEDERAL**

**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)

BRASÍLIA, DF

2018

## RESUMO

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe de água doce mais cultivada no Brasil. Durante a produção e comercialização deste pescado possíveis contaminações microbiológicas podem ocorrer, tornando o alimento impróprio para consumo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de tilápia fresca comercializada em supermercados do Distrito Federal com ênfase em pesquisa de *Salmonella*. Para as análises microbiológicas foram coletadas seis amostras de tilápia fresca de diferentes supermercados. Para a investigação de *Salmonella*, foram adicionadas mais seis amostras, totalizando doze amostras. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicrófilas, determinação de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp. A identificação molecular de *Salmonella* foi realizada através da técnica de PCR e foram realizados testes de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias *Salmonella* isoladas. No presente estudo, das seis amostras analisadas, duas amostras (33,3%) estavam impróprias para o consumo: uma amostra de filé pela alta contagem de *S. aureus* e outra amostra de peixe inteiro pela presença de *Salmonella*. Do total de 12 amostras de tilápia fresca analisadas para a detecção de *Salmonella*, cinco amostras (41,6%) apresentaram a bactéria, confirmada pela detecção do gene *invA* na análise molecular e, portanto, estavam impróprias para o consumo. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 21 cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca mostrou que 52,4% das cepas apresentaram resistência à Amoxicilina com ácido clavulânico, seguido de 14,3% para a Tetraciclina e 4,8% para Sulfonamida e Ceftazidima. A detecção de perfis de *Salmonella* resistentes é indicativa de uso irracional de antimicrobianos na cadeia de produção da tilápia. Assim, existe a necessidade de um maior controle nas boas práticas de manipulação e fabricação deste pescado, como também uma monitorização mais rigorosa para a antibioticoterapia veterinária.

**Palavras-chave:** tilápia, qualidade microbiológica, *Salmonella enterica*, gene *invA*, resistência bacteriana.



## ABSTRACT

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most cultivated species of freshwater fish in Brazil. During the production and commercialization of this fish possible microbiological contaminations can occur, making the food unfit for consumption. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of fresh tilapia marketed in supermarkets in the Federal District with emphasis on *Salmonella* research. For the microbiological analyzes, six samples of fresh tilapia from different supermarkets were collected. For the *Salmonella* investigation, more six samples were added, totaling twelve samples. The analyzes were: total count of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* count and *Salmonella* spp. detection. Molecular identification of *Salmonella* was performed by the PCR technique and antimicrobial susceptibility tests for *Salmonella* bacteria isolated were done. In the present study, of the six samples analyzed, two samples (33.3%) were unfit for consumption: one fillet sample for the high count of *S. aureus* and another whole fish sample for the presence of *Salmonella*. From the total of 12 fresh tilapia samples analyzed for the detection of *Salmonella*, five samples (41.6%) presented the bacterium, confirmed by detection of the *invA* gene in the molecular analysis and therefore were unfit for consumption. The antimicrobial susceptibility profile of 21 strains of *Salmonella enterica* isolated from fresh tilapia samples showed that 52.4% of the strains showed resistance to Amoxicillin with clavulanic acid, followed by 14.3% for Tetracycline and 4.8% for Sulfonamide and Ceftazidime. The detection of resistant *Salmonella* profiles is indicative of irrational antimicrobial use in the tilapia production chain. Finally, there is a need for a stronger control in the good practices of fish's handling and manufacturing, as well as a more rigorous monitoring for veterinary antibiotic therapy.

**Keywords:** tilapia, microbiological quality, *Salmonella enterica*, gene *invA*, bacterial resistance.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1. Produção e consumo de tilápia no Brasil .....	9
1.2. Segurança alimentar e qualidade do pescado .....	11
1.3. Microbiologia do pescado .....	12
1.4. Uso da biologia molecular na identificação de bactérias.....	14
1.5. Características do gênero <i>Salmonella</i> spp. e identificação dos genes de virulência .....	16
1.6. Resistência antimicrobiana de bactérias .....	18
2. JUSTIFICATIVA .....	22
3. OBJETIVOS .....	23
3.1. Objetivo geral .....	23
3.2. Objetivos específicos .....	23
4. ARTIGO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS .....	27
Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas .....	27
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	28
Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias <i>Salmonella</i> spp. isoladas .....	29
Análises moleculares.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO.....	38
5. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA .....	42
ANEXOS .....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência do primer e tamanho do produto amplificado na PCR para identificação do gene <i>invA</i> .....	29
<b>Tabela 2.</b> Análises microbiológicas das amostras de tilápia fresca.....	29
<b>Tabela 3.</b> Prevalência de bactérias <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de tilápia fresca.....	34
<b>Tabela 4.</b> Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias <i>Salmonella</i> spp. isoladas das amostras de tilápia fresca.....	35
<b>Tabela 5.</b> Número de cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de carne de frango com resistência aos antimicrobianos testados.....	36
<b>Tabela 6.</b> Perfis de resistência antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de das amostras de tilápia fresca.....	37

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Visualização dos resultados da PCR em transiluminador sob luz violeta.....	47
<b>ANEXO 2.</b> Genoma de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar java strain NCTC5706.....	48
<b>ANEXO 3.</b> Sequência do primer para <i>Salmonella enterica</i> .....	49
<b>ANEXO 4.</b> Região genômica correspondente ao primer deste estudo mostrando <i>Salmonella enterica</i> .....	51
<b>ANEXO 5.</b> Antibiograma das bactérias <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de tilápia fresca.....	58
<b>ANEXO 6.</b> Normas de submissão para a revista higiene alimentar.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

APPCC (HACCP, em inglês) – Análises de Perigo e Pontos Críticos de Controle

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal

BHI – Brain Heart Infusion

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FA – Fenilalanina

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

g – gramas

°C- grau Celsius

GTA – Guia de Trânsito Animal

Hs – horas

H<sub>2</sub>S – ácido sulfídrico

IPS-1(SPI-1, sigla em inglês) – Ilhas de patogenicidade em *Salmonella* spp.

LIA – Lisina Iron Agar

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL - mililitros

OMS – Organização Mundial de Saúde

SCV – Vacúolo que contém *Salmonella* spp.

SIFs – Filamentos Induzidos por *Salmonella* spp.

Subsp. – Subespécie

SS – *Salmonella* Shigella

SVE – Serviço Veterinário Estadual

SVO – Serviço Veterinário Oficial

SIF – Serviço de Inspeção Federal

TSI – Três Açúcares e Ferro

UE – União Europeia

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

XLD – ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Produção e consumo de tilápia no Brasil

A tilápia é a espécie de água doce mais cultivada no mundo e também no Brasil, correspondendo a 43,1% da produção nacional de peixes (ARAÚJO, 2015). Existem cerca de 100 espécies de tilápia, distribuídas em três gêneros, *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. Dentre as espécies produzidas no Brasil, destacam-se: a Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* que pode alcançar cerca de 5 kg; a *Tilapia rendali* com cerca de 1 kg; a tilápia de Zanzibar *Sarotherodon homorum* de coloração escura e maxilas protráteis; uma variedade desenvolvida em Israel conhecida como Saint-Peters e a tilápia tailandesa, uma nova variedade de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (PIZAIA et al., 2008).

Por apresentar excelente adaptabilidade, rusticidade e boa conversão alimentar, a tilápia vem ganhando cada vez mais espaço no cenário da piscicultura. Além disso, entre as várias espécies de peixes a serem criadas no sistema de confinamento, a tilápia apresenta um excelente resultado no que se refere a crescimento rápido (PIRES, 2014).

No Brasil, a tilápia foi introduzida pela primeira vez em 1953, quando a companhia de luz “Light”, em São Paulo, importou *Tilapia rendali* do Congo (DE OLIVEIRA et al., 2007), com finalidade de povoamento de represas da Companhia de Energia Elétrica de São Paulo (CASTAGNOLLI, 1992) Posteriormente, em 1971, o Departamento Nacional de Obras Contra a Seca introduziu exemplares da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) visando ao peixamento dos reservatórios públicos da Região Nordeste (DE OLIVEIRA et al., 2007). A tilapicultura firmou-se como atividade empresarial a partir da década de 1980, quando surgiram os empreendimentos pioneiros (JÚNIOR & JÚNIOR, 2008).

Represamentos constituem a interferência antrópica de maior impacto sobre os ecossistemas fluviais. A regulação do fluxo de águas pelas hidrelétricas ocasiona a perda de intensidade das enchentes, visto que a maior parte da água é armazenada na represa para a geração de energia, sendo liberada em um ritmo irregular, de acordo com a demanda energética. Essas interferências levam a drástica redução de produtividade do ecossistema, desde redução da ictiofauna do local à retenção de sedimentos e nutrientes pela represa (ROSA & LIMA, 2005).

Desta maneira, explica-se o peixamento, em especial com a tilápia, para o repovoamento dos lagos formados pelos reservatórios das usinas hidrelétricas, visando à preservação ambiental dessas regiões (ALVES, 2017), fator esse relacionado à boa capacidade de adaptação do peixe (SEBRAE-RN, 2014) e ainda pela contribuição para um ambiente de melhor qualidade e sanidade, uma vez que o muco da tilápia tem componentes que modulam a composição e virulência da flora bacteriana no ambiente, reduz contagem e virulência de vibriões, movimentam e melhora a condição do solo e ainda reduz a carga orgânica presente (KUBITZA, 2016).

No âmbito da produção, várias espécies de tilápia são utilizadas, cada uma com características próprias de adaptação e reprodução, o que leva os produtores a estabelecerem as preferências pelas espécies de acordo com a região e as condições do ambiente de cultivo. Dentre os peixes que podem ser cultivados em cativeiro, a tilápia destaca-se por sua resistência a doenças, tolerância ao cultivo em altas densidades e em ambientes hostis e estressantes, o que a tornou rapidamente a espécie preferida pela aquicultura (JÚNIOR & JÚNIOR, 2008).

O pescado é um alimento que se destaca nutricionalmente quanto à quantidade e qualidade das suas proteínas, à presença de vitaminas e minerais e, principalmente, por ser fonte de ácidos graxos essenciais ômega-3 (eicosapentaenoico EPA e docosaenoico DHA). O consumo desses lipídios é associado à redução do risco de doenças cardiovasculares e a funções importantes nas fases iniciais do desenvolvimento humano (SARTORI; AMANCIO, 2012).

De sabor delicado e com poucos espinhos na musculatura, a tilápia vem cada vez mais ganhando espaço nas gôndolas dos supermercados. Nem mesmo a importação de filés de pangá e merluza do Alasca tiraram espaço do produto brasileiro. Apesar dos produtos importados apresentarem preços inferiores, o consumidor já aprendeu a identificar o diferencial de qualidade da tilápia brasileira. Tanto que, nos últimos anos, os preços da tilápia para o consumidor final apresentaram considerável aumento, pois a demanda é maior que a produção (SUSSEL, 2013).

No geral, a demanda interna de pescado cresceu 76% de 2004 para 2014. Provavelmente, esse aumento se deve tanto aos incentivos à produção, quanto à forte promoção do pescado com um programa de marketing para aumento de

consumo interno realizado nos primeiros anos do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura. Outros países da América Latina, como Colômbia e Argentina, apesar de apresentarem um aumento na produção de pescado, não registraram o mesmo aumento de demanda interna, como ocorrido no Brasil. Hoje, 99% da produção nacional de tilápia é consumida no Brasil (BARROSO; PINCINATO; MUNOZ, 2017), sendo o país também o sexto maior produtor de tilápia no mundo (KUBITZA, 2007).

As estimativas apontam que a aquicultura será o setor produtor de alimentos que mais crescerá no mundo. Essa atividade produtiva é praticada em vários países, sendo uma importante fonte de renda e de proteína animal, com papel relevante na segurança alimentar (SCHULTER; FILHO, 2017). Cerca de 60% dos peixes para o consumo humano virão da aquicultura (produção em cativeiro) até 2030 (MSANGI et al., 2013). Neste contexto, a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO), o braço das Nações Unidas para o fomento da produção agropecuária, confere ao Brasil o papel de potencial protagonista na produção aquícola, atribuindo ao país uma produção esperada de 20 milhões de toneladas ao ano a serem produzidas até 2030 (SCHULTER; FILHO, 2017)

## **1.2. Segurança alimentar e qualidade do pescado**

A segurança e a qualidade dos produtos alimentares são tópicos importantes da atualidade, o que é evidenciado pelo crescente número de leis que exigem a qualidade dos alimentos nas várias etapas da cadeia de produção (PEREIRA; FONSECA, 2011). Quando os padrões de qualidade estão presentes nas diversas etapas do processo produtivo, maiores são os lucros para a empresa e maior será a confiabilidade perante o consumidor e o mercado (BERTI; SANTOS, 2016). Pode-se definir como um alimento seguro aquele que não contém agentes ou substâncias nocivas em quantidades que possam causar agravos à saúde ou dano ao consumidor. Esses agentes e substâncias são conhecidos como perigosos e podem ser prevenidos ou reduzidos por meio de cuidados e regras a serem adotadas durante todas as etapas do preparo dos alimentos (BRASIL, 2015).

No âmbito legislativo, para a garantia de alimento seguro foi criada a Codex Alimentarius que é um fórum internacional de normalização de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) por meio da Organização

para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), com a finalidade de proteger a saúde do consumidor e equiparar práticas de comércio regional e internacional de alimentos, abrangendo normas sobre aditivos alimentares, resíduos de pesticidas e medicamentos veterinários, contaminantes, rotulagem, classificação, amostragem e análises de riscos (BERTI; SANTOS, 2016).

Em relação ao controle microbiológico, o pescado, quando examinado segundo os métodos adequados de coleta de amostras e análises, deverá estar: isento de microrganismos patogênicos e parasitas que possam representar perigo para a saúde do consumidor e isento de substâncias que derivem de microrganismos em quantidades que possam apresentar perigo para a saúde do consumidor (BRASIL, 1997).

Para fins de registro e fiscalização de alimentos definem-se tolerância máxima de microrganismos e padrões mínimos de qualidade para os diferentes produtos alimentícios. Estes limites e critérios podem ser complementados quando do estabelecimento de programas de vigilância e rastreamento de microrganismos patogênicos e de qualidade higiênica e sanitária de produtos (BRASIL, 2001). A legislação brasileira (BRASIL, 2001), que estabelece os parâmetros microbiológicos para o pescado *in natura*, determina a contagem de coliformes termotolerantes, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus* coagulase positivo (*Staphylococcus aureus*) e a pesquisa de *Salmonella* em amostra de 25 g. Para pescados e produtos oriundos de pescados, *Salmonella* spp. deve estar ausente.

### **1.3. Microbiologia do pescado**

O pescado pode ser contaminado por um variado grupo de microrganismos, bem como por resíduos de produtos químicos, através de águas contaminadas ou poluídas. O pescado vivo apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal (SANTIAGO et al., 2013). Além da contaminação ambiental, a contaminação se dá também por falta de cuidados básicos de armazenamento, exposição e manipulação do pescado (CAMPOS; PAIVA, 2012), onde a qualidade do gelo e dos recipientes para transporte são de extrema relevância para assegurar a qualidade do produto.



Desta forma, a manipulação indevida e a não observância de medidas higiênicas durante o transporte, manuseio e conservação podem facilitar o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, presentes no próprio pescado ou provenientes do ambiente (FAO, 2010). Dentre os microrganismos que podem ser veiculados pelos pescados e crustáceos, destacam-se o *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SANTIAGO et al., 2013).

As bactérias do gênero *Vibrio* são bacilos retos ou curvos, gram negativos e móveis. Fermentam glicose sem produção de gás e são halofílicos, necessitando geralmente de 2% ou mais NaCl para um crescimento ótimo. Duas espécies patogênicas para o homem são: *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (CARVALHO, 2010). O *V. parahaemolyticus* é atualmente reconhecido como o maior causador de gastroenterites de origem alimentar no Japão. Isso porque o microrganismo é associado com o consumo de alimentos marinhos, os quais são parte significativa da dieta dos japoneses (FIB, 2011). Os alimentos associados à doença provocada por *V. parahaemolyticus* são os peixes e moluscos (em geral, ostras), consumidos crus, malcozidos ou cozidos e recontaminados. Existe uma correlação entre a doença e o consumo desses alimentos nos meses mais quentes do ano. A refrigeração imprópria dos alimentos contaminados ou a permanência destes em temperatura ambiente favorecem a proliferação desses microrganismos (LOURENÇO, 2011).

As bactérias *Staphylococcus aureus* são cocos gram positivos, mesófilas (mas podem crescer a uma temperatura de 7 a 47,8 °C), toleram alta concentração de 10 a 20% de NaCl, porém não produzem toxinas em concentrações superiores a 5% de NaCl. Estes microrganismos produzem uma grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência: estafiloquinases, hialurodinases, fosfatases, coagulases e hemolisinas (FIB, 2011). *S. aureus* podem produzir enterotoxinas, e a intoxicação alimentar causada por estafilococos é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns no mundo, resultante da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas em alimentos (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012). A contaminação dos alimentos está relacionada principalmente ao ser humano, pois este é o principal reservatório do microrganismo, estando presente nas fossas nasais, garganta e pele de 30-50% dos indivíduos saudáveis. A transmissão ocorre devido a ferimentos nas mãos ou outras lesões na pele e

principalmente pela tosse e espirros, que contaminam os alimentos durante sua manipulação (SES-SP, 2013).

A *Salmonella* spp. tem se mostrado um importante fator relacionado às doenças transmitidas por alimentos. Uma possível fonte para a contaminação do pescado cultivado com *Salmonella* spp. pode estar relacionada com a alimentação fornecida aos cardumes durante a cadeia de produção. Uma vez introduzida matérias-primas contaminadas nas fábricas de rações, as cepas de *Salmonella* ali presentes poderiam persistir por anos como uma “linhagem doméstica” (NESSE et al., 2003). Adicionalmente, o uso de camas de frango como alimentação direta aos cardumes também leva à contaminação, dado que esta por ser matéria orgânica proveniente de fezes de animais representa um risco para o meio aquático (MLEJNKOVA & SOVOVA, 2012) uma vez que as concentrações de microrganismos se tornam elevadas em tanques de aquicultura com pouca troca de água (LEIRA et al., 2017).

A bactéria *Escherichia coli* faz parte da família *Enterobacteriaceae*, tem forma de bacilo, é gram negativa, não esporulada, anaeróbia facultativa e fermentadora de lactose. Existem muitos subtipos de *E. coli*, sendo algumas comensais e outras patogênicas para o homem. O intestino da maioria dos animais de “sangue quente”, inclusive o homem, é colonizado por formas comensais de *E. coli*. O contágio por *E. coli* se dá através da ingestão de água ou alimentos que não foram processados e tiveram algum tipo de contaminação fecal durante a sua produção (DE OLIVEIRA, 2013). Várias linhagens de *E. coli* adquiriram fatores de virulência específicos, que conferem uma maior capacidade em se adaptar a novos nichos e ocasionar um amplo espectro de doenças (CARDOZO, 2014). As linhagens patogênicas de *E. coli* são divididas de acordo com os sintomas clínicos e com os mecanismos da patogenicidade em seis grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente adesiva (DAEC) (FIB, 2011).

A contaminação do pescado por estes microrganismos pode ocorrer durante a pós-captura nas seguintes circunstâncias: nos porões dos barcos pesqueiros sem condições de higiene; durante o trajeto para o porto, em contato com gelo produzido a partir de água de má qualidade; no cais do entreposto quando lavado com água

proveniente dos canais contaminados com matéria orgânica; nos caminhões mal refrigerados durante o transporte do porto para as fábricas ou armazéns distribuidores e, em toda a malha de distribuição até alcançar o comércio varejista ou o domicílio do consumidor. Em todas essas etapas a refrigeração é de fundamental importância para a conservação do pescado, ao lado da higiene das instalações e qualidade da água (SANTIAGO et al., 2013).

#### **1.4. Uso da biologia molecular na identificação de bactérias**

Os testes microbiológicos são tradicionalmente utilizados para avaliar a segurança de um produto alimentar e para definir critérios de rejeição ou aceitação de um lote de alimentos. No entanto, essa abordagem possui algumas limitações, especialmente para detecção de patógenos que ocorrem em números reduzidos e com distribuição não homogênea (GONÇALVES et al., 2014). Devido a isso, métodos moleculares são bastante utilizados para auxiliar no monitoramento de agentes causadores de doenças dentro da cadeia de produção de alimentos. Dentre os métodos moleculares destaca-se a PCR (PEREIRA & PETRECHEN, 2011).

A PCR, nos últimos anos, está sendo amplamente aplicada em centenas de procedimentos laboratoriais e considerada como o método de escolha na detecção e caracterização molecular de diversos agentes bacterianos. A principal vantagem desta metodologia em relação à cultura é a redução do tempo de obtenção de resultados e a detecção do microrganismo sem necessidade de um cultivo prévio. Além disso, a PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade que a cultura, representando um método laboratorial rápido e seguro (SES-SP, 2007).

A técnica de PCR tem por objetivo amplificar uma sequência alvo-específica por meio de uma enzima DNA polimerase termoestável, *in vitro*. Neste método utilizam-se além da enzima, nucleotídeos e um par de primers (aproximadamente 20 pares de base) que limitam a região do DNA a ser amplificada. Estes primers são utilizados para direcionar a síntese do DNA, em ciclos repetidos. Em cada ciclo, as fitas servem de molde para a geração de novas fitas (SILVA, 2001). A enzima DNA polimerase é a responsável pela amplificação e multiplicação da fita molde. Com esta amplificação, a reação PCR é capaz de identificar o microrganismo a partir do seu material genético (DE MEDEIROS, 2013). A reação de PCR em tempo real

permite o acompanhamento da reação em tempo real, enquanto que na PCR convencional se obtém os resultados somente no final da análise (CHEN et al., 2010).

A PCR em tempo real quantitativa, também conhecida como PCR quantitativa ou simplesmente qPCR ou RTQ-PCR, foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores. Nessa PCR, foi montado um sistema ao qual acoplaram uma câmara de vídeo, de modo a monitorizar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permite detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (HIGUCHI et al., 1993). A PCR em tempo real compreende as etapas do PCR convencional acrescido de fluoróforo, esta molécula que, quando excitada por uma fonte de luz (laser), emite uma fluorescência que é detectada por uma luz UV acoplada ao termociclador (GANDRA et al., 2008).

O produto da reação da PCR é normalmente visualizado através de eletroforese em gel. Outros métodos analíticos podem ser aplicados com a finalidade de detecção dos produtos da PCR, tais como, Southern blotting, ensaio ELAHA (enzyme-linked amplicon hybridization assay), ensaio ELOSA (enzyme-linked oligosorbent assay), entre outros (OLIVEIRA, 2010). Com isso, a amplificação de DNA utilizando a PCR tornou-se mais uma alternativa para a detecção de bactérias patogênicas em alimentos. Esta técnica pode auxiliar no controle de microrganismos causadores de DTAs, pois com ela é possível detectar e localizar os agentes patogênicos (DE MEDEIROS, 2013).

### **1.5. Características do gênero *Salmonella* spp. e identificação dos genes de virulência**

A *Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*. São gram negativas, anaeróbias facultativas, não formam esporos e têm forma de bastonetes curtos (1 a 2 µm). A maioria das espécies é móvel, com flagelos peritríquos; *S. gallinarum* e *S. pullorum* não são móveis (FIB, 2011). Além de glicose, fermentam também arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol. A maioria das salmonelas de interesse clínico não fermentam lactose, contudo, muitas cepas podem adquirir essa característica por meio de transferência

plasmidial. São oxidase negativa, catalase positiva, indol, Voges Proskauer, Vermelho de Metila, malonato e ureia negativa. Produzem gás sulfídrico a partir da redução do enxofre por ação da enzima cisteína desulfidrase. Apresentam ainda como características metabólicas a capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, redução de nitrato a nitrito e utilização do citrato como única fonte de carbono, podendo ocorrer variações em função do sorovar e/ou da subespécie (BRASIL, 2011).

A classificação taxonômica das salmonelas sempre foi motivo de controvérsias. Atualmente entre esses vários esquemas taxonômicos propostos vêm ganhando aceitação internacional o utilizado pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, USA), que divide o gênero *Salmonella* em dois grandes grupos: *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori* (MENDONÇA, 2016). A *Salmonella bongori* com 23 sorovares conhecidos e *Salmonella enterica*, subdividida em seis subespécies denominadas por *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, *Salmonella enterica* subespécie *salamae*, *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*, *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae*, *Salmonella enterica* subespécie *houtenae*, *Salmonella enterica* subespécie *indica*, tendo sido descritos ao todo 2.587 sorovares (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Os mecanismos pelos quais *Salmonella* spp. interage com o seu hospedeiro para causar doenças são complexos e dependem de vários fatores que ainda não foram completamente elucidados. Genes associados à virulência, resistência a antimicrobianos e adaptação ao meio em que vivem são considerados fatores de virulência em todas as bactérias. O resultado das infecções por *Salmonella* spp. é determinado pelo status do hospedeiro e o status da bactéria. Assim, enquanto idade e genética podem determinar a susceptibilidade do hospedeiro, o status das bactérias é determinado pelos fatores de virulência (MENDONÇA, 2016).

Entre os métodos utilizados para a identificação de *Salmonella* sp. destacam-se a caracterização bioquímica, sorotipagens, suscetibilidade a antimicrobianos e sorologia que, embora apresentem alta confiabilidade, requerem um longo tempo para a identificação do microrganismo (ANDRADE et al., 2010). A análise por PCR diminui o tempo de identificação e detecção da salmonelose, de dias para poucas horas, auxiliando as análises de rotina de laboratórios clínicos e industriais, facilitando também a detecção de organismos não adaptados ao cultivo

convencional. Por ser uma técnica altamente específica, a PCR pode ser realizada utilizando o DNA cromossomal ou mesmo o DNA plasmidial, sendo assim possível traçar o perfil genético de um organismo a partir de genes conhecidos e únicos para a espécie (ANDRADE et al., 2010).

Diversos ensaios de PCR foram desenvolvidos identificando vários genes de *Salmonella*, tais como o *invA*, 16S rRNA, *agFA*, *viaB*, *hilA*, *sirA*, *ttr* e plasmídeos associados a virulência. O gene *invA* em particular é amplamente utilizado como alvo em ensaios de PCR para detecção de *Salmonella* (HALATSI et al., 2006). Em cada caso, os conjuntos de primers foram avaliados no contexto de sua aplicação para detecção em alimentos ou a verificação de *Salmonella* em um cenário clínico (ZIEMER; STEADHAM, 2003).

Um conjunto de primers que amplifica uma sequência de 284 pares de bases do gene *invA* foi publicado por RAHN et al (1992). Com exceção de dois isolados de *Salmonella* litchfield e dois de *Salmonella* senftenberg, todas as cepas de *Salmonella* apresentaram resultados positivos para a presença de *invA* usando este conjunto de primers. O gene *invA* codifica um componente essencial do aparato de secreção de proteínas associadas à invasão celular (GALÁN; GINOCCHIO; COSTEAS; 1992). O gene *invA* encontra-se no centrossomo 63 do cromossomo da *Salmonella*. Este locus genético codifica um sistema especializado de secreção de proteínas tipo  $\emptyset$  (GALAN, 1996).

## **1.6. Resistência antimicrobiana de bactérias**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a resistência antimicrobiana é a capacidade do microrganismo de interromper um determinado agente antimicrobiano de atuar sobre ele, resultando assim em tratamentos ineficazes, infecções persistentes e a possibilidade de transmitir essa característica a outros microrganismos (WHO, 2018). Atualmente, é um fato aceito que a resistência antimicrobiana é um campo em constante evolução, no qual o desenvolvimento e o uso de novos agentes antimicrobianos são geralmente seguidos, mais cedo ou mais tarde, pela ocorrência de bactérias que apresentam resistência a esses agentes antimicrobianos. Isto se aplica não só aos agentes antimicrobianos utilizados na medicina humana, mas também aos utilizados na

agricultura e na medicina veterinária (MICHAEL et al., 2015). Nas últimas décadas, a cada introdução de um novo antimicrobiano na prática clínica e com o decorrer do seu uso, tem sido observado um padrão de evolução de resistência antimicrobiana partindo dos hospitais para a comunidade (ATIQUE et al., 2012).

A resistência aos antimicrobianos pode ocorrer de forma intrínseca ou extrínseca. A intrínseca corresponde a uma característica de espécie bacteriana, quando estes microrganismos são naturalmente resistentes a certo tipo de antibiótico. Este processo é decorrente da ausência de estruturas de atuação de antimicrobianos ou a impermeabilidade, por parte de estruturas periféricas das bactérias (HENRIQUE et al., 2012). A resistência intrínseca ocorre sem que haja qualquer alteração genética adicional, sendo transmitido verticalmente, ou seja, de uma bactéria para suas descendentes (FRANÇA, 2017). A resistência adquirida ocorre por mecanismos genéticos diversos, tais como: produção de enzimas inativadoras, interferência com a entrada e acúmulo de droga na bactéria, alteração do receptor para ação da droga, via metabólica alternativa. É originada através de uma alteração a nível genético da célula, de natureza cromossômica pelos processos de mutação, transdução e transformação ou extracromossômica (plasmidial) (HENRIQUE et al., 2012).

Como exemplo, o aumento no isolamento de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos de casos humanos de Salmonelose tem sido associado ao uso de antimicrobianos em animais de produção. Esse fato representa um risco para a saúde pública pela transferência de cepas resistentes de *Salmonella* aos humanos em função do consumo de alimentos contaminados (TUNON et al., 2008). O isolamento de fenótipos multirresistentes (MRs) tem sido bastante documentado em amostras clínicas e na produção de alimentos de origem animal, incluindo o ciclo de produção avícola e suína, além de alimentos derivados (DA SILVA, 2011).

A ocorrência de cepas de *Salmonella* resistentes a um ou vários os antimicrobianos são essencialmente intensificados no sorotipo Typhimurium isolado de humanos e animais. Os espectros de resistência a drogas das cepas de *Salmonella* também têm se expandido nos últimos anos, especialmente para as aminopenicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol (BOUHRIF et al., 2009). Como mecanismos de resistência, a aquisição de genes codificadores de betalactamases, transferases modificadoras de aminoglicosídeos e fenicóis tem sido

associado a fenótipos de MR em *Salmonella* spp. Além disso, a super expressão de bombas de efluxo tem sido descrita como um mecanismo de resistência que reconhece um amplo espectro de antibióticos independente da sua composição química (DA SILVA, 2011).

Outro exemplo de resistência ocorre em cepas de *Staphylococcus aureus* e também tem relação com o uso indiscriminado de antibióticos. Os mecanismos de resistência de *S. aureus* incluem a inativação enzimática do antibiótico (penicilinase e enzimas de modificação de aminoglicosídeos), alteração do alvo com diminuição da afinidade pelo antibiótico (como a proteína de ligação da penicilina em cepas resistentes à meticilina e D-Ala-D-Lac de precursores de peptidoglicano em cepas resistentes à vancomicina), aprisionamento do antibiótico (para vancomicina e possivelmente daptomicina) e bombas de efluxo (fluoroquinolonas e tetraciclina). Matrizes genéticas complexas foram adquiridas por *S. aureus* através da transferência horizontal de genes, enquanto a resistência a outros antibióticos, incluindo alguns dos mais recentes (fluoroquinolonas, linezolida e daptomicina) foram adquiridas através de mutações espontâneas e seleção positiva (PANTOSTI; SANCHINI & MONACO, 2007).

Uma das maneiras de se avaliar a resistência das bactérias aos antimicrobianos é pelo antibiograma. Esta é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana in vitro frente a agentes antimicrobianos, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) (LABORCLIN, 2011). O método de disco-difusão é uma das abordagens mais antigas para realização de testes de sensibilidade antimicrobiana e permanece como um dos mais amplamente utilizados na rotina dos laboratórios clínicos (BrCAST, 2016). O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano (BRASIL, 2008).

A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano. Quando os halos de inibição são correlacionados aos valores logarítmicos da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela análise de regressão linear, encontra-se uma relação linear consistente demonstrando que o halo de inibição é inversamente proporcional à CIM daquele antimicrobiano (BRASIL, 2008). Para fins de simplificação, foi introduzido um esquema padronizado de avaliação baseado em limiar, no qual a amostra é classificada em "susceptível",



"intermediário" ou "resistente", dependendo do valor da CIM (RODLOFF et al., 2008). O teste é adequado para testar a maioria dos patógenos bacterianos, incluindo as bactérias fastidiosas mais comuns, é versátil em relação a gama de agentes antimicrobianos que podem ser testados e não requer equipamento especial (BrCAST, 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

O pescado pode ser veiculador de microrganismos patogênicos para o homem, causando Doenças Transmitidas por Alimentos em que os consome. Em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, foram analisadas oito amostras de tilápias resfriadas comercializadas em diferentes supermercados de Brasília. Os resultados mostraram que mais da metade das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Considerando que o Distrito Federal representa um importante mercado consumidor de pescado e que a tilápia é um peixe de água doce muito popular, este trabalho tem como principal objetivo avaliar a qualidade microbiológica em amostras de tilápia comercializadas no Distrito Federal, com ênfase na pesquisa de *Salmonella* spp.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica em amostras de tilápia fresca comercializadas no Distrito Federal, com ênfase na pesquisa de *Salmonella* spp.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicrotróficos, 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* spp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação do gene de virulência *invA* das bactérias *Salmonella* isoladas.
- Realizar teste de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias *Salmonella* isoladas utilizando o método de difusão com disco.

#### **4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR**

### **QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE TILÁPIA FRESCA COMERCIALIZADA NO DISTRITO FEDERAL**

Erika da Silva Monteiro, Izabel Cristina Rodrigues da Silva, Daniela Castilho Orsi

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Controle de  
Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

#### **RESUMO**

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe de água doce mais cultivada no Brasil. Durante a produção e comercialização deste pescado possíveis contaminações microbiológicas podem ocorrer, tornando o alimento impróprio para consumo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de tilápia fresca comercializada em supermercados do Distrito Federal com ênfase em pesquisa de *Salmonella*. Para as análises microbiológicas foram coletadas seis amostras de tilápia fresca de diferentes supermercados. Para a investigação de *Salmonella*, foram adicionadas mais seis amostras, totalizando doze amostras. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicrotóricas, determinação de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp. A identificação molecular de *Salmonella* foi realizada através da técnica de PCR e foram realizados testes de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias *Salmonella* isoladas. No presente estudo, das seis amostras analisadas, duas amostras (33,3%) estavam impróprias para o consumo: uma amostra de filé pela alta contagem de *S. aureus* e outra amostra de peixe inteiro pela presença de *Salmonella*. Do total de 12 amostras de tilápia fresca analisadas para a detecção de *Salmonella*, cinco amostras (41,6%) apresentaram a bactéria, confirmada pela detecção do gene *invA* na análise molecular e portanto estavam impróprias para o consumo. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 21 cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca mostrou que 52,4% das cepas apresentaram resistência à Amoxicilina com ácido clavulânico, seguido de 14,3% para a Tetraciclina e 4,8% para Sulfonamida e Ceftazidima. A detecção de perfis de *Salmonella*

resistentes é indicativa de uso irracional de antimicrobianos na cadeia de produção da tilápia. Assim, existe a necessidade de um maior controle nas boas práticas de manipulação e fabricação deste pescado, como também uma monitorização mais rigorosa para a antibioticoterapia veterinária.

**Palavras-chave:** tilápia, qualidade microbiológica, *Salmonella enterica*, gene *invA*, resistência bacteriana.

## ABSTRACT

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most cultivated species of freshwater fish in Brazil. During the production and commercialization of this fish possible microbiological contaminations can occur, making the food unfit for consumption. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of fresh tilapia marketed in supermarkets in the Federal District with emphasis on *Salmonella* research. For the microbiological analyzes, six samples of fresh tilapia from different supermarkets were collected. For the *Salmonella* investigation, more six samples were added, totaling twelve samples. The analyzes were: total count of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* count and *Salmonella* spp. detection. Molecular identification of *Salmonella* was performed by the PCR technique and antimicrobial susceptibility tests for *Salmonella* bacteria isolated were done. In the present study, of the six samples analyzed, two samples (33.3%) were unfit for consumption: one fillet sample for the high count of *S. aureus* and another whole fish sample for the presence of *Salmonella*. From the total of 12 fresh tilapia samples analyzed for the detection of *Salmonella*, five samples (41.6%) presented the bacterium, confirmed by detection of the *invA* gene in the molecular analysis and therefore were unfit for consumption. The antimicrobial susceptibility profile of 21 strains of *Salmonella enterica* isolated from fresh tilapia samples showed that 52.4% of the strains showed resistance to Amoxicillin with clavulanic acid, followed by 14.3% for Tetracycline and 4.8% for Sulfonamide and Ceftazidime. The detection of resistant *Salmonella* profiles is indicative of irrational antimicrobial use in the tilapia production chain. Finally, there is a need for a stronger control in the good practices of fish's handling and manufacturing, as well as a more rigorous monitoring for veterinary antibiotic therapy.

**Keywords:** tilapia, microbiological quality, *Salmonella enterica*, gene *invA*., bacterial resistance.

## INTRODUÇÃO

A tilápia representa uma das espécies de peixe de água doce mais cultivada em todo o mundo. No Brasil, a expansão da criação da tilápia tem sido impulsionada pela alta demanda do mercado consumidor, pois o filé de tilápia apresenta os típicos requisitos dos peixes preferidos pelo consumidor, tais como, carne branca de sabor delicado, não tendo espinhos (SOARES & GONÇALVES, 2012 a).

Dentre os produtos de origem animal, o pescado 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 microrganismos, rápida ação das enzimas autolíticas e alta atividade metabólica da microbiota natural (BARTOLOMEU et al, 2011; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

O manuseio e a conservação incorretamente aplicados durante a cadeia de produção representam os principais problemas para manter a qualidade do pescado. Mudanças sensoriais acompanhadas com aumento da deterioração e elevados números de microrganismos patogênicos costumam ser as principais causas que impedem a ideal comercialização dos peixes (BARTOLOMEU et al, 2011; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Portanto, o pescado pode ser veiculador de microrganismos patogênicos para o homem, causando Doenças Transmitidas por Alimentos em que os consome. Entre os microrganismos patogênicos, a *Salmonella* spp. tem sido identificada como agente causador de surtos relacionados ao consumo de pescado em diferentes países do mundo (AMAGLIANI et al., 2012). O principal habitat das salmonelas é o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, com destaque para as aves (FRANCO & LANDGRAF, 2008; KOWALSKI et al., 2011), e embora *Salmonella* spp. já tenha sido encontrada no intestino de diferentes espécies de peixes tropicais (GAERTNER et al., 2008), peixes capturados em águas não poluídas estão isentos de *Salmonella*, pelo fato desta não fazer parte da microbiota natural do peixe (LINDER et al. 2011).

Ademais, outros microrganismos patogênicos podem estar presentes no pescado, como *S. aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157H7, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica*, Norwalk-like vírus, Rotavírus, *Cryptosporidium parvum*

e *Giardia lamblia*, sendo a contaminação destes no pescado o resultado do ambiente aquático contaminado, além de manipulação e conservação inadequados (SOARES; GONÇALVES, 2012 b).

Outra preocupação com a presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é o crescente aumento da resistência aos antimicrobianos apresentada por várias espécies, incluindo resistência a drogas de última geração utilizadas na terapêutica humana, enfatizando a necessidade de estudos que avaliem constantemente a circulação de cepas resistentes, tendo em vista a capacidade de disseminação dessas características para outras espécies ou ecossistemas (LIMA et al., 2016).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica em amostras de tilápia fresca comercializadas no Distrito Federal, com ênfase na pesquisa de *Salmonella* spp.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas**

Para as análises microbiológicas, foram coletadas seis amostras de tilápia fresca (duas amostras de filé e quatro amostras de peixe inteiro) em cinco diferentes supermercados do Distrito Federal. As amostras foram adequadamente acondicionadas e conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE), onde foram imediatamente analisadas. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada embalagem e os resultados foram expressos como média em log de UFC/g ou NMP/g. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até  $10^{-3}$ ).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para bactérias mesófilas e a 7°C  $\pm$  1°C por 7 dias para bactérias psicotróficas. Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/g.

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos,

iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lauril Sulfato Triptose. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Aliquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/g.

Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Sal Manitol. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram reisoladas em tubos de Agar Sal Manitol e submetidas à coloração de gram.

#### **Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., além das seis amostras citadas acima foram coletadas mais seis amostras de tilápia fresca, totalizando 12 amostras (cinco amostras de filé e sete amostras de peixe inteiro) provenientes de cinco diferentes supermercados do Distrito Federal. Foram pesadas 25 g de cada amostra em 225 mL de água peptonada 1% (p/v) e após 18-24 h de incubação em estufa a 37°C, alíquotas desse caldo de enriquecimento foram transferidas para o caldo seletivo tetracionato com iodo e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, alíquotas foram transferidas do caldo seletivo para os meios Ágar Salmonella Shigella (SS) e/ou Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). As colônias não fermentadoras de lactose (com ou sem pigmento preto) foram transferidas do SS e do XLD para o meio de cultivo Agar TSI (três açúcares e ferro). Os tubos de TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* spp. foram novamente repicadas para os meios SS e/ou XLD e levados para a estufa a 37°C por 24 h. As colônias puras isoladas do SS e/ou XLD com característica típica de *Salmonella* spp. foram repicadas nos meios bioquímicos LIA (Lysina Iron Agar) e FA (fenilalanina Agar) e incubadas na estufa bacteriológica entre 18-24 h. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



### **Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias *Salmonella* spp. isoladas**

A susceptibilidade das cepas de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (método Kirby-Bauer), utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testados foram: amoxicilina com ácido clavulânico (10 µg) (β-lactâmico/penicilina), ceftazidima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), cefotaxima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), gentamicina (10 µg) (aminoglicosídeo), cloranfenicol (30 µg) (fenicol), imipenem (10 µg) (β-lactâmico/carbapenem), tetraciclina (30 µg) (tetraciclina), ciprofloxacina (5 µg) (quinolona) e sulfonamida (300 µg) (sulfonamida) (NEWPROV®). As zonas de inibição foram medidas e classificadas como sensível e resistente de acordo com recomendações do CLSI (2013).

### **Análises moleculares**

Os isolados suspeitos de serem *Salmonella* spp. foram identificados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), partindo-se de culturas puras ressuspensas em caldo Luria Bertani. As colônias isoladas foram inoculadas, individualmente, e incubadas a 37°C por 18 horas. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). 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®). 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. Os produtos de PCR submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo foram visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®). Para a identificação de *Salmonella enterica* foi utilizado o fragmento de 103 pares de base referente ao gene *invA*. A Tabela 1 apresenta a sequência do primer para identificação do gene *invA* (anotação descrita para o gene que codifica as proteínas de invasão celular de *Salmonella enterica*).

**Tabela 1. Sequência do primer e tamanho do produto amplificado na PCR para identificação do gene *invA***

Primer	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado	Espécie
<i>invA</i> forward	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	103 pb	<i>Salmonella</i>
<i>invA</i> reverse	TGTCACCGTGGTCCAGTTTA		<i>enterica</i>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas seis amostras de tilápia fresca e os resultados das análises microbiológicas estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2. Análises microbiológicas das amostras de tilápia fresca**

Amostras	Bactérias mesófilas (log UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (log UFC/g)	Coliformes totais (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	<i>S. aureus</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
1*	5,85 ± 0,42	7,54 ± 0,03	2,90 ± 0,22	ND	ND	Ausência
2*	3,09 ± 0,10	5,02 ± 0,19	1,00 ± 0,55	0,16 ***	<b>3,15 ± 0,21</b>	Ausência
3**	5,20 ± 0,69	6,25 ± 0,62	2,68 ± 0,37	2,68 ± 0,62	0,70 ***	Ausência
4**	3,92 ± 0,19	4,85 ± 0,30	1,10 ± 0,17	0,19 ***	0,70 ***	Ausência
5**	2,00 ± 0,00	5,84 ± 0,20	0,20 ***	0,16 ***	ND	<b>Presença</b>
6**	---	5,08 ± 0,83	0,34 ± 0,30	0,50 ± 0,05	ND	Ausência

\*filé de tilápia; \*\* peixe inteiro; \*\*\* = não foi possível calcular o desvio padrão, pois apenas uma bateria de tubos ou uma placa apresentou resultados positivos; ND = não detectado; os resultados foram expressos como média de análises em triplicata ± desvio padrão.

As bactérias mesófilas constituem um grupo capaz de se multiplicar entre 10 e 45°C, sendo a temperatura ideal em torno de 35°C. Esse grupo é importante porque inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal, podendo atingir altas contagens quando o alimento é mantido a temperatura ambiente (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014). Segundo o ICMSF (1984), o número de microrganismos mesófilos encontrados em um alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente

utilizados, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada.

Em relação às bactérias psicrotróficas, estas se multiplicam em baixas temperaturas, abaixo de 7°C, embora a temperatura ótima de crescimento se situe entre 20 e 30°C (FURTADO, 2005). Contagens elevadas desse grupo de bactérias contribuem para a redução do prazo de vida comercial em virtude de suas características proteolíticas e lipolíticas (LANZARIN et al., 2011). Em pescado refrigerado, as bactérias psicrotróficas participam diretamente do processo de deterioração, pelo fato de se multiplicarem bem nessas condições. Esse grupo microbiano utiliza o pescado como substrato para realização de suas atividades metabólicas, produzindo substâncias que conferem aroma e sabor desagradável ao alimento (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A legislação brasileira vigente sobre padrões microbiológicos para alimentos não estabelece valores para a contagem de bactérias mesófilas e psicrotróficas, porém, de acordo com a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986), a contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos máxima deve ser de 7 log UFC/g ( $10^7$  UFCg<sup>-1</sup>) para o pescado refrigerado. Neste estudo, a contagem total de bactérias mesófilas das amostras apresentou-se dentro dos limites aceitáveis de consumo (2,00 a 5,85 log UFC/g). Para a contagem de bactérias psicrotróficas, apenas uma amostra apresentou valores acima do permitido (amostra 1 de filé de tilápia, 7,54 UFC/g).

Resultados semelhantes a este estudo foram reportados por SOARES e GONÇALVES (2014), em um estudo sobre a qualidade microbiológica de filés de tilápia durante o armazenamento em gelo, na cidade de Apodi, Rio Grande do Norte. Os autores verificaram que as contagens de bactérias mesófilas foram no máximo de 6,14 log UFC/g, enquanto as contagens de bactérias psicrotróficas foram no máximo de 6,20 log UFC/g, apresentando assim qualidade microbiológica satisfatória. Nas análises de SANTOS & COELHO (2016), que avaliaram a qualidade microbiológica de pescados comercializados em feiras livres de Palmas, Tocantins, todas as 51 amostras analisadas também se encontravam dentro dos limites estabelecidos, sendo a maior contagem de 6,43 log UFC/g para bactérias mesófilas e de 6,81 log UFC/g para bactérias psicrotróficas.

O grupo de coliformes totais inclui bactérias de origem fecal e bactérias que, além de habitarem o trato intestinal de animais de sangue quente, habitam também outros ambientes, como vegetais e solo. A importância da utilização desse parâmetro microbiológico é a

avaliação de qualidade higiênicossanitária de água e alimentos. Já o grupo dos coliformes termotolerantes constitui o indicador de contaminação fecal mais frequentemente utilizado, sendo empregado há mais de cem anos na definição de padrões de qualidade de águas e alimentos (SOUZA, 2006).

A legislação brasileira não estabelece valores para coliformes totais e termotolerantes no pescado fresco. Para coliformes a 45°C, há valores preconizados pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986) com máximo de 3 log NMP/g ( $10^3$  NMP/g). No presente estudo, apenas a amostra 3 apresentou enumeração elevada de coliformes termotolerantes (2,68 log NMP/g), estando ainda assim dentro do limite estabelecido pela ICMSF.

No estudo de SOARES e GONÇALVES (2014), houve baixa contagem de coliformes totais e ausência de coliformes termotolerantes nos filés de tilápia, resultados relacionados às boas condições higiênicas sanitárias do ambiente no qual os peixes foram capturados e processados. Já nas análises de SANTOS & COELHO (2016), 77,2% das amostras de Tambaqui apresentaram-se inadequadas quanto à enumeração de coliformes termotolerantes, com valores acima de 3,04 log NMP/g.

O microrganismo *S. aureus* em altas contagens nos alimentos constitui risco à saúde humana, por causa do seu potencial toxigênico. As toxinas estafilocócicas são higroscópicas solubilizando-se com facilidade em água e soluções salinas, o que permite uma rápida difusão no alimento contaminado. Tais toxinas são termorresistentes e quimiorresistentes, não sendo afetadas pelo cozimento nem pela exposição posterior às enzimas presentes no trato gastrointestinal humano. Adicionalmente, são capazes de provocar intoxicação, mesmo quando presentes em concentrações da ordem de 0,015 µg/kg (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Para *S. aureus*, a legislação brasileira estabelece um valor máximo de 3 log UFC/g ( $1,0 \times 10^3$  UFC/g) no pescado fresco (BRASIL, 2001).

Neste estudo, das seis amostras analisadas, somente a amostra 2 (filé de tilápia) apresentou contagem de *S. aureus* acima do permitido pela legislação brasileira (3,15 log UFC/g). A elevada presença de bactérias *S. aureus* nessa amostra indica falha nas Boas Práticas de Fabricação durante a filetagem e falta de higiene do manipulador. Já a baixa contagem de *S. aureus* ou ausência do microrganismo em 83,33% das amostras é um indicativo de condições adequadas na manipulação destes produtos.

No trabalho de SOARES e GONÇALVES (2014), verificou-se ausência de *S. aureus* durante todo o período de armazenamento das amostras. No estudo de ARAÚJO (2015), das

oito amostras de tilápia analisadas, seis amostras (75%) apresentaram cepas de *S. aureus* indicando condições higiênicas inapropriadas e/ou processamentos deficientes. Porém todas as amostras estavam adequadas se comparadas com os valores da legislação brasileira (BRASIL, 2001).

No que diz respeito à *Salmonella*, esta é uma bactéria patogênica de distribuição mundial, sendo os alimentos os principais veículos de sua transmissão. São responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes quanto nos desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos, envolvendo, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal (BRASIL, 2011). De acordo com a legislação brasileira, a *Salmonella* deve estar ausente em pescados "in natura", resfriados ou congelados (BRASIL, 2001).

Do total de 12 amostras de tilápia fresca analisadas para a detecção de *Salmonella* (cinco amostras de filé e sete amostras de peixe inteiro), cinco amostras (41,6%) apresentaram a bactéria, confirmada pela detecção do gene *invA* na análise molecular e, portanto, estavam impróprias para o consumo, como apresentado na tabela 3.

**Tabela 3. Prevalência de bactérias *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca**

Amostras	Total de amostras	Número de amostras positivas no teste molecular (gene <i>invA</i> )
Filé de tilápia	5	2
Peixe inteiro	7	3
Total	12 (100%)	5 (41,6%)

No estudo de SANTOS & COELHO (2016), em 11,1% das amostras de Caranha e 4,5% das amostras de Tambaqui detectou-se a presença de *Salmonella* e, portanto, essas amostras não estavam aptas para o consumo. Nas análises de ARAÚJO (2015), das 8 amostras de tilápia fresca avaliadas (4 amostras de filé e 4 amostras de peixe inteiro), 5 amostras (62,5%) foram positivas para *Salmonella* spp., ou seja, mais da metade das amostras estavam impróprias para o consumo segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2001).

No Brasil, poucos estudos sobre a prevalência de *Salmonella* em pescado estão disponíveis na literatura. No estudo de DUARTE et al. (2010), foi reportado uma ocorrência de 5% de *Salmonella* em peixes e crustáceos de cativeiro e no estudo de SILVA & FRANCO (2013) foi relatado uma contaminação com *Salmonella* de 18,5% nos pescados salgados e secos comercializados nos mercados da cidade de Belém, no estado do Pará

O gene *invA* da *Salmonella* é responsável pela produção de proteínas que auxiliam a bactéria no processo de invasão de células epiteliais do hospedeiro. Esse gene contém sequências únicas para este gênero e foi provado como um alvo de PCR adequado com potencial aplicação diagnóstica (DE OLIVEIRA et al., 2013). A PCR com base no gene *invA* é simples, rápida, sensível e específica em comparação com o método tradicional (YAN et al., 2011).

Outros estudos também determinaram a prevalência de *Salmonella* em alimentos como o pescado através da detecção de gene *invA*. O estudo de SIALA et al. (2017), que realizou a detecção de *Salmonella* em diferentes tipos de alimentos no Sul da Tunísia utilizando método de PCR em tempo real, confirmou a presença de *Salmonella* pelo uso do gene *InvA* em 11 das 46 amostras de peixe analisadas (23,9%).

No estudo de CHENG et al. (2008), que teve como objetivo a detecção rápida de *Salmonella* em alimentos usando PCR em tempo real, também foi utilizado o gene *InvA* para a detecção de *Salmonella*, e como resultado, 37 das 420 amostras de alimentos analisadas (8,8%) estavam contaminadas com *Salmonella*. A categoria de alimentos mais contaminada foram os frutos do mar, que tiveram uma taxa de detecção de *Salmonella* de 10,9%. O camarão e o peixe representaram 75% do total positivo de *Salmonella* para frutos do mar (18 amostras positivas do total de 24), enquanto que nos alimentos secos, os temperos foram responsáveis por 54% de *Salmonella* positiva (7 amostras positivas do total de 13).

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 21 cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca está apresentado na Tabela 4. No presente estudo, 52,4% das cepas apresentaram resistência à Amoxicilina com ácido clavulânico, seguido de 14,3% para a Tetraciclina e 4,8% para Sulfonamida e Ceftazidima. Para a Tetraciclina, Ciprofloxacina, Imipenem e Ceftazidima houve presença de cepas intermediárias, indicando a possível presença de cepas mutantes. Estas cepas mutantes existem normalmente na população bacteriana e o seu aparecimento não é induzido, mas ocorre devido ao fenômeno de mutação espontânea (UFJF, 2018). Para Gentamicina, Cloranfenicol e Cefotaxima, houve 100% de sensibilidade. Todos os antibióticos testados são pertencentes às classes de uso

veterinário exclusivo em terapêutica, sendo vedada a sua utilização como melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

**Tabela 4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca**

Antibióticos	S n (%)	I n (%)	R n (%)	HALO S (mm)	HALO I (mm)	HALO R (mm)
Amoxicilina	10 (47,6%)	–	<b>11 (52,4%)</b>	>18	-	< 18
Sulfonamida	20 (95,2%)	0,0%	1 (4,8%)	>17	12-17	< 12
Gentamicina	21 (100%)	0,0%	0,0%	>15	12-15	< 12
Tetraciclina	17 (81,0%)	1 (4,8%)	<b>3 (14,3%)</b>	>21	17-21	< 17
Cloranfenicol	21 (100%)	0,0%	0,0%	>18	12-18	< 12
Ciprofloxacina	19 (90,5%)	2 (9,5%)	0,0%	>21	15-21	< 15
Imipenem	19 (90,5%)	2 (9,5%)	0,0%	>23	19-23	< 19
Ceftazidima	18 (85,7%)	2 (9,5%)	1 (4,8%)	>26	22-26	< 22
Cefotaxima	21 (100%)	0,0%	0,0%	>21	17-21	< 17

S = sensível; I = intermediário; R = resistente; n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de 21 cepas.

Estudos anteriores demonstraram um perfil de resistência antimicrobiana variada das cepas de *Salmonella* isoladas de pescado. No estudo de ELHADI (2014), que determinou a prevalência e resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. nos peixes de água doce congelados importados para a Província Oriental da Arábia Saudita, do total de 223 amostras de peixe analisadas, 89 (39,9%) foram positivas para *Salmonella*. A maioria das cepas isoladas de *Salmonella* apresentou resistência à tetraciclina (90,71%, n = 127), seguida por ampicilina (70%, n = 98) e amoxicilina com ácido clavulânico (45%, n = 63). Já no estudo de BUDIATI et al. (2013), que determinou resistência a antibióticos de cepas de *Salmonella* isoladas de bagre (*Clarias gariepinus*) e de tilápia (*Tilapia mossambica*) obtidos de mercados na Malásia, dos 34 isolados de *Salmonella*, 100% foram resistentes à clindamicina, 90,7% à rifampicina, 67,4% à tetraciclina e 37,2% ao cloranfenicol.

Nesse estudo, das 21 cepas testadas, 13 cepas (61,9%) apresentaram resistência antimicrobiana, onde 47,6% das cepas demonstrou resistência a um antibiótico testado e

14,3% das cepas demonstrou resistência a dois antibióticos testados, como apresentado na tabela 5. De acordo com MAGIORAKOS et al. (2012), uma bactéria multirresistente é aquela que apresenta resistência a mais de um antibiótico e segundo esta definição três cepas (14,3%) neste estudo foram multirresistentes.

**Tabela 5. Número de cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca com resistência aos antimicrobianos testados**

Número de cepas	Cepas (%)*	Números de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência
8	38,1	0
10	47,6	1
3	14,3	2
21	100	Total

\* % = porcentagem em relação ao total de 21 cepas

A tabela 6 apresenta os perfis de resistência das cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de tilápia fresca. O aparecimento de cepas de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos tem se tornado uma preocupação para a saúde pública e traçar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dessas cepas é uma medida importante para monitoramento e posterior controle. No presente trabalho, foram encontrados 4 perfis de resistência nas cepas isoladas, sendo o perfil de multirresistência à amoxicilina e tetraciclina encontrado em 14,29% das cepas.



**Tabela 6. Perfis de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca**

Perfis	Resistência Antimicrobiana	Número de antimicrobianos*	Número de cepas
1	AMC	1	8 (38,1%) **
2	CAZ	1	1 (4,76 %) **
3	SUL	1	1 (4,76%) **
4	AMC e TET	2	3 (14,29%) **

\* Número de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência; Número de cepas (%)\*\* = número de cepas com perfil de resistência e porcentagem em relação ao total de 21 cepas; AMC = amoxicilina, CAZ = ceftazidima, SUL = sulfonamida, TET = tetraciclina.

No estudo de SETTI et al. (2009), das 57 cepas de *Salmonella* isoladas de amostras de água do mar, sedimentos marinhos e mexilhões ao longo da costa do Marrocos, 28 cepas (49,1%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados. Os isolados de *Salmonella* apresentaram resistência à ampicilina (22 isolados), ácido nalidíxico (9 isolados), sulfonamida (2 isolados) e tetraciclina (1 isolado), sendo que seis desses isolados apresentaram resistência múltipla a dois agentes antimicrobianos. No estudo de BROUGHTON & WALKER (2009), 100% (n = 05) das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de peixes de água doce provenientes de aquicultura na província de Guangdong, China eram resistentes a pelo menos dois dos antibióticos testados, indicando um perfil de multirresistência.

O surgimento de cepas resistentes e multirresistentes se torna um problema de saúde pública, por gerar consequências clínicas e econômicas graves, relacionadas com o aumento da morbidade e mortalidade de humanos e animais. A utilização a longo prazo de antibióticos na criação de animais exerce pressão de seleção sobre as bactérias, favorecendo assim a sobrevivência de cepas de *Salmonella* resistentes, as quais podem ser transferidas para o homem pelo consumo de alimentos contaminados, podendo levar ao fracasso da antibioticoterapia (LAI et al., 2014).

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que das seis amostras analisadas, duas amostras (33,33%) estavam impróprias para o consumo: uma amostra de filé pela alta contagem de *S. aureus* e outra amostra de peixe inteiro pela presença de *Salmonella*. Em relação às doze amostras analisadas para a detecção de *Salmonella*, cinco amostras (41,6%) apresentaram a bactéria, confirmada pela detecção do gene *invA* na análise molecular, estando impróprias consumo. Adicionalmente, das 21 cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca, 13 cepas (61,9%) apresentaram resistência antimicrobiana. O surgimento de cepas resistentes pode estar relacionado ao uso indiscriminado de antibióticos em produção animal, incluindo aquicultura, para prevenção e tratamento de doenças infecciosas. Dessa forma, torna-se nítido a necessidade de um controle mais rígido nas boas práticas de manipulação e fabricação e na melhoria das condições para a criação de pescados, como também de um maior controle por parte de entidades públicas para o uso veterinário racional de antibióticos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA DO ARTIGO

AMAGLIANI, G; BRANDI, G; SCHIAVANO, G.F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. **Food Research Internacional**, v.45, n.2, p.780-788, 2012.

ARAÚJO, Y. F. Avaliação da qualidade da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) fresca e resfriada e do gelo de manutenção comercializados na cidade de Brasília. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, 2015. Disponível em: <http://bdm.unb.br/handle/10483/10959>.

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.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, Nº 26, de 09 de julho de 2009. **Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário.** Diário Oficial da União, DF, 10 jul. 2009, Seção 1, p. 14.

BRASIL. Diagnóstico Laboratorial do Gênero *Salmonella*. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.** Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>

BROUGHTON, E. I.; WALKER, D. G. Prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* in fish in Guangdong, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 4, p. 519-521, 2009.

BUDIATI, T. et al. Prevalence, antibiotic resistance and plasmid profiling of *Salmonella* in catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia mossambica*) obtained from wet markets and ponds in Malaysia. **Aquaculture**, v. 372, p. 127-132, 2013.

CHENG, C. et al. Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 12, p. 2436-2441, 2008.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement.** CLSI M100-S23, Wayne.

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

DUARTE, D. A. M. et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em pescado no Nordeste, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 711-713, 2010.

ELHADI, N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern Province of Saudi Arabia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 3, p. 234-238, 2014.

FERREIRA, H; LIMA, H; COELHO, T. Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal. Portal UFERSA. 2014. Texto para Discussão. Disponível em: <http://www2.ufersa.edu.br/portal/view/uploads/setores/126/Resumo%20MO%20indicadores.%20Heider,%20Hiagos,%20Thiago.pdf>

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causa e prevenção**. Editora Fonte. São Paulo, Brasil, p. 200, 2005.

GAERTNER, J.; WHEELER, P.E.; OBAFEMI, S. et al. Detection of *Salmonella* from fish in a natural river system. **Journal of Aquat. Anim. Health**, v.20, n.3, p.50–157, 2008.

ICMSF. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984. 431p.

ICMSF. **Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications**. 2.ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1986. 131p.

KOWALSKI, L. H. et al. Salmoneloses emergentes de origem aviária. **PUBVET**, v. 5, n. 34, p. 1-22, 2011.

LAI, J. et al. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. **International Journal of Food Microbiology**, v. 180, p. 30-38, 2014.

LANZARIN, M. et al. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e microrganismos psicrotóxicos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) mantidos sob refrigeração. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, 2011.

LIMA, A. L.; RODRIGUES, D.P.; ARAÚJO, M.S.; REIS, E.M.F.; FESTIVO, M.L.; RODRIGUES, E.C.P.; LÁZARO, N.S. Sorovares e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em *Salmonella* spp. isoladas de produtos de origem suína, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 1, p. 39-47, 2016.

LINDER, C. E. et al. *Salmonella* spp. em sistema intensivo de criação de peixes tropicais de água doce. **Revista Higiene Alimentar**, v. 25, n. 192/193, p. 126-133, 2011.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

SANTOS, D. D. M.; COELHO, A. F. S. Qualidade microbiológica de pescado comercializado em feiras livres de Palmas - TO. **Revista Higiene Alimentar**, v. 30, n. 262/263, p. 125-130, 2016.

SETTI, I. et al. Characteristics and dynamics of *Salmonella* contamination along the coast of Agadir, Morocco. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7700-7709, 2009.

SIALA, M. et al. Screening and detecting *Salmonella* in different food matrices in Southern Tunisia using a combined Enrichment/Real-Time PCR Method: correlation with conventional culture method. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2416, 2017.

SILVA, M. C. et al. Avaliação da qualidade do camarão salgado seco (aviú) e da farinha de peixe (piracuí) comercializados em mercados varejistas da cidade de Belém, Pará. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, p. 147-54, 2013.

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**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2289-2300, 2012a.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012 b.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A.; SOUZA, L.B. Qualidade microbiológica de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o armazenamento em gelo. **Ciência Rural**, v. 44, n. 12, 2014.

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.

UFJF. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA - estudo *in vitro* da susceptibilidade bacteriana à ação das drogas antimicrobianas, 2018. Roteiro para aulas práticas. Disponível em: <http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2018/04/ROTEIRO-PARA-AULAS-PR%C3%81TICAS-bacteriologia-2018-parte-06-Antibiograma.pdf>

YAN, L. et al. Comparison study of enrichment-PCR and traditional method for detection of *Salmonella* in poultry. **Journal of Hygiene Research**, v. 40, n. 3, p. 348-51, 354, 2011.

## 5. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ANDRADE, R. B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

ALVES, C. B. M. Peixamento: problema ou solução? Bio Ambiental Consultoria, 2017. Texto Informativo. Disponível em: [https://www.cemig.com.br/pt-br/A\\_Cemig\\_e\\_o\\_Futuro/sustentabilidade/nossos\\_programas/ambientais/peixe\\_vivo/seminario\\_estrategia\\_conservacao\\_peixes/Documents/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2021.11.2017/2%20-%20Carlos%20Alves%20-%20Peixamento%20problema%20ou%20solu%C3%A7%C3%A3o.pdf](https://www.cemig.com.br/pt-br/A_Cemig_e_o_Futuro/sustentabilidade/nossos_programas/ambientais/peixe_vivo/seminario_estrategia_conservacao_peixes/Documents/Apresenta%C3%A7%C3%B5es%2021.11.2017/2%20-%20Carlos%20Alves%20-%20Peixamento%20problema%20ou%20solu%C3%A7%C3%A3o.pdf)

ARAÚJO, Y. F. Avaliação da qualidade da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) fresca e resfriada e do gelo de manutenção comercializados na cidade de Brasília. Universidade de Brasília. Trabalho de Conclusão de Curso, 2015. Disponível em: <http://bdm.unb.br/handle/10483/10959>

ATIQUE, T. S. C. et al. Sensibilidade à meticilina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 3, p. 347-352, 2012.

BARROSO, R. M.; PINCINATO, R. B. M.; MUNOZ, A. E. P. O mercado da tilápia-2 trimestre de 2017 e Análise da estrutura do preço da tilápia no varejo. Embrapa Pesca e Aquicultura-Outras publicações técnicas (INFOTECA-E), 2017. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1072746/1/CNPASA2017mt11.pdf>

BrCAST. Teste sensibilidade aos antimicrobianos Método de disco-difusão EUCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. v. 5. 2016. Disponível em: [http://brcast.org.br/download/vers%C3%B5es\\_antteriores/Manual-Disco-Difusa%CC%83o-BrCAST-03-2016.pdf](http://brcast.org.br/download/vers%C3%B5es_antteriores/Manual-Disco-Difusa%CC%83o-BrCAST-03-2016.pdf)

BERTI, R. C.; SANTOS, D. C. Importância do controle de qualidade na indústria alimentícia: prováveis medidas para evitar contaminação por resíduos de limpeza em bebida UHT. **Atas de Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 23-38, 2016.

BOUCHRIF, B. et al. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 01, p. 035-040, 2009.

BRASIL. Boas Práticas de Manipulação em Serviços de Alimentação. Módulo 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2015. Cartilha para estudos. Disponível em: <https://jundiai.sp.gov.br/saude/wp-content/uploads/sites/17/2015/01/Aula-1.pdf>

BRASIL. Diagnóstico Laboratorial do Gênero *Salmonella*. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.** Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>

BRASIL. PORTARIA Nº 185, DE 13 DE MAIO DE 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1997.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001.

BRASIL. Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2008. Disponível em: [http://anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo5/et est.htm](http://anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/et est.htm)

CAMPOS, D. S.; PAIVA, Z. C. Condição higiênico-sanitária do pescado comercializado em feira no município de Manaus-AM. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**, v. 2, p.1-7, 2012.

CARDOZO, M. V. Detecção de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em peixes de pisciculturas e de vida livre. Repositório Unesp, 2014. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/122015>

CARVALHO, I. T. Microbiologia dos alimentos. Escola Técnica Aberta do Brasil, 2010. Manual técnico. Disponível em: [http://pronatec.ifpr.edu.br/wpcontent/uploads/2013/06/Microbiologia\\_dos\\_Alimentos.pdf](http://pronatec.ifpr.edu.br/wpcontent/uploads/2013/06/Microbiologia_dos_Alimentos.pdf)

CASTAGNOLLI, N. Piscicultura de água doce. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p.



CHEN, Z. B, WANG, M. L, BARKLEY, N. A., PITTMAN, R. N. A simple allele-specific PCR assay for detecting *FAD2* alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, p. 542–548, 2010.

DA COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DA SILVA, K. C. Monitoramento dos mecanismos de resistência em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos derivados. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP, 2011. Tese de Doutorado. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-13022012-082940/en.php>

DE MEDEIROS, N. X. de et al. Detecção molecular de *Salmonella* sp. em amostras avícolas. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações UFG, 2013. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5217>

DE OLIVEIRA, E. G. et al. Produção de tilápia: mercado, espécie, biologia e recria. Embrapa Meio-Norte-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2007. Cartilha Informativa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/69806/producao-de-tilapia-mercado-especie-biologia-e-recria>

DE OLIVEIRA, M. A. F. M. Infecções Alimentares por *Escherichia Coli*. Repositório UNESP – Rio Claro, 2013. Texto para Discussão. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2013/InfecoesAlimentaresporEscherichiacoli.pdf>

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Farming the waters for people and food. Proceedings of the Global Conference on Aquaculture, 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e.pdf>

FIB. Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. **Food Ingredients Brasil**, v. 19, p. 51-59, 2011.

FRANÇA, M. S. S. **Resistência bacteriana em bacilos Gram-negativos: a importância dos testes fenotípicos**. Biblioteca Digital de Monografias UFRN, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Disponível em: <https://monografias.ufrn.br/jspui/handle/123456789/5826>

GALÁN, J. E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 263-271, 1996.

GALAN, Jorge E.; GINOCCHIO, Christine; COSTEAS, Paul. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4338-4349, 1992.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GONÇALVES, J. S. et al. Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de técnica PCR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 4, p. 223-226, 2014.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

HALATSI, K. et al. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, n. 2, p. 201-207, 2006.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v.36, n.4, p.815-836, 2012.

HENRIQUE, W. N. et al. Resistência bacteriana. Faculdade Alfredo Nasser, 2012. Anais de evento. Disponível em: <http://www.faculdadealfredonasser.edu.br/files/pesquisa/poster%20HENRIQUE,%20Wilker%20Natividade;%20SANTIAGO,%20Silvania,%20CAVALCANTI,%20D.S.P.%20Resist%C3%Aancia%20Bacteriana.pdf>

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

JÚNIOR, C. A. F.; JÚNIOR, A. S. V. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Fortaleza, Ceará, 2008. Anais de evento. Disponível em: <https://ageconsearch.umn.edu/bitstream/108143/2/178.pdf>

KUBITZA, F. O mar está para peixe... para peixe cultivado. **Panorama da Aquicultura**, v 17, n. 100, p. 14-23, 2007.

KUBITZA, F. Cultivo misto de camarão e tilápia: oportunidades, benefícios e desafios, 2016. Texto informativo. Disponível em: <http://abccam.com.br/wp-content/uploads/2016/12/Fernando-Kubtiza.pdf>

LABORCLIN. Manual Para Antibiograma: difusão em disco (Kirby e Bauer). 2011. Disponível em: [http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf\\_190.pdf](http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf)

LEIRA, M. H. et al. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **PUBVET**, v. 11, p. 11-17, 2017.

LOURENÇO, J. I. R. Implementação da técnica de PCR em tempo real na detecção de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos. Repositório Científico do *Instituto Politécnico de Santarém*, 2011. Tese de Doutorado. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.15/1166>

MENDONÇA, E. P. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. Repositório Institucional Universidade Federal de Uberlândia, 2016. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17625>

MICHAEL, G. B. et al. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. **Future Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 427-443, 2015.

MLEJNKOVA, H; SOVOVA, K. Impact of fish pond manuring on microbial water quality. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 60, n. 3, p. 117-124, 2012.

MSANGI, S. et al. Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. **World Bank Report**, 2013. Texto para Discussão. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/019/i3640e/i3640e.pdf>

NESSE, L. L. et al. Molecular analyses of *Salmonella enterica* isolates from fish feed factories and fish feed ingredients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1075-1081, 2003.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. Repositório Institucional da Universidade de Aveiro, 2010. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10773/7230>

PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 323-334, 2007.

PEREIRA, L. A. R.; FONSECA, V. V. Controle de qualidade de pescados com verificação dos seus PCC'S em um restaurante no município de Volta Redonda. **Interbio**. v.5 n.1, p. 21-27, 2011.

PEREIRA, R. E. P., PETRECHEN, G. G. Principais métodos diagnósticos bacterianos – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 16, p. 1- 12, 2011.

PIRES, P. H. V. Relatório do estudo de viabilidade técnica e econômica da criação de peixes em tanques-rede na represa da Usina de Corumbá IV situada em Santo Antônio do Descoberto-Goiás. Biblioteca Digital da Produção Intelectual Discente da Universidade de Brasília, 2014. Relatório de Estágio. Disponível em: <http://bdm.unb.br/handle/10483/7932>

PIZAIA, M. G. et al. A piscicultura no Brasil: um estudo sobre a produção e comercialização de “*Oreochromis niloticus*”. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER)**. Anais de evento, 2008. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/9/497.pdf>

RAHN, K. et al. Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, n. 4, p. 271-279, 1992.

RODLOFF, Arne et al. Susceptible, intermediate, and resistant—the intensity of antibiotic action. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 105, n. 39, p. 657-662, 2008.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Peixes: Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2005. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/livro-vermelho/volumell/Peixes.pdf>

SANTIAGO, J. A. S. et al. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados-revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 2, p. 92-103, 2013.

SARTORI, A. G. O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.

SCHULTER, E. P.; FILHO, J. E. R. V. Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Repositório do Conhecimento Ipea, 2017. Texto para Discussão. Disponível em: [http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8043/1/td\\_2328.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8043/1/td_2328.pdf)

SEBRAE-RN. Criação de tilápias em tanques escavados, 2014. Cartilha Informativa. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/8f207413cf7a8402b142400d385397ad/\\$File/5203.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8f207413cf7a8402b142400d385397ad/$File/5203.pdf)

SES-SP, SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. Informe NET-DTA, 2013. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-devigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/bacterias/201316staphylo.pdf>

SES-SP, SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.4, n. 40, p. 24-27. 2007.

SILVA, F. H. Biologia Molecular. Apostila de Introdução à Engenharia genética da UFSCar. **Escola Brasileira de Inteligência Artificial e Bioinformática InBio São Carlos**. 2001. Disponível em: [http://genfis40.esalq.usp.br/downloads/biologia\\_molecular.pdf](http://genfis40.esalq.usp.br/downloads/biologia_molecular.pdf)

SUSSEL, F. R. **Tilapicultura no Brasil e entraves na produção**. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios-Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, v. 8510, 2013. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/TilapiculturaEntraves2013.pdf>

TUNON, G. I. L. et al. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp. isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 52, p. 04-06, 2008.

WHO. Antimicrobial Resistance. **World Health Organization**, 2018. Texto informativo. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>

ZIEMER, C. J.; STEADHAM, S. R. Evaluation of the specificity of Salmonella PCR primers using various intestinal bacterial species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 463-469, 2003.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Visualização dos resultados da PCR em transiluminador sob luz violeta

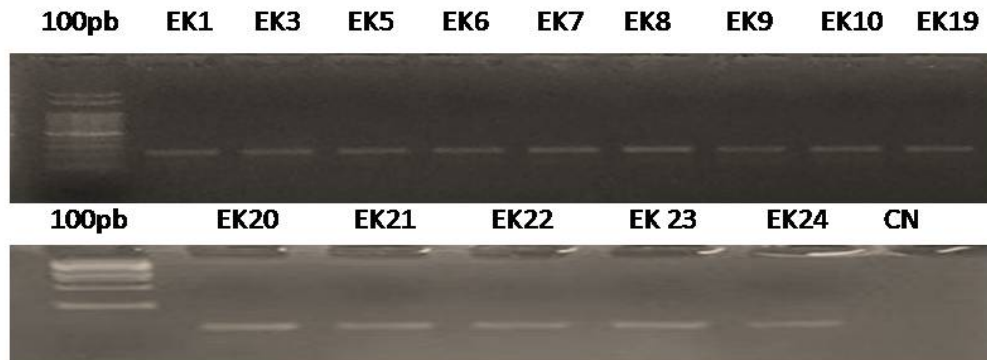


Figura A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella enterica*. M = marcador de 100 pb; EK1 a EK24 = amostras deste estudo com amplicons de *invA* (103 pb); CN = Controle Negativo.



## ANEXO 2. Genoma de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Java strain NCTC5706

17/10/2018 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Java strain NCTC5706 genom - Nucleotide - NCBI

Nucleotide

[Learn more](#) about upcoming changes to the Nucleotide, EST, and GSS databases.

GenBank

Showing 620 bp region from base 1006009 to 1006628.

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

GenBank: LT571437.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

---

Go to:

LOCUS LT571437 620 bp DNA linear BCT 19-MAY-2016  
 DEFINITION *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Java strain NCTC5706 genome assembly, chromosome: 1.  
 ACCESSION [LT571437](#) REGION: 1006009..1006628  
 VERSION LT571437.1  
 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  
 ..620  
 /organism="Salmonella enterica subsp. enterica serovar Java"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="NCTC5706"  
 /db\_xref="taxon:224729"  
 /chromosome="1"  
 gene <1..620  
 /gene="invA"  
 /locus\_tag="SAMEA3468845\_00989"  
 CDS <1..620  
 /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="SBL14949.1"  
 /translation="MLLSLLNSARLRPELLILVLMVMIISMFIPLPTYLVDFLIALN  
 IVLAILVFMGSFYIDRILSPSTFPVALLITLFRLLSISTSRLLIEADAGEIATF  
 GQFVIGDSLAVGVFVIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDGMGPKQMSIDADLK  
 AGIIDADAARERRSVLRESQLYGSDGAMKFIKSDAIIAGIIIFVNFVIGGISVGMTR  
 HMDLSSALSTYMLTIGDGLVAQIPALLIAISAGFIVRVNGSDNMGRIIMTQLLN  
 NPFVLVVTAILTISMGTLPGFPLPVFVILSVVLSVLFYFKFREAKRSAAPKTSKGEQ  
 PLSIEEKGSLLGLIGLDKYSTVPLIILVPKSRREDLEKAQLAERLRSQFFIDYG  
 VRLPEVLLRDGEGLDNDSIVLLINEIRVEQFTVYFDLMRVVNVYSEVVSFGINPTIHQ  
 QGSSQYFWVTHEEGEKLRRELVLRNALDELYHCLAVTLARNVNEYFGIETKHMLDQ  
 LEAKFPDLLKEVLRHATVQRISEVLQRLLSERVSVRNMKLIMEALALWAPREKDVINL  
 VEHIRGAMARYICHKFANGGELRAVMVSAEVEDVIRKGIKQTSGSTFLSLDPEASANL  
 MDLITLKLDDLLIAHKDLVLLTSDVRRFIKKMIEGRFPDLELVSFGEIADSKSVNVI  
 KTI"  
 ORIGIN  
 1 gctgatgcc gtgaaattat cggcagttc gggcaattcg ttattggcga tagcctggcg  
 61 gtgggtttt ttgtcttctc tattgtcacc gtgtccagc ttatcgttat taccaaaggt  
 121 tcagaacgc tcgcggaagt cggcggcggc tttctctcgg atggtatgcc cggtaaacag  
 181 atgagtatt atgccgatt gaaggcgggt attattgatg cggatgccgc ggcgaacgg  
 241 cgaagcgtac tggaaagaga aagccagcct tacggttctc ttgacgtgac gatgaagtt  
 301 atcaaagggt acgctattgc cggcatcatt atcatctttg tgaactttat tggcggatt  
 361 tcggtgggga tgaccgccca tggatggatt ttgtcctcgc ccctgtctac ttataccatg  
 421 ctgaccattg gtgatggtct tgtcgccag atccccgcat tgttgattgc gattatgccc  
 481 ggttttatcg tgactcgcgt aatggcgat agcgataata tgggacggaa tatcatgacg  
 541 cagctgttga acaaccatt tgtattggtt gttacggcta ttttgacctt tccaatggga  
 601 actctgccgg gattcccgcg  
 //

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LT571437.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast\\_rank=2&RID=WETAYA1S01R&from=1006009&to=1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LT571437.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=2&RID=WETAYA1S01R&from=1006009&to=1)



### ANEXO 3. Sequência do primer para *Salmonella enterica*

Desenho dos oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)

pick primers from a DNA sequence [About](#) [Source Code](#)

WARNING: Numbers in input sequence were deleted.

< Back

Pair 1:

Left Primer 1:

Sequence:

Start: 377      Length: 20 bp      Tm: 60.0 °C      GC: 50.0 %      ANY: 6.0      SELF: 2.0

Right Primer 1:

Sequence:

Start: 494      Length: 20 bp      Tm: 60.0 °C      GC: 50.0 %      ANY: 4.0      SELF: 1.0

Product Size: 118 bp      Pair Any: 5.0      Pair End: 1.0

```

1      gctgatgccg  gtgaaattat  cgccacgttc  gggcaattcg  ttattggcga
51     tagcctggcg  gtgggttttg  ttgtcttctc  tattgtcacc  gtggtccagt
101    ttatcgttat  taccaaaggt  tcagaacgcg  tcgcggaagt  cgcgcccca
151    ttttctctgg  atggtatgcc  cggtaaacag  atgagtattg  atgccgattt
201    gaaggccggt  attattgatg  cggatgccgc  gcgcgaacgg  cgaagcgtac
251    tggaaagaga  aagccagctt  tacggttctc  ttgacgggtg  gatgaagttt
301    atcaaaggtg  acgctattgc  cggcatcatt  atcatctttg  tgaactttat
351    tggcgggtatt  tcggtgggga  tgaccgcgca  tggtatggat  ttgtctccg
401    ccctgtctac  ttataccatg  ctgaccattg  gtgatggtct  tgtcgcccag
451    atccccgcat  tgttgattgc  gattagtgcc  ggttttatcg  tgactcgcgt
501    aaatggcgat  agcgataata  tgggacggaa  tatcatgacg  cagctgttga
551    acaaccatt  tgtattggtt  gttacggcta  ttttgacct  ttcaatggga
601    actctgccg  gattcccgt

```

Select all Primers

Pair 2:

Left Primer 2:

Sequence:

Start: 1      Length: 20 bp      Tm: 59.9 °C      GC: 45.0 %      ANY: 4.0      SELF: 3.0

Right Primer 2:

Sequence:

Start: 103      Length: 20 bp      Tm: 60.0 °C      GC: 50.0 %      ANY: 5.0      SELF: 3.0

Product Size: 103 bp      Pair Any: 3.0      Pair End: 1.0



Pair 3:

Left Primer 3:

Sequence:

Start: 394      Length: 20 bp      Tm: 59.8 °C      GC: 55.0 %      ANY: 2.0      SELF: 2.0

Right Primer 3:

Sequence:

Start: 494      Length: 20 bp      Tm: 60.0 °C      GC: 50.0 %      ANY: 4.0      SELF: 1.0

Product Size: 101 bp      Pair Any: 3.0      Pair End: 1.0

Pair 4:

Left Primer 4:

Sequence:

Start: 394      Length: 20 bp      Tm: 59.8 °C      GC: 55.0 %      ANY: 2.0      SELF: 2.0

[tp://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi](http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)

7/10/2018

Primer3Plus

Right Primer 4:

Sequence:

Start: 500      Length: 20 bp      Tm: 60.1 °C      GC: 50.0 %      ANY: 5.0      SELF: 0.0

Product Size: 107 bp      Pair Any: 3.0      Pair End: 0.0

Pair 5:

Left Primer 5:

Sequence:

Start: 195      Length: 20 bp      Tm: 59.9 °C      GC: 45.0 %      ANY: 4.0      SELF: 3.0

Right Primer 5:

Sequence:

Start: 301      Length: 20 bp      Tm: 60.3 °C      GC: 45.0 %      ANY: 3.0      SELF: 1.0

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

Statistics:

Left Primer:	considered 4363, GC content failed 18, low tm 880, high tm 2472, high end compl 2,high 3' stability 883
Right Primer:	considered 4460, GC content failed 18, low tm 951, high tm 2420, high end compl 1,high 3' stability 971
Primer Pair:	considered 453, unacceptable product size 443, high end compl 1, ok 9

fore about [Primer3Plus...](#)



## ANEXO 4. Região genômica correspondente ao primer deste estudo mostrando *Salmonella enterica*

Recuperada no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

17/10/2018

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (20 letters)

[BLAST®](#) » [blastn suite](#) » RID-WEUDJ66D014

### BLAST Results

[Questions/comments](#)

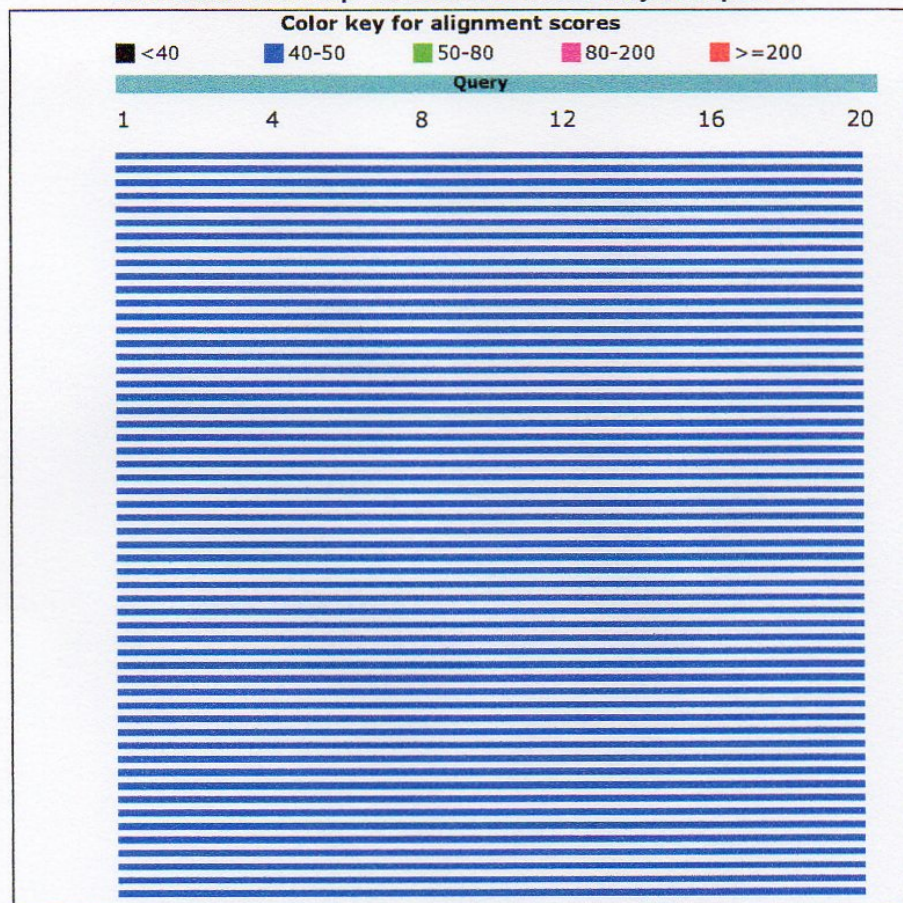
Job title: Nucleotide Sequence (20 letters)

**RID** [WEUDJ66D014](#) (Expires on 10-19 00:56 am)  
**Query ID** Id|Query\_60063  
**Description** None  
**Molecule type** nucleic acid  
**Query Length** 20

Have you ever used the BLAST AMI or want to use BLAST in the Cloud?  
If so, please [click here](#). Your feedback is very important to us.  
Click here to never see this message again.

### Graphic Summary

Distribution of the top 100 Blast Hits on 100 subject sequences





## Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium BK invA gene, partial sequence	40.1					
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg strain NCTC5717 genome assembly, chromosome: 1	40.1					
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Thompson strain NCTC8496 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483493.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Poona strain NCTC4840 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483489.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Bredeney strain NCTC6026 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483481.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Infantis strain NCTC6703 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483479.1</a>
Salmonella enterica subsp. houtenae serovar Houten strain NCTC10401 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483478.1</a>
Salmonella enterica subsp. salamae strain NCTC10310 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483477.1</a>
Salmonella enterica subsp. salamae serovar Greenside strain NCTC9936 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483475.1</a>
Salmonella enterica subsp. diarizonae strain NCTC10381 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483474.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Senftenberg strain NCTC10080 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483465.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Give strain NCTC5778 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483463.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain NCTC9787 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483457.1</a>
Salmonella enterica subsp. salamae strain NCTC9930 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483456.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain NCTC9872 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483455.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain NCTC6480 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483454.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Aberdeen strain NCTC5791 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483453.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Stanley strain NCTC5716 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483434.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Thompson strain NCTC5740 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LS483419.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Anatum strain R16.0676 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP029800.1</a>



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Salmonella enterica strain DA34821 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP029567.1</a>
Salmonella enterica strain LT2 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP014051.2</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain FDAARGOS_54 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP026976.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis SS2 InvA gene, invasion protein A, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP026976.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Derby isolate 2014LSAL01779 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP026569.1</a>
Salmonella enterica strain MFDS1004839 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP026569.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain PA1 InvA protein (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">MF580381.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Ouakam invA gene, partial sequence, strain: SSH	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC312443.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky strain PU131 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP026327.1</a>
Salmonella enterica strain FDAARGOS_70 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP026052.1</a>
Salmonella enterica strain MFDS1004024 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP025745.1</a>
Salmonella enterica strain CFSAN024439 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP024169.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Tennessee strain CFSAN070643 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP024168.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gaminara strain CFSAN070644 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP024165.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Tennessee strain CFSAN070645 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP024164.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B invA gene for invasion protein A, partial sequence, strain: SAS	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC315643.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolate VNB151-sc-2315230 genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LT795114.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar India invA gene, invasion protein A, partial sequence, strain: SS36	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC322990.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport invA gene, invasion protein A, partial sequence, strain: SS40	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC322989.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Ouakam invA gene, invasion protein A, partial sequence, strain: SS34	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC322987.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport invA gene, invasion protein A, partial sequence, strain: SS30	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC322224.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Ouakam invA gene, invasion protein A, partial sequence, strain: SS29	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC322223.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar India invA gene, invasion protein A, partial sequence, strain: SS27	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC322133.1</a>

Have you ever used the BLAST AMI or want to use BLAST in the 40.Cloud?  
 If so, please [click here](#). Your feedback is very important to us.  
 Click here to never see this message again.

Ok Cancel



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Indiana invA gene, invasion protein A, partial sequence, strain: SS26	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC322132.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica invA gene, invasion protein A, partial sequence, strain: SS25	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">LC322110.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain 16A242, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP020822.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU105 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524151.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU104 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524151.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU58 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524160.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU56 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524159.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU55 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524158.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU54 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524157.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU53 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524156.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU52 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524155.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU50 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524154.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU42 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524153.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain Egy Vet CU31 invasion protein A (invA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">KX524152.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain CFSAN033543, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP020825.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain CFSAN033541, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP020823.1</a>
Salmonella enterica strain FORC_038, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP015574.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Bergen str. ST350, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019405.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str. 9184, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019035.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Senftenberg strain 775W, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP016837.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Saintpaul strain CFSAN004174, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019206.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Saintpaul strain CFSAN004173, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019204.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Mbandaka str. ATCC 51958, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019183.1</a>

Have you ever used the BLAST AMI or want to use BLAST in the Cloud?  
 If so, please [click here](#). Your feedback is very important to us.  
 Click here to never see this message again.

Ok Cancel



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 11511, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019185.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Muenster str. 0315 strain 315, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019198.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Thompson strain CFSAN000738, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019192.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Senftenberg str. ATCC 43845, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019184.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Rubislaw str. ATCC 10717, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019179.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Minnesota str. ATCC 49284, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019178.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. ATCC 39184, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019177.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Chester str. ATCC 11997, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019176.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Albany str. ATCC 51960, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019172.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. SARA35, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP016406.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Saintpaul strain CFSAN004175, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP016412.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Infantis strain FSIS1502169, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP021462.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Infantis strain CVM44454, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP028151.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain UGA14 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP028157.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. RM2968 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP029595.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain RM4283 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP029593.1</a>
Salmonella enterica strain DA34833 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP029568.1</a>
Salmonella enterica strain DA34827 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP026700.1</a>
Salmonella enterica strain DA34837 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP022658.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain AR_0031 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP022663.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica strain RM11060 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	
Salmonella enterica subsp. enterica strain RM11065 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	

40. Have you ever used the BLAST AMI or want to use BLAST in the Cloud?

If so, please [click here](#). Your feedback is very important to us.  
40. Click here to never see this message again.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Saintpaul strain FDAARGOS_373 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP023512.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A strain FDAARGOS_368 chromosome, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP023508.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019418.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolate STMU2UK genome assembly, chromosome: 1	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019417.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Yovokome str. S-1850, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019415.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Wandsworth str. SA20092095, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019416.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Moscow str. S-1843, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019414.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Nitra strain S-1687, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019413.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Manchester str. ST278, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019412.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Krefeld str. SA20030536, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019411.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Koessen str. S-1501, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019411.1</a>
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Johannesburg str. ST203, complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	<a href="#">CP019411.1</a>

Have you ever used the BLAST AMI or want to use BLAST in the Cloud?  
 If so, please [click here](#). Your feedback is very important to us.  
 Click here to never see this message again.

Ok Cancel

### Alignments

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium BK invA gene, partial sequence  
 Sequence ID: **LC388420.1** Length: 256 Number of Matches: 1  
 Range 1: 43 to 62

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
40.1 bits(20)	0.33()	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus	

Features:

```
Query 1 TAAACTGGACCACGGTGACA 20
Sbjct 62 TAAACTGGACCACGGTGACA 43
```

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg strain NCTC5717 genome assembly, chromosome: 1  
 Sequence ID: **LS483494.1** Length: 4786558 Number of Matches: 1  
 Range 1: 1005400 to 1005419

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
40.1 bits(20)	0.33()	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus	

Features:

```
Query 1 TAAACTGGACCACGGTGACA 20
Sbjct 1005419 TAAACTGGACCACGGTGACA 1005400
```



Salmonella enterica subsp. enterica serovar Thompson strain NCTC8496 genome assembly, chromosome: 1  
 Sequence ID: **LS483493.1** Length: 4757428 Number of Matches: 1  
 Range 1: 1009866 to 1009885

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
40.1 bits(20)	0.33()	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus	

Features:

Query 1 TAAACTGGACCACGGTGACA 20  
 Sbjct 1009885 TAAACTGGACCACGGTGACA 1009866

Have you ever used the BLAST API or want to use BLAST in the Cloud?  
 If so, please [click here](#). Your feedback is very important to us.  
 Click here to never see this message again.

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Poona strain NCTC8496 genome assembly, chromosome: 1  
 Sequence ID: **LS483489.1** Length: 4670674 Number of Matches: 1  
 Range 1: 1013115 to 1013134

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
40.1 bits(20)	0.33()	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus	

Features:

Query 1 TAAACTGGACCACGGTGACA 20  
 Sbjct 1013134 TAAACTGGACCACGGTGACA 1013115

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Bredeney strain NCTC6026 genome assembly, chromosome: 1  
 Sequence ID: **LS483481.1** Length: 4627083 Number of Matches: 1  
 Range 1: 978331 to 978350

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
40.1 bits(20)	0.33()	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus	

Features:

Query 1 TAAACTGGACCACGGTGACA 20  
 Sbjct 978350 TAAACTGGACCACGGTGACA 978331

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#) [YouTube](#)

- [National Library Of Medicine](#)
- [National Institutes Of Health](#)
- [U.S. Department of Health & Human Services](#)
- [USA.gov](#)

**NCBI**

[National Center for Biotechnology Information](#), U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA  
[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

**ANEXO 5. Antibiograma das bactérias *Salmonella enterica* isoladas das amostras de tilápia fresca**

Antibióticos	Cepas isoladas (halo de inibição medido em mm)																				
	EK1	EK2	EK3	EK4	EK5	EK6	EK7	EK8	EK9	EK10	EK11	EK12	EK13	EK14	EK15	EK19	EK20	EK21	EK22	EK23	EK24
<b>SUL</b>	24	35	33	32	26	29	HC	HC	34	36	35	32	27	30	35	27	30	SH	28	HC	25
<b>CLO</b>	35	32	33	29	32	32	27	30	28	32	31	30	29	24	HC	29	30	22	30	30	31
<b>CTX</b>	33	34	32	36	34	35	31	35	36	36	36	33	33	42	40	48	29	39	31	34	36
<b>TET</b>	28	32	33	8	32	30	HC	27	31	27	29	28	27	10	SH	32	30	17	25	28	29
<b>IMP</b>	35	31	34	30	28	33	29	31	32	32	31	32	27	24	32	40	28	43	23	30	22
<b>GEN</b>	30	26	28	28	26	20	25	24	27	26	27	26	26	28	29	HC	35	29	22	30	29
<b>AMC</b>	HC	SH	23	HC	SH	HC	8	10	HC	HC	HC	HC	10	13	HC	27	24	32	23	HC	25
<b>CIP</b>	44	38	42	40	38	37	38	45	41	45	36	34	42	44	42	32	19	30	21	28	35
<b>CAZ</b>	30	33	34	32	32	33	32	30	31	32	30	28	38	37	40	21	41	22	24	30	34

SH = sem halo de inibição; HC = halo com presença de colônias; SUL = sulfonamida, CLO = cloranfenicol, CTX = cefotaxima, TET = tetraciclina, IMP = imipenem, GEN = gentamicina, AMC = amoxicilina com ácido clavulânico, CIP = ciprofloxacina, CAZ = ceftazidima.

## ANEXO 6. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA HIGIENE ALIMENTAR

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, revisões bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do programa*; gráficos em *Winword, Power Point* ou *Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw* nas mais variadas versões do programa (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *Photo Shop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. Do trabalho deverão constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Resultados de pesquisas relacionados a seres humanos deverão ser apresentados acompanhados do número do parecer junto ao Comitê de Ética da instituição de origem ou outro relacionado ao Conselho Nacional de Saúde.

05. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e co-autores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições às quais pertencem, com três níveis hierárquicos (Universidade, Faculdade, Departamento), também a cidade, estado e país.

06. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.

07. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).

08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados

09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.

10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.

11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e co-autores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.

12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br).

13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada **declaração de recebimento** ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-mail [autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br)

14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via e-mail.

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à

Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista. Neste caso, por ocasião da publicação, será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diagramada. Não havendo autor assinante, a taxa de publicação será de R\$ 70,00 por página diagramada.

17. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do *e-mail*

[autores@higienealimentar.com.br](mailto:autores@higienealimentar.com.br)

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM775q Monteiro, Erika da Silva  
Qualidade microbiológica de tilápia fresca comercializada  
no Distrito Federal / Erika da Silva Monteiro; orientador  
Daniela Castilho Orsi; co-orientador Izabel Cristina  
Rodrigues da Silva. -- Brasília, 2018.  
66 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de  
Brasília, 2018.

1. Tilápia. 2. Qualidade microbiológica. 3. Salmonella  
enterica. 4. gene InvA. 5. Resistência bacteriana. I. Orsi,  
Daniela Castilho, orient. II. da Silva, Izabel Cristina  
Rodrigues, co-orient. III. Título.