

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

YOHANNA FERREIRA DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
FRESCA E RESFRIADA E DO GELO DE MANUTENÇÃO COMERCIALIZADOS
NA CIDADE DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA, DF

2015

YOHANNA FERREIRA DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
FRESCA E RESFRIADA E DO GELO DE MANUTENÇÃO COMERCIALIZADOS
NA CIDADE DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada 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

2015

YOHANNA FERREIRA DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
FRESCA E RESFRIADA E DO GELO DE MANUTENÇÃO COMERCIALIZADOS
NA CIDADE DE BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

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

Co-orientador: Profa Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Eliana Fortes Gris
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(UniCEUB - Centro Universitário de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, sei que sem ele não teria capacidade de chegar aonde cheguei, ao Divino Espírito Santo pelo dom da sabedoria necessária para seguir essa caminhada acadêmica e a Nossa Senhora que é minha guia e está sempre ao meu lado. À minha família, meu pai Lázaro, minha mãe Margareth que são meus exemplos de superação e lutaram muito para que eu chegasse aqui, a eles tenho todo amor e gratidão. Também preciso citar meus irmãos que estavam sempre na torcida me incentivando. Meu esposo Célio Henrique, ele é uma peça fundamental para esse conquista, sempre me dando apoio, sendo compreensivo nos momentos mais difíceis, sem ele nada disso seria possível. E por fim e não menos importante meu filho Miguel, foi por ele que cheguei ate aqui e é ele que me da forças para enfrentar as jornadas que virão.

A minha orientadora Daniela Castilho Orsi e a minha co-orientadora Izabel Cristina que não mediram esforços para me ajudar, estavam sempre dispostas para esclarecer minhas duvidas e me auxiliar nos momentos de dificuldades. Muito obrigada pela paciência e sabedoria que foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao corpo decente da Universidade de Brasilia, foram eles que me deram a base para chegar ate aqui, graças a vocês pude conhecer e amar essa profissão maravilhosa.

RESUMO

A piscicultura brasileira vem crescendo nos últimos anos, resultando em maior oferta e maior consumo de pescado pela população brasileira. A tilápia se destaca por ser a espécie de água doce mais cultivada, correspondendo a 43,1% da produção nacional. Considerando que o Distrito Federal é o segundo mercado consumidor de pescado no país, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica da tilápia do Nilo fresca, comercializada nos supermercados de Brasília e do gelo utilizado na sua conservação. Foram realizadas análises microbiológicas em oito amostras de tilápia (quatro amostras de peixe inteiro e quatro amostras de filé) e nas amostras de gelo. As amostras de filé apresentaram uma contagem total de bactérias mesófilas ($6,43 \times 10^4$ a $1,78 \times 10^6$ UFC/g) e psicotróficas ($2,60 \times 10^6$ a $1,02 \times 10^8$ UFC/g) consideravelmente maior que as amostras de peixe inteiro. Na enumeração dos coliformes totais, duas amostras de filé indicaram falhas higiênico-sanitárias, com enumeração acima de $1,0 \times 10^2$ NMP/g. Todas as amostras de tilápia estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para a contagem de coliformes termotolerantes e de *S. aureus*. Os resultados das análises moleculares mostraram que 5 amostras de tilápia (62,5%) estavam contaminadas com *Salmonella* ssp. e impróprias para o consumo humano. Os resultados da avaliação microbiológica de 8 amostras de gelo, mostraram que 6 amostras (75%) estavam impróprias para o uso na conservação do pescado devido à presença de coliformes totais e de coliformes termotolerantes. A presença de *Escherichia coli* O157:H7 nas amostras de gelo mostrou que o gelo utilizado para a conservação e manutenção da qualidade do pescado pode ser uma fonte de transmissão de patógenos.

Palavras-chave: tilápia, gelo de manutenção do pescado, qualidade microbiológica, análise molecular.

ABSTRACT

The Brazilian fish farming has been growing in recent years, resulting in increased supply and higher consumption of fish by the Brazilian population. Tilapia stands out as the freshwater species most cultivated, corresponding to 43.1% of national production. Considering the Federal District the second consumer market for fish in the country, the objective of this work was to evaluate the microbiological quality of fresh Nile tilapia commercialized in supermarkets of Brasilia and the ice used for its preservation. Microbiological analyzes were performed in eight samples of tilapia (four whole fish samples and four fillet samples) and in ice samples. The fillet samples presented a total count of mesophilic bacteria ($6,43 \times 10^4$ to $1,78 \times 10^6$ CFU/g) and psychotropic ($2,60 \times 10^6$ to $1,02 \times 10^8$ CFU/g) considerably larger than the whole fish samples. In the enumeration of total coliforms, two fillet samples indicated hygienic and sanitary failures, with enumeration above $1,0 \times 10^2$ MPN/g. All samples of tilapia were within the limits established by Brazilian legislation for thermotolerant coliforms and *S.aureus* counts. The results of molecular analyzes showed that 5 samples of tilapia (62.5%) were contaminated with *Salmonella* ssp. and unfit for human consumption. The results of the microbiological evaluation of 8 ice samples showed that 6 samples (75%) were unsuitable for use in the storage of fish due to the presence of total coliforms and thermotolerant coliforms. The presence of *Escherichia coli* O157:H7 in ice samples showed that the ice used for the preservation and maintenance of fish quality can be a source of pathogen transmission.

Key-words: tilapia, ice used for fish preservation, microbiological quality, molecular analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. A piscicultura da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) e o consumo de pescado em Brasília.....	12
1.2. O pescado como veículo transmissor de bactérias patogênicas ao homem	13
1.3. Métodos de controle de qualidade do pescado.....	15
1.4. Importância da qualidade do gelo de manutenção do pescado	17
1.5. Qualidade no processo de filetagem da tilápia.....	19
1.6. Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Coleta das amostras	24
4.2. Preparo das amostras e análises microbiológicas	24
4.3. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas	25
4.4. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	25
4.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	29
4.6. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp.....	30
4.7. Determinação do pH da carne do pescado	30
4.8. Inspeção sensorial do frescor da tilápia (peixe inteiro).....	31
4.9. Extração de DNA bacteriano para as análises moleculares.....	31
4.10. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR	32
4.12. Eletroforese em gel de agarose	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Análises microbiológicas da tilápia (peixe inteiro ou filé de tilápia)	35
5.2. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de tilápia.....	35
5.3. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de tilápia	38
5.4. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. nas amostras tilápia	40
5.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de tilápia	41
5.6. Análises microbiológicas do gelo de manutenção do pescado	43
5.7. Análises moleculares	45

5.8. Determinação do pH da carne do pescado	49
5.9. Inspeção sensorial do frescor da tilápia (peixe inteiro).....	50
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para as amostras de peixe e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	27
Tabela 2. Número mais provável por 100 ml (NMP/100 ml) para as amostras de gelo de manutenção do pescado e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	28
Tabela 3. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	33
Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	33
Tabela 5. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de tilápia (peixe inteiro).....	36
Tabela 6. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de filé de tilápia.....	36
Tabela 7. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de tilápia (peixe inteiro).....	38
Tabela 8. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de filé de tilápia.....	39
Tabela 9. Contagem de bactérias <i>Staphylococcus spp.</i> e de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras de tilápia (peixe inteiro e filé).....	40
Tabela 10. Resultado de pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> nas amostras de tilápia (peixe inteiro e filé).....	42
Tabela 11. Determinação do número mais provável (NMP/100 ml) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes e contagem total de bactérias mesófilas nas amostras de gelo de manutenção do pescado.....	44
Tabela 12. Identificação através de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de tilápia (peixe inteiro ou filé de tilápia) e gelo de manutenção do pescado.....	45
Tabela 13. Determinação do pH da carne do pescado.....	50
Tabela 14. Avaliação sensorial do frescor da tilápia.....	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Processos de filetagem da tilápia (FONTE:OETTERER, M. Industrialização do pescado cultivado. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200p).....19
- Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).....30
- Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *CoA* de *S. aureus*. M = marcador de 100 pb; ES 2 = amostra deste estudo com fragmentos de *CoA*(303 pb) obtidos a partir de DNA de *S. aureus* amostra de *S. aureus*; ES16, ES 17 e ES 18 = amostra cedida por OLIVEIRA(2015); CP1 e CP2= Controle Positivo (cepa ATCC 25923 *S. aureus*);CN = Controle Negativo.....46
- Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *tetB* de *E. coli*. M = marcador de 100 pb;EC 8, EC 9 e EC 10 = amostras deste estudo com fragmentos de *tetB* (302 pb) obtidos a partir de DNA de *E. coli*O157:H7; EC 14 e EC 15 =amostras de *E. coli* cedidas por OLIVEIRA(2015); CPC = Controle Positivo (cepa ATCC 35218 *E. coli*);CN = Controle Negativo.....47
- Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *invA* de *Salmonella* ssp; M = marcador de 100 pb;S3, S4, S5, S6, S7 = amostras deste estudo com fragmentos de *invA* (298 pb) obtidos a partir de DNA de *Salmonella**aenteritidis*; S12 e S13 = amostras de *Salmonella* ssp. cedidas por OLIVEIRA(2015);CP1= Controle Positivo 1 (amostra cedida por MAFRIN, 2013), CP2= Controle Positivo 2 (amostra cedida por BARBOSA, 2014); CN = Controle Negativo.).....49
- Figura 6. Descrição da avaliação sensorial do frescor da tilápia na amostra 1– CATEGORIA entre B e REJEITADO (Pele com brilho menos intenso, com cores desvanecidas e perda das escamas; olhos achatados e odor forte de peixe; guelras de cor amarronzada a descorada e muco coagulado; peritônio com parede abdominal descolada da carne).....51
- Figura 7: Descrição da avaliação sensorial do frescor da tilápia na amostra 4 – CATEGORIA EXTRA (pele com brilho; escamas brilhantes bem aderentes à pele; olhos com pupila negra e viva e córnea transparente; odor fresco e carne rosa claro brilhosa; guelras de cor vermelho vivo, com muco claro; peritônio com parede abdominal íntegra, cor viva e brilhante, prata brilhosa com manchas pretas).....52

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. Parâmetros de qualidade usados na inspeção sensorial do frescor da tilápia.....65

Anexo 2. Seleção dos oligonucleotídeos utilizados no estudo, com uso do BLAST.....	66
--	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. A piscicultura da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o consumo de pescado em Brasília

Durante as últimas décadas o Brasil sofreu constantes modificações em sua piscicultura, consolidando-se como importante atividade no agronegócio do país. As características naturais do Brasil facilitam esse crescimento, como a associação da abundância de recursos hídricos (5,5 milhões de hectares de reservatórios naturais e artificiais), disponibilidade de grãos para o processamento de rações balanceadas e clima favorável. Os peixes de água doce representam 87% da produção nacional (AYROZA, 2009).

Segundo dados do IBGE (2013) a produção total da piscicultura brasileira cresceu bastante e em 2013 foi de 392.493 mil toneladas. A principal produtora foi a Região do Centro-Oeste, essa teve uma despesca de 105.010 mil toneladas, que corresponde a 26,8% do total de peixes produzidos. A tilápia foi à espécie mais criada, correspondendo a 43,1% da produção nacional e atingiu a quantidade de 169.306 toneladas no ano de 2013.

No grupo das tilápias (*Oreochromis spp*), a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) se sobressai por ser um dos peixes mais produzidos mundialmente (ZIMMERMANN e FITZSIMMONS, 2004). Foi inserida no Brasil em 1971, na região do nordeste e daí se difundiu por todo país. A tilápia possui algumas características que a destaca como uma das principais espécies cultivadas, dentre elas uma grande capacidade de adaptação em cativeiro, resistência a doenças, desenvolvimento rápido, não requer muita energia e sua carne tem aceitabilidade elevada pelo mercado consumidor (SOARES e GONÇALVES, 2012). Além disso, a tilápia é um peixe de fácil filetagem, possui rendimento alto do filé, 35 a 40%, em exemplares com peso médio de 450 a 500g, tornando-a ideal para a industrialização (AYROZA, 2009; SIMÕES et al., 2007).

O Distrito Federal é o segundo mercado consumidor de pescado do país, ficando atrás somente de São Paulo. Como a carne do pescado é saudável comparada aos outros tipos de carne e possui alto teor de proteínas animais, esse alimento vem despertando o interesse da população candanga. No período de 2007 a 2011 o consumo anual médio de pescado por habitante em Brasília passou de

12,8 kg para 14 kg, valor acima da média nacional que é aproximadamente 9 kg per capita. O peixe mais produzido no DF também é a tilápia, com grande aceitação pela população (AMUSUH, 2012). De acordo com LEONHARDT et al. (2006), a carne da tilápia é bem aceita por ser saborosa, de cor branca e ter alto teor proteico.

O Distrito Federal produz em média 14% do pescado que consome. O pescado produzido no DF fica restrito ao lago Paranoá e a aquicultura regional que é responsável por mais de 90% do pescado produzido na região. A aquicultura regional vem crescendo e ganhando espaço no mercado. Em dez anos (2000 a 2009) a produção de pescado pela aquicultura mostrou um aumento de 206%. A produção de tilápia vem ganhando destaque a cada ano que passa (BORGES, 2010). De acordo com o IBGE, em 2013, a produção de peixes no Distrito Federal chegou a 800 toneladas e acredita-se que esse valor tende a crescer nos próximos anos.

A comercialização do pescado em Brasília é feita principalmente em supermercados, peixarias, feiras e mercado informal. Acredita-se que os supermercados vendam aproximadamente a metade do volume de pescado que é comercializado em Brasília. As peixarias e feiras comercializam em sua maioria os peixes de água doce (BORGES, 2010).

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

A microbiota da superfície corporal, brânquias e trato gastrointestinal dos peixes está diretamente ligada a microbiota do ambiente em que ele vive, a água. Então, peixes que são criados em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes podem carregar consigo muitos microrganismos patogênicos e indicadores de poluição fecal (GUZMÁN et al., 2004).

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

contaminação de origem fecal, indicando a possível presença de bactérias enteropatogênicas (FARIAS e FREITAS, 2008). A presença de coliformes termotolerantes no pescado e produtos de pesca é limitada a valores de $1,0 \times 10^2$ UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama) ou NMP/ g (Número Mais Provável por grama) (BRASIL, 2001).

A *Salmonellasp.* é outra bactéria que pode estar presente nos peixes criados em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes. A *Salmonellasp.* pertence à família Enterobacteriaceae e seu habitat principal é no trato intestinal de aves, reptéis e seres humanos. Essa bactéria não faz parte da microbiota natural dos peixes e caso esteja presente é proveniente de manipulação inadequada em qualquer etapa da cadeia produtiva ou consequência do contato com as águas contaminadas, que são consideradas uma importante via de transmissão desse patógeno (PARK et al., 2009).

De acordo com dados publicados pela Secretária de Vigilância em Saúde (SVS), no Brasil 84% dos surtos de doenças veiculadas por alimentos foram causados por bactérias patogênicas e/ou suas toxinas, sendo que 42,9% dos casos foram causados por *Salmonellasp.* (BRASIL, 2011). A legislação brasileira (BRASIL, 2001) determina que *Salmonella sp.* deve estar ausente em qualquer amostra de alimento estudada, ou seja, o resultado da pesquisa de *Salmonella sp.* no pescado deve ser expresso como Presença ou Ausência nas amostras estudadas.

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 25g.

O *Staphylococcus aureus* é de grande importância nos surtos de intoxicações alimentares. Habita a nasofaringe humana e assim tem grande acesso as mãos do hospedeiro para então contaminar os alimentos. A falta de higiene do manipulador infectado pode facilmente contaminar o pescado. O patógeno está presente em 30% da população humana, onde um a dois terços destes possuem cepas enterotoxigênicas produtoras de toxina proteica termoestável (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A produção de coagulase é uma característica na identificação das espécies da *Staphylococcus* enterotoxigênicos, principalmente *S. Aureus* (JORGENSEN et

al., 2005). Por esse motivo a legislação brasileira (BRASIL, 2001), considera que a enumeração de estafilococos coagulase positiva é equivalente a *Staphylococcus aureus*. A contagem de estafilococos coagulase positiva no pescado é limitada a valores de $1,0 \times 10^3$ UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama) (BRASIL, 2001).

Assim, existem os gêneros de bactérias que fazem parte da microbiota natural do pescado, dentre eles temos as *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*. Esses são os principais responsáveis pela deterioração do pescado, com destaque para as *Pseudomonas* e *Shewanella*, causadores das alterações organolépticas do pescado (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

No entanto, as bactérias patogênicas contaminantes do pescado são as que causam maior preocupação e dentre elas temos: *Escherichia coli*, *Salmonella ssp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibriosp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*. Alguns destes microrganismos patogênicos mesmo que em níveis baixos nos alimentos, devem ser considerados, pois podem causar sérios problemas de saúde (FDA, 2011; MINAMI et al., 2010).

1.3. Métodos de controle de qualidade do pescado

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

Entende-se qualidade do pescado à aparência estética e o frescor. Devem-se associar também os aspectos de segurança como: ausência de bactérias patogênicas e compostos químicos ou parasitas. Sua qualidade pode ser avaliada por testes sensoriais, químicos e microbiológicos. É de suma importância utilizar métodos de avaliação do pescado durante todas as etapas de comercialização desse produto para garantirmos a sua qualidade (GERMANO e GERMANO, 2008; SOARES e GONÇALVES, 2012).

A carne do peixe é um dos alimentos mais vulneráveis a deterioração por ter elevada atividade de água, por sua composição química com teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e também por seu pH próximo da neutralidade, favorecendo o desenvolvimento microbiano (FRANCO e LANDGRAF, 2008; MACARI, 2007). Além desses fatores intrínsecos, temos ainda a contaminação da água que influencia a microbiota do peixe. Outros fatores extrínsecos como a temperatura de armazenamento também influenciam a velocidade de deterioração do pescado (BARTOLOMEU et al, 2011; VIEIRA, 2004).

A avaliação microbiológica é considerada um dos melhores métodos de controle da qualidade do pescado. Além da avaliação microbiológica temos também os testes sensoriais e físico-químicos. A determinação do pH da carne é um dos métodos físico-químicos utilizados para avaliar a qualidade do pescado, mas não deve ser usado como único indicador de frescor e seus resultados devem vir acompanhados das análises microbiológicas e sensoriais (TAVARES e GONÇALVES, 2011). Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1997 a), o pH da carne interna de peixes frescos deve ser inferior a 6,5. Quando o pescado está deteriorado, seu pH é alterado para valores acima de 6,5, deixando-o impróprio para o consumo.

A carne dos peixes possui um pH próximo da neutralidade. Porém, após sua morte, ocorre a quebra do glicogênio em anaerobiose, gerando um acúmulo de ácido láctico nos músculos, o que causa a queda do pH, em média, de 6,9 para 6,3. Quando o pescado está deteriorado, ocorre a hidrólise proteica da carne pelas próprias enzimas do pescado e pelas bactérias deteriorantes, com produção de peptídeos, aminoácidos livres e aminas, que são responsáveis pelas mudanças de odor, textura e aumento do pH da carne (BARROS, 2003; GHALY et al., 2010; TAVARES e GONÇALVES, 2011).

Os testes sensoriais evidenciam alterações que são características do início da decomposição do pescado. Um peixe fresco deve ter as seguintes características: superfície do corpo limpa, pele brilhante e com escamas bem aderidas; guelras róseas ou avermelhadas, úmidas e brilhantes; carne com textura firme e cor adequada para cada espécie, a musculatura da parede abdominal não deve apresentar autólise; olhos transparentes, brilhantes e salientes ocupando completamente as órbitas. Na Europa, o método de avaliação do frescor do pescado recorre à inspeção sensorial e está regulamentada pelo Regulamento EC

nº 2406/96. Nesse esquema preconizado pela União Europeia as espécies são classificadas em 3 categorias: E (extra), A e B, sendo que extra corresponde à qualidade mais elevada e abaixo do nível B o produto não está próprio para consumo. No decorrer do processo de deterioração o peixe vai perdendo suas características e passa a ter escamas opacas que se desprendem facilmente, brânquias pálidas ou escuras, carne amolecida, com ausência de brilho, olhos turvos e as pupilas esbranquiçadas com aspecto leitoso e cheiro desagradável, ficando impróprio para o consumo (AMARAL e FREITAS, 2013; VIEIRA et al., 2004).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado), (BRASIL, 1997 a), descreve as características sensoriais necessárias do peixe fresco para que estes sejam considerados aptos para consumo humano. De acordo com o regulamento, as escamas devem ser translúcidas, com brilho metálico, unidas entre si e fortemente aderidas à pele. Os olhos devem ocupar toda a cavidade orbitária e serem brilhantes e salientes. As brânquias devem apresentar cor rosa ao vermelho intenso e serem úmidas e brilhantes. O abdome deve estar tenso e a sua evisceração, o peritônio deverá apresentar-se muito bem aderido às paredes, as vísceras inteiras, bem diferenciadas, brilhantes e sem dano aparente. Os músculos devem estar aderidos aos ossos fortemente e com elasticidade marcante. O odor, sabor, cor são característicos da espécie que se trate. O mesmo regulamento descreve como pescado impróprio para o consumo aquele com aspecto repugnante, mutilado, traumatizado ou deformado, que apresente coloração, cheiro ou sabor anormal (BRASIL, 1997 a).

1.4. Importância da qualidade do gelo de manutenção do pescado

Existe a necessidade de conservação do pescado em baixas temperaturas durante todas as etapas de produção, para impedir a instalação dos processos autolíticos e retardar a multiplicação bacteriana, que são causadores da deterioração do pescado (TAVARES e GONÇALVES, 2011). Portanto, a manutenção de temperatura baixa é um ponto crucial para a qualidade do pescado. A temperatura sempre deve estar próxima de zero (BRASIL, 1997 b) e segundo a *Food & Drug Administration* esta temperatura não deve ultrapassar os 4°C (FDA,

2011). O gelo é uma das formas mais usadas para refrigerar o pescado e manter seu frescor, por retardar a atividade enzimática e diminuir a ação dos microrganismos (SCHERER et al., 2004; VIEIRA e SAKER-SAMPAIO, 2004).

O gelo utilizado para a conservação do pescado deve seguir os padrões microbiológicos de potabilidade da água para consumo humano, presente na Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004). Segundo a legislação os coliformes totais e coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli*, devem estar ausentes em 100 ml de água do gelo. Além disso, a Portaria nº326 de 30 de julho de 1997 afirma que o gelo utilizado na conservação de alimentos, que tem contato direto com o alimento ou com superfícies, não deve ter nenhuma substância que possa contaminá-lo ou causar risco a saúde do consumidor, devendo seguir o padrão de água potável quanto à identidade e qualidade vigentes (BRASIL, 1997 b).

O gelo utilizado na conservação do pescado geralmente é feito em escamas e a relação gelo/pescado deve ter uma proporção de 1:1 (SCHERER et al., 2004; GALVÃO, 2006). O gelo não é um meio de cultivo, por ter pouca quantidade de nutrientes para o desenvolvimento microbiano, mas pode agir como um veículo de contaminação do pescado e comprometer sua qualidade. Os microrganismos patogênicos são encontrados no gelo quando sua fonte de água estiver contaminada ou caso haja falhas de higiene no seu manuseio (VIEIRA e SAKER-SAMPAIO, 2004).

Vários estudos (FALCÃO et al., 2002; FERREIRA et al., 2014; GIAMPIETRO e REZENDE-LAGO, 2009) comprovaram a presença de coliformes totais e termotolerantes no gelo. No estudo de GIAMPIETRO e REZENDE-LAGO (2009) foram analisadas amostras de gelo de diferentes estabelecimentos comerciais na cidade de Ribeirão Preto – SP, sendo que 96,7% das amostras estavam contaminadas por coliformes totais e 73,3% das amostras também estavam contaminadas por coliformes termotolerantes. No estudo de FALCÃO et al (2002) que analisou amostras de gelo utilizadas na conservação de pescado e frutos do mar de 6 diferentes estabelecimentos comerciais na cidade de Araraquara – SP, o gelo de 4 estabelecimentos apresentou valores de *E. coli* acima de 2NMP/100 mL.

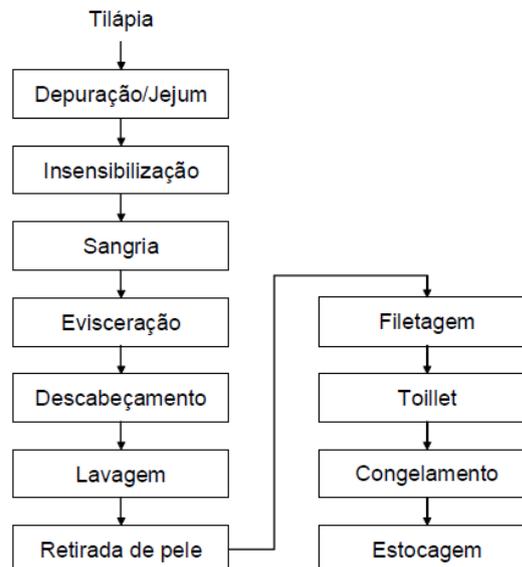
Uma das formas de reduzir os microrganismos é colocar cloro nas águas destinadas a produção do gelo. SCHERER et al. (2004) verificaram que o uso de gelo clorado foi efetivo na redução da contagem de microrganismos aeróbios

mesófilos e psicrotróficos na carne de peixe, ampliando em aproximadamente 3 dias o prazo de validade do peixe. Acredita-se que a desinfecção da água com cloro é uma das principais medidas de saúde pública, pois o cloro provoca a destruição das bactérias patogênicas e microrganismos. Essa prática tem diminuído consideravelmente as doenças propagadas pela água (DOMINGUES e LANGONI, 2001; SCHERER et al., 2004).

1.5. Qualidade no processo de filetagem da tilápia

A rápida decomposição do pescado pode ser prevenida através de processos limpos e refrigeração. A limpeza visa diminuir as fontes contaminantes das bactérias, assegurando a manipulação de forma higiênica do pescado. E a refrigeração durante toda a cadeia de produção impede a instalação dos processos autolíticos e retarda a multiplicação bacteriana (RODRIGUES, 2008).

O processo de filetagem da tilápia com qualidade envolve as seguintes etapas descritas abaixo:



FONTE: OETTERER (2002).

Figura 1: Processos de filetagem da tilápia (FONTE: OETTERER, M. Industrialização do pescado cultivado. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200p).

A tilápia antes de ser abatida passa pelo processo de depuração em tanques de água correntelimpa para que sejam retiradas as substâncias de odor e sabor

desagradáveis. O jejum é feito junto com a depuração para diminuir o conteúdo gastrointestinal e reduzir os microrganismos que são possíveis fontes de contaminações. A água corrente é importante para evitar depósitos de excrementos e recontaminação do peixe (MACARI, 2007).

Depois os peixes são colocados no gelo para facilitar a sangria e evitar o estresse. Após a sangria o peixe vai para a lavagem, evisceração e retirada da pele, essas etapas são importantes para retirada dos microrganismos presentes no intestino e na pele e também eliminam fragmentos de vísceras e outras sujeiras que podem aumentar a carga microbiana e acelerar a deterioração (MACARI, 2007).

Finalmente é realizada a filetagem, são retirados retalhos do filé, com objetivo de padronizar o tamanho dos filés a serem exportados, essa etapa é denominada de "*toillet*" (MACARI, 2007). O pescado imediatamente deve ser conservado em baixas temperaturas por congelamento ou ser estocado em caixas de policloreto de vinila (PVC) e armazenado em câmaras refrigeradas até ser enviado para comercialização.

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

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

Uma alternativa foi a implantação de técnicas moleculares para a caracterização, identificação e detecção de bactérias patogênicas em alimentos. As técnicas moleculares utilizam-se da caracterização do DNA cromossômico,

plasmidial ou até de um microrganismo (POSTOLLEC et al., 2011). A reação em cadeia da polimerase – PCR vem ganhando destaque dentre as demais e tem como objetivo amplificar sequências de DNA, capaz de detectar até uma cópia de DNA de qualquer célula. Quando comparada com os métodos convencionais se mostra altamente sensível e específica, produzindo resultados em poucas horas e serve também como confirmação e esclarecimento, quando os resultados dos testes convencionais geram dúvidas (RODRIGUES, et al., 2011). Também é uma forma de detectar as amostras falso-negativas e células consideradas viáveis, mas não cultiváveis (TEODORO et al., 2006).

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

2. JUSTIFICATIVA

A manipulação do pescado fresco durante o período compreendido entre a captura e o processamento é crucial para a qualidade do produto final. 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 são as principais causas que impedem a ideal comercialização dos peixes. O pescado também pode ser veiculador de microrganismos patogênicos para o homem, causando Doenças Transmitidas por Alimentos em que os consome.

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 pesquisar as condições microbiológicas da tilápia resfriada e exposta ao consumo nos supermercados da cidade de Brasília e assim determinar se nessa cidade esse pescado está sendo distribuído com qualidade, de forma a garantir a segurança alimentar do consumidor.

O abaixamento da temperatura por meio do resfriamento em gelo tem por objetivo retardar a multiplicação dos microrganismos deteriorantes do pescado. A presença de uma cadeia de frio é essencial para a conservação e distribuição do pescado com qualidade sensorial, físico-química e microbiológica. Para que o gelo exerça sua função de manutenção da qualidade do pescado, este deve ser de ótima qualidade microbiológica, pois sua qualidade afetará diretamente a qualidade do pescado. Assim este trabalho também buscou avaliar a qualidade microbiológica do gelo de manutenção do pescado.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho de pesquisa tem como principal objetivo avaliar a qualidade datilápia do Nilo resfriada e a qualidade microbiológica do gelo de manutenção desse pescado de água doce comercializado nos supermercados de Brasília, Distrito Federal.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar as avaliações microbiológicas do pescado, como contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas; determinação do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes; pesquisa de *Salmonella spp.* e contagem de *Staphylococcus spp.*
- Determinar as características microbiológicas do gelo utilizado para manter o pescado
- Realizar genotipagem bacteriana por técnica de PCR para confirmação dos microrganismos patogênicos
- Avaliar o estado de frescor do pescado através de inspeção sensorial e determinar o pH da carne do pescado

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras

As amostras de peixe fresco exposto ao consumo (peixe inteiro ou filé de tilápia) foram coletadas em 5 diferentes peixarias de supermercados da cidade de Brasília, no período de Janeiro a Fevereiro de 2015. As amostras 1, 2, 3 e 4 eram de peixe inteiro e nesses casos foram adquiridos dois peixes inteiros resfriados de cada lugar, sendo um peixe usado para a avaliação sensorial do frescor do pescado e o outro usado para as análises microbiológicas. Já as amostras 5, 6, 7 e 8 eram de filé de tilápia e nesses casos foram adquiridos 200-300 g de filé embalado em bandejas de isopor. O processo de filetagem da tilápia não ocorreu nos supermercados, mas na indústria de processamento do pescado.

Para todas as amostras coletadas, foi solicitada também uma amostra do gelo de manutenção do pescado, que foi embalada em saco plástico separado do pescado. As amostras coletadas nos supermercados foram levadas ao laboratório de Controle de Qualidade da FCE UnB para análise imediata.

4.2. Preparo das amostras e análises microbiológicas

Para as amostras de peixe, foram pesadas, assepticamente, 25 g de cada amostra e diluídas em 225 ml de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado por 20 minutos, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição foram realizadas as demais diluições decimais. As análises microbiológicas realizadas nas amostras de peixe foram: contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* sp e pesquisa de *Salmonella* sp.

As amostras de gelo foram transferidas do saco plástico para frascos estéreis e deixadas para derreter. Nas amostras de gelo foram realizadas as análises de contagem total dos microrganismos mesófilos e determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.

4.3. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas

Para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de peixe, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo ágar Padrão para Contagem (ágar PCA). As placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas e a 7°C ± 1°C por 7 dias para bactérias psicrotróficas. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente, e expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

Para contagem total de bactérias mesófilas nas amostras de gelo, inoculou-se 1 ml de gelo derretido em placas estéreis vazias e verteu-se o meio de cultivo ágar PCA. Após solidificação, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como média de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro de amostra (UFC/ml).

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

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

Para a determinação do NMP de coliformes nas amostras de peixe, utilizou-se uma bateria de 9 tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v)) e tubos de Durham invertidos. Inoculou-se 1 ml de cada diluição das amostras (diluições 1:10, 1:100 e 1:1000), em cada série de 3 tubos de ensaio incubou-se a 37°C durante 24 horas (BLODGETT, 2010).

Para a determinação do NMP de coliformes nas amostras de gelo, utilizou-se uma bateria de 15 tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo lactosado e tubos de Durham invertidos. Nos primeiros 5 tubos inoculou-se 10 ml da amostra de gelo derretido em cada tubo (diluição 1:1). Nos próximos 5 tubos, inoculou-se 1 ml da amostra de gelo derretido em cada tubo (diluição 1:10) e nos 5 últimos tubos inoculou-se 0,1 ml da amostra de gelo derretido em cada tubo (diluição 1:100). Os tubos foram incubados a 37°C durante 24 horas (FUNASA, 2006).

Após a incubação no caldo lactosado foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais. Alíquotas dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas, simultaneamente, para caldo verde brilhante bile lactose 2% (para a confirmação de coliformes totais) e para caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes).

Os tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e tubos de Durham invertidos foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo *Escherichia coli* e tubos de Durham invertidos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes.

Através da Tabela 1 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama das amostras de peixe (NMP/g). Já o resultado de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por 100 ml das amostras de gelo (NMP/100 ml) foi obtido com o uso da Tabela 2.

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para as amostras de peixe e os respectivos intervalos de confiança a 95%.

Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

FONTE: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>

Tabela 2. Número mais provável por 100 ml (NMP/100 ml) para as amostras de gelo de manutenção do pescado e os respectivos intervalos de confiança a 95%.

Tubos positivos			NMP/ 100 ml	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/ 100 ml	Limite de confiança	
1.0	0.1	0.01		Baixo	Alto	1.0	0.1	0.01		Baixo	Alto
0	0	0	<2.0	--	--	4	3	0	27.0	12	67
0	0	1	2.0	1.0	10.0	4	3	1	33.0	15	77
0	1	0	2.0	1.0	10.0	4	4	0	34.0	16	80
0	2	0	4.0	1.0	13.0	5	0	0	23.0	9	86
1	0	0	2.0	1.0	11.0	5	0	1	30.0	10	110
1	0	1	4.0	1.0	15.0	5	0	2	40.0	20	140
1	1	0	4.0	1.0	15.0	5	1	0	30.0	10	120
1	1	1	6.0	2.0	18.0	5	1	1	50.0	20	150
1	2	0	6.0	2.0	18.0	5	1	2	60.0	30	180
2	0	0	4.0	1.0	17.0	5	2	0	50.0	20	170
2	0	1	7.0	2.0	20.0	5	2	1	70.0	30	210
2	1	0	7.0	2.0	21.0	5	2	2	90.0	40	250
2	1	1	9.0	3.0	24.0	5	3	0	80.0	30	250
2	2	0	9.0	3.0	25.0	5	3	1	110.0	40	300
2	3	0	12.0	5.0	29.0	5	3	2	140.0	60	360
3	0	0	8.0	3.0	24.0	5	3	3	170.0	80	410
3	0	1	11.0	4.0	29.0	5	4	0	130.0	50	390
3	1	0	11.0	4.0	29.0	5	4	1	170.0	70	480
3	1	1	14.0	6.0	35.0	5	4	2	220.0	100	560
3	2	0	14.0	6.0	35.0	5	4	3	280.0	120	690
3	2	1	17.0	7.0	40	5	4	4	350.0	160	820
4	0	0	13.0	5.0	38	5	5	0	240.0	100	940
4	0	1	17.0	7.0	45	5	5	1	300.0	100	1300
4	1	0	17.0	7.0	46	5	5	2	500.0	200	2000
4	1	1	21.0	9.0	55	5	5	3	900.0	300	2900
4	1	2	26.0	12	63	5	5	4	1600.0	600	5300
4	2	0	22.0	9.0	56	5	5	5	>1600.0	-	-
4	2	1	26.0	12	65						

FONTE: FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Manual Prático de Análise de Água, Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, 2006.

4.5. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 ml foram transferidas para caldo selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, placas de Petri contendo o meio ágar *Salmonella* *Shigella* (Ágar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em ágar SS para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo ágar TSI (três açúcares e ferro). Este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. A fermentação de carboidratos é indicada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo. Se o microrganismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio (H_2S), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra (indicado pela cor preta na base do tubo) (ANVISA, 2010).

No ágar TSI, enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares do meio) tornando a base e a superfície do tubo de cor amarela e geralmente é possível detectar a presença de gás (CO_2) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Os microrganismos degradam, preferencialmente, a glicose em primeiro lugar, mas como este substrato está presente em concentração mínima, a quantidade de ácido produzida é limitada e é rapidamente oxidada na superfície. Se houver produção de sulfeto de ferro a base do meio torna-se negra (Figura 2). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de H_2S como *Salmonella* (ANVISA, 2010).

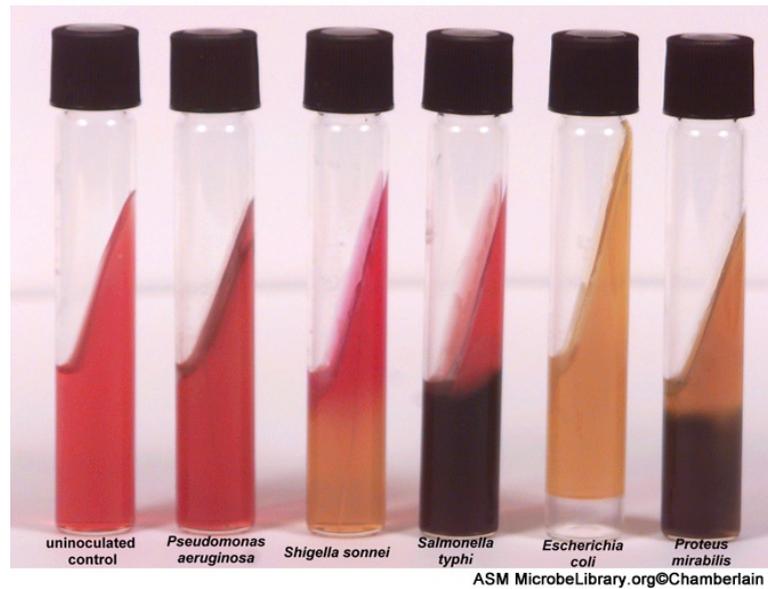


Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).

4.6. Contagem de *Staphylococcus* spp.

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

4.7. Determinação do pH da carne do pescado

Para a determinação do valor de pH foram pesados 50 g da musculatura do peixe sem pele, as quais foram adicionadas de 20 ml de água destilada e misturadas até obter-se uma pasta homogênea. A leitura do pH foi realizada em potenciômetro digital, diretamente em aproximadamente 50 g da amostra preparada (BRASIL,1981). A leitura foi realizada em triplicata e como resultado foi expresso a

média das leituras. A legislação estabelece que o pH da carne interna de peixes frescos deve ser inferior a 6,5 (BRASIL, 1997 a).

4.8. Inspeção sensorial do frescor da tilápia (peixe inteiro)

A inspeção sensorial do frescor do pescado (Anexo 1) foi realizada submetendo-se os peixes a uma avaliação macroscópica, julgando-se as características sensoriais para peixes frescos: aparência da pele (cor, brilho), condição dos olhos (transparência, brilho, saliência), guelras (cor, odor), musculatura (cor) e aspecto do peritônio.

O anexo 1 usado para a inspeção sensorial do frescor da tilápia (peixe inteiro) foi adaptado do esquema preconizado pelo Regulamento (CE) nº 2406/96 para peixes brancos e do trabalho de RODRIGUES (2008) que desenvolveu o Método de Índice de Qualidade para a tilápia do Nilo.

4.9. Extração de DNA bacteriano para as análises moleculares

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Plasmid[®] (MN). Antes de iniciar a extração foi feita a preparação das soluções reagentes (colocou-se em banho-maria à 50°C o tampão AW), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas suspeitas de serem patogênicas cultivadas por 12h em caldo LB.

Adicionou-se 1,5 mL da amostra no tubo eppendorf, centrifugou-se por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o Pellet). Repetiu-se este procedimento por mais três vezes, completando-se o volume de 6mL. Foram adicionados 250µL do tampão Resuspension Buffer A1, encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos eppendorfs foram homogeneizados em “vortex”.

Em seguida, foram adicionados 250 µL do tampão Lysis Buffer A2, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo da célula). Passado o tempo de descanso, foi adicionado 300 µL do tampão Neutralization Buffer A3, homogeneizou-se e centrifugou-se por 10 minutos (este tampão tem

como função retirar as proteínas que envolvem o DNA e tornar o pH próximo de 8, impedindo que a solução de lise facilite a quebra das ligações covalentes do ácido nucléico).

Em seguida, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica, transferiu-se o sobrenadante para o filtro e centrifugou-se por 5 minutos. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 500 µL do tampão AW (mantido no banho-maria à 50°C) e centrifugou-se por 2 minutos. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 600 µL do tampão A4, centrifugou-se por 2 minutos e descartou-se o filtrado (os tampões AW e A4 contém isotiocianato de guanidina, em concentrações crescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e retirada das outras biomoléculas da amostra). Foi feita outra centrifugação com o tubo vazio.

Após isto, o filtro foi trocado para outro eppendorf definitivo, onde foi adicionado 50µL do tampão Elution Buffer AE (este tampão favorece a eluição do DNA), centrifugou-se por 2 minutos, descartou-se o filtro e as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

4.10. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas a serem analisadas para *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* ssp. foi realizada conforme busca na literatura e optou-se por três regiões gênicas específicas, tetB, CoA e a invA, respectivamente. A partir da descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, ANEXO2), foram desenhados oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos primers estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
Tm do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	270 bases	330 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e ΔG de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Produto estimado	Espécie
CoA_F	GATCTTCGCGTGATACGTCA	303pb	<i>S. aureus</i>
CoA_R	GTTCGTGCAATGTTTTGTCC		
invA_F	CATTGGTGATGGTCTTGTCG	298 pb	<i>Salmonella ssp.</i>
invA_R	CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG		
tetB_F	CAAACTTGCCCCTAACCAA	302pb	<i>E. coli</i>
tetB_R	ATACGCCAAAGTGGTTAGCG		

4.11. PCR qualitativo

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

de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos.

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

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA[®]).

4.12. Eletroforese em gel de agarose

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises microbiológicas da tilápia (peixe inteiro ou filé de tilápia)

Para a tilápia as análises realizadas foram: contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* spp. e pesquisa de *Salmonella* spp. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* e *Salmonella* spp. foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

5.2. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de tilápia

A contagem total de bactérias aeróbias em placas é usada como um indicador da população bacteriana nos alimentos. A contagem elevada desses microrganismos pode causar deterioração do alimento e/ou diminuir sua vida de prateleira (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Quando esses microrganismos estão presentes em grandes quantidades nos alimentos perecíveis indicam abuso durante o armazenamento em relação ao tempo/temperatura, falha na sanitização ou deficiência no processo (LIMA, 2012). Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos - ICMSF (2002) a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas é um indicador microbiano comumente utilizado para certificar a qualidade dos alimentos.

A Tabela 5 e a Tabela 6 apresentam a contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de peixe inteiro e filé de tilápia, respectivamente e os resultados foram expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão.

Tabela 5. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de tilápia (peixe inteiro)

Amostras de peixe inteiro	Bactérias Mesófilas		Bactérias Psicotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	8,60x10 ⁴	4,90 ± 0,18	2,34x10 ⁵	5,36 ± 0,05
Amostra 2	5,30x10 ³	3,71 ± 0,09	1,00x10 ³	1,16 ± 2,00
Amostra 3	7,00x10 ²	1,77 ± 1,66	1,77x10 ⁴	4,23 ± 0,12
Amostra 4	1,00x10 ²	1,43 ± 1,25	3,33x10 ³	3,46 ± 0,27

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

Tabela 6. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de tilápia (filé)

Amostras de filé de tilápia	Bactérias Mesófilas		Bactérias Psicotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 5	1,78x10 ⁶	6,31 ± 0,21	2,98x10 ⁷	7,36 ± 0,39
Amostra 6	1,12x10 ⁶	5,90 ± 0,42	2,60x10 ⁶	6,37 ± 0,23
Amostra 7	6,43x10 ⁴	4,80 ± 0,10	7,70x10 ⁶	6,73 ± 0,53
Amostra 8	4,67x10 ⁵	5,71 ± 0,09	1,02x10 ⁸	8,00 ± 0,01

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

Neste estudo, as amostras de peixe inteiro apresentaram uma baixa contagem total de bactérias aeróbias, variando de 1,00x10² a 8,60x10⁴ para bactérias mesófilas e 1,00x10³ a 2,34x10⁵ para as bactérias psicotróficas. Já as amostras de filé de tilápia mostraram contagens de bactérias aeróbias totais consideravelmente maiores que as amostras de peixe inteiro, variando de 6,43x10⁴ a 1,78x10⁶ para bactérias mesófilas e 2,60x10⁶ a 1,02x10⁸ para as bactérias psicotróficas.

Embora, a legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabeleça um padrão para contagem total de bactérias aeróbias totais nos alimentos, de acordo com FRANCO e LANDGRAF (2008) contagens de bactérias mesófilas na carne crua entre 10³ e 10⁶ UFC/g indicam um produto sem deterioração microbiana. Já carnes

contendo concentrações bacterianas entre 10^6 e 10^7 UFC/g estão com a qualidade comprometida, com início de deterioração. Acima de 10^8 UFC/g a carne já apresenta sinais de deterioração, com a presença de odores desagradáveis. Neste estudo as amostras de filé de tilápia 5 e 6 podem ser consideradas produtos com a qualidade comprometida, pois apresentaram altas contagens de mesófilos (acima de $1,0 \times 10^6$ UFC/g).

As bactérias que crescem nos alimentos refrigerados são chamadas de psicotróficas e tem a capacidade de multiplicar-se em temperaturas baixas. As bactérias psicotróficas são um grupo de microrganismos com crescimento visível a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ em 07 a 10 dias. Os microrganismos psicotróficos em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira do pescado, por constituírem seus principais deterioradores (BARTOLOMEU et al., 2011).

Neste estudo todas as amostras de filé de tilápia apresentaram altas contagens de bactérias psicotróficas variando de $2,60 \times 10^6$ a $1,02 \times 10^8$. No estudo de LIBRELATO e SHIKIDA (2005), ao analisarem filés de tilápias comercializados no município de Toledo, PR, foram encontradas contagens de psicotróficos em níveis superiores aos mesófilos, assim como aconteceu no presente estudo. BATISTA et al. (2004), em um estudo sobre as alterações bioquímicas *post-mortem* do peixe matrinxã mantido em gelo, concluíram que as bactérias psicotróficas tem uma participação maior no processo de deterioração do pescado, em comparação com as bactérias mesófilas.

Neste estudo, a menor carga microbiana nas amostras de peixe inteiro em relação às amostras de filé de tilápia indica possíveis falhas de processamento durante a etapa de filetagem que ocorreu na indústria de processamento. No trabalho de BARTOLOMEU et al (2011), os filés de tilápia coletados de uma indústria de processamento localizada em Curitiba, PR, mostraram altas contagens de bactérias psicotróficas em todas as etapas do processamento. O produto final embalado mostrou altas contagens de psicotróficos variando de $8,0 \times 10^6$ a $2,6 \times 10^7$ UFC/g.

5.3. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de tilápia

Os coliformes termotolerantes atuam como indicador de poluição fecal e sua presença no pescado evidencia diretamente o risco de microrganismos patogênicos de origem fecal (FARIAS e FREITAS, 2008). Nas amostras de peixe inteiro (Tabela 7) foi observada baixa enumeração de coliformes totais e não houve presença de coliformes termotolerantes. As amostras de filé de tilápia 5 e 6 tiveram as maiores enumerações de coliformes totais e de coliformes termotolerantes. As outras amostras de filé de tilápia mostraram um número baixo de coliformes totais e termotolerantes (Tabela 8). Ainda assim, todas as amostras estavam de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001), que estabelece limites de coliformes termotolerantes no pescado a valores de no máximo $1,0 \times 10^2$ NMP/ g.

Tabela 7. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de tilápia (peixe inteiro)

Amostras de peixe inteiro	Coliformes Totais Teste presuntivo (caldo lactosado)	Coliformes Totais Teste confirmativo (caldo verde brilhante)	Coliformes termotolerantes (caldo EC)
	NMP/g	NMP/g	NMP/g
Amostra 1	$7,3 \times 10^1$	$0,9 \times 10$	Ausente
Amostra 2	$6,1 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	Ausente
Amostra 3	$2,0 \times 10^2$	Ausente	Ausente
Amostra 4	$3,5 \times 10^1$	$0,9 \times 10$	Ausente

Os resultados foram expressos como média de medidas em duplicata

Tabela 8 - Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de filé de tilápia

Amostras de filé de tilápia	Coliformes Totais Teste presuntivo (caldo lactosado)	Coliformes Totais Teste confirmativo (caldo verde brilhante)	Coliformes termotolerantes (caldo EC)
	NMP/g	NMP/g	NMP/g
Amostra 5	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$	$1,3 \times 10$
Amostra 6	$>1,1 \times 10^3$	$>6,5 \times 10^2$	$3,1 \times 10$
Amostra 7	$5,6 \times 10^2$	$0,8 \times 10$	$0,9 \times 10$
Amostra 8	$0,8 \times 10$	$0,8 \times 10$	$0,5 \times 10$

Os resultados foram expressos como média de medidas em duplicata

A legislação brasileira (BRASIL 2001) não estabelece limites de tolerância para o grupo dos coliformes totais em alimentos. Entretanto, a enumeração elevada de coliformes totais indica falhas higiênicas durante o processamento (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Segundo GATTI JUNIOR (2011), a enumeração de coliformes totais acima de $1,0 \times 10^2$ NMP/g (como ocorreu nas amostras 5 e 6 deste estudo) já indica a necessidade de realizar um controle mais rígido das condições higiênico-sanitárias de cultivo, processamento e comercialização do pescado. Neste estudo, as amostras de filé tiveram uma enumeração de coliformes totais maior que as amostras de peixe inteiro, confirmando a necessidade de mais higiene durante os processos de filetagem da tilápia.

BARTOLOMEU et al. (2011) observaram valores $4,5 \times 10^3$ UFC/g de coliformes totais e $6,0 \times 10^1$ UFC/g de *E. coli* nas amostras de filé de tilápia prontas para comercialização e esses resultados foram próximos ao deste estudo. Já VIEIRA et al (2000) analisaram 60 amostras de peixes coletadas ao longo da cadeia de produção de filés de tilápia e verificaram que a contaminação dos peixes foi crescente ao longo da cadeia de processamento, atingindo altos valores de $2,4 \times 10^3$ NMP/g tanto para coliformes totais como para coliformes termotolerantes, concluindo haver precárias condições higiênicas e sanitárias na manipulação. COSTA et al. (2009) isolaram 50 culturas bacterianas de amostras de tilápia obtidas em vários pontos da Lagoa da Fazenda no Município de Sobral (CE) e identificaram 37 cepas (74% das culturas) como *E. coli*, confirmando a contaminação das amostras por material fecal.

5.4. Contagem de *Staphylococcus* spp. nas amostras tilápia

O *Staphylococcus aureus* não faz parte da microbiota natural do peixe. A contagem de *Staphylococcus aureus* em números inferiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g (limite estabelecido pela legislação), normalmente, indica condições higiênicas inapropriadas e/ou processamento deficiente, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada (MARCHI, 2006; SIMON e SANJEEV, 2007). A Tabela 9 apresenta os resultados da contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de tilápia (peixe inteiro e filé).

Tabela 9. Contagem de bactérias *Staphylococcus* spp. e de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de tilápia (peixe inteiro e filé)

Amostras	Agar sal <i>Staphylococcus</i> spp.	Agar sal manitol (Colônias amarelas) <i>Staphylococcus aureus</i>
	UFC/g	UFC/g
Amostra 1	$3,0 \times 10^2$ *	$2,0 \times 10^2$
Amostra 2	$6,0 \times 10^2$ **	$1,0 \times 10^2$
Amostra 3	sem contagem	sem contagem
Amostra 4	$5,6 \times 10^3$ *	$1,0 \times 10^2$
Amostra 5	$7,0 \times 10^2$ **	$7,0 \times 10^2$
Amostra 6	sem contagem	sem contagem
Amostra 7	$3,0 \times 10^2$ *	$3,0 \times 10^2$
Amostra 8	$4,5 \times 10^2$ **	$4,5 \times 10^2$

Todas as amostras foram analisadas em triplicata; * somente uma placa apresentou colônias; ** duas placas apresentaram colônias e o resultado foi expresso como média.

Neste trabalho das oito amostras de tilápia analisadas (peixe inteiro e filé), seis amostras (75%) apresentaram cepas de *S. aureus* indicando condições higiênicas inapropriadas e/ou processamentos deficientes. Porém todas as amostras estavam de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001), que estabeleceu limite máximo aceitável para a contagem de *Staphylococcus aureus* no pescado de $1,0 \times 10^3$ UFC/g.

Outros estudos encontraram resultados similares para a contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* na tilápia. BARTOLOMEU et al. (2011), trabalharam com filés de tilápia coletados de uma indústria de processamento localizada em Curitiba, PR e verificaram a presença da *S. aureus* em todas as amostras de filé após a embalagem, contudo o valor observado foi inferior a $1,0 \times 10^3$ UFC/g. BOARI et al (2008), realizaram experimentos em filés frescos de tilápia e encontraram contagens de aproximadamente $3,0 \times 10$ UFC/g para *Staphylococcus* spp., sendo detectadas cepas de *S. aureus* em 6 das 18 amostras analisadas (33,34%).

SIMON e SANJEEV (2007) estudaram a prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos em amostras de filés de pescado coletadas de supermercados locais e indústrias de processamento em Cochin, Índia. Os autores concluíram que 10% das amostras (17 amostras de 168 testadas) foram positivas para cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos. De acordo com esses autores a presença dessas bactérias indicou condições de falta de higiene durante o processamento, sendo a contaminação do pescado resultante de erros de manipulação, estocagem inadequada e contaminação cruzada.

5.5. Pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de tilápia

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

Este trabalho buscou realizar técnicas laboratoriais baseadas na diferenciação e isolamento da *Salmonella*. É possível observar na Tabela 10 que

das 8 amostras estudadas (peixe inteiro e filé de tilápia), 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), que determina que *Salmonella* spp. deve estar ausente em qualquer amostra de alimento estudada. No trabalho de BARTOLOMEU et al (2011), de um total de 12 amostras de filé de tilápia analisadas, 4 amostras (33,34%) mostraram presença de *Salmonella* spp..

Tabela 10. Resultado de pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de tilápia (peixe inteiro e filé)

Amostras	Agar TSI * Suspeita de <i>Salmonella</i> spp.	Resultados do PCR
Amostra 1	Negativo	-----
Amostra 2	Positivo	Positivo
Amostra 3	Negativo	-----
Amostra 4	Positivo	Positivo
Amostra 5	Negativo	-----
Amostra 6	Positivo	Positivo
Amostra 7	Positivo	Positivo
Amostra 8	Positivo	Positivo

* superfície do meio vermelho e base amarela ou com pigmento preto

Os resultados do presente estudo mostram que há um grande problema higiênico-sanitário nos processos de produção do pescado, desde a contaminação das águas dos pesqueiros onde são criados até os processos de produção e comercialização. A bactéria *Salmonella* não faz parte da microbiota natural do peixe e sua presença pode ser justificada pela manipulação inadequada nas etapas da cadeia produtiva ou contato com águas contaminadas, através de descarga de efluentes de esgoto, bacias pesqueiras, representando uma via de transmissão dessas bactérias (MARTINS et al., 2002; NOVOTNY et al 2004; SANTOS et al., 2008).

Alguns estudos realizados no Brasil revelaram que a *Salmonella* detectada em peixes foi oriunda dos criatórios. ESPOSTO et al. (2007) realizaram um trabalho capturando tilápias diretamente de um criatório em sistema de reciclagem de

nutrientes e aporte de cama de galinha utilizada como adubo e encontraram *Salmonella* em 6,4% das amostras analisadas. LINDER et al. (2011) detectaram *Salmonella* em 5,7% de peixes analisados de alguns pescueiros no Estado de São Paulo.

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

5.6. Análises microbiológicas do gelo de manutenção do pescado

Neste estudo, as análises realizadas no gelo de manutenção do pescado foram: contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos e determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes. As colônias suspeitas de serem *E. coli* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

A Tabela 11 apresenta os resultados das análises realizadas no gelo de manutenção do pescado e foi possível observar que das oito amostras estudadas, seis estavam contaminadas por coliformes totais, representando 75% das amostras. Já os coliformes termotolerantes foram encontrados em cinco amostras, representando 62,5% das amostras. De acordo com a legislação (BRASIL, 2004), os coliformes totais e coliformes termotolerantes devem estar ausentes em 100 ml de água do gelo e a população mesofílica não deve ultrapassar $5,0 \times 10^2$ UFC/mL, o que significa que neste estudo somente as amostras 7 e 8 de gelo de manutenção do pescado estavam próprias para o uso.

Outros trabalhos encontraram resultados semelhantes ao deste estudo. FERREIRA et al. (2014) ao analisarem oito amostras de gelo procedentes de fábricas fornecedoras de gelo para os produtores de pescado, encontraram coliformes totais e termotolerantes em 75% das amostras, ou seja em seis amostras. GIAMPIETRO e REZENDE-LAGO (2009), cujo trabalho avaliou 30 amostras de gelo em quatro estabelecimentos comerciais na cidade de Ribeirão Preto (SP), constataram que 29 amostras (96,7%) estavam contaminadas por coliformes totais e 22 amostras (73,3%) por coliformes termotolerantes.

Tabela 11. Determinação do número mais provável (NMP/100 ml) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes e contagem total de bactérias mesófilas nas amostras de gelo de manutenção do pescado

Amostras de gelo	Coliformes Totais Teste confirmativo (caldo verde brilhante) NMP/100 ml	Coliformes termotolerantes (caldo EC) NMP/100 ml	Bactérias Mesófilas (UFC/ml)
Amostra 1	1,6x10 ³	9,0x10	1,3x10 ²
Amostra 2	1,6x10 ³	2,8x10 ²	9,8x10
Amostra 3	5,0x10	2,2x10	6,4x10
Amostra 4	1,3x10	Ausente	1,2x10
Amostra 5	0,4x10	0,4x10	sem contagem
Amostra 6	2,6x10	0,6x10	sem contagem
Amostra 7	Ausente	Ausente	sem contagem
Amostra 8	Ausente	Ausente	sem contagem

Na contagem total de bactérias mesófilas os resultados foram expressos como média de medidas em duplicata

A contaminação das amostras de gelo com coliformes totais indica que o produto apresentou condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, tornando-se impróprio para a conservação do pescado. A presença de coliformes termotolerantes (*E. coli*) é preocupante, pois indica que a água possivelmente teve contaminação fecal, mostrando uma má qualidade na matéria prima usada ou nos processos de elaboração do gelo. Os coliformes termotolerantes não se multiplicam e não se mantêm viáveis por um longo tempo no gelo, pois a água possui baixa concentração de nutrientes e temperatura adversa. Então sua presença indica contaminação recente. As falhas podem estar associadas a problemas higiênico-sanitários por parte dos manipuladores, contaminação cruzada por equipamentos e utensílios, ou limpeza inadequada do ambiente e dos materiais utilizados (FERREIRA et al; 2004).

5.7. Análises moleculares

No presente estudo, uma bactéria isolada suspeita de ser *S. aureus* proveniente da amostra 5 (filé de tilápia) foi testada e após análises molecular a amostra foi geneticamente confirmada como *S. aureus* (Figura 2). Algumas colônias suspeitas de serem *E. coli* provenientes das amostras de gelo 2 e 3 foram analisadas, sendo que após as análises moleculares 3 amostras foram geneticamente confirmadas como *E. coli* O157:H7 (Figura 3). E por fim, as colônias suspeitas de serem *Salmonella* spp. provenientes das amostra 1 e 3 (peixe inteiro) e das amostras 6, 7 e 8 (filé de tilápia) foram analisadas e após as análises moleculares foram geneticamente confirmadas como *Salmonella enteritidis* (Figura 4). A Tabela 12 apresenta a identificação das colônias isoladas através de PCR e as amostras de onde essas bactérias foram isoladas

Tabela 12. Identificação através de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de tilápia (peixe inteiro ou filé de tilápia) e gelo de manutenção do pescado

Número da colônia	Amostra	Resultado molecular
ES16	5 (filé de tilápia)	<i>Staphylococcus aureus</i>
EC 8	2 (gelo)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
EC 9	2(gelo)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
EC 10	3 (gelo)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
EC 11	3 (gelo)	Não era <i>Escherichia coli</i>
S 3	3 (peixe inteiro)	<i>Salmonella enteritidis</i>
S 4	8 (filé de tilápia)	<i>Salmonella enteritidis</i>
S 5	1 (peixe inteiro)	<i>Salmonella enteritidis</i>
S 6	7 (filé de tilápia)	<i>Salmonella enteritidis</i>
S7	6 (filé de tilápia)	<i>Salmonella enteritidis</i>

A Figura 3 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com o primer CoA, identificando algumas colônias de *S. aureus*. Todas as

amostras, incluindo a cepa ATCC, tiveram a amplificação bem sucedida e não houve amplificação do Controle negativo, o que reflete que o experimento foi executado com Boa Prática Laboratorial, além de não ter sido detectada contaminação cruzada.

Houve amplificação específica da região gênica CoA em todas as colônias isoladas suspeitas de serem *S. aureus*. O gene CoA é considerado um importante fator de virulência para *S. aureus*. A expressão desse gene é feita para facilitar o crescimento bacteriano e promover a infecção diante dos mecanismos de defesa do hospedeiro, tais como a fagocitose. Sua positividade é um indicador confiável de enterotoxigenicidade. O gene CoA foi isolado em 100% dos isolados de *S. aureus* deste estudo (KARAHAN, 2007 & LUZ, 2008).

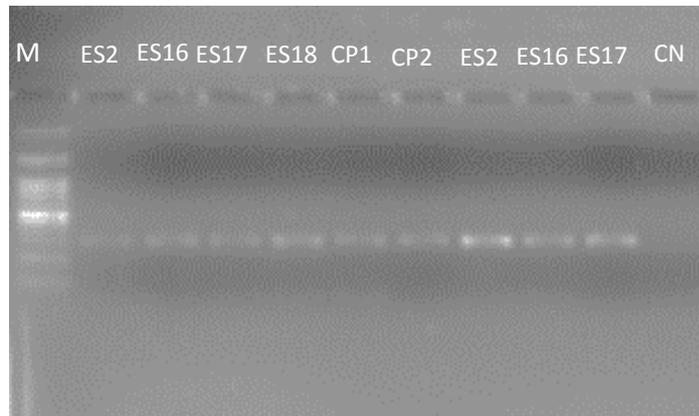


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene CoA de *S. aureus*. M = marcador de 100 pb; ES 2 = amostra deste estudo com fragmentos de CoA(303 pb) obtidos a partir de DNA de *S. aureus* amostra de *S. aureus*; ES16, ES 17 e ES 18 = amostra cedida por OLIVEIRA(2015); CP1 e CP2= Controle Positivo (cepa ATCC 25923 *S. aureus*);CN = Controle Negativo.

A Figura 4 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com o primer tetB, identificando algumas colônias como *E. coli* O157:H7. Todas as amostras (com exceção da amostra EC 11), incluindo a cepa ATCC, tiveram a amplificação bem sucedida e não houve amplificação do Controle negativo.

Houve amplificação específica da região gênica tetB em todas as colônias isoladas que eram *E. coli*. A região tetB é responsável pela a resistência ao antibiótico tetraciclina. A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro que inibi a

síntese protéica bacteriana. De um modo geral a rápida disseminação da resistência a tetraciclina entre bactérias é devido a localização do tetB, geralmente estão em plasmídeos, transposons e integrons (BRYAN, 2004).

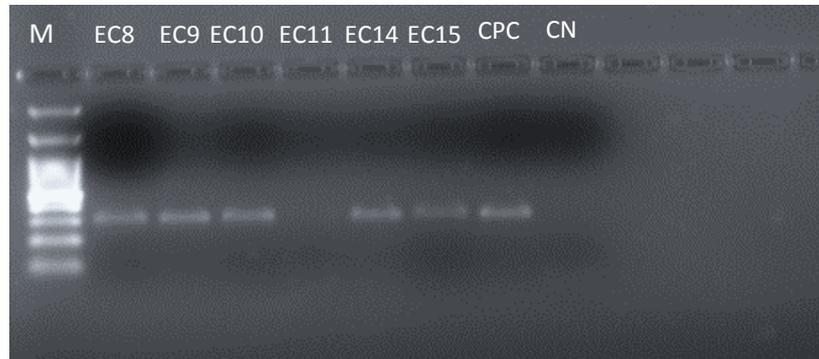


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene tetB de *E. coli*. M = marcador de 100 pb; EC 8, EC 9 e EC 10 = amostras deste estudo com fragmentos de tetB (302 pb) obtidos a partir de DNA de *E. coli* O157:H7; EC 14 e EC 15 = amostras de *E. coli* cedidas por OLIVEIRA(2015); CPC = Controle Positivo (cepa ATCC 25922 *E. coli*); CN = Controle Negativo.

As amostras 2 e 3 de gelo de manutenção do pescado que já haviam sido reprovadas pela presença de coliformes termotolerantes, também estavam contaminadas com *Escherichia coli* O157:H7, um patógeno entérico importante em doenças de origem alimentar. A presença de *E.coli* patogênica no gelo reforça a preocupação com a contaminação cruzada, onde o gelo passaria a funcionar como uma potencial fonte de contaminação da carne do pescado.

A transmissão de *Escherichia coli* O157:H7 se dá através dos alimentos contaminados, principalmente produtos de origem animal como carne crua ou mal cozida e leite cru, mas pode também ser disseminada através de água não clorada. O principal reservatório é o trato gastrintestinal de bovinos e a bactéria se encontra nas fezes dos bovinos. Esse sorotipo de *E.coli* é muito virulento, necessitando menos de 100 células para infecção e tem seu principal fator de virulência na produção da verotoxina. Estima-se que em até 10% dos casos, essa enterite pode ser complicada pela síndrome urêmica hemolítica, caracterizada por anemia hemolítica e insuficiência renal aguda, com taxa de mortalidade de 3-5%, especialmente em criançaspequenase idosos. A síndrome urêmica hemolítica é a

causa mais comum de insuficiência renal aguda em crianças pequenas. Ela pode causar complicações neurológicas (como convulsões, acidente vascular cerebral e coma) em 25% dos pacientes e seqüela renal, geralmente leve, em torno de 50% dos sobreviventes (WHO, 2011).

A Figura 5 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com o primer *invA*, identificando algumas colônias como *Salmonella enteritidis*. Todas as amostras tiveram a amplificação bem sucedida e não houve amplificação do Controle negativo. As amostras cedidas por MAFRIN (2013) e BARBOSA (2014) foram previamente confirmadas como *Salmonella* spp. por outras estratégias de análise molecular e por isso foram utilizadas como controle positivo.

Houve amplificação específica da região gênica *invA* em todas as colônias isoladas suspeitas de serem *Salmonella* spp. O gene *invA* está relacionado com invasão celular de *Salmonella*, sendo um componente essencial para a patogênese da doença, diferenciando *Salmonella* de outras espécies bacterianas (CHEN e GRIFFITHS, 2001; KAWASAKI et al., 2005). A caracterização molecular de um dos genes de invasão de *Salmonella*, um componente essencial para a patogênese da doença, revelou a presença do locus genético, denominado *inv*, como o primeiro de um operon de genes arranjados na mesma unidade transcricional, que codificaria proteínas relacionadas com invasão celular. Os grupos de genes *inv*, denominados A, B, C, D e E estão presentes na maioria das salmonelas e ausentes na região correspondente de *E. coli*, sendo considerados capazes para distinguir entre *Salmonella* e outras espécies bacterianas por meio de PCR (CHEN e GRIFFITHS, 2001).

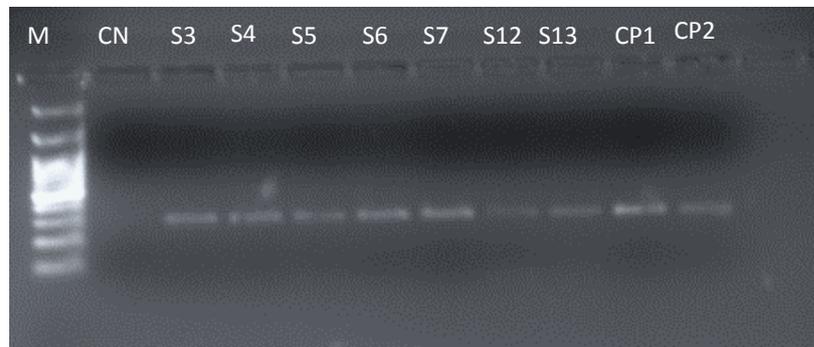


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *invA* de *Salmonella* spp; M = marcador de 100 pb; S3, S4, S5, S6, S7 = amostras deste estudo com fragmentos de *invA* (298 pb) obtidos a partir de DNA de *Salmonella enteritidis*; S12 e S13 = amostras de *Salmonella* spp. cedidas por OLIVEIRA(2015); CP1= Controle Positivo 1 (amostra cedida por MAFRIN, 2013), CP2= Controle Positivo 2 (amostra cedida por BARBOSA, 2014); CN = Controle Negativo.

A presença de *Salmonella* spp. em 2 amostras de peixe inteiro foi surpreendente, considerando que essas amostras apresentaram uma baixa contagem total de bactérias mesófilas e ausência de coliformes termotolerantes. O peixe inteiro é uma amostra menos manipulada que o filé e esses resultados mostram possível contaminação com material fecal das águas dos tanques onde esses peixes são criados. Já a presença de *Salmonella* spp. em 3 amostras de filé de tilápia pode ser justificada pela manipulação inadequada nas etapas da cadeia produtiva ou pelo contato do pescado com águas contaminadas. A microbiota da superfície corporal, brânquias e trato gastrointestinal dos peixes está diretamente ligada a microbiota do ambiente em que ele vive, a água. Então, peixes que são criados em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes podem carregar consigo muitos microrganismos patogênicos e indicadores de poluição fecal (GUZMÁN et al., 2004).

5.8. Determinação do pH da carne do pescado

A legislação estabelece que o pH da carne interna de peixes frescos deve ser inferior a 6,5 (BRASIL, 1997 a). Neste estudo, todas as amostras estavam com o pH inferior ao estabelecido pela legislação, com valores que variaram de 5,73 a 6,48 (tabela 13). SOARES e GONÇALVES (2012) fizeram estudos sobre a vida útil do filé de tilápia e encontraram valores de pH que variaram de 5,90 a 7,11. O pH atingiu um valor acima do determinado pela legislação (6,5) somente no 15º dia de estocagem em gelo e esse período coincidiu com a rejeição sensorial do mesmo. RODRIGUES

(2008) que desenvolveu métodos sensoriais para determinar o grau de frescor da tilápia (peixe inteiro) estocada em gelo, também observou um aumento do pH após o 15º dia de estocagem. O pH das tilápias variou de 5,90 a 6,12 entre os dias 1 e 8 de estocagem em gelo e aumentou para 6,44 a 6,86 entre os dias 15 e 22 de estocagem em gelo e houve rejeição na análise sensorial quando o pH passou de 6,44.

Tabela 13. Determinação do pH da carne do pescado

Amostras de peixe inteiro	pH	Amostras de filé	pH
Amostra 1	6,33	Amostra 5	5,73
Amostra 2	6,47	Amostra 6	6,03
Amostra 3	6,38	Amostra 7	6,48
Amostra 4	6,41	Amostra 8	6,35

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata

5.9. Inspeção sensorial do frescor da tilápia (peixe inteiro)

Segundo NUNES et al. (2007), os métodos sensoriais são efetuados de maneira rápida e fácil, além de possuírem resultados de fácil entendimento. Porém, pelo fato dos métodos sensoriais possuírem uma natureza subjetiva, é necessário a adoção de critérios de avaliação harmonizados e a participação de provadores treinados e familiarizados com os produtos da pesca e com os critérios de avaliação usados.

Neste estudo, de acordo com a inspeção sensorial do frescor da tilápia (Tabela 14), a amostra 1 de tilápia (Figura 6) apresentou algumas características sensoriais como aspecto da pele, cor das guelras e aspecto do peritônio entre a categoria B e rejeitado. Apesar de esta amostra estar menos fresca e apresentar a maior quantidade de bactérias mesófilas entre as amostras analisadas, as contagens ainda estavam dentro de um limite aceitável. Já as outras amostras (Figura 6) foram classificadas nas categorias A ou Extra de frescor e apresentaram baixas contagens bactérias mesófilas. De acordo com o estudo de Sant'Ana et al. (2011), que estabeleceu o prazo de validade do pescado *Pagellus bogaraveo*

resfriado em gelo, existe uma correlação entre a diminuição do frescor do pescado e o aumento progressivo da contagem de bactérias totais.

Tabela 14. Avaliação sensorial do frescor da tilápia

Amostras de peixe inteiro	Bactérias mesófilas (UFC/g)	Categoria de frescor
Amostra 1	$8,60 \times 10^4$	B
Amostra 2	$5,30 \times 10^3$	A
Amostra 3	$7,00 \times 10^2$	E
Amostra 4	$1,00 \times 10^2$	E



Figura 6. Descrição da avaliação sensorial do frescor da tilápia na amostra 1– CATEGORIA entre B e REJEITADO (Pele com brilho menos intenso, com cores desvanecidas e perda das escamas; olhos achatados e odor forte de peixe; guelras de cor amarronzada a descorada e muco coagulado; peritônio com parede abdominal descolada da carne).



Figura 7: Descrição da avaliação sensorial do frescor da tilápia na amostra 4 – CATEGORIA EXTRA (pele com brilho; escamas brilhantes bem aderentes à pele; olhos com pupila negra e viva e córnea transparente; odor fresco e carne rosa claro brilhosa; guelras de cor vermelho vivo, com muco claro; peritônio com parede abdominal íntegra, cor viva e brilhante, prata brilhosa com manchas pretas)

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, os resultados da avaliação microbiológica de 8 amostras de tilápia fresca (peixe inteiro e filé) exposta ao consumo nos supermercados da cidade de Brasília, mostraram que 5 amostras (62,5%) foram reprovadas devido à presença da bactéria *Salmonella* spp., ou seja, mais da metade das amostras estavam impróprias para o consumo segundo a legislação brasileira. Esses resultados mostram uma provável contaminação com material fecal das águas dos tanques onde esses peixes são criados. Portanto, o monitoramento da qualidade da água dos criatórios é de suma importância para garantir a produção de peixes com qualidade e segurança alimentar.

Os resultados da avaliação microbiológica de 8 amostras de gelo de manutenção do pescado, mostraram que 6 amostras (75%) estavam impróprias para o uso na conservação do pescado devido a presença de coliformes totais e de coliformes termotolerantes. A presença de coliformes termotolerantes (*E. coli*) é preocupante, pois indicou que a água possivelmente teve contaminação fecal, mostrando uma má qualidade na matéria prima usada e más condições higiênico-sanitárias nos processos de elaboração do gelo. A presença de *Escherichia coli*O157:H7, um patógeno entérico, nas amostras 2 e 3 de gelo reforça a preocupação com a contaminação cruzada, onde o gelo pode funcionar como uma potencial fonte de contaminação da carne do pescado

Acredita-se que a elevada carga de bactérias esteja relacionada a falhas higiênico-sanitárias na manipulação do pescado, principalmente nas amostras de filé que apresentaram uma maior contagem de bactérias e que exigem um maior contato por parte dos manipuladores nos processos de filetagem. As amostras de gelo também podem interferir na elevada carga de microrganismos visto que estavam bastante contaminadas e estão em contato direto com o pescado. Mas a contaminação da água dos tanques de criação é a provável fonte de contaminação do pescado com *Salmonella* spp. e pode ser avaliada em estudos futuros.

Os resultados deste estudo permitiram concluir que a maioria das amostras de tilápia exposta ao consumo nos supermercados da cidade de Brasília e de gelo de manutenção do pescado carece de qualidade microbiológica e sanitária e seu consumo pode representar risco à saúde pública, sem garantia de segurança alimentar ao consumidor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, G. V.; FREITAS D. G. C. Método do índice de qualidade na determinação do frescor de peixes. **Ciência Rural**, v.43, n.11, p. 2093-2100, 2013.

AMUSUH - DF quer produzir mais peixe. 2012. Disponível em: http://amusuh.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=153:df-quer-produzir-mais-peixe&catid=37:noticias&Itemid=60. Acesso em 21 de Março de 2015.

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

AYROZA, L. M. S. Criação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de Chavantes, rio Paranapanema, SP/PR.92 p. Tese de Doutorado, UNESP, Campus de Jaboticabal, 2009.

BARBOSA, T. A. Avaliação da qualidade microbiológica de couve minimamente processada comercializada nos supermercados de Brasília, 60 p., Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, DF, 2014

BARROS, C.G. Perda da qualidade do pescado e deterioração e putrefação. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 2, n. 30, p.59-66, 2003.

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.

BATISTA G. M.; LESSI, E.;KODAIRA, M.; FALCÃO, P. T. Alterações bioquímicas *post-mortem* de matrinxã *Brycon cephalus*(Günther, 1869) procedente da

piscicultura, mantido em gelo, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 573-581, 2004.

BLODGETT R. Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2 - Most Probable Number from Serial Dilutions, 2010. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>. Acesso em: 29 de março de 2015.

BOARI, C.A.; PEREIRA, G.I.; VALERIANO, C. et al. Bacterial ecology of tilápia fresh fillets and some factors that can influence their microbial quality. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n 4, p.863-867, 2008.

BORGES, A. M. O mercado do pescado em Brasília, 109 p., INFOPECA. 2010. Disponível em: www.infopesca.org/sites/.../Informe-Brasilia.pdf. Acesso em: 29 de março de 2015.

BRASIL. Secretária de Vigilância em Saúde – SVS. Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011. Brasília: SVS, 2011. Disponível em: http://www.portaoc.saude.gov.br/...../dados_epidemiologicos_dta_15911>. Acesso em: 25 de março de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, Resolução Nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01_rde.htm. Acesso em 24 de junho de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe

Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 de maio de 1997, Seção 1., p. 10282, 1997 a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SVS/MS n. 326 de 30 de julho de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 ago. 1997 b.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981.

BRYAN. A., et al. Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. **American Society for Microbiology**. v. 70, n. 4, p. 2503-2507, 2004.

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

CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. Detection of *Salmonella* and simultaneous detection of *Salmonella* and Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using the magnetic capture hybridization polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, n. 1, p. 7-11, 2001

COSTA R. A.; VIEIRA, G. H. F.; ALBUQUERQUE, I. A. et al. Enterobactérias em pescado oriundo da Lagoa da Fazenda, Sobral, CE. **Revista Higiene Alimentar**, v.23, p.102-105, 2009.

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

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Manejo Sanitário Animal. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. p. 03-05.

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

ESPOSTO, E. M. et al. Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 144-148, 2007.

FALCÃO, J.P.; DIAS, A.M.G.; CORREA, E.F.; FALCÃO, D.P. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. **Food Microbiology**, v.19, p.269-276, 2002.

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

FDA (Food & Drug Administration) (2011). Scombrotxin (histamine) formation. Fish and Fisheries products hazard & control guides. Disponível: <<http://www.fda.gov/.../fishandfisheriesproductshazardsandcontrolsguide/Chapt7>>. Acesso: 23 de Março de 2015.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. Bacteriological Analytical Manual - Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, 2002. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>, Acesso em 2 de abril de 2015.

FERREIRA, E. M. et al. Qualidade microbiológica do peixe serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.1, p. 49-54, 2014.

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

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. **Manual Prático de Análise de Água**, Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, 2006.

GALVÃO, J. A. Boas práticas de fabricação: da despesca ao beneficiamento. In: SIMCOPE, 2., 2006, São Vicente. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/iisimcope/palestras.htm>>. Acesso em: 03 de abril de 2015.

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

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

GHALY, A. E. et al. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, n.7, p. 859-877, 2010.

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

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

GUZMÁN, M.C.; BISTONI, M. A.; TAMAGNINI, L. M.; GONZÁLEZ, R. D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v. 38, p. 2368-2374, 2004.

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

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 2: Sampling for microbiological analysis – Principles and specific applications. Ed. Blackwell Scientific Publications, 1986.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de tilápias no período de 01.01 a 31.12 e participações relativa e acumulada no total da produção, segundo as Unidades da Federação e os 20 municípios com as maiores produções, em ordem decrescente, 2013. Tabela 43. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2013/default_pdf.shtm>. Acesso em 22 de Março de 2015.

JORGENSEN, H. J. et al. Enterotoxigenic *S. aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 158-166, 2005.

KARAHAN. M.; ÇETINKAYA. B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. **The Veterinary Journal**. v. 174, p. 428–431, 2007.

KAWASAKI, S. et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 551-556, 2005.

LEONHARDT, J. H.; CAETANO FILHO, M.; FROSSARD, H.; MORENO, A. M. Características morfológicas, rendimento e composição do filé de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem tailandesa, local e do cruzamento de ambas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 125–132, 2006.

LIBRELATO, F.R.; SHIKIDA, S.A.R.L. Segurança alimentar: um estudo multidisciplinar de qualidade do filé de tilápia comercializado no município de Toledo – PR. **Revista do Grupo de Pesquisa em Agronegócios e Desenvolvimento Regional (GEPEC) da UNIOESTE**, v. 9, n. 2, p. 1-4, 2005.

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

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.

LUZ, I. S. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco. 2008. 126f.. Dissertação de Mestrado, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MACARI, S. M. Desenvolvimento de formulação de embutidos cozidos à base de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), 75 p., Tese de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MANFRIN, L. C. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída bovina comercializada nos supermercados das cidades de Brasília e Taguatinga – DF. 64 p., Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, DF, 2013.

MARCHI, G. P; JUNIOR, R. D. O; CERESER, D. N; SOUZA, V; REZENDE, M. C. N; FARIA, A. A. Avaliação microbiológica e físico-química da carne bovina moída comercializada em supermercados e açougues de Jaboticabal – SP. **Revista Eletrônica da Univar**, São Paulo, n.7 p. 81 – 87, 2012.

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

MINAMI, A. et al. Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand. **Food Control**, v. 21, p. 221-226, 2010.

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

NUNES, M.L. et al. Aplicação do Índice de Qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. Lisboa: IPIMAR, 2007. 51p.

OLIVEIRA, M. C. S. D. Avaliação microbiológica e aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para estudo do prazo de validade comercial do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) estocado em gelo, comercializado em Brasília – DF. 59 p., Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, DF, 2015.

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

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

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

REGULAMENTO CE nº 2406/96 de 26 de Dezembro de 1996, Fixação de normas comuns de comercialização para certos produtos da pesca, Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31996R2406&from=P>

I

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

RODRIGUES, T. P. Estudo de critérios para avaliação da qualidade da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivada; eviscerada e estocada em gelo. 116 p., Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2008.

SANT'ANA, L.S. et al. Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.2253-2259, 2011.

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

SCHERER, R.; DANIEL, A. P.; AUGUSTI, P. R.; LAZZARI, R.; LIMA, R. L.; FRIES, L. L. M.; RADUNZ NETO, J.; EMANUELLI, T. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 680-684, 2004.

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

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

SIMÕES et al. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 608-613, 2007.

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

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para o estudo da vida útil de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sem pele, armazenados em gelo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2289-2300, 2012.

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

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

WHO – World Health Organization, **Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)**, Fact sheet N°125, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>, Acesso em: 05/11/2014.

VIEIRA, K.V.M; MAIA, D.C.C.; JANEIRO, D. I.; VIEIRA, R. H. S. F.; CEBALLOS, B. S. O. Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em filé congelados. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p.37-40, 2000.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 380p.

VIEIRA, R. H. S. F.; SAKER-SAMPAIO, S. Emprego de gelo nos barcos. In: VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004. cap. 02. p. 37-39.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: José Eurico Possebon Cyrino, Elisabeth Criscuolo Urbinati, Débora Machado Fracalosi, Newton

Castagnolli (Eds), Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva, São Paulo: TecArt, Cap.9, p. 239-266, 2004.

Anexo 1. Parâmetros de qualidade usados na inspeção sensorial do frescor da tilápia

Características sensoriais	CATEGORIAS DE FRESCOR			
	EXTRA - fresco, com alta qualidade	A – fresco, boa qualidade	B – menos fresco qualidade satisfatória	REJEITADO
Cor e aparência da pele	Com brilho, coloração acinzentada, com listras mais escuras intercaladas e bem definidas. Escamas brilhantes bem aderentes à pele.	Brilho menos intenso, mas com listras mais escuras intercaladas e bem definidas. Escamas bem aderentes à pele.	Brilho menos intenso, com diminuição da definição das listras. Perda das escamas.	Sem brilho, com perda de definição das listras, cores desvanecidas. Perda das escamas.
Olhos	Pupila negra e viva; córnea transparente.	Olhos planos ou achatados, pupila negra e ligeiramente opaca; córnea ligeiramente opaca.	Olhos planos ou achatados; córnea opaca; pupila opaca.	Olho afundado, pupila cinzenta; córnea leitosa.
Odor	Fresco, odor neutro.	Fresco, odor neutro.	Odor forte de peixe.	Azedo, pútrido.
Guelras	Vermelho vivo, com muco claro, aquoso, transparente.	Vermelho vivo, com muco claro, mas leitoso.	Vermelho escuro, muco leitoso e coagulado.	Vermelho opaco amarronzado a descorado, muco marrom e coagulado.
Cor da carne	Rosa claro brilhosa.	Rosa claro brilhosa.	Opaca, rosa velho, "cor de carne de coxa de frango".	Opaca, rosa velho, "cor de carne de coxa de frango", carne amolecida.
Aspecto do peritônio (peixe eviscerado)	Peritônio íntegro, parede abdominal íntegra. Cor viva e brilhante, prata brilhosa com manchas pretas.	Peritônio íntegro, parede abdominal íntegra. Cor viva e brilhante, prata brilhosa com manchas pretas.	Peritônio íntegro, parede abdominal íntegra. Cor menos viva e ligeiramente opaca, madreperla brilhosa com manchas pretas.	Parede abdominal descolada da carne, cor branca amarelada sem brilho, com manchas pretas.

Anexo 2. Seleção dos oligonucleotídeos utilizados no estudo, com uso do BLAST <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

OBSERVAÇÃO: os oligonucleotídeos estão destacados em amarelo e as sequências amplificadas em vermelho.

***Staphylococcus aureus* Coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: NVAU02080**

GenBank: AB436975.1

LOCUS: AB436975 6465 bp DNA linear BCT 28-MAY-2009

DEFINITION: *Staphylococcus aureus* Coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: NVAU02080.

ACCESSION: AB436975

VERSION: AB436975.1 GI:238549872

KEYWORDS SOURCE: *Staphylococcus aureus*

ORGANISM: *Staphylococcus aureus*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; *Staphylococcus*.

REFERENCE 1

AUTHORS: Watanabe, S., Ito, T., Sasaki, T., Li, S., Uchiyama, I., Kishii, K., Kikuchi, K., Skov, R.L. and Hiramatsu, K.

TITLE: Genetic Diversity of Staphylocoagulase Genes (Coa): Insight into the Evolution of Variable Chromosomal Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*

JOURNAL: Unpublished

REMARK: Publication Status: Online-Only

REFERENCE 2 (bases 1 to 6465)

AUTHORS: Watanabe, S., Ito, T., Sasaki, T., Kishii, K. and Hiramatsu, K.

TITLE: Direct Submission

JOURNAL: Submitted (13-MAY-2008) Contact: Shinya Watanabe Juntendo University, Department of Infection Control Science; Hongo 2-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

FEATURES: Location/Qualifiers

```

source      1..6465
            /organism="Staphylococcus aureus"
            /mol_type="genomic DNA"
            /strain="NVAU02080"
            /db_xref="taxon:1280"

CDS         1..1764
            /note="similar to glycerophosphodiester
phosphodiesterase"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="hypothetical protein"
            /protein_id="BAH66220.1"
            /db_xref="GI:238549873"

/translation="MKRISKDIWAVFKLLYQNKGRFSINALLQLIMIFISSTYLILL
FNMLKVAGQSQLTINNWMEIVSHPASVILLIIFILSVAFIYVEFSLLVYMYAGFD
RQIITFKSIFKNAFVNVKRLIGVPVIFVVIYMLMIPIANLGLSSVLTKNYIPKFLT
EELMKTTKGIIYGTFMIAVFIILNFKLIFTLPLTILNRQSLFKNMRLSWQITKRNKFR
LVIEIVILELIIGAILTLIISGATYLAICVDEEGDKFLVSSILFVVLKSSLFFYYLFT
KLSLISVVLVHLKQENVLDQPGLEFKYKPKRKRSRFFIISMVLAVTCTFIGYNMYLLYN
NTINTNISIIHGRGFEDKGVENSIPSLKAAAKANVEYVELDTIMTKDKQFVSHDNNL
KRLTGVNKNISESNFKDVVGLKMRQNGHEAKLVSLDEFIETAKQSNVKLLVELKPHGK
EPADYTQRVIDILKKHGVVEHQYRVMASLDYDVMTKLKEAPYLKCGYIIPLQFGHFKET
SLDFFVIEDFSYSPRLVNAHLENKEVYTWTINGEEDLTKYLQTNVDGIITDDPALAD
            QIKEEKKDETYFDRSIRIIFE"

CDScomplement(1928..2272)
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="hypothetical protein"
            /protein_id="BAH66221.1"
            /db_xref="GI:238549874"

/translation="MTTQMKIPTYLVAGIKAALLDGTGKILASKSETTSHTYQHQUALV
DQLHELIANTDLNKLSTLNLDAYQKRDILAAHYIAKSAIRTKNLDQMTKAKHRLESY
            DSISNPLHSQNN"

gene       2462..4696
            /gene="coa"

CDS         2462..4696
            /gene="coa"
            /function="coagulation of plasma"
            /codon_start=1

```

```

/transl_table=11
/product="staphylocoagulase"
/protein_id="BAH66222.1"
/db_xref="GI:238549875"

```

```

/translation="MKKQIISLGALAVASSLFTWDNKADAIVTKDYSGKSQVNAGSKN
GTLIDSRYLNSALYYLEDYIIYAIGLTNKYEYGDNIYKEAKDRLLEKVLREDQYLLER
KKSQYEDYKQWYANYKKENPRPTDLKMANFHKYNLEELSMKEYNELQNALKGALDDFHR
EVKDIKDKNSDLKTFNAAEEDKATKEVYDLVSEIDTLVVSYYGDKDYGEHAKELRAKL
DLILGDTDNPHKITNERIKKEMIDDLNSIIDDFFMETKQNRPNSTITKYDPTKHNFKKEK
SENKPNFDKLVVEETTKAVKEADNSWKTKTVKTYGEAETKAHVVKEEKKVENPQLPKVG
NQQEVETTVDKAEAEATQPVAQPLVKIPQGTITGEIVKGPDYLTMENKTLQGEIVQGPD
FPTMEQNRPSLSDNYTQPTTPNPILKGIENSSKLEIKPQGTESTLKGIQGESSDIEV
KPQATETTEASQYGPRPQFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYEARPRFNKPKSETN
AYNVTTNQDGTVSYGARPTYNKPSETNAYNVTTTHGNGQVSYGARPTQNKPKSETNAYNV
TTHANGQVSYGARPTQNKPKSKTNEYNVTTTHANGQVSYGARPTYKKPKSETNAYNVTTTHA
NGQVSYGARPTQNKPKSETNAYNVTTTHGNGQVSYGARPTQNKPKSKTSAYNVTTTHANGQV
SYGARPTQNKPKSKTNEYNVTTTHANGQVSYGARPTYKKPKSETNAYNVTTTHADGTATYGP
RVTK"

```

CDS complement (5281..6465)

```

/codon_start=1
/transl_table=11
/product="acetyl-CoA acethyltransferase homologue"
/protein_id="BAH66223.1"
/db_xref="GI:238549876"

```

```

/translation="MQEAYIVAYGRSAAAKAKQGALFHERPDDVAAKVLQGVLKRIDG
KFNKNMIEDVIVGTAFFPEGLQGQNIARTIALRTGLSDTVPGQTVNRYCSSGLQTIAIA
ANQIMAGQGDILVAGGVELMSAVPMGGNEPTNNPTLQYDDIGVSYPMGLTAENVASQF
DVSREDQDAYAVRSHQRAFDAQRDGRFKDEIIPIQVNSVEYTNAGPKVHTNIFDQDEF
IRPDTTMEALAKLRVFKADGTVTAGTSAPLSDGAGFVVLMSGDKVKELGVTPPIARFV
GYKAVGVDPKIMGIGPAYAIPPEVLSLSNLSVEDIDLIELNEAFASQTIASIKEVGLDI
SRTNVNGGAIALGHPLGATGAMLTARLLNEMGRRPDSRYGMVTMCIGVGMGAAAIFFEY
VR"

```

ORIGIN

1	cgtttttagca	ttaatgcctt	actattgcag	ttgatcatga	tttttattag
51	tagtacatac	ttaattttac	tatttaatat	gatgttaaaa	gtagctgggc
101	aaagccaact	tacgattaac	aattggatgg	aaatcgtaag	tcaccctgcc
151	agtgtgatac	ttcttattat	attcatatta	agtgttgctt	ttctgattta
201	tgtagagttt	tcattgtag	tttatatggg	ttatgcccggc	tttgatcgac
251	agattattac	atntaaatcc	atnttttaaaa	atgcctttgt	aatgtgcgt
301	aaactcatag	gtgtaccagt	tattttcttt	gtcatttatt	taatgttaat
351	gataccatt	gccaacctag	gactaagttc	agtattaaca	aaaaatattt
401	acatacctaa	atnttttaacg	gaagaactta	tgaaaacgac	gaaaggtata
451	atcatttacg	gtacctttat	gattgctgta	tttatattaa	actttaaatt
501	aatatttacc	ttaccgttaa	cgattttaaa	ccgtcagtc	ttatttaaaa
551	atatgagact	aagttggcaa	attacgaagc	gaaataagtt	tcggcttggt
601	atagaaatag	ttatattgga	actcatcatt	gggtgcgattt	taacattaat
651	tatttcagga	gcaacataatc	ttgctatttg	tgtagatgaa	gaaggagata
701	agtttttagt	ctcatcaatt	ttatttgttg	tattgaaaag	ctcattgttc
751	ttctattatt	tatttacgaa	attatcatta	atcagtggtg	tagtactgca
801	cttaaaacaa	gagaatgtat	tagaccaacc	gggcttagaa	tttaaatacc
851	caaaaccgaa	acggaagtct	aggttcttta	taatttcaat	gggtgcttgca
901	gtgacatggt	ttatcggtta	taacatgtac	ttactttaca	ataatactat
951	caatacaaat	atctccatta	ttggatcatcg	tggtttcgaa	gataaaggcg
1001	ttgaaaattc	tattccgtca	ttgaaagctg	ctgcaaaagc	gaatgtcgaa
1051	tacgttgagt	tagatacaat	tatgacgaaa	gataaacaat	ttggtgtag
1101	tcatgataac	aatttgaac	gtttaacagg	tgtaataaaa	aatatttctg
1151	aatctaattt	caaagatgtc	gtcggtttga	aaatgcgtca	aatggacat
1201	gaagcaaaac	ttgtatcctt	agacgaattt	attgaaacgg	ctaaacaatc
1251	aatgtgaaag	ctactagtag	agttaaagcc	acatggtaaa	gaaccagcag
1301	attatacaca	acgtgttatt	gatattttga	aaaagcatgg	tgttgaacat
1351	caatatcgtg	tgatgtcatt	ggattatgat	gtgatgacta	agttgaaaaa
1401	agaagcgcca	tatctcaagt	gtgggtatat	cataccgtta	cagtttggtc
1451	atntttaaaga	aacatcatta	gatttctttg	tcacgaaga	tttttcttat
1501	tcgccgagac	ttgttaatca	agcacacttg	gaaaataaag	aagtctatac
1551	ttggaccatt	aacggagaag	aagatttaac	gaaataactta	caaaccaatg
1601	ttgatggtat	tatcacagat	gaccagcat	tagctgatca	gattaaagaa
1651	gaaaagaaag	acgaaacata	cttcgatcgt	tctataagaa	taatatttga
1701	ataataaaaa	caaagacctc	taaagttatc	aagacgatac	tttcagaggt
1751	ctnttttaacg	ttgccttcta	tggggtaggc	aatcgtttca	ttcgtttata
1801	atcatatgac	aagtatattat	aaggtaattt	ggcgtcataa	acacttacat
1851	gatttattgg	tgaattatta	attgttttgt	gaatgcaaag	ggttagaaat
1901	tgaatcgtaa	atactttcta	atctatgttt	cgcttttagtc	atttgatcca
1951	aatnttttagt	gcgtatagca	gattttgcaa	tatagtgtgc	agctaaaata

2001	tcgcgctttt	gatacgcac	taaatttagg	tacgataatt	tatttaagtc
2051	agtgtttgct	attaattcat	gtaattgatc	tacaagcgct	tgatgttgat
2101	acgtatgtga	tgtagtttca	gatttgcttg	ctaatttaat	accagtcgta
2151	tcaaggagcg	ccgctttaat	accagcaact	aaatatgttt	tgattttcat
2201	ttgtgttgct	atgctttggt	actccttga	tgtacattaa	tcaaaaaaat
2251	tatacactat	tgtatattgc	aaagctaatt	aactataaca	aaaagatagt
2301	taatgctttg	tttattctag	ttaatata	gttaatgtct	tttaataatt
2351	tgtttcttta	atgtagattg	ggcaattaca	ttttggagga	attaaaaaat
2401	tatgaaaaag	caaataattt	cgctaggcgc	attagcagtt	gcatctagct
2451	tatttacatg	ggataacaaa	gcagatgcga	tagtaacaaa	ggattatagt
2501	gggaaatcac	aagttaatgc	tgggagtaaa	aatgggacat	taatagatag
2551	cagatattta	aattcagctc	tatattattt	ggaagactat	ataatttatg
2601	ctataggatt	aactaataaa	tatgaatatg	gagataatat	ttataaagaa
2651	gctaaagata	ggttgttgga	aaaggtatta	agggaagatc	aatatctttt
2701	ggagagaaa	aaatctcaat	atgaagatta	taaacaatgg	tatgcaaatt
2751	ataaaaaaga	aaatcctcgt	acagatttaa	aaatggctaa	ttttcataaa
2801	tataatttag	aagaactttc	gatgaaagaa	tacaatgaac	tacagaatgc
2851	attaaagggg	gcactggatg	atthttcacag	agaagttaa	gatattaagg
2901	ataagaattc	agacttgaaa	acttttaatg	cagcagaaga	agataaagca
2951	actaaggaag	tatacgatct	cgtatctgaa	attgatacat	tagttgtatc
3001	atattatggt	gataaggatt	atggggagca	cgcgaaagag	ttacgagcaa
3051	aactggactt	aatccttgga	gatacagaca	atccacataa	aattacaaat
3101	gagcgtatta	aaaaagaaat	gatcgatgac	ttaaatcaa	ttattgatga
3151	tttctttatg	gagactaaac	aaaatagacc	gaattctata	acaaaatag
3201	atccaacaaa	acacaatttt	aaagagaaga	gtgaaaataa	acctaatttt
3251	gataaattag	ttgaagaaac	aaaaaaagca	gttaaagaag	cagataattc
3301	ttggaaaact	aaaactgtca	aaacatatgg	tgaagctgaa	acaaaagcac
3351	atgttgtaaa	agaagagaag	aaagttgaaa	accctcaatt	acctaaggtt
3401	ggaaaccaac	aagaggttga	aactacagtt	gataaagctg	aagaagcaac
3451	acaaccagtg	gcacagccat	tagttaaaat	tccacagggc	acaattacag
3501	gtgaaattgt	aaaaggtccc	gactatctaa	cgatggaaaa	taaaacgtta
3551	caaggtgaaa	tcgttcaagg	tcctgatttc	ccaacaatgg	aacaaaacag
3601	accatcttta	agcgataatt	atactcaacc	gacgacaccg	aaccctatft
3651	taaaaggtat	tgaaggaaac	tcatctaaac	ttgaaataaa	accacaaggt
3701	actgaatcaa	cgttgaaagg	tattcaagga	gaatcaagtg	atattgaagt
3751	taaacctcaa	gcaactgaaa	caacagaagc	ttctcaatat	ggtccgagac
3801	ctcaatttaa	caaaacacct	aaatatgtga	aatatagaga	tgctggtaca
3851	ggtattcgtg	aatacaacga	tggaaacattt	ggatatgaag	cgagaccaag
3901	attcaataag	ccatcagaaa	caaacgcata	caacgtaacg	acaaaccaag
3951	atggcacagt	atcatacggc	gctcgcccga	catacaataa	gccatcagaa
4001	acaaacgcat	ataacgtaac	aacacacgga	aatggccaag	tatcatacgg
4051	agctcgcccg	acacaaaaca	agccaagcga	aacaaatgca	tataacgtaa

4101	caacacatgc	aaacggccaa	gtatcatacg	gagctcgccc	gacacaaaac
4151	aagccaagca	aaacaaacga	gtataacgta	acaacacatg	caaatggcca
4201	agtatcatac	ggagctcgtc	cgacatacaa	gaagccaagc	gaaacgfaatg
4251	catataacgt	aacaacacat	gcaaacggcc	aagtatcata	tggcgctcgc
4301	ccaacacaaa	acaagccaag	tgaaacgaac	gcatataacg	taacaacaca
4351	cggaaatggc	caagtatcat	atggcgctcg	cccaacacaa	aacaaaccaa
4401	gtaaaacaag	tgcatataac	gtaacaacac	atgcaaacgg	ccaagtatca
4451	tacggagctc	gcccgcacaca	aaacaagcca	agcaaaaaca	acgcatataa
4501	cgtaacaaca	catgcaaatg	gccaagtatc	atacggagct	cgtccgacat
4551	acaagaagcc	aagtgaaacg	aatgcataca	atgtaacaac	acatgcagat
4601	ggtactgcga	catatgggtcc	tagagtaaca	aaataagttt	ataactctat
4651	ccatagacat	acagtcaata	caaaacatta	tgtatcttta	caacagtaat
4701	catgcattcg	atgatgcttc	taactgaatt	aaagcatcga	acaatcggaa
4751	gcatatctct	aaattattta	tcattatag	tcttaaacad	aacatgacct
4801	aatatattac	taacctatta	aaataaacca	cgcacatcta	tgtgatatac
4851	gacaatcaca	gcaataataa	ttgctttaga	aagtcgtacc	gaactggaac
4901	ttacaagtct	agttcgaaca	cactgatgtg	agtggttttc	tttattttaa
4951	acatgaacaa	tcagataagt	tacttgcatt	agcaaatatt	attaaatcaa
5001	agggcttcga	ttcataaaat	ttaaaacaat	gattagaatt	agacgtgtaa
5051	atgttaaatt	ctaaaacgga	aatacccgct	atcctattaa	actactatct
5101	tgttcgatca	ctatatttca	cacagcttca	ataataaaaac	gaaactgctt
5151	caatctgctt	caacttcagc	ctacttcatt	caataacaaa	acgaatccgc
5201	ttcatccaaa	atcaaccatt	ctaacgcaca	tactcaaata	tagcagctgc
5251	accataaccg	acaccaatac	acatcgtaac	catgccgtaa	cgactatcgg
5301	gacgtctacc	catttcatta	agtaaacgcg	cggttaacat	tgcccctgta
5351	gcacctaatg	gatgacctaa	agcaatagcg	ccaccattca	cattcgtacg
5401	tgatataatc	agacctactt	ctttaataga	tgcaatcggt	tgagaagcaa
5451	atgcttcggt	caattcgatc	aatcaatgt	cttcaacaga	tagattgctg
5501	agtgacaata	cttcaggaat	cgcatatgca	ggccaatac	ccataatctt
5551	cgggtcaacg	cctactgcct	tataaccaac	gaatcgtgca	ataggtgtca
5601	cgccgagttc	tttcacttta	tctccagaca	ttaaaactac	aatcctgca
5651	ccatcagaaa	gtggggcaga	tgttcctgca	gtcacagtgc	cgtcagcttt
5701	aaatactgta	cgtaatttgg	ctaatgcctc	cattgtgggtg	tcaggtcgta
5751	taaattcatc	ttgggtcaaag	atatttgtgt	gtacttttgg	tcctgctgtt
5801	gtatattcaa	ctgagtttac	ttgtattgga	ataatttcat	ctttgaaccg
5851	accatcacgt	tgtgcgtcaa	aggcacgttg	atgacttctg	acagcataag
5901	catcttgatc	ttcgcgtgat	acgtcaaatt	gggatgctac	atcttcagca
5951	gttaaaccca	taggatatga	cacacctata	tcatcatatt	gtaaggtagg
6001	attgtttgtg	ggctcgttgc	caccattgg	tacggcactc	atcaattcaa
6051	cgccaccagc	tacaagtata	tctccttgac	cagccataat	ttgattggct
6101	gcaatcgcga	tggtttgtaa	tcctgatgag	cagtagcgat	tcactgtttg
6151	accggtacc	gtgtcagata	atcccgtacg	caatgcaatc	gttcgtgcaa

```

6201      tgttttgtcc  ttgtaatcct  tctggaaaag  cegtaccaac  aatgacatct
6251      tcaatcatat  tcttattgaa  ttttccgtca  atacgtttca  atacgccttg
6301      taatactttg  gctgcgacat  catcaggtct  ttcgtggaat  aatgcgctt
6351      gctttgcttt  cgctgcggct  gaacgcccat  aagctacaat  gtatgcttct
6401      tgcac
    
```

Pair 2:

Left Primer 2:

Sequence:

Start: 5906 Length: 20 bp Tm: 59.8 °C GC: 50.0 % ANY: 4.0 SELF: 2.0

Right Primer 2:

Sequence:

Start: 6208 Length: 20 bp Tm: 60.2 °C GC: 40.0 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Product Size: 303 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 2.0

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

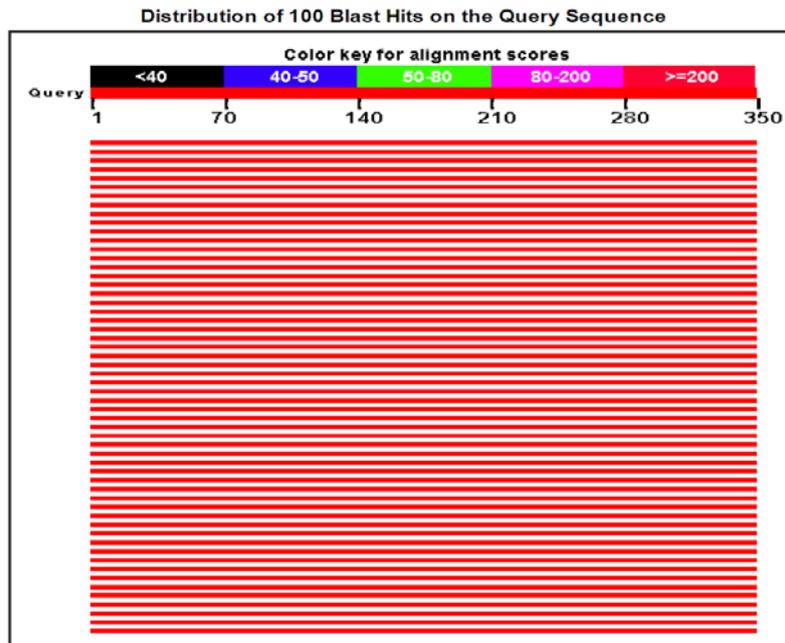
[NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - PFBV4ZET014](#)
[Formatting options](#)
[Download](#)
[Blast report description](#)

Nucleotide Sequence (350 letters)

RID [PFBV4ZET014](#) (Expires on 05-30 08:14 am)

Query ID	lcl Query_53479	Database Name	nr
Description	None	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.31+
Query Length	350		

[Graphic Summary](#)



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: NVAU02080	647	647	100%	0.0	100%	AB436975.1
Staphylococcus aureus strain 93b_S9 genome	641	641	100%	2e-180	99%	CP010952.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus 6850, complete genome	641	641	100%	2e-180	99%	CP006706.1
Staphylococcus aureus 08BA02176, complete genome	641	641	100%	2e-180	99%	CP003808.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus 71193, complete genome	641	641	100%	2e-180	99%	CP003045.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus LGA251 complete genome sequence	641	641	100%	2e-180	99%	FR821779.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST398 complete genome	641	641	100%	2e-180	99%	AM990992.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: NVAU02081	641	641	100%	2e-180	99%	AB436985.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: JCSC6908	641	641	100%	2e-180	99%	AB436983.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: NVAU02064	641	641	100%	2e-180	99%	AB436974.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: JCSC4744	641	641	100%	2e-180	99%	AB436973.1
Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain:No.55	641	641	100%	2e-180	99%	AB158551.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus DNA, complete genome, strain: TMUS2134	636	636	100%	8e-179	99%	AP014653.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus DNA, complete genome, strain: TMUS2126	636	636	100%	8e-179	99%	AP014652.1
Staphylococcus aureus strain 71A_S11 genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP010940.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus SA268, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP006630.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus strain H-EMRSA-15, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP007659.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus SA40, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP003604.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus SA957, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP003603.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus CN1, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP003979.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus HO 5096 0412 complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	HE681097.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus M013, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP003166.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus JKD6159, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP002114.2

Staphylococcus aureus subsp. aureus ED133, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	CP001996.1
Staphylococcus aureus genes for hypothetical protein, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: IFH514	636	636	100%	8e-179	99%	AB437138.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: AIS2002059	636	636	100%	8e-179	99%	AB436979.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: C-1C	636	636	100%	8e-179	99%	AB436977.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: NVAU02066	636	636	100%	8e-179	99%	AB436972.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: JCSC6669	636	636	100%	8e-179	99%	AB436971.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: JCSC6075	636	636	100%	8e-179	99%	AB436967.1
Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain:19	636	636	100%	8e-179	99%	AB158555.1
Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain:17573	636	636	100%	8e-179	99%	AB158554.1
Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain:104	636	636	100%	8e-179	99%	AB158549.1
Staphylococcus aureus strain MSSA476, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	BX571857.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus MW2 DNA, complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	BA000033.2
Staphylococcus aureus RF122 complete genome	636	636	100%	8e-179	99%	AJ938182.1
Staphylococcus aureus strain FCFHV36, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP011147.1
Staphylococcus aureus genome assembly NCTC13435, chromosome : 1	630	630	100%	4e-177	99%	LN831036.1
Staphylococcus aureus strain 79_S10 genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP010944.1
Staphylococcus aureus strain 144_S7 genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP010943.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST772-MRSA-V strain DAR4145, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP010526.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus strain FORC_001, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP009554.1
Staphylococcus aureus genome assembly Staphylococcus_aureus_ILRI_Eymole1/1, chromosome : I	630	630	100%	4e-177	99%	LN626917.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus strain Gv69, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP009681.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus strain ATCC 25923, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP009361.1
Staphylococcus aureus strain XN108, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP007447.1
Staphylococcus aureus strain 502A, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP007454.1

Staphylococcus aureus subsp. aureus Z172, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP006838.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus 55/2053, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP002388.1
Staphylococcus aureus Bmb9393, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP005288.1
Staphylococcus aureus CA-347, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP006044.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228 complete genome, isolate 18583	630	630	100%	4e-177	99%	HE579073.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228 complete genome, isolate 18412	630	630	100%	4e-177	99%	HE579071.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228 complete genome, isolate 18341	630	630	100%	4e-177	99%	HE579069.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228 complete genome, isolate 16125	630	630	100%	4e-177	99%	HE579067.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228 complete genome, isolate 16035	630	630	100%	4e-177	99%	HE579065.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228 complete genome, isolate 15532	630	630	100%	4e-177	99%	HE579063.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228 complete genome, isolate 10497	630	630	100%	4e-177	99%	HE579061.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ST228 complete genome, isolate 10388	630	630	100%	4e-177	99%	HE579059.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus 11819-97, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP003194.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus T0131, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP002643.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ECT-R 2 complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	FR714927.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus TCH60, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP002110.1
Staphylococcus aureus 04-02981, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP001844.2
Staphylococcus aureus subsp. aureus str. JKD6008, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP002120.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus TW20, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	FN433596.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ED98, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP001781.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: AIS2002058	630	630	100%	4e-177	99%	AB436981.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: JCSC6666	630	630	100%	4e-177	99%	AB436966.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu3 DNA, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	AP009324.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus JH1, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP000736.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus JH9, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	CP000703.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu50 DNA, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	BA000017.4
Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain:Stp-12	630	630	100%	4e-177	99%	AB158552.1
Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain:Stp-28	630	630	100%	4e-177	99%	AB158550.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus N315 DNA, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	BA000018.3

Staphylococcus aureus subsp. aureus strain MRSA252, complete genome	630	630	100%	4e-177	99%	BX571856.1
Staphylococcus aureus genome assembly NCTC8532, plasmid : 2	625	625	100%	2e-175	99%	LN831049.1
Staphylococcus aureus strain 2395 USA500, complete genome	625	625	100%	2e-175	99%	CP007499.1
Staphylococcus aureus strain NRS 100, complete genome	625	625	100%	2e-175	99%	CP007539.1
Staphylococcus aureus M1 complete genome	625	625	100%	2e-175	99%	HF937103.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus VC40, complete genome	625	625	100%	2e-175	99%	CP003033.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: JCSC6488	625	625	99%	2e-175	99%	AB436980.1
Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: M9N	625	625	100%	2e-175	99%	AB436976.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus str. Newman DNA, complete genome	625	625	100%	2e-175	99%	AP009351.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus COL, complete genome	625	625	100%	2e-175	99%	CP000046.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus NCTC 8325, complete genome	625	625	100%	2e-175	99%	CP000253.1
Staphylococcus aureus putative fatty acid degradation operon, complete sequence	625	625	100%	2e-175	99%	AY033081.1
Staphylococcus aureus clone sabac-134, complete sequence	625	625	100%	2e-175	99%	AC025591.8
Staphylococcus aureus strain SA17_S6 genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP010941.1
Staphylococcus aureus strain 27b_MRSA, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP010300.1
Staphylococcus aureus strain 25b_MRSA, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP010299.1
Staphylococcus aureus strain 26b_MRSA, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP010298.1
Staphylococcus aureus strain 33b, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP010297.1
Staphylococcus aureus strain 31b_MRSA, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP010296.1
Staphylococcus aureus strain 29b_MRSA, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP010295.1
Staphylococcus aureus strain UA-S391_USA300, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP007690.1
Staphylococcus aureus USA300-ISMMS1, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP007176.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH1516, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP000730.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_FPR3757, complete genome	619	619	100%	8e-174	99%	CP000255.1

Alignments

Staphylococcus aureus coa genes for hypothetical proteins, staphylocoagulase, acetyl-CoA acetyltransferase homologue, complete cds, strain: NVAU02080

Sequence ID: **dbj|AB436975.1|** Length: 6465 Number of Matches: 1
Range 1: 5961 to 6310

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
647 bits(350)	0.0()	350/350(100%)	0/350(0%)	Plus/Plus	

Features:

Query 1 CATCTTGATCTTCGCGTGATACGTCAAATGGGATGCTACATTTTCAGCAGTTAAACCCA 60

Sbjct 5961 CATCTTGATCTTCGCGTGATACGTCAAATGGGATGCTACATTTTCAGCAGTTAAACCCA 6020

Query 61 TAGGATATGACACACCTATATCATCATATTGTAAGGTAGGATTGTTTGTGGGCTCGTTGC 120

Sbjct 6021 TAGGATATGACACACCTATATCATCATATTGTAAGGTAGGATTGTTTGTGGGCTCGTTGC 6080

Query 121 CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATCAACGCCACCAAGTATATCTCCTTGAC 180

Sbjct 6081 CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATCAACGCCACCAAGTATATCTCCTTGAC 6140

Query 181 CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCTGATGAGCAGTAGCGAT 240

Sbjct 6141 CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCTGATGAGCAGTAGCGAT 6200

Query 241 TCACGTTTGGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA 300

Sbjct 6201 TCACGTTTGGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA 6260

Query 301 TGTTCCTTGTAACTCTCTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 350

Sbjct 6261 TGTTCCTTGTAACTCTCTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 6310

Staphylococcus aureus strain 93b_S9 genome

Sequence ID: **gb|CP010952.1|** Length: 2788353 Number of Matches: 1
Range 1: 216569 to 216918

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
641 bits(347)	2e-180()	349/350(99%)	0/350(0%)	Plus/Plus	

Features:

Query 1 CATCTTGATCTTCGCGTGATACGTCAAATGGGATGCTACATTTTCAGCAGTTAAACCCA 60

Sbjct 216569 CATCTTGATCTTCGCGTGATACGTCAAATGGGATGCTACATTTTCAGCAGTTAAACCCA 216628

Query 61 TAGGATATGACACACCTATATCATCATATTGTAAGGTAGGATTGTTTGTGGGCTCGTTGC 120

Sbjct 216629 TAGGATATGACACACCTATATCATCATATTGTAAGGTAGGATTGTTTGTGGGCTCGTTGC 216688

Query 121 CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATCAACGCCACCAAGTATATCTCCTTGAC 180

Sbjct 216689 CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATCAACGCCACCAAGTATATCTCCTTGAC 216748

Query 181 CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCTGATGAGCAGTAGCGAT 240

Sbjct 216749 CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCTGATGAGCAGTAGCGAT 216808

Query 241 TCACGTTTGGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA 300

Sbjct 216809 TCACGTTTGGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA 216868

Query 301 TGTTCCTTGTAACTCTCTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 350

Sbjct 216869 TGTTCCTTGTAACTCTCTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 216918

Staphylococcus aureus subsp. aureus 6850, complete genome

Sequence ID: **gb|CP006706.1|** Length: 2736560 Number of Matches: 1
Range 1: 210124 to 210473

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
641 bits(347)	2e-180()	349/350(99%)	0/350(0%)	Plus/Plus	

Features:

Query 1 CATCTTGATCTTCGCGTGATACGTCAAATGGGATGCTACATTTTCAGCAGTTAAACCCA 60

Sbjct 210124 CATCTTGATCTTCGCGTGATACGTCAAATGGGATGCTACATTTTCAGCAGTTAAACCCA 210183

Query 61 TAGGATATGACACACCTATATCATCATATTGTAAGGTAGGATTGTTTGTGGGCTCGTTGC 120

Sbjct 210184 TAGGATATGACACACCTATATCATCATATTGTAAGGTAGGATTGTTTGTGGGCTCGTTGC 210243

Query 121 CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATCAACGCCACCAAGTATATCTCCTTGAC 180

Sbjct 210244 CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATCAACGCCACCAAGTATATCTCCTTGAC 210303

Query 181 CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCTGATGAGCAGTAGCGAT 240

Sbjct 210304 CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCTGATGAGCAGTAGCGAT 210363

Query 241 TCACGTTTGGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA 300

Sbjct 210364 TCACGTTTGGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA 210423

Query 301 TGTTCCTTGTAACTCTCTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 350

Sbjct 210424 TGTTCCTTGTAACTCTCTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 210473

Escherichia coli O157:H7 strain EC20020119 antimicrobial resistance island, genomic sequence

GenBank: HQ018801.1

LOCUS: HQ018801 2001 bp DNA linear BCT 03-APR-2011

DEFINITION: *Escherichia coli* O157:H7 strain EC20020119 antimicrobial resistance island, genomic sequence.

ACCESSION: HQ018801 REGION: 6000..8000

VERSION: HQ018801.1 GI:327185020

KEYWORDS-SOURCE: *Escherichia coli* O157:H7

ORGANISM *Escherichia coli* O157:H7

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2001)

AUTHORS: Ziebell, K., Johnson, R.P., Kropinski, A.M., Reid-Smith, R., Ahmed, R., Gannon, V.P., Gilmour, M. and Boerlin, P.

TITLE: Gene Cluster Conferring Streptomycin, Sulfonamide, and Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* O157:H7 Phage Types 23, 45, and 67

JOURNAL: Appl. Environ. Microbiol. 77 (5), 1900-1903 (2011)

PUBMED:21239555

REFERENCE 2 (bases 1 to 2001)

AUTHORS: Ziebell, K., Johnson, R.P., Kropinski, A.M., Ahmed, R., Gannon, V., Gilmour, M. and Boerlin, P.

TITLE: Direct Submission

JOURNAL: Submitted (04-AUG-2010) Laboratory for Foodborne Zoonoses, Public Health Agency of Canada, 110 Stone Road West, Guelph, Ontario N1G 3W4, Canada

FEATURES Location/Qualifiers

```

source          1..2001
/organism="Escherichia coli O157:H7"
/mol_type="genomic DNA"
                /strain="EC20020119"
                /db_xref="taxon:83334"
misc_feature    <1..>2001
                /note="contains antimicrobial resistance island"
gene            complement(96..1301)
                /gene="tetB"
CDS             complement(96..1301)
                /gene="tetB"
                /note="TetB; similar to NP_052931.1 tetracycline
resistance protein A in Plasmid R100"
                /codon_start=1
                /transl_table=11

```

```

        /product="tetracycline resistance determinant"
        /protein_id="AEA34667.1"
        /db_xref="GI:327185027"
/translation="MNSSTKIALVITLLDAMGIGLIMPVLPVLLREFIASEDIANHFQ
VLLALYALMQVIFAPWLGKMSDRFGRRPVLLLSLIGASLDYLLAFSSALWMLYLGRLL
LSGITGATGAVAASVIADTTTSASQVRVKWFGWLGASFGLGLIAGPIIGGFAGEISPHSP
FFIAALLNIVTFLVVMFWFRETKNTRDNTDTEVGVETQNSVYITLTKTMPILLIYF
SAQLIGQIPATVWVLFTEENRFGWNSMMVGFSLAGLGLLHVSFQAFVAGRIATKWGEKT
AVLLGFIADSSAFAFLAFISEGWLVPVLLLAGGGIALPALQGVMSIQTKSHQQGAL
QGLLVSLTNATGVIGPLLFAVIYNHSLPIWDGWIWIIGLAFYCIILLSMTFMLTPQA
QGSKQETS"
gene          1383..>2001
                /gene="tetR"
    CDS        1383..>2001
                /gene="tetR"
                /note="TetR; similar to NP_058294.1 tetracycline
repressor
protein TetR in Salmonella typhi and NP_052930.1
tetracycline repressor protein TetR in Plasmid R100"
                /codon_start=1
                /transl_table=11
                /product="tetracycline repressor protein"
                /protein_id="AEA34668.1"
                /db_xref="GI:327185028"

/translation="MSRLDKSKVINSALPELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWH
VKNKRALLDALAIEMLDLRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLG
TRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSavgHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
                PTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPAFLEGLLELIICGLEKQKCESGS"
    CDS        complement(1984..>2001)
                /note="similar to NP_052929.1 hypothetical protein
R100p049 in Plasmid R100"
                /codon_start=1
                /transl_table=11
                /product="hypothetical protein"
                /protein_id="AEA34669.1"
                /db_xref="GI:327185029"

/translation="MANLIRKEVTFESSIAAIGAAMSDISRKILSALMDGRAWTATE
LSSVANISASTASSHLSKLLDCQLITVVAQGHRYFRLAGKDIAELMESMMGISLNHG
VHAKVSTPVHLRKARTCYDHLAGEVAVKIYDSLQQQWITENGSMITLSGIQYFHEMG

```

IDVPSKHSRKICCACLDWSERRFHLGGYVGAALFSLYESKGWLTRHLGYREVTITEKG
YAAFKTHFHI "

ORIGIN

1	tgaagctaaa	tcttctttat	cgtaaaaaat	gccctcttgg	gttatcaaga
51	gggtcattat	atttcgcgga	ataacatcat	ttggtgacga	aataactaag
101	cacttgtctc	ctgtttactc	ccctgagctt	gagggggtta	catgaaggctc
151	atcgatagca	ggataataat	acagtaaaac	gctaaaccaa	taatccaaat
201	ccagccatcc	caaattggta	gtgaatgatt	ataaataaca	gcaaacagta
251	atgggccaat	aacaccgggt	gcattggtaa	ggctcaccaa	taatccctgt
301	aaagcacctt	gctgatgact	ctttgtttgg	atagacatca	ctccctgtaa
351	tgcaggtaaa	gcgatcccac	caccagccaa	taaaattaaa	acagggaaaa
401	ctaaccaacc	ttcagatata	aacgctaaaa	aggcaaatgc	actactatct
451	gcaataaatc	cgagcagtac	tgccgttttt	tcgccccatt	tagtggctat
501	tcttcctgcc	acaaaggctt	ggaatactga	gtgtaaaaga	ccaagacccg
551	ctaatgaaaa	gccaaccatc	atgctattcc	atccaaaacg	atcttcggta
601	aatagcacc	acaccgttgc	gggaatttgg	cctatcaatt	gcgctgaaaa
651	ataaataatc	aacaaaatgg	gcatacgttt	aaataaagtg	atgtataccg
701	aattcgattg	cgtctcaacc	cctacttcgg	tatctgtatt	atcacgtgta
751	tttttggttt	cacggaacca	aaacataacc	acaaggaaag	tgacaatatt
801	tagcaacgca	gcgataaaaa	agggactatg	cggtgaaatc	tctcctgcaa
851	aaccaccaat	aataggcccc	gctattaaac	caagcc	caaaa acttgcccct
901	aaccaaccga	accacttcac	gcgttgagaa	gctgaggtgg	tatcggcaat
951	gaccgatgcc	gcgacagccc	cagtagctcc	tgtgatccct	gaaagcaaac
1001	ggcctaata	cagcatccaa	agcgcacttg	aaaaagccag	caataagtaa
1051	tccagcgatg	cgctatttaa	tgacaacaac	agcactgggc	gccgaccaa
1101	tcggtcagac	atctttccaa	gccaaaggagc	aaagataacc	tgcattaacg
1151	cataaagtgc	aagcaatagc	ccaaagtggg	tagcg atatac	ttccgaagca
1201	ataaattcac	gtaataacgt	tggcaagact	ggcatgataa	ggccaatccc
1251	catggcatcg	agtaacgtaa	ttaccaatgc	gatctttgtc	gaactattca
1301	tttcactttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaataa	ctctatcaat
1351	gatagagtgt	caacaaaaat	taggaattaa	tgatgtctag	attagataaa
1401	agtaaagtga	ttaacagcgc	attagagctg	cttaatgagg	tcggaatcga
1451	aggtttaaca	acccgtaaac	tcgcccagaa	gctaggtgta	gagcagccta
1501	cattgtattg	gcatagtaaa	aataagcggg	ctttgctcga	cgccttagcc
1551	attgagatgt	tagataggca	ccatactcac	ttttgcccct	tagaagggga
1601	aagctggcaa	gattttttac	gtaataacgc	taaaagtttt	agatgtgctt
1651	tactaagtca	tcgcatgga	gcaaaagtac	atctaggtac	acggcctaca
1701	gaaaaacagt	atgaaactct	cgaaaatcaa	ttagcctttt	tatgccaaaca
1751	aggtttttca	ctagagaatg	cattatatgc	actcagcgt	gtggggcatt
1801	ttactttagg	ttgcgtattg	gaagatcaag	agcatcaagt	cgctaaagaa
1851	gaaagggaaa	cacctactac	tgatagtatg	ccgccattat	tacgacaagc
1901	tatcgaatta	tttgatcacc	aaggtgcaga	gccagccttc	ttattcggcc

1951 ttgaattgat catatgcgga ttagaaaaac aacttaaag tgaaagtggg
2001 t

Left Primer 2:

Primer_1_F

Sequence: ataacaccggttcattgg

Start: 259 Length: 20 bp

Tm: 60.1 °C GC: 45.0 % ANY: 6.0 SELF:
2.0



Right Primer 2:

Primer_1_R

Sequence: tttcattagcgggtctgg

Start: 560 Length: 20 bp

Tm: 60.1 °C GC: 45.0 % ANY: 2.0 SELF:
0.0

Product Size: 302 bp

Pair Any: 4.0 Pair End: 0.0

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - PFDG4DZY014](#)
[Formatting options](#)
[Download](#)
[Blast report description](#)

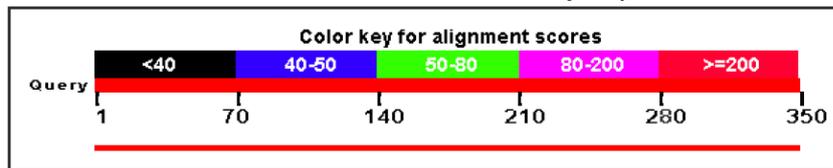
Nucleotide Sequence (350 letters)

RID [PFDG4DZY014](#) (Expires on 05-30 08:42 am)

Query ID	Id Query_1439	Database Name	nr
Description	None	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.31+
Query Length	350		

Graphic Summary

Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Escherichia coli O157:H7 strain EC20020119 antimicrobial resistance island, genomic sequence	647	647	100%	0.0	100%	HQ018801.1

Alignments

Escherichia coli O157:H7 strain EC20020119 antimicrobial resistance island, genomic sequence
 Sequence ID: [gb|HQ018801.1](#) | Length: 32756 | Number of Matches: 1
 Range 1: 6850 to 7199

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
647 bits(350)	0.0()	350/350(100%)	0/350(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	AACCACCAATAATAGGCCCGCTATTAACCAAGCCAAAACCTTGCCCTAACCAACCGA				60
Sbjct 6850	AACCACCAATAATAGGCCCGCTATTAACCAAGCCAAAACCTTGCCCTAACCAACCGA				6909
Query 61	ACCACTTCACGCGTTGAGAAGCTGAGGTGGTATCGGCAATGACCGATGCCGCGACAGCCC				120
Sbjct 6910	ACCACTTCACGCGTTGAGAAGCTGAGGTGGTATCGGCAATGACCGATGCCGCGACAGCCC				6969
Query 121	CAGTAGCTCCTGTGATCCCTGAAAGCAAACGGCCTAAATACAGCATCCAAAGCGCACTTG				180
Sbjct 6970	CAGTAGCTCCTGTGATCCCTGAAAGCAAACGGCCTAAATACAGCATCCAAAGCGCACTTG				7029
Query 181	AAAAAGCCAGCAATAAGTAATCCAGCGATGCGCCTATTAATGACAACAACAGCACTGGGC				240
Sbjct 7030	AAAAAGCCAGCAATAAGTAATCCAGCGATGCGCCTATTAATGACAACAACAGCACTGGGC				7089
Query 241	GCCGACCAAAATCGGTCAGACATTTTCCAAGCCAAGGAGCAAAGATAACCTGCATTAAACG				300
Sbjct 7090	GCCGACCAAAATCGGTCAGACATTTTCCAAGCCAAGGAGCAAAGATAACCTGCATTAAACG				7149
Query 301	CATAAAGTGCAAGCAATACGCCAAAAGTGGTTAGCGATATCTTCCGAAGCA				350
Sbjct 7150	CATAAAGTGCAAGCAATACGCCAAAAGTGGTTAGCGATATCTTCCGAAGCA				7199

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. 18569, complete genome

GenBank: CP011394.1

LOCUS: CP011394 2001 bp DNA linear BCT 11-MAY-2015

DEFINITION: Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. 18569, complete genome.

ACCESSION: [CP011394](#) REGION: 994000..996000

VERSION: CP011394.1 GI:820758584

DBLINK: BioProject: [PRJNA41929](#). BioSample: [SAMN01041085](#)

KEYWORDS-SOURCE: Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. 18569

ORGANISM: [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. 18569](#)

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2001)

AUTHORS: Allard, M.W., Luo, Y., Strain, E., Pettengill, J., Timme, R., Wang, C., Li, C., Keys, C.E., Zheng, J., Stones, R., Wilson, M.R., Musser, S.M. and Brown, E.W.

TITLE: On the evolutionary history, population genetics and diversity among isolates of Salmonella Enteritidis PFGE pattern JEGX01.0004

JOURNAL: PLoS ONE 8 (1), E55254 (2013)

PUBMED: [23383127](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 2001)

AUTHORS: Timme, R., Allard, M.W., Strain, E., Evans, P.S. and Brown, E.

TITLE: Whole genome shotgun sequencing of cultured foodborne pathogen

JOURNAL: Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 2001)

AUTHORS: Strain, E.A., Brown, E., Allard, M.W., Luo, Y. and Timme, R.

TITLE: Direct Submission

JOURNAL: Submitted (23-MAY-2012) Center for Food Safety and Applied Nutrition, United States Food and Drug Administration, 5100 Paint Branch Parkway, College Park, MD 20740, USA

REFERENCE 4 (bases 1 to 2001)

AUTHORS: Strain, E.A., Allard, M.W., Payne, J.S., Evans, P.S. and Timme, R.

TITLE: Direct Submission

JOURNAL: Submitted (08-MAY-2015) Center for Food Safety and Applied Nutrition, United States Food and Drug Administration, 5100 Paint Branch Parkway, College Park, MD 20740, USA

COMMENT Bacterial culture available from Dwayne Roberson, FDA College Park Campus, 5100 Paint Branch Parkway, College Park, MD 20740. Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be found here:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/

```

##Genome-Assembly-Data-START##
Assembly Method      :: SMRT Portal HGAP v. 2.1.1
Assembly Name       :: CFSAN000006_65.0
Genome Coverage     :: 196X
Sequencing Technology :: PacBio RS
##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##
Annotation Provider  :: NCBI
Annotation Date     :: 05/04/2015 11:22:16
Annotation Pipeline  :: NCBI Prokaryotic Genome
Annotation

Annotation Method    Pipeline
:: Best-placed reference protein
set;
GeneMarkS+
Annotation Software revision :: 2.10 (rev. 463717)
Features Annotated      :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA;
                        repeat_region
Genes                   :: 4,612
CDS                    :: 4,434
Pseudo Genes           :: 66
CRISPR Arrays          :: 2
rRNAs                  :: 22 ( 5S, 16S, 23S )
tRNAs                   :: 84
ncRNA                   :: 6
Frameshifted Genes     :: 43
##Genome-Annotation-Data-END##
FEATURES
Location/Qualifiers

source                1..2001
                      /organism="Salmonella enterica subsp. enterica serovar
                      Enteritidis str. 18569"
                      /mol_type="genomic DNA"
                      /strain="18569"
                      /serovar="Enteritidis"
                      /isolation_source="Poultry"
                      /sub_species="enterica"
                      /db_xref="taxon:696867"
                      /country="Mexico"
                      /collected_by="FDA"

gene<1..532
                      /locus_tag="SEE18569_04725"
                      CDS
                      <1..532
                      /locus_tag="SEE18569_04725"
                      /inference="EXISTENCE: similar to AA
                      sequence:RefSeq:WP_001740368.1"
                      /note="involved in regulation of genes necessary for
                      the
                      entry of Salmonella into host cells; Derived by automated
                      computational analysis using gene prediction method:
                      Protein Homology."
                      /codon_start=1

```

```

        /transl_table=11
        /product="type III secretion system regulator InvE"
        /protein_id="AKG76286.1"
        /db_xref="GI:820759478"

/translacion="MIPGSTSGISFSRILSRQTSHQDATQHTDAQAEIQQAEDSSP
GAEVQKFVQSTDEMSAALAQFRNRRDYEKSSNLSNSFERVLEDEALPKAKQILKLIS
VHGGALEDFLRQARSLFPDPSDLVVLVRELLRRKDLEEIVRKKLESLLKHVEEQTDPK
TLKAGINCALKARLFGKTLKPGLLRASYRQFIQSESHEVEIYSDWIASYGYQRRLV
VLDFIGSLLTDIDANDASCSRLEFGQLLRRLTQLKMLRSADLLFVSTLLSYSFTKAF
NAEESWLLLMLSLQPPHEVDSLLADIIGLNALLLSHKEHASFLQIFYQVCKAIPSS
        LFYEEYWQEELLMALRSMTDIAYKHEMAEQRRRTIEKLS"
gene          557..>2001
                /locus_tag="SEE18569_04730"
        CDS          557..>2001
                /locus_tag="SEE18569_04730"
                /inference="EXISTENCE: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_015406314.1"
                /note="Derived by automated computational analysis
using
gene prediction method: Protein Homology."
                /codon_start=1
                /transl_table=11
                /product="type III secretion system protein InvA"
                /protein_id="AKG76287.1"
                /db_xref="GI:820759479"

/translacion="MLLSLLNSARLRPELLLILVLMVMIISMVFIPLPTYLVDFLIALN
IVLAILVFMGSFYIDRILSFSTFPVALLITTLFRLALSISTSRLILIEADAGEI IATF
GQFVIGDSLAVGFVVFVSIIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDGM PGKQMSIDADLK
AGIIDADAARERRSVLERESQLYGSFDGAMKFIKGD A IAGIIIIIFVNF IGGISVGMTR
HGMDLSSALSTYTMLTIGDGLVAQIPALLIAISAGFIVTRVNGSDNMGRNIMTQLLN
NPFVLVVTAILTISMGTLPGFPLPVFVILSVVLSVLFYFKFREAKRSAAKPKTSKGEQ
PLSIEEKEGSSLGLIGDLDKVSTETVPLILLVPKSRREDLEKAQLAERLRSQFFIDYG
VRLPEVLLRDGEGLDDNSIVLLINEIRVEQFTVYFDLMRVVNYSDEVVSFGINPTIHQ
QGSSQYFWVTHEEGEKLRELGYVLRNALDELYHCLAVTLARNVNEYFGIQETKHMLDQ
LEAKFPDLLKEVLRHATVQR ISEVLQRLLSERVSVRNMKLIMEALALWAPREKDVINL
VEHIRGAMARYICHKFANGGELRAVMVSAEVEDVIRK GIRQTS GSTF LSLDPEASANL

```

Pair 2:

MDLITLKLDDLLIAHKDLVLLTSVDVRRFIKKMIEGRFPDLEVLFSFGEIADSKSVNVI
 KTI "

ORIGIN

1 tgaatcacat gaagtggaga tttactctga ctggatagcc agttatggct atcaacgtcg
 61 actggtggta ctggatttta ttgagggttc gctattaacc gatattgacg cgaatgacgc
 121 cagttgttcg cgcctggagt ttggccagct tttacgacgc ctgacgcaac ttaaaatggt
 181 gcgctccgct gacctactgt ttgtgagtac attggtgtcg tattegttta ccaaagcgtt
 241 taatgcggag gagtcgtcgt ggctactact gatgctttcg ctattgcaac agccacatga
 301 agtggattcg ctgtagccg atattatagg tttgaatgcy ttattgctta gtcataaaga
 361 acatgcatcc tttttgcaga tattttatca agtatgtaa gccataacct cttactcctt
 421 ttatgaagaa tattggcagg aagaattggt aatggcgta ctagtatga ccgatattgc
 481 ctacaagcat gaaatggcag aacagcgtcg tactattgaa aagctgtcct aatttaatat
 541 taacaggata cctatagtgc tgctttctct acttaacagt gctcgtttac gacctgaatt
 601 actgattctg gtactaatgg tgatgatcat ttctatgttc gtcattccat tacctaccta
 661 tctggttgat ttctgatcg cactgaatat cgtactggcg atattgggtg ttatggggtc
 721 gttctacatt gacagaatcc tcagttttcc aacgtttcct gcggtactgt taattaccac
 781 gctctttcgt ctggcattat cgatcagtag cagccgtcct atcttgattg aagccgatgc
 841 cggtgaaatt atcgccacgt tcgggcaatt cgttattggc gatagcctgg cggtgggttt
 901 tgttgctctt tctat**tgtcaccggtggtccagtttatcgtt attaccaaag gttcagaacg**
961 cgtcgcggaa gtcgcggccc gattttctct ggatggtagt cccggtaaac agatgagtat
1021 tgatgccgat ttgaaggccg gtattattga tgccgatgct gcgcgcgaac ggcaagcgt
1081 actggaaagg gaaagccagc tttacgggtc ctttgacggt gcgatgaagt ttatcaaagg
1141 tgacgctatt gccggcatca ttattatcct tgtgaacttt attggcggtta tttcggtggg
1201 gatgaccgcg catggtatggatttgcctc cgetctgtct acttatacca tgctgaccat
 1261 tggatgatgg cttgtcgccc agatccccgc attggtgatt gcgattagtg ccggtttttat
 1321 cgtgactcgc gtaaatggcg atagcgataa tatggggcgg aatatcatga cgcagctggt
 1381 gaacaacca tttgtattgg ttgttacggc tattttgacc atttcaatgg gaactctgcc
 1441 gggattcccg ctgccggtat ttgttatttt atcggtggtt ttaagcgtac tcttctattt
 1501 taaattccgt gaagcaaac gtagcgccgc caaacctaaa accagcaaag gcgagcagcc
 1561 gcttagtatt gaggaaaaag aagggtcgtc gttgggactg attggcgatc tcgataaagt
 1621 ctctacagag accgtaccgt tgatattact tgtgccgaag agccggcgtg aagatctgga
 1681 aaaagctcaa cttgcggagc gtctacgtag tcagttcttt attgattatg gcgtgcgcct
 1741 gccggaagta ttgttacgcy atggcgaggg cctggacgat aacagcatcy tattgttgat
 1801 taatgagatc cgtgttgaac aatttacggt ctattttgat ttgatgcgag tggtaaatta
 1861 ttccgatgaa gtcgtgcct ttggtattaa tccaacaatc catcagcaag gtagcagtca
 1921 gtatttctgg gtaacgcatg aagaggggga gaaactccgg gagcttggct atgtgttgcg
 1981 gaacgcgctt gatgagcttt a

Left Primer 2:

Sequence:

Start: 1258 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 50.0 % ANY: 3.0 SELF: 2.0

Right Primer 2:

Sequence:

Start: 1555 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 50.0 % ANY: 2.0 SELF: 0.0

Product Size: 298 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 0.0

BLAST®

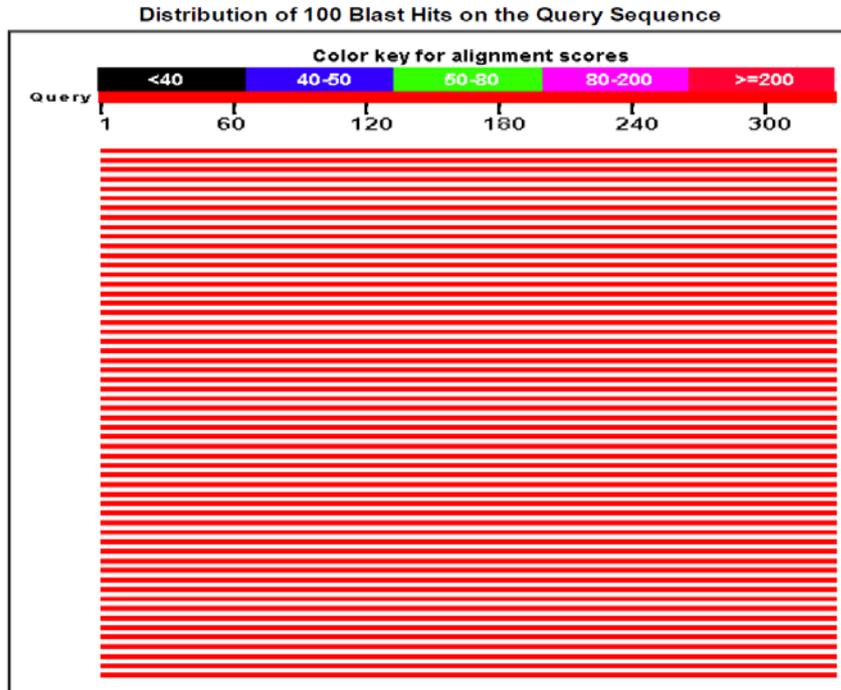
Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - PFF8X8BC014](#)
[Formatting options](#)
[Download](#)
[Blast report description](#)

V00152:Partial sequence of goat gene for beta-globin...

RID	PFF8X8BC014 (Expires on 05-30 09:13 am)	Database Name	nr
Query ID	Id Query_12307	Description	Nucleotide collection (nt)
Description	None	Program	BLASTN 2.2.31+
Molecule type	nucleic acid		
Query Length	331		

[Graphic Summary](#)



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. 18569, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP011394.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain FORC_015, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP011365.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Senftenberg strain KC14SEF specific pathogenicity island SPI-1 genomic sequence	610	610	99%	5e-171	100%	KP279309.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE2-98984-6, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009084.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE3-98983-4, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009085.2
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain SEJ, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP008928.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE6-00219-16, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009088.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE1-1019-1, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009083.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE5-1104-2, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009087.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE4-0317-8, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009086.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE11-10058, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009093.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE10-10052, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009092.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE9-10012, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009091.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE8-1021710, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009090.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE7-100819, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP009089.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Pullorum genome assembly S44987_1, chromosome : l	610	610	99%	5e-171	100%	LK931482.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. 77-1427, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007598.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20100325 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007360.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. CDC_2010K_0968, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007528.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain Durban, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007507.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111510 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007498.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar						

Enteritidis str. SA20094301, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007469.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20094177, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007468.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20084824, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007467.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20084644, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007466.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20090698, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007248.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20110221, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007247.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20100101, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007246.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120008, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007245.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20110354, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007175.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111174, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007253.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111175, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007252.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20110353, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007251.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20110355, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007250.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20090641, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007249.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA19940857 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007465.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121747 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007464.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120929, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007463.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120009 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007438.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111095, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007254.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20100349 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007361.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20100134, complete genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007359.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121970 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007385.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121969 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007384.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121826 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007383.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121825 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007382.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121812 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007381.1

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20094350 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007311.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20094079 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007310.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20093977 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007309.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20093950 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007308.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20093788 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007307.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111554 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007326.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111515 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007325.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20111514 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007324.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20110222 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007323.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. SA20095440 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007319.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120356 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007348.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120240 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007347.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120229 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007346.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120219 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007345.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120213 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007344.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120505 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007353.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120498 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007352.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120497 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007351.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120496 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007350.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20120469 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007349.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. EC20121542 genome	610	610	99%	5e-171	100%	CP007368.1

Alignments

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. 18569, complete genome
 Sequence ID: **gb|CP011394.1** Length: 4685993 Number of Matches: 1
 Range 1: 994910 to 995239

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
610 bits(330)	5e-171()	330/330(100%)	0/330(0%)	Plus/Plus	
Features:					
type III secretion system protein InvA					
Query 2	TCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAA				61
Sbjct 994910	TCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAA				994969
Query 62	GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGAT				121
Sbjct 994970	GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGAT				995029
Query 122	TTGAAGGCCGGTATTATTGATGCGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAAGG				181
Sbjct 995030	TTGAAGGCCGGTATTATTGATGCGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAAGG				995089
Query 182	GAAAGCCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTTATCAAAGGTGACGCTATT				241
Sbjct 995090	GAAAGCCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTTATCAAAGGTGACGCTATT				995149
Query 242	GCCGGCATCATTATTATCTTTGTGAACTTTATTGGCGGTATTTCCGGTGGGGATGACCCGC				301
Sbjct 995150	GCCGGCATCATTATTATCTTTGTGAACTTTATTGGCGGTATTTCCGGTGGGGATGACCCGC				995209
Query 302	CATGGTATGGATTTGTCCTCCGCTCTGTCT		331		
Sbjct 995210	CATGGTATGGATTTGTCCTCCGCTCTGTCT		995239		

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain FORC_015, complete genome
 Sequence ID: **gb|CP011365.1** Length: 4759372 Number of Matches: 1
 Range 1: 2967784 to 2968113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
610 bits(330)	5e-171()	330/330(100%)	0/330(0%)	Plus/Minus	
Features:					
Type III secretion system protein InvA					
Query 2	TCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAA				61
Sbjct 2968113	TCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAA				2968054
Query 62	GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGAT				121
Sbjct 2968053	GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGAT				2967994
Query 122	TTGAAGGCCGGTATTATTGATGCGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAAGG				181
Sbjct 2967993	TTGAAGGCCGGTATTATTGATGCGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAAGG				2967934
Query 182	GAAAGCCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTTATCAAAGGTGACGCTATT				241
Sbjct 2967933	GAAAGCCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTTATCAAAGGTGACGCTATT				2967874
Query 242	GCCGGCATCATTATTATCTTTGTGAACTTTATTGGCGGTATTTCCGGTGGGGATGACCCGC				301
Sbjct 2967873	GCCGGCATCATTATTATCTTTGTGAACTTTATTGGCGGTATTTCCGGTGGGGATGACCCGC				2967814
Query 302	CATGGTATGGATTTGTCCTCCGCTCTGTCT		331		
Sbjct 2967813	CATGGTATGGATTTGTCCTCCGCTCTGTCT		2967784		