



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

LUCIANA DE AZEVEDO RIBEIRO

**CONFIRMAÇÃO DE *SALMONELLA SSP.* EM TILÁPIAS POR IDENTIFICAÇÃO
DO GENE *OMPC* EM COMPARAÇÃO AO GENE *INVA***

BRASÍLIA, DF

2021

LUCIANA DE AZEVEDO RIBEIRO

**CONFIRMAÇÃO DE *SALMONELLA* SSP. EM TILÁPIAS POR IDENTIFICAÇÃO
DO GENE *OMPC* EM COMPARAÇÃO AO GENE *INVA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Farmacêutica Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, DF

2021

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

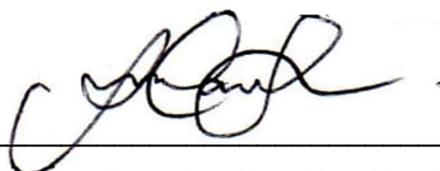
dc de Azevedo Ribeiro, Luciana
Confirmação de *Salmonella ssp.* em tilápias por
identificação do gene *ompC* em comparação ao gene *invA* /
Luciana de Azevedo Ribeiro; orientador Ana Carolina
Almeida de Oliveira Ferreira; co-orientador Daniela
Castilho Orsi. -- Brasília, 2021.
33 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2021.

1. Genética. 2. Microbiologia. 3. Controle de qualidade
de alimentos. I. Almeida de Oliveira Ferreira, Ana Carolina
, orient. II. Castilho Orsi, Daniela, co-orient. III. Título.

LUCIANA DE AZEVEDO RIBEIRO

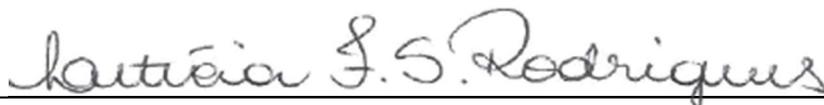
**CONFIRMAÇÃO DE *SALMONELLA* SSP. EM TILÁPIAS POR IDENTIFICAÇÃO
DO GENE *OMPC* EM COMPARAÇÃO AO GENE *INVA*
BANCA EXAMINADORA**



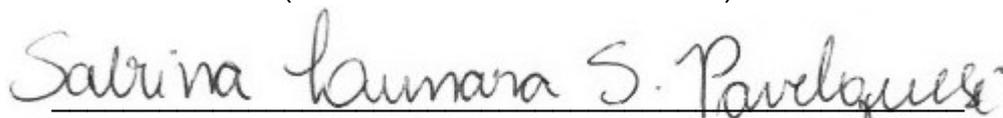
Orientadora: Farmacêutica Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira
(FCE/ Universidade de Brasília)



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



Farmacêutica Leticia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE/ Universidade de Brasília)



Farmacêutica Sabrina Lunara Santos Pavelquesi
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Ana Carolina, pela paciência e pela dedicação durante a composição deste trabalho.

Agradeço às professoras Izabel e Daniela, por me apresentarem a essa área que acabei por criar grande apreço e respeito e por todo o suporte que deram durante minha graduação dentro e fora do laboratório.

Agradeço à Sabrina e Letícia, pelo apoio durante a realização dos experimentos e por me ensinarem as práticas do laboratório.

Às amigas que criei durante o curso de Farmácia, pois a simples presença me incentivou a persistir. A meus amigos fora da faculdade, por serem minha âncora quando queria ser levada à deriva.

E agradeço a minha família por me criarem da melhor maneira que puderam e por insistirem em uma educação de qualidade para mim.

BRASÍLIA, DF

2021

RESUMO

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais proeminente na aquicultura brasileira e tem se mostrado bastante suscetível a contaminação por bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. Essa bactéria é um importante agente patogênico veiculador de doenças transmitidas por alimentos e as diferentes técnicas de isolamento e confirmação de *Salmonella* spp. devem ser estudadas para o controle de qualidade. Esse estudo usou os genes *ompC* e *invA* como marcadores moleculares para a confirmação de bactérias *Salmonella* spp. isoladas de filés de tilápia comercializados no Distrito Federal. Foram coletados 49 filés de tilápia de diferentes estabelecimentos comerciais, no qual foram realizadas as análises microbiológicas para pesquisa de *Salmonella* spp.. Os isolados suspeitos de serem *Salmonella* spp. foram submetidos a identificação dos genes *ompC* e *invA* para confirmação molecular por meio da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os resultados obtidos mostraram que 95,0% (38/40) dos isolados nas análises microbiológicas apresentaram os genes *ompC* e/ou *invA* em seu material genético. Entre esses, o gene *ompC* foi detectado em 92,1% (35/38) das cepas de *Salmonella* spp. e o gene *invA* foi detectado em 97,4% (37/38) das cepas isoladas. A detecção dos genes *ompC* e *invA* por meio da PCR se mostrou uma metodologia confiável para a confirmação de *Salmonella* spp. em alimentos. Além disso, 57,1% (28/49) das amostras frescas de filés de tilápia apresentaram *Salmonella* spp., e, portanto, estavam impróprias para o consumo, o que indica uma maior necessidade de controle nas etapas de produção desse pescado, desde o cultivo até a sua comercialização no Distrito Federal.

Palavras-chave: Tilápia. Qualidade microbiológica. *Salmonella* spp.. Gene *invA*. Gene *ompC*.

ABSTRACT

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most prominent fish species in Brazilian aquaculture and has been shown to be very susceptible to contamination by pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. This bacterium is an important pathogenic carrier of foodborne diseases and the different techniques for isolating and confirming *Salmonella* spp. should be studied for quality control. This study used the *ompC* gene as a molecular marker for confirmation of *Salmonella* spp. bacteria isolated from tilapia fillets sold in the Federal District. For this, 49 tilapia fillets were collected from different commercial establishments, in which microbiological analyzes were carried out for research of *Salmonella* spp.. Isolates were subjected to identification of the *ompC* and *invA* genes for molecular confirmation using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The results obtained showed that 95.0% (38/40) of the isolates in the microbiological analyzes presented the *ompC* and/or *invA* genes in their genetic material. Among these, *ompC* was detected in 92.1% (35/38) of the strains of *Salmonella* spp. and the gene *invA* was detected in 97.4% (37/38) of the strains used. Detection of *ompC* and *invA* genes through PCR was a reliable methodology for the detection of *Salmonella* spp. species in food. In addition, 57.1% (28/49) of the fresh tilapia fillet samples had *Salmonella* spp., and therefore were unsuitable for consumption, which indicates a greater need for control in the production stages of this fish, from cultivation to its commercialization in the Federal District.

Keywords: Tilapia. Microbiological quality. *Salmonella* spp.. *InvA* gene. *OmpC* gene.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A evolução da produção de tilápia na piscicultura brasileira (em mil toneladas) **3**
- Figura 2.** Visualização dos resultados da PCR em transiluminador sob luz ultravioleta **14**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência do primer e tamanho do produto amplificado na PCR para identificação dos genes <i>invA</i> e <i>ompC</i>	11
Tabela 2. Detecção dos genes <i>invA</i> e <i>ompC</i> nas cepas isoladas suspeitas de serem <i>Salmonella</i> spp. das amostras de filé de tilápia	12
Tabela 3. Prevalência de bactérias <i>Salmonella</i> ssp. isoladas das amostras de filé de tilápia.....	16

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Papel da Tilápia na aquicultura brasileira	2
2.2 A Tilápia Fresca como alimento transmissor de <i>Salmonella</i>	4
2.3 Caracterização do gênero <i>Salmonella</i> e do gene <i>OmpC</i>	5
2.4 A PCR como metodologia para identificação de <i>Salmonella</i>	6
3. JUSTIFICATIVA	8
4. OBJETIVOS.....	9
4.1. Objetivo geral	9
4.2. Objetivos específicos	9
5. MÉTODOS	10
5.1. Coleta das amostras e isolamento das cepas de <i>Salmonella</i>	10
5.2. PCR para confirmação molecular das cepas de <i>Salmonella</i>	10
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
7. CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Gramas
°C	Grau Celsius
<i>InvA</i>	Invasion A gene (gene de invasão A)
LIA	Lisina Iron Agar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
<i>OmpC</i>	Outer Membrane Protein C (gene de Proteína de membrana externa C)
OMS	Organização Mundial de Saúde
TSI	Três Açúcares e Ferro
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

1. INTRODUÇÃO

Salmonella spp. tem se mostrado um importante patógeno relacionado às doenças transmitidas por alimentos. Sabe-se que a contaminação do pescado por *Salmonella* spp. está relacionada as práticas de higiene deficientes (FERNANDES *et al.*, 2018). Sendo a tilápia o pescado de maior produção e consumo no Brasil, o país em 4º lugar em ranking mundial (PEIXE BR, 2020), a realização de trabalhos que visam avaliar a qualidade microbiológica da tilápia comercializada no Distrito Federal torna-se bastante relevante.

De acordo com a legislação brasileira, *Salmonella* spp. deve estar ausente em pescados *in natura*, resfriados ou congelados (BRASIL, 2019), entretanto a presença dessa bactéria já foi identificada como agente causador de surtos relacionados a pescados em diferentes partes do mundo (FERNANDES *et al.*, 2018). A presença de *Salmonella* spp. está associada a má qualidade higiênica do pescado, e indica a condição da água no local de captura, uma vez que essa bactéria se encontra no trato intestinal de diversos animais de sangue quente e ocorre a contaminação fecal das águas. Outra possível causa de contaminação do pescado com *Salmonella* spp. é o uso de camas de frango em substituição a fertilizantes minerais nos tanques de cultivo, visando corte de custos e reaproveitamento dos resíduos de granjas (PONTES *et al.*, 2020), e isso representa um risco para o meio aquático, uma vez que as concentrações de microrganismos se tornam elevadas em tanques de aquicultura com pouca troca de água (LEIRA *et al.*, 2017; MLEJNKOVA & SOVOVA, 2012).

Os métodos tradicionais de detecção de *Salmonella* são um conjunto de uso de meios seletivos, testes bioquímicos e sorológicos. Uma boa forma de identificação de *Salmonella* é a detecção do gene *ompC* pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (THUNG *et al.*, 2019). O gene *ompC* codifica proteínas estruturais de membrana externa de *Salmonella* e possui sequências únicas a esses microrganismos, apresentando, portanto, alta especificidade. Em razão disso, o gene *ompC* se mostrou tão eficiente quanto métodos convencionais de detecção de *Salmonella*. (JAWAD & AL-CHARRAKH, 2016).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar o gene *ompC* como marcador molecular para a confirmação de bactérias *Salmonella ssp.* isoladas de filés de tilápia comercializados no Distrito Federal e comparar os resultados obtidos com o gene *InvA*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papel da Tilápia na aquicultura brasileira

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, nas últimas cinco décadas, a oferta de peixe mundial cresceu de forma constante, com um crescimento anual de 3,1% entre os anos de 1961 e 2017, o dobro da taxa de crescimento da população, resultando em um aumento de consumo de peixe *per capita*, de 9 kg para 20,5 kg *per capita* em 2018. No Brasil, espera-se aumentar a produção de peixes no ano de 2030 em 12,9% em comparação a 2018, e um aumento de 32,2% da aquicultura do país (FAO, 2020a).

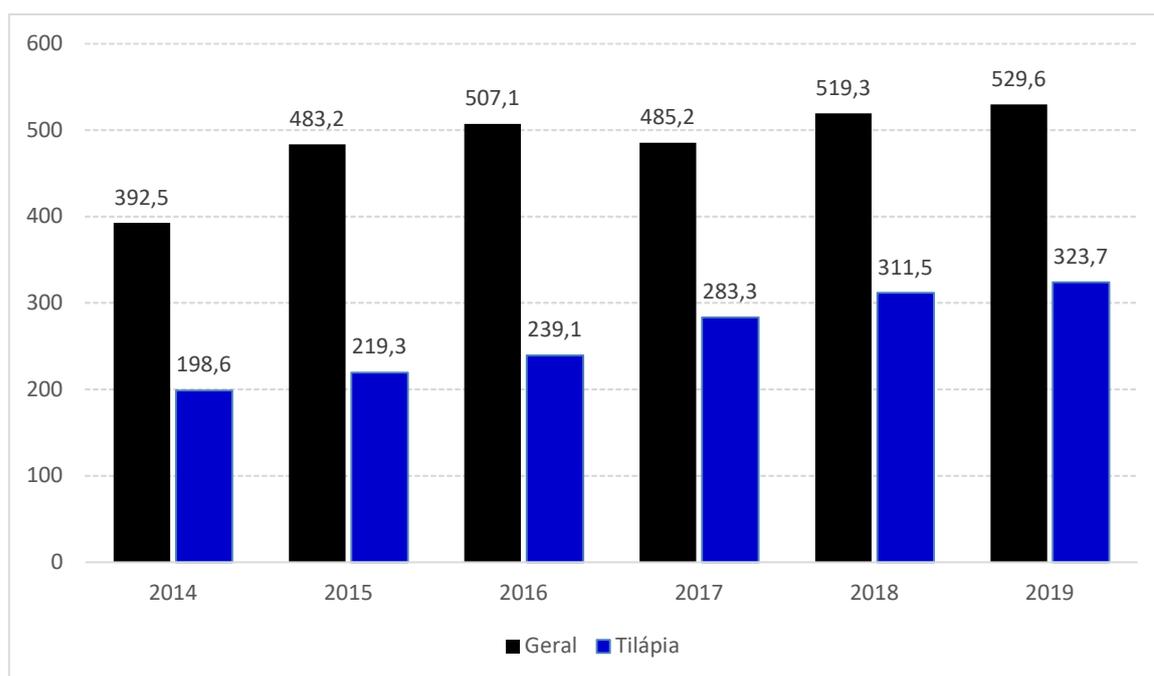
A Lei nº 11959/09, que dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, regula as atividades pesqueiras, define a aquicultura como “a atividade de cultivo de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático, implicando a propriedade do estoque sob cultivo, equiparada à atividade agropecuária”. Os organismos a qual essa lei se refere incluem os peixes, bivalves, e outros animais aquáticos, os quais podem ser cultivados em tanques escavados ou em tanques-redes, em águas marinhas ou continentais (BRASIL, 2009). Pelo decreto nº 4.895 de 2003, que dispõe sobre a autorização de uso de espaços físicos de corpos d’água de domínio da União para fins de aquicultura, e dá outras providências., “os espaços físicos em corpos d’água da União poderão ter seus usos autorizados para fins da prática de aquicultura, observando-se critérios de ordenamento, localização e preferência” (BRASIL, 2003). Hoje, esse decreto foi revogado pelo decreto nº 10.576 de 2020, mas contribuiu para que a produção de pescado aumentasse 123% em uma década, saltando de 257 mil para 574 mil toneladas de pescados entre os anos de 2005 a 2015 (BRASIL, 2016).

Tilápia é um termo popularizado dado ao gênero *Oreochromis* que abrange cerca de 22 espécies em todo o mundo. A facilidade de adaptação e de cultivo desses peixes, somados à boa textura, sabor, elevado valor nutricional e falta de microespinhas tornam sua criação bastante atrativa. As tilápias pertencem ao grupo de peixes de água doce mais cultivado no Brasil, e ao segundo grupo de maior importância mundialmente, com 6 milhões toneladas provenientes da aquicultura,

ficando atrás apenas do grupo das carpas com 29 milhões de toneladas em 2018 (FAO, 2020b). No ano de 2019 se tornou a espécie de peixe mais representativa na piscicultura brasileira, destacando o Brasil como o 4º maior produtor de tilápia no mundo (PEIXE BR, 2020).

A criação de peixes no Brasil foi produtiva em 2019 e o Brasil somou 529,6 mil toneladas de pescado no total, um aumento de crescimento de 1,7% em relação a 2018. De toda a produção de pescado em 2019, a tilápia representou 61,1% desse valor (323,7 mil toneladas), seguida do tambaqui com 19,1% (101,1 mil toneladas). Em estados como o Paraná, líder da criação de peixes no país, 95,2% de toda a sua produção correspondeu à tilápia (IBGE, 2019). O gráfico 1 apresenta o crescimento progressivo na produção de tilápias no Brasil entre os anos de 2014 a 2019.

Figura 1. A evolução da produção de tilápia na piscicultura brasileira (em mil toneladas)



FONTE: IBGE, 2019.

O Distrito Federal (DF) se mostrou uma região de interesse para a produção de peixes, pois tornou-se o terceiro maior consumidor de peixes per capita no Brasil, ficando atrás apenas das cidades São Paulo e Rio de Janeiro. No ano 2020, a população do Distrito Federal consumiu 10 kg/ano, acima da média nacional de 9,5 kg/ano. (BRASIL, 2020)

A alta demanda de peixes e os programas de incentivo dados aos produtores do DF, como o fornecimento de alevinos de tilápia melhorados geneticamente, a produção desse produto não é suficiente para satisfazer a região, pois, embora toda a produção local esteja voltada ao consumo interno, 85% do total comercializado vem de outras regiões do país. Apesar disso, no ano de 2020, a produção de peixes no DF aumentou em relação aos anos anteriores, alcançando 2,06 mil toneladas, ultrapassando as 1,5 mil toneladas/ano que havia se estabilizado desde 2017. (BORGES, 2009; PEIXE BR, 2021).

2.2 A Tilápia Fresca como alimento transmissor de *Salmonella*

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) é um termo genérico para um quadro clínico que consiste em náuseas, vômitos e/ou diarreia, anorexia, acompanhada ou não de febre, que é atribuída à ingestão de água ou alimentos contaminados. Além disso, também podem ocorrer manifestações extraintestinais em órgãos como rins, fígado e sistema nervoso central, dependendo do agente envolvido. É usualmente uma doença autolimitada, mas pode se mostrar grave, podendo levar ao óbito, especialmente em recém nascidos, idosos, indivíduos com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), neoplasias ou acloridria gástrica (BRASIL, 2011).

A regulação da fabricação de alimentos de origem animal é de responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mas pode ser complementada com os códigos sanitários dos estados e municípios. A ANVISA estabelece que a qualidade microbiológica do pescado deve avaliar: *Staphylococcus aureus*, coliformes a 45°C e *Salmonella* spp.. *Salmonella*, em especial, deve estar ausente em qualquer forma de pescado, sem tolerância para amostra significativa (BRASIL, 2019). A salmonelose é uma das principais DTA no mundo, sendo a *Salmonella* uma bactéria encontrada predominantemente em alimentos pouco ácidos, com pH > 4,5 como leite, carnes, pescados e alguns vegetais (BRASIL, 2011). *Salmonella* foi responsável por 7,5% dos casos de infecção alimentar no Brasil em 2016 (FERNANDES *et al.*, 2018).

A presença de *Salmonella* no pescado pode indicar má qualidade higiênica da água de aquicultura. Alguns fatores que favorecem a contaminação da água são o contato desta com redes de esgoto ou fezes de animais hospedeiros da *Salmonella* nos tanques escavados e reservatórios de água desprotegidos da poluição urbana

(FERNANDES *et al.*, 2018). Outra prática que tem se tornado cada vez mais comum é a utilização de camas de frango como adubo orgânico para fertilização dos tanques de piscicultura (PONTES *et al.*, 2020), assim os microrganismos que estariam presentes na cama de frango (incluindo a *Salmonella*) entrariam em contato com a água e, então, com os peixes. Isso se mostra mais aparente em tanques de aquicultura em que não há a troca de água com tanta frequência, o que resulta na elevação das concentrações desses microrganismos (LEIRA *et al.*, 2017; MLEJNKOVA & SOVOVA, 2012).

2.3 Caracterização do gênero *Salmonella* e do gene *ompC*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, e é constituído de duas espécies geneticamente distintas: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a primeira está dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, com um total de 2500 sorovares entre as subespécies de *Salmonella ssp.* Os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são de maior prevalência em casos de septicemia e infecções localizadas (BRASIL, 2011).

Bactérias *Salmonella* são Gram-negativas, geralmente móveis e em forma de bacilo. São fermentadoras de glicose, maltose, manitol, sorbitol, entre outros açúcares, e apesar de usualmente não fermentarem lactose, elas podem adquirir essa característica a partir de transferência de plasmídeos (BRASIL, 2011). Em comparação a outras bactérias Gram-negativas, *Salmonella* é relativamente resistente a fatores ambientais. Nas fezes de seus hospedeiros, por onde é eliminada em grande número, pode sobreviver por volta de 28 meses, 280 dias no solo cultivado e ainda pode chegar a água como resultado de contaminação fecal. No pescado, apresenta capacidade de sobrevivência de várias semanas a meses (BRASIL, 2011).

Na análise convencional para detecção de *Salmonella spp.* em alimentos, a metodologia se divide em quatro partes: pré-enriquecimento; enriquecimento seletivo em Caldo Rappaport Vassiliadis e em Caldo Tetrionato; isolamento em meio seletivo Ágar Hektoen Entérico e em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato e identificação bioquímica presuntiva em Ágar Três Açúcares e Ferro, Ágar Lisina Ferro e Ureia (BRASIL, 2011).

A membrana externa de bactérias Gram-negativas como a *Salmonella* funciona como uma barreira física que auxilia ou dificulta a passagem de substâncias. As

porinas são estruturas proteicas na membrana externa e algumas dessas proteínas de membrana são expressas em altos níveis, como a Proteína de Membrana externa C (*Outer Membrane Protein C - ompC*), que serve como uma barreira para antimicrobianos e outros agentes potencialmente nocivos não entrarem na célula, e está envolvida no transporte de solutos não específicos (CHETRI *et al.*, 2019).

O gene *ompC* se mostrou uma importante ferramenta na virulência da *Salmonella*, essencial para a sua sobrevivência em ambientes de estresse oxidativo e é capaz de regular a susceptibilidade da *Salmonella* a tetraciclinas e florfenicol (MECHESSO & PARK, 2020). O gene *ompC* é um dos principais genes de caracterização e identificação da *Salmonella*, pois é expresso mesmo quando *Salmonella* está em ambientes com baixa ou alta osmolaridade, portanto, pode ser encontrado tanto no ambiente quanto no hospedeiro (JAWAD & AL-CHARRAKH, 2016).

2.4 A PCR como metodologia para identificação de *Salmonella*

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação do material genético até um nível em que seja possível a identificação do DNA. Na técnica de PCR é usada a enzima DNA polimerase que por meio de múltiplos ciclos de replicação, com temperaturas específicas e tempos ajustados para cada etapa, resulta na amplificação do DNA. Primeiramente ocorre a desnaturação da fita de DNA, depois um par de nucleotídeos (Primers Forward e Reverse) se anela às fitas moldes de DNA e então a enzima DNA polimerase segue acrescentando nucleotídeos análogos à sequência de DNA molde. Essas etapas formam um ciclo que se repete entre 25 e 35 vezes e o resultado amplificado pode ser facilmente detectado em gel de agarose ou acrilamida, revelado com brometo de etídeo (CURY *et al.*, 2005).

Apesar de ser encontrada em outros microrganismos como *Escherichia coli*, o gene *ompC* na *Salmonella* possui sequências únicas, o que demonstra que o gene consegue ser um bom alvo para a PCR (JAWAD & AL-CHARRAKH, 2016). No estudo de Kwang *et al.* (1996), todas as 40 amostras de *Salmonella* tiveram resultados positivos na amplificação do gene *ompC*, enquanto a sequência específica de primers usada não foi capaz de amplificar qualquer fragmento de 24 amostras de outras bactérias, indicando que essa sequência possa ser única da *Salmonella*.

Outros genes de interesse da *Salmonella* também foram estudados com o método de PCR para identificação deste gênero. O gene *InvA*, que tem relação com a capacidade de invasão das células epiteliais intestinais, também se mostrou altamente específico em *Salmonella*, com sequências únicas à bactéria (KARMI, 2013).

3. JUSTIFICATIVA

A tilápia é a espécie de pescado mais cultivada no Brasil, sendo assim, é fundamental buscar boa qualidade e segurança alimentar desse produto. Por outro lado, as salmoneloses são uma das principais doenças transmitidas por alimentos. A avaliação do gene *ompC* como confirmador molecular da presença de *Salmonella* em amostras de tilápia, pode auxiliar na utilização desse gene como possível alternativa para detecção dessa bactéria em alimentos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o uso do gene *ompC* como marcador molecular para a confirmação de bactérias *Salmonella ssp.* isoladas de filés de tilápia comercializadas no Distrito Federal.

4.2. Objetivos específicos

- Isolar cepas suspeitas de serem *Salmonella* nas amostras de filés de tilápia por meio das análises microbiológicas;
- Realizar a identificação molecular para confirmação das bactérias *Salmonella ssp.* por meio da detecção do gene *ompC*.
- Comparar os resultados entre genes *ompC* e *InvA*.

5. MÉTODOS

5.1. Coleta das amostras e isolamento das cepas de *Salmonella*

As amostras de filé de tilápia, coletadas em grandes redes de supermercados do Distrito Federal, foram transportadas resfriadas para o laboratório em tempo de 30-50 min, e no prazo máximo de 1 hora após a coleta foram iniciadas as análises microbiológicas. Foram pesadas 25 g em triplicata de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado por 20 minutos, obtendo-se assim a primeira diluição em 10^{-1} . Alíquotas do caldo de enriquecimento foram transferidas para caldo selenito cistina e caldo tetrationato e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, os microrganismos foram isolados em Ágar Salmonella Shigella e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato. As colônias não fermentadoras de lactose foram transferidas para o meio de cultivo Ágar TSI (Três Açúcares e Ferro). Os tubos de TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* foram submetidos a provas bioquímicas (descarboxilação de lisina e não uso da fenilalanina). As bactérias isoladas suspeitas de serem salmonela foram identificadas por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

5.2. PCR para confirmação molecular das cepas de *Salmonella*

As colônias isoladas foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37°C por 16-24 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo no kit comercial "Purelink Genomic DNA®". A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas em eletroforese em gel de agarose, em comparação ao padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando os termocicladores Life Express Thermal Cycler modelo TC-96/G/H(b), Swift MiniPro Thermal Cycler modelo SWT-MIP-0-2-1. A programação do gene *invA* foi realizada em 1 ciclo inicial de 2 min a 95°C, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 1 min para a extensão final. A programação do gene *ompC* foi em 1 ciclo inicial de 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 57°C e 2 minutos a 72°C, então 5

minutos a 72°C. A programação dura por volta de 2 horas e 20 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizado sob iluminação ultravioleta. Para identificação de *Salmonella spp.* foram utilizados os genes *ompC* e *InvA* (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para identificação de *Salmonella spp.* com sequência de bases, produtos de PCR estimados e espécies alvo.

Gene	Sequência de Primer (5'-3')	Amplificação (pares de bases)	Espécie
<i>invA</i> foward	CATTGGTGATGGTCTTGTCG	298 pb	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>
<i>invA</i> reverse	CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG		
<i>ompC</i> foward	ATCGCTGACTTATGCAATCG	204 pb	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>
<i>ompC</i> reverse	CGGGTTGCGTTATAGGTCTG		

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas 49 amostras de filé de tilápia fresca comercializadas em supermercados do Distrito Federal. Foram isoladas 40 cepas suspeitas de serem *Salmonella* spp. nas análises microbiológicas a partir de 29 amostras de filé de tilápia do total de 49 amostras analisadas. A Tabela 2 apresenta os resultados de detecção dos genes *invA* e *ompC* nessas cepas isoladas.

Tabela 2. Detecção dos genes *invA* e *ompC* nas cepas isoladas suspeitas de serem *Salmonella* spp. das amostras de filé de tilápia

Amostras de filé de tilápia	Isolados suspeitos de <i>Salmonella</i>	Detecção do gene <i>invA</i>	Detecção do gene <i>ompC</i>
1	AC1	Sim	Não
	AC2	Sim	Sim
	AC3	Sim	Sim
2	AC4	Sim	Não
3	AC5	Não	Sim
	AC6	Sim	Sim
4	AC7	Sim	Sim
5	AC8	Sim	Sim
6	AC9	Não	Não
7	AC10	Sim	Sim
8	AC11	Sim	Sim
9	AC12	Sim	Sim
10	AC13	Sim	Sim
11	AC14	Sim	Sim
12	AC15	Sim	Sim
13	AC16	Sim	Sim
14	AC17	Sim	Sim
15	AC18	Sim	Sim
16	AC19	Sim	Sim
	AC20	Sim	Sim

17	AC21	Sim	Sim
	AC22	Sim	Não
18	AC23	Sim	Sim
	AC24	Sim	Sim
	AC25	Sim	Sim
19	AC26	Sim	Sim
20	AC27	Sim	Sim
21	AC28	Sim	Sim
22	AC29	Sim	Sim
	AC30	Não	Não
23	AC31	Sim	Sim
	AC32	Sim	Sim
24	AC33	Sim	Sim
25	AC34	Sim	Sim
26	AC35	Sim	Sim
	AC36	Sim	Sim
27	AC37	Sim	Sim
28	AC38	Sim	Sim
	AC39	Sim	Sim
29	AC40	Sim	Sim
	40	37	35

Com um número de 40 cepas de *Salmonella* isoladas, observa-se que somente 2 cepas (C30 e C9) não apresentaram ambos os genes *invA* e *ompC* e, portanto, não foram consideradas *Salmonella*. Nas cepas AC1, AC4 e AC22 houve amplificação somente do gene *invA* e na cepa AC5 houve amplificação somente do gene *ompC*. Esses resultados revelam que os genes *invA* e *ompC* podem ser usados como marcadores moleculares confiáveis para a detecção de *Salmonella ssp.* em alimentos, quando comparados ao total de cepas isoladas por meio dos métodos microbiológicos, visto que 95,0% (38/40) dos isolados suspeitos de *Salmonella* nos métodos tradicionais (meios seletivos e testes bioquímicos) foram confirmados por meio da PCR.

Figura 2. Visualização dos resultados da PCR em transiluminador sob luz ultravioleta

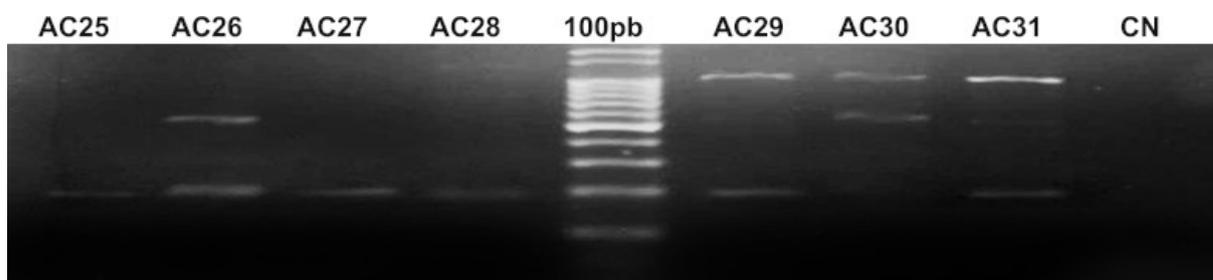


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *ompC* de *Salmonella* ssp. Com marcador de 100 pares de base. AC25 a AC31 = amostras deste estudo com amplicons de *ompC* (204 pb); CN = Controle Negativo.

Excluindo então as cepas não-*Salmonella*, as que não apresentaram os genes *invA* e/ou *ompC* no seu material genético, observa-se que o gene *invA* foi detectado em 97,4% (37/38) das cepas de *Salmonella* isoladas, ausente apenas na cepa AC5 e o *ompC* esteve presente em 92,1% (35/38), não sendo detectado nas cepas AC1, AC4 e AC22. Mostrando que o gene *ompC* está presente em uma porcentagem considerável de bactérias *Salmonella* quando comparado ao gene *invA*, um marcador molecular já estabelecido para detecção de *Salmonella* (ARNOLD *et al.*, 2004; RAHN *et al.*, 1992).

É importante considerar que o gene *invA* é diretamente responsável pela capacidade de penetração celular da *Salmonella* e está presente na maioria das cepas. No estudo de Rahn *et al.* (1992), feito no Canadá, o *invA* apenas não foi observado em sorovares da *Salmonella* Litchfield e *Salmonella* Senftenberg. Semelhantemente, o estudo de Malorny *et al.* (2002), na Alemanha, sugeriu que a ausência do gene *invA* é rara em *Salmonella*, onde do total de 242 cepas isoladas, apenas uma cepa do sorovar Saintpaul não foi identificada a partir da amplificação do gene *invA*, enquanto as outras 19 cepas Saintpaul foram identificadas corretamente. A ausência do gene *invA* indica a possibilidade das cepas em questão não serem invasivas ou de obterem outros métodos para invasão celular e patogenicidade.

Na pesquisa de Santos *et al.* (2001), no Brasil, observou-se a presença do gene *invA* em todas as amostras de *Salmonella* testadas. Assim como no estudo de Arnold

et al. (2004), na Alemanha, no qual foram infectados 24 porcos com *Salmonella*, e após o abate, 14 amostras de cada porco foram submetidas à PCR para identificação do gene *invA*. Todos os porcos em que a *Salmonella* foi introduzida tiveram resultados positivos tanto na PCR quanto no cultivo microbiológico.

O gene *ompC* codifica a biossíntese das porinas da membrana externa do gênero *Salmonella*, estruturas proteicas expressas em altos níveis, onde a porina *ompC* contém sequências de aminoácidos altamente conservadas em sorovares de *Salmonella* tifoide e não tifoïdes clinicamente relevantes (VALERO-PACHECO *et al.*, 2020). Não existem muitos estudos que comparem a sua presença com o gene *invA* em *Salmonella*. Porém, recentemente, o estudo de Azevedo *et al.* (2020), no Brasil, pesquisou a detecção dos genes *ompC* e *invA* em bactérias *Salmonella spp.* submetidas à técnica de PCR e todas as 29 cepas isoladas após cultura característica apresentaram resultado positivo na amplificação dos respectivos genes, demonstrando o método de PCR como uma técnica efetiva, rápida e sensível para a detecção dos genes *invA* e *ompC* em *Salmonella*.

O estudo de Jawad & Al-Charrakh (2016), no Iraque, utilizou o gene *ompC* como o alvo para o diagnóstico de espécies de *Salmonella*, demonstrando que esse gene é um alvo de PCR adequado para a detecção de cepas de *Salmonella*. Semelhantemente, o estudo de Modarressi e Thong (2010), na Malásia, utilizou os genes *ompC* e *hilA*, um gene de transcrição, para confirmação de *Salmonella*, e todas as cepas analisadas apresentaram os genes em eletroforese.

No nosso estudo, do total de 49 amostras de filé de tilápia analisadas, 29 amostras eram suspeitas de estarem contaminadas com *Salmonella spp.*, e dessas, 28 foram confirmadas pela detecção dos genes *invA* e/ou *ompC* na análise molecular, como apresentado na Tabela 3. A legislação brasileira determina que a *Salmonella spp.* deve estar ausente em pescados "in natura", resfriados ou congelados e, portanto, 57,1% (28/49) das amostras de filé de tilápia estavam impróprias para consumo. O estudo de Lerma-Fierro *et al.* (2020), no México, relatou que 33,3% das amostras de tilápia fresca estavam contaminadas com *Salmonella spp.*. Os autores do estudo sugerem que as práticas higiênicas devem ser melhoradas, além da ocorrência de fiscalizações sobre o manuseio e comercialização de pescados.

Tabela 3. Prevalência de bactérias *Salmonella ssp.* isoladas das amostras de filé de tilápia

	Total de amostras	Número de amostras positivas no teste molecular (genes <i>invA</i> e/ou <i>ompC</i>)
	49	28
Total:	100% (49/49)	57,14% (28/49)

Além da qualidade microbiológica da água de criação, considerada uma das vias de introdução da bactéria no pescado, o controle sanitário também deve estar presente nas técnicas de processamento, visto que a contaminação pode ocorrer por meio da manipulação do pescado. A contaminação cruzada com objetos utilizados em outros alimentos também pode ocorrer, uma vez que a *Salmonella* é comumente encontrada em outros animais, como as aves e os bovinos. (MATAÇA, 2014).

No estudo de Cossi *et al.* (2013), no Brasil, quatro açougues foram analisados em busca de *Salmonella* nos instrumentos de manipulação da carne e nas mãos dos funcionários. Quinze cepas apresentaram reações típicas de *Salmonella* em testes bioquímicos e todas foram confirmadas como *Salmonella* com a utilização do gene *ompC* por meio da PCR. Outros genes foram analisados, inclusive o *invA*, que foi detectado em 13 cepas. Nesse estudo as tábuas de corte foram apontadas como um importante veículo de contaminação, sendo o único instrumento em que a *Salmonella* se fez presente.

A Organização Mundial da Saúde estimou aproximadamente 78,4 milhões (95%) de casos de DTA associadas a *Salmonella ssp.* mundialmente em 2010, com o número de mortes estimado em até 50 mil, afetando particularmente crianças abaixo dos 5 anos e pessoas de baixa renda ao redor do mundo (OMS, 2015). No período de 2013 a 2017, 123 casos notificados de DTA no Brasil foram atribuídos a *Salmonella* (3,46%). A salmonelose está fortemente associada ao consumo de ovos ou produtos à base de ovos (CAETANO & PAGANO, 2019), porém a presença de *Salmonella* em alimentos como o pescado também é preocupante pelo grande consumo de peixes no Distrito Federal (BORGES, 2009). A salmonelose pode ser evitada com o preparo em altas temperaturas, por consequência, alimentos preparados a frio têm mais

potencial de apresentar essa bactéria, conforme apresentado no estudo de Gomes *et al.* (2020) ao analisarem amostras de comida japonesa comercializadas no Distrito Federal, onde encontraram níveis de alguns patógenos acima do tolerado, incluindo 7 (25,9%) amostras de sashimi positivas para *Salmonella*.

As salmoneloses, por apresentarem sintomas brandos e autolimitados, muitas vezes não se tem a assistência médica e a notificação de DTA não é realizada. Portanto o número de casos notificados pode ser consideravelmente inferior ao número de surtos de salmonelose por alimentos no Brasil, como é visto em outras partes do mundo (BRASIL, 2011). AMAGLIANI *et al.* (2012) consideram que sistemas de monitoramento por meio de autoridades competentes são fundamentais para a prevenção de contaminação e proteção à saúde pública. Sendo assim, é fundamental um controle mais rígido da qualidade dos alimentos como o pescado fornecido ao consumidor.

7. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o gene *ompC* pode ser usado como marcador molecular para a detecção de *Salmonella ssp.* em alimentos, visto que foi detectado em 92,1% (35/38) das cepas de *Salmonella* isoladas, um número significativo considerando que o gene *invA*, comumente utilizado para confirmação de *Salmonella*, foi detectado em 97,4% (37/38) das cepas. Em relação às quarenta cepas suspeitas de serem *Salmonella* com base nas análises microbiológicas, 95,0% (38/40) dos isolados apresentaram os genes *ompC* e/ou *invA* em seu material genético quando submetidas à PCR, mostrando que as ampliações desses genes específicos podem ser utilizadas como marcadores moleculares confiáveis para a detecção de *Salmonella ssp.*, com a vantagem de tempo em favor à PCR.

E das amostras de tilápia fresca analisadas, 57,1% (28/49) apresentaram *Salmonella*, estando assim impróprias para consumo segundo os padrões microbiológicos para alimentos da legislação brasileira. Com isso, os resultados do experimento revelam a necessidade de melhora nos critérios de higiene na manipulação do pescado, desde a criação da tilápia até sua manipulação. Os estabelecimentos produtores devem atentar-se as condições higiênico-sanitárias e reforçar o monitoramento das águas de piscicultura. E os estabelecimentos comerciais devem atentar-se a contaminação cruzada em ambientes em que a *Salmonella* pode estar presente e acabar contaminando os peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARNOLD, T. *et al.* Impact of *invA*-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of *Salmonella* in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 51, n. 10, p. 459-463, 2004.

AZEVEDO, Everton Cruz *et al.* Multidrug Resistance and Virulence Profiles of *Salmonella* Isolated from Swine Lymph Nodes. **Microbial Drug Resistance**, 2020.

BORGES, Aldamyr Morais Secretaria de Estado de Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Criação de tilápias**. 2. ed. Brasília: Emater-DF, 2009.

BRASIL. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal. **Cooperativa de produtores assume gestão do Mercado do Peixe**, 2020. Disponível em: <http://emater.df.gov.br/cooperativa-de-produtores-assume-gestao-do-mercado-do-peixe/>

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-ndeg-60-de-23-de-dezembro-de-2019.pdf/view>

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aquicultura brasileira cresce 123% em dez anos**, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos>

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

BRASIL. **Lei nº 11.869 de 29 de junho de 2009**. Dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, regula as atividades pesqueiras, revoga a Lei nº 7.679, de 23 de novembro de 1988, e dispositivos do Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967, e dá outras providências, 2009. Disponível em:

BRASIL. **Decreto nº 4.895, de 24 de novembro de 2003**. Dispõe sobre a autorização de uso de espaços físicos de corpos d'água de domínio da união para fins de aquicultura, e dá outras providências, 2003. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/D4895.htm.

CAETANO, Franciele; PAGANO, Mariana. Prevalência de infecções causadas por *Salmonella* sp. no Brasil no período de 2013 a 2017. **Journal of Infection Control**, v. 8, n. 2, 2019.

CHETRI, Shiela *et al.* Transcriptional response of OmpC and OmpF in *Escherichia coli* against differential gradient of carbapenem stress. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2019.

COSSI, Marcus Vinícius Coutinho *et al.* Antimicrobial Resistance and Virulence Profiles of *Salmonella* Isolated From Butcher Shops in Minas Gerais, Brazil. **Journal of food protection**, v. 76, n. 9, p. 1633-1637, 2013.

CURY, Patricia Ramos; FURUSE, Cristiane; ARAÚJO, Ney Soares. Técnica e aplicação da reação da polimerase em cadeia na área odontológica. **Revista Odontológica de Araçatuba**, p. 34-39, 2005.

FAO, Rome. FAO yearbook: fishery and aquaculture statistics 2018. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2020a.

FAO, Rome. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2020b.

FERNANDES, Dandara Virginia Guia Semedo *et al.* Salmonella spp. in the fish production chain: a review. **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, 2018.

GOMES, Karolina Oliveira *et al.* Microbiological Quality Assessment of Sashimi and Sushi Sold in the Federal District, Brazil. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 8, n. 11, p. 687-692, 2020.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal 2014**. 2015.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal 2015**. 2016.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal 2016**. 2017.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal 2017**. 2018.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal 2018**. 2019.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal 2019**. 2020.

JAWAD, Alaa Abdel-Kadhim; AL-CHARRAKH, Alaa H. Outer membrane protein C (ompC) gene as the target for diagnosis of *Salmonella* species isolated from human and animal sources. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 42, 2016.

KARMI, M. Detection of virulence gene (*invA*) in *Salmonella* isolated from meat and poultry products, **International Journal of Genetics**, v. 3, n. 2, 07-12. 2013.

KWANG, J.; LITLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 46-51, 1996.

LEIRA, Matheus Hernandes *et al.* Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **Pubvet**, v. 11, p. 1-102, 2016.

LERMA-FIERRO, A. G. *et al.* Microbiological evaluation of minimally processed and marketed fish in popular market of the city of Tepic Nayarit, Mexico: Sanitary quality of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Tropicultura**, v. 38, n. 2, p. 1–19, 2020.

MATACA, Azido Ribeiro. **Estudo da frequência de *Salmonella ssp* no pescado comercializado no Brasil**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

MECHESSO, Abraham Fikru; PARK, Seung-Chun. Tylosin exposure reduces the susceptibility of *Salmonella* Typhimurium to florfenicol and tetracycline. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 22, 2020.

MODARRESSI, Shabnam; THONG, Kwai Lin. Isolation and molecular sub typing of *Salmonella ssp.* from chicken, beef and street foods in Malaysia. **Scientific Research and Essays**, v. 5, n. 18, p. 2713-2720, 2010.

MLEJNKOVA, H. *et al.* Impact of fishpond manuring on microbial water quality. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 60, n. 3, p. 117-124, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. World Health Organization, 2015.

PEIXE, BR. **Anuário Peixe BR da piscicultura**, 2020. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura, 2020.

PEIXE, BR. **Anuário Peixe BR da piscicultura**, 2021. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura, 2021.

PONTES, W. P. *et al.* Cadeia do pescado: *Salmonella* spp. como agente contaminante. **Revista Ciência e Saúde Animal**, v. 2, p. 48-68, 2020.

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

VALERO-PACHECO, Nuriban *et al.* Conservação da porina *OmpC* entre sorovares de *Salmonella* tifóide e não tifóide. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2966, 2020.

THUNG, T. Y. *et al.* A review of culture-dependent and molecular methods for detection of *Salmonella* in food safety. **Food Research**, v. 3, n. 6, p. 622-627, 2019.