

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

**MAYRLA CRISTIANE SOUZA DOURADO DE OLIVEIRA**

**Avaliação microbiológica e aplicação do Método do Índice de Qualidade (MIQ) para pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) estocado em gelo e comercializado em Brasília - DF**

**BRASÍLIA, DF**

**2015**

MAYRLA CRISTIANE SOUZA DOURADO DE OLIVEIRA

**Avaliação microbiológica e aplicação do Método do Índice de Qualidade (MIQ) para pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) estocado em gelo e comercializado em Brasília - DF**

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

MAYRLA CRISTIANE SOUZA DOURADO DE OLIVEIRA

**Avaliação microbiológica e aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para pintado (*Pseudoplatystoma* sp.) estocado em gelo e comercializado em Brasília - DF**

**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)

BRASÍLIA, DF

2015

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, devo agradecer à Deus, que me abençoou e me deu oportunidade, força, ânimo e determinação por toda essa jornada, todas que já concluí e certamente todas que ainda virão. À minha família, meu pai Walter, por todo esforço e incentivo para me dar condições de concluir todos os meus objetivos, à minha mãe, Rosa Maria, por toda parceria, oração, pela enorme felicidade por cada conquista minha e todo orgulho que sempre expressou, à minha madrinha, Graça, por toda torcida, aconselhamentos e apoio nos melhores e piores momentos, ao meu irmão Vitor, que, com toda certeza, está torcendo e me acompanhando lá do céu. Ao meu namorado, Lucas, que apesar de não ter acompanhado boa parte deste ciclo, se tornou um parceiro indispensável nestes momentos finais.

À minha orientadora e minha co-orientadora, que se fizeram sempre presentes e não se limitaram a me ajudar nas minhas dificuldades e me impulsionaram em todos os momentos.

À minha universidade que me recebeu tão nova e imatura, e hoje, participou da construção de uma mulher e profissional.

## RESUMO

O consumo de carne de pescado vem crescendo exponencialmente no mundo devido a sua qualidade nutricional elevada, sendo uma rica fonte de proteínas e ácidos graxos insaturados na dieta humana. O pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), também conhecido como surubim, é uma espécie de pescado de água doce de grande porte, sua carne é considerada nobre e atualmente, sua criação encontra-se em expansão no Brasil. O objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa das condições microbiológicas de 6 amostras de pintado fresco, resfriado e exposto ao consumo nas peixarias de hipermercados da cidade de Brasília. E também desenvolver o Método do Índice de Qualidade (MIQ) para o pintado cultivado e aplicá-lo no estabelecimento do seu prazo de validade comercial. Os resultados das análises mostraram que 4 amostras (66,67%) tiveram contagens elevadas de bactérias psicotróficas (entre  $1,9 \times 10^6$  a  $9,3 \times 10^7$ ), indicando uma possível condição de refrigeração inadequada. Verificou-se que 2 amostras estavam impróprias para o consumo, devido à presença da bactéria *Salmonella* spp. (confirmada geneticamente). Apesar do número baixo de coliformes totais e de coliformes termotolerantes em todas as amostras, *E. coli* O157:H7 foi identificada através de PCR nas amostras 1 e 6. Também foi verificado que todas as amostras mostraram condições higiênicas insatisfatórias por apresentarem bactérias *Staphylococcus aureus*, uma bactéria relacionada com falta de higiene durante a manipulação. A aplicação do Método de Índice de Qualidade (MIQ) para avaliação do tempo de prateleira para o pintado inteiro, fresco e conservado em gelo foi realizada e o tempo de validade comercial para esta espécie foi de 10 dias de estocagem em gelo (máximo 13 dias de abate). Sendo a região Centro-Oeste a principal região produtora de pintado cultivado, trabalhos que busquem avaliar a qualidade desse pescado se tornam importantes para que haja uma busca na manutenção da qualidade em todos os níveis de produção e comércio.

**Palavras-chave:** pintado, qualidade microbiológica, MIQ, PCR.

## ABSTRACT

The fish meat consumption has been growing exponentially in the world due to its high nutritional value, being a rich source of protein and unsaturated fatty acids in the human diet. Painted (coruscans *Pseudoplatystoma*), also known as catfish is a species of large freshwater fish, their meat is considered noble and currently, its creation is booming in Brazil. The objective of this study was to search the microbiological conditions of 6 samples of fresh painted, cold and exposed to consumption in fishmongers hypermarket in the city of Brasilia. And also develop the Quality Index Method (MIQ) for cultivated painted and apply it in the establishment of its period of validity commercial. The test results showed that 4 samples (66.67%) had high scores of psychotropic bacteria (between  $1,9 \times 10^6$  to  $9,3 \times 10^7$ ), indicating a possible improper cooling condition. It was found that samples 2 were unsuitable for consumption due to presence of the bacterium *Salmonella* spp. (Genetically confirmed). Despite the low number of total coliforms and fecal coliforms in all samples, *E. coli* O157: H7 was identified by PCR in samples 1 and 6. It has also been found that all samples showed unsatisfactory hygienic conditions for presenting *Staphylococcus aureus* a related bacterium with poor hygiene during handling. The implementation of the Quality Index Method (MIQ) for evaluation of the shelf life for the entire painted, fresh and stored on ice was performed, and business time validity for this species was 10 days of storage on ice (maximum 13 days slaughter). It is the Midwest the main producing region of cultivated painted works that seek to assess the quality of the fish become important so that there is a search on maintaining quality at all levels of production and trade.

**Key words:** painted, microbiological quality, MIQ, PCR.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1.	Produção e consumo do pescado em Brasília .....	11
1.2.	A piscicultura do pintado ( <i>Pseudoplatystoma coruscans</i> ) no Brasil .....	12
1.3.	Fatores determinantes na qualidade do pescado .....	13
1.4.	Análises microbiológicas e controle de qualidade do pescado .....	15
1.5.	Avaliação sensorial do frescor do pescado e o Método do Índice de Qualidade (MIQ).....	16
1.6.	Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas.....	18
2.	OBJETIVOS .....	20
2.1.	Objetivo Geral .....	20
2.2.	Objetivos Específicos.....	20
3.	JUSTIFICATIVA.....	21
4.	METODOLOGIA.....	22
4.1.	Coleta e preparo das amostras para as análises microbiológicas .....	22
4.2.	Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas.....	22
4.3.	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	23
4.4.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	25
4.5.	Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp.....	26
4.6.	Extração do DNA bacteriano para análise molecular.....	26
4.7.	Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR .....	28
4.8.	PCR qualitativo .....	29
4.9.	Eletroforese em gel de agarose .....	29
4.10.	Método do índice de qualidade (MIQ) para o pintado .....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1.	Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas no pintado fresco e resfriado .....	32
5.2.	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes no pintado fresco e resfriado.....	34
5.3.	Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. no pintado fresco e resfriado .....	35
5.4.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. no pintado fresco e resfriado.....	37
5.5.	Análises moleculares .....	38

5.6. Método do índice de qualidade (MIQ) para o pintado de cativoiro (peixe inteiro)	43
8. CONCLUSÃO	52
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de pescado.....	11
Tabela 2. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	24
Tabela 3. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	28
Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	28
Tabela 5. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de pintado fresco.....	31
Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de pintado fresco.....	33
Tabela 7. Contagem das colônias no ágar sal, das colônias fermentadoras de manitol no ágar sal manitol e de <i>Staphylococcus aureus</i> , após coloração de gram nas amostras de pintado fresco.....	35
Tabela 8. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de pintado fresco.....	37
Tabela 9. Identificação através de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de pintado fresco e resfriado.....	38
Tabela 10. Esquema preliminar do MIQ do pintado de cativeiro (peixe inteiro).....	42
Tabela 11. Esquema final do MIQ do pintado de cativeiro (peixe inteiro).....	46
Tabela 12. Índice de qualidade (IQ) e tempo de estocagem em gelo (em dias) para o esquema do MIQ do pintado de cativeiro (peixe inteiro).....	47
Tabela 13. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras de pintado mantidas em gelo por 21 dias.....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.....	26
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene CoA de <i>S. aureus</i> .....	39
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene tetB de <i>E. coli</i> .....	40
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene invA de <i>Salmonella ssp</i> .....	41
Figura 5 - Amostra com IQ ZERO.....	43
Figura 6 - Amostra com IQ 13.....	44
Figura 7 – IQ dos olhos do pintado.....	45
Figura 8. Relação linear entre o índice de qualidade (IQ) e o tempo de estocagem em gelo (em dias) para o esquema do MIQ do pintado de cativeiro (peixe inteiro).....	47
Figura 9. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas no período de estocagem do pintado em gelo.....	49

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Seleção dos oligonucleotídeos utilizados no estudo, com uso do BLAST.....	61
--	----

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. Produção e consumo do pescado em Brasília

Entende-se por pescado todo animal que, em condições normais, vive em água doce ou salgada e que é utilizado como fonte de alimentação. Pescado fresco é aquele quantitativo que não passou por quaisquer processo de conservação (excetua-se o resfriamento) e que tem mantido suas características essenciais e naturais inalteradas. A Tabela 1 apresenta como o pescado pode ser classificado de acordo com a forma de acondicionamento depois do abate (BRASIL, 1997).

**Tabela 1. Classificação do pescado**

<b>PESCADO</b>	<b>FORMA DE CONSERVAÇÃO</b>
FRESCO	Apenas ação do gelo
RESFRIADO	Acondicionado em gelo e mantido entre -0,5 a -2°C
CONGELADO	Não superior a -25°C

Durante as últimas décadas a aquicultura consolidou-se como importante atividade no agronegócio do Brasil, tendo um importante impacto socioeconômico. Entende-se por aquicultura a criação de animais aquáticos em condições controladas, com o objetivo de produção de alimentos para o homem (AYROZA, 2009, OLIVEIRA, 2009). O cultivo de peixes (piscicultura) constitui o grupo mais importante da aquicultura brasileira, sendo responsável por 82,37% da produção aquícola. O restante é dividido entre o cultivo de crustáceos (13,57%) e moluscos (4,06%) (IBGE, 2013).

A atividade de pesca em Brasília é explorada desde a época da construção da capital federal, sendo basicamente restrita ao Lago Paranoá. Porém, com o passar dos anos a produção pesqueira representa uma parcela cada vez menor em relação ao volume de pescado comercializado em Brasília. Em contrapartida, a aquicultura regional é uma atividade que vem demonstrando um considerável crescimento na sua participação no mercado. Nos últimos dez anos (2000 a 2009) a aquicultura apresentou um aumento de 206%, triplicando o volume de pescado

criado em Brasília (BORGES, 2010). Segundo o IBGE, em 2013, a produção de peixes no Distrito Federal foi de 800 toneladas e acredita-se que esse valor tende a aumentar nos próximos anos.

A carne de pescado é muito consumida pela população mundial, sendo uma importante fonte de proteínas de alta qualidade na alimentação atual. As carnes provenientes dos peixes são uma opção saudável por serem ricas em proteínas e ácidos graxos insaturados (BOMBARDELLI et al., 2005; FARIAS e FREITAS, 2008; RIBEIRO et al., 2009). O Distrito Federal é o segundo mercado consumidor de pescado do país, só fica atrás de São Paulo. Em apenas quatro anos (2007 a 2011), o consumo anual médio de pescado por habitante em Brasília passou de 12,8 para 14 kg, bem acima da média nacional, que é de aproximadamente 9 kg per capita (AMUSUH, 2012; BORGES, 2010). No estudo de Borges (2010) quando se avaliou a venda de peixes no DF no segmento de peixarias e feiras, o pintado apresentou desempenho superior ao salmão, mostrando grande potencial de mercado.

## **1.2. A piscicultura do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) no Brasil**

O pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), também conhecido como surubim, é um peixe tropical que habita exclusivamente a água doce podendo ser encontrado nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, como Amazônica, Prata e São Francisco (FAUSTINO et al, 2007). O pintado é um peixe de grande porte podendo atingir 50 kg na natureza e apresenta manchas escuras arredondadas pelo corpo. Atualmente o pintado é uma das espécies mais atingidas pela construção de hidroelétricas, pela poluição dos rios e pela pesca predatória (FAGUNDES, 2009).

O pintado possui atributos favoráveis para a aquicultura, como crescimento rápido, alto valor econômico da carne e grande aceitação no mercado nacional. O pintado apresenta alta taxa de crescimento, atingindo 2,0 kg/ano, tamanho estabelecido pelo mercado consumidor. A porcentagem de filé de pintado, com média de 48,26%, apresenta-se superior à da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com média de 33%. A carne do pintado é considerada nobre, tanto pelo gosto como pela ausência de espinhos intramusculares. Sua carne possui sabor pouco acentuado, cor clara, textura firme e baixo teor de gordura. Essa espécie apresenta, também, grande potencial para a pesca esportiva (ALMEIDA FILHO et al., 2010; FAGUNDES, 2009).

O pintado é uma espécie carnívora, de hábitos noturnos, que tem demonstrado crescimento satisfatório em sistemas de criação onde é alimentado com ração contendo alto teor de proteína de origem animal. Seu cultivo em larga escala, sempre esbarrou na viabilização da produção de juvenis e na ausência de tecnologia para a engorda. Atualmente, o desenvolvimento da piscicultura com a criação de bagres carnívoros como o pintado é uma realidade devido aos conhecimentos gerados pela pesquisa e empreendimentos por parte da iniciativa privada, especialmente por produtores particulares localizados no estado do Mato Grosso do Sul (FAGUNDES, 2009; SCORVO FILHO, 2005).

A criação de pintado encontra-se em franca expansão no Brasil, porém a produção ainda é modesta (2.043 toneladas no ano de 2010) e concentrada na região Centro-Oeste (MPA, 2012). Segundo dados do IBGE (2013) a produção de pintado, cachara e pintachara (todos peixes do gênero *Pseudoplatystoma*) no Brasil em 2013 foi de 15.715 toneladas, sendo a região Centro Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) responsável pela produção de 13.029 toneladas (82,91%).

### **1.3. Fatores determinantes na qualidade do pescado**

O peixe é considerado um dos alimentos proteicos com maior facilidade de sofrer deterioração devido a diversos fatores intrínsecos, que incluem a grande atividade de água nos tecidos, a ação rápida das enzimas autolíticas, o pH próximo da neutralidade e a presença de microrganismos que podem se desenvolver rapidamente devido a riqueza de nutrientes presentes. Além da sua microbiota natural que está localizada, principalmente, nos intestinos, guelras e limo superficial, fatores extrínsecos como a qualidade da água, a captura do pescado e a temperatura de conservação, também influenciam a velocidade de deterioração do pescado (GOMES, 2006; FARIAS e FREITAS, 2008; RIBEIRO et al., 2009).

Na execução da técnica de aquicultura, as operações de limpeza dos tanques de criação merecem especial atenção, pois melhoram a qualidade da água, reduzem as doenças bacterianas e parasitárias do pescado e também garantem a boa higiene e boas características organolépticas ao animal capturado, evitando contaminações por este meio (FREIRE e GONÇALVES, 2013). Os peixes que são criados em

ambientes poluídos por esgotos e dejetos que podem carregar consigo muitos microrganismos patogênicos (GUZMÁN et al., 2004).

As etapas da fase de manipulação do pescado fresco que estão entre a captura e o processamento final são fundamentais e determinantes para a qualidade do produto final (GOMES, 2006; RIBEIRO et al., 2009). Para que o abate tenha reconhecimento humanitário, deve haver uma insensibilização imediata do animal ou deve ser escolhida uma técnica que evite a dor e o sofrimento. Entende-se por *rigor mortis* o momento pós abate em que ocorre o enrijecimento corporal do pescado. No período pós-morte, o oxigênio não chega às células, e estas, para que sobrevivam imediatamente, fazem uso do glicogênio estocado nos músculos e da glicólise anaeróbia, produzindo ácido lático e diminuindo então o valor do pH da carne do pescado (ALMEIDA et al., 2006; ECHEVENGUA et al., 2008; FREIRE e GONÇALVES, 2013).

A deterioração bacteriana do pescado é retardada até o término do *rigor mortis*. Logo, quanto mais prolongada for a rigidez, maior será o tempo de conservação do pescado. O estresse causado por um abate mal executado diminui consideravelmente as reservas de glicogênio dos músculos, o que proporciona uma menor redução do pH da carne e menor duração da fase de *rigor mortis*. Assim as condições de captura do pescado afetam diretamente o tempo de duração *rigor mortis* e a vida de prateleira do produto final (ALMEIDA et al., 2006; ECHEVENGUA et al., 2008; FREIRE e GONÇALVES, 2013).

Outro fator fundamental na conservação do pescado é o abaixamento da temperatura por meio do resfriamento. O resfriamento normalmente é feito por meio do uso do gelo, que deve ser de ótima qualidade microbiológica, pois sua qualidade afetará diretamente a qualidade do pescado. A quantidade de gelo deve ser suficiente para manter a temperatura do pescado por volta de 0 a 2°C. Peixes submetidos a esse método são denominados de pescado fresco ou resfriado (GIAMPIETRO e REZENDE-LAGO, 2009; SCHERER et al., 2004).

Quando o gelo é empregado de maneira correta e em quantidade adequada, ele contribui para a qualidade do pescado reduzindo a temperatura até 0 a 2°C, havendo então um atraso nas alterações enzimáticas e bacterianas e banhando o pescado em águas limpas e frias resultantes da fusão do gelo, arrastando assim

considerável quantidade de muco, sangue e microrganismos (GIAMPIETRO e REZENDE-LAGO, 2009; SCHERER et al., 2004).

#### **1.4. Análises microbiológicas e controle de qualidade do pescado**

Processos de controle de qualidade podem ser considerados e entendidos como ações que busquem a aquisição pelo consumidor de alimentos de boa qualidade, livres de contaminantes de natureza química, física ou biológica, que possam acarretar problemas à saúde (VELLOSO, 2004). A análise microbiológica qualitativa e quantitativa é fundamental para conhecer as condições de higiene de processamento dos alimentos, determinar possíveis riscos que aquele alimento pode oferecer à saúde dos consumidores e também estimar o tempo de longevidade do alimento nas condições de prateleira (SILVA, 2002).

A perda inicial de qualidade do pescado fresco se deve as atividades autolíticas *post mortem*, contudo, as alterações causadas pelo crescimento de bactérias são consideradas a principal causa de deterioração do pescado. O pescado pode ser veiculador de microrganismos patogênicos para o homem, causando doenças em que os consome (Doenças Transmitidas por Alimentos) (RIBEIRO et al., 2009). Os parâmetros microbiológicos adotados pela resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) para o pescado *in natura* compreendem a contagem de *Staphylococcus aureus*, coliformes termotolerantes (*E. coli*) e a pesquisa de *Salmonella* em 25 g de amostra.

Os estafilococos são bactérias gram positivas, anaeróbicas facultativas, com temperatura ótima de crescimento de 30 a 37°C. *Staphylococcus aureus* é um dos microrganismos mais implicados em casos de intoxicação alimentar (NETO, SILVA e STAMFORD, 2002). A intoxicação causada pelo *S. aureus* é desencadeada pelo consumo de enterotoxinas que são produzidas por esta bactéria durante seu processo de multiplicação no alimento. A presença de *S. aureus* no pescado ocorre, predominantemente, por meio da manipulação. A bactéria *Staphylococcus aureus* habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode contaminar as mãos do homem e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica. O patógeno é encontrado em 30% da população humana e um a dois

terços destes possuem cepas enterotoxigênicas, produtoras de toxina proteica termoestável (CUNHA NETO et al., 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A *Escherichia coli* é uma das espécies predominantes de anaeróbios facultativos no intestino de homens e animais e geralmente é inofensiva para o hospedeiro. Apesar disso, determinados sorotipos podem causar Doenças Transmitidas por Alimentos. *Escherichia coli* tem sido comumente isolada a partir de fragmentos estomacais e intestinais dos peixes que são criados em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes, assim, o estudo da flora microbiana dos peixes permite a avaliação das condições de criação dos mesmos (GUZMAN et al., 2004).

Outra enterobactéria que pode estar presente no pescado cultivado em água poluída é a *Salmonella* spp. O principal habitat das salmonelas é o trato intestinal de aves, répteis e seres humanos. Geralmente, os alimentos são contaminados pelo contato com águas poluídas e direta ou indiretamente pelas fezes dos animais. A *Salmonella* spp, bactéria causal da salmonelose, é um dos principais agentes etiológicos de casos de surtos de toxinfecções (GUIMARÃES, et al. 2001). Segundo AMPOFO e CLERK (2003) bactérias do gênero *Salmonella* têm sido frequentemente associadas ao trato intestinal dos peixes e também são capazes de sobreviver e multiplicar no muco e tecidos do peixe. Portanto, tornam os peixes um potencial veículo de transmissão de doenças alimentares.

### **1.5. Avaliação sensorial do frescor do pescado e o Método do Índice de Qualidade (MIQ)**

As propriedades sensoriais dos alimentos determinam a aceitabilidade do produto no mercado consumidor e, portanto, sua viabilidade econômica. No caso do pescado, o frescor tem grande importância pelo fato de constituir o principal critério que determina a sua aceitação. O pescado é avaliado pelos consumidores com um rigor ainda maior do que muitos outros produtos de origem animal, por ser um alimento mais perecível. A análise sensorial é uma ferramenta importante na avaliação da qualidade do pescado fresco, sendo comumente utilizada tanto pelos consumidores, quanto pelo setor pesqueiro e pelos serviços de inspeção sanitária (AMARAL e FREITAS, 2013; BERNARDI et al., 2013).

O método conhecido como "Quality Index Method" (QIM), traduzido para o português como o Método do Índice de Qualidade (MIQ), foi originalmente desenvolvido em 1980 pela "Tasmanian Food Research Unit", mas a maioria dos esquemas de MIQ para diversas espécies de pescado foram desenvolvidos na Europa, onde esse método é largamente empregado. Inicialmente o MIQ foi desenvolvido para peixes inteiros armazenados em refrigeração e hoje em dia, tem sido aplicado em outros produtos, como filés e peixes congelados (AMARAL e FREITAS, 2013; BERNARDI et al., 2013).

O método do Índice de Qualidade tomou grande importância na Comunidade Europeia como uma medida alternativa para ultrapassar as dificuldades encontradas nas tabelas sensoriais ("Esquema EU", CEE - Regulamento n.º103/76) de avaliação do pescado fresco, as quais fazem uso de três níveis de qualificação: E - extra, com alta qualidade; A - boa qualidade; B - satisfatória, não levando em conta as diferenças biológicas entre as espécies, gerando grande deficiência (AMARAL e FREITAS, 2013; BERNARDI et al., 2013). O desenvolvimento de uma aliança estratégica, entre os institutos europeus de pesquisa pesqueira, chamada "QIM-EUROFISH", foi de suma importância para a globalização do método (QIM EUROFISH, 2008).

O Método do Índice de Qualidade baseia-se na avaliação objetiva dos principais atributos sensoriais de cada espécie de peixe, através de um sistema de pontos de demérito. Consiste na avaliação dos diversos atributos de qualidade do pescado fresco, como aparência, textura, olhos, guelras e como ocorre a modificação destes atributos de acordo com o tempo de estocagem. A cada atributo é dada uma pontuação, que varia de zero a três ou de zero a dois (de acordo com o seu grau de importância), sendo considerado zero como a melhor e dois ou três como a pior pontuação. As pontuações registradas em cada característica somam-se para dar uma pontuação sensorial total, o denominado Índice de Qualidade (IQ). Quanto mais próximo o IQ estiver de zero, mais fresco o pescado estará (AMARAL e FREITAS, 2013; QIM EUROFISH, 2008; SVEINSDOTTIR et al., 2003).

O objetivo do desenvolvimento do MIQ para várias espécies é a obtenção de uma relação linear em que o Índice de Qualidade aumente com o tempo de armazenagem em gelo. Além de avaliar a qualidade do pescado em questão, o MIQ permite a previsão da validade comercial da espécie estudada. Quando a correlação linear entre o Índice de Qualidade (IQ) e tempo de armazenamento em gelo é obtido,

as pontuações totais demérito podem ser utilizadas para prever o período de validade comercial restante. Embora o MIQ seja uma ferramenta importante para prever o fim da validade comercial ou o tempo de rejeição, ele deve ser estimado com a ajuda e o apoio de outros métodos de avaliação, como as análises microbiológicas e físico-químicas (AMARAL e FREITAS, 2013; BERNARDI et al., 2013; SANT'ANA et al., 2011).

O Método de Índice de Qualidade (MIQ) vem sendo adaptado para várias espécies de pescado: filé de bacalhau fresco (*Gadus morhua*) (BONILLA et al., 2007), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (SVEINSDOTTIR et al., 2003), sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis* e *Cetengraulis edentulus*) (ANDRADE et al., 2012), corvina (*Micropogonias furnieri*) (TEIXEIRA et al., 2009), dourada (*Sparus aurata* L.) (SIMAT et al., 2012), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (RODRIGUES, 2008), entre outros.

Para a o desenvolvimento do esquema do MIQ é importante escolher um pescado que tenha sido produzido com boas práticas de fabricação e boa qualidade higiênico-sanitária. A primeira etapa do MIQ é desenvolvida por 2 a 3 avaliadores com experiência em avaliação sensorial de pescado e consiste na familiarização com a espécie em questão, com descrição e listagem dos atributos de qualidade, dando origem a um esquema de MIQ preliminar. Na segunda etapa do MIQ o esquema preliminar deve ser aprimorado para obter o esquema oficial e 4 a 6 julgadores devem ser treinados para aplicar o esquema do MIQ corretamente. Na terceira etapa do MIQ o esquema oficial deve ser validado e para isso o pescado deve ser avaliado no mínimo a cada 3 dias pelos julgadores treinados durante todo o período de estocagem no gelo. O MIQ deve ser aplicado para estabelecer a correlação entre o IQ e o tempo de estocagem no gelo. Durante esse período análises físico-químicas e microbiológicas devem ser incluídas para determinar o grau de deterioração e comparar com os resultados do MIQ (BERNARDI et al., 2013).

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

Atualmente um diagnóstico completo e preciso em casos de infecções alimentares é um desafio para que haja um controle adequado dos casos isolados e surtos. Diante de inovações tecnológicas disponíveis, hoje em dia já são utilizados sistemas moleculares que estão sendo empregados com a finalidade de triagem e

confirmação para diagnóstico microbiológico de algumas espécies de microrganismos causadores de toxinfecções (DICKEL et al., 2005).

A reação em cadeia da polimerase – PCR – é uma técnica molecular altamente sensível e específica capaz de detectar até uma cópia de DNA de qualquer célula e produzir resultados em poucas horas. O diagnóstico de diversas doenças infecciosas, não só de origem alimentar, tem sido feito através da amplificação específica de sequências de ácidos nucleicos por meio da PCR (RODRIGUES et al., 2011).

A utilização da PCR no diagnóstico microbiológico surgiu como uma opção a mais em relação aos métodos de cultura tradicionais já utilizados há bastante tempo. Comparando com os métodos convencionais, esta técnica apresenta diversas vantagens como um bom limite de detecção, maior poder de tipificação e discriminação, além de um potencial para que possam ser realizados trabalhos com espécies bacterianas que não são cultiváveis nos meios de cultura tradicionais (GANDRA et al., 2008).

Outro ponto que valoriza a utilização do método analítico PCR na verificação da presença de microrganismos patogênicos em alimentos é a confirmação e esclarecimento, já que métodos microbiológicos tradicionais apresentam desvantagens como presença de resultados falso-negativos e longo tempo para liberação de resultados. Sendo assim, a aplicação da técnica da PCR tem o objetivo de reduzir ou eliminar inconveniências e erros que possam ter passado pelos métodos microbiológicos convencionais (RODRIGUES et al., 2011).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo do presente trabalho foi adaptar e aplicar o Método do Índice de Qualidade (MIQ) para o pintado cultivado afim de estabelecer o seu prazo de validade comercial. Também foram pesquisadas as condições microbiológicas do pintado fresco, resfriado e exposto ao consumo nas peixarias de hipermercados da cidade de Brasília – DF.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Adaptar e aplicar o Método de Índice de Qualidade para avaliação dos aspectos sensoriais do pintado fresco e conservado em gelo, com determinação do seu frescor e do tempo de longevidade.
- Realizar nas amostras de pintado fresco as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* sp. e pesquisa de *Salmonella* sp.
- Aplicar a técnica de PCR para caracterização genética de bactérias suspeitas de serem patogênicas (*S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* sp.).

### 3. JUSTIFICATIVA

Os trabalhos com foco em controle microbiológico de alimentos são, em sua totalidade, de grande importância e impacto, não só para a comunidade acadêmica, em termos de conhecimento e pesquisa, mas também para a comunidade em geral, que está diretamente ligada com o consumo.

O consumo de pescado vem aumentando de forma exponencial em todo o mundo nos últimos anos, sendo a carne do pescado uma importante fonte de proteínas, vitaminas e minerais. A carne proveniente de peixes como o pintado tem baixo teor de gordura e baixo valor calórico, o que incentiva o seu consumo pela população em busca de uma alimentação mais saudável. A carne do pintado é considerada nobre, tanto pela aparência (sabor pouco acentuado, cor clara e textura firme) como pela ausência de espinhos intramusculares.

Diante do aumento do consumo também se faz necessário o aumento da produção através da prática piscicultura e o controle de qualidade do pescado produzido. Sendo o pescado considerado um dos alimentos proteicos com maior facilidade de sofrer deterioração, a qualidade da carne do pescado deve ser priorizada desde a fase de produção até a fase de comercialização do produto final.

O desenvolvimento do Método do Índice de Qualidade (MIQ) para estabelecimento do prazo de validade comercial do pintado tem uma forte relevância, já que, na literatura, ainda há poucos registros que relacionem este método com o pintado.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Coleta e preparo das amostras para as análises microbiológicas**

Foram coletadas seis amostras de pintado inteiro e eviscerado, que, posteriormente foram cortadas em postas, comercializadas em quatro hipermercados de Brasília no período de Setembro a Novembro de 2014. As coletas das amostras foram realizadas no mesmo dia em que se iniciaram as análises laboratoriais, sendo as mesmas transportadas dos supermercados por tempo máximo de uma hora até o laboratório. Para o preparo das amostras, 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 foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A numeração das amostras foi feita em ordem de coleta (1 ao 6) para que a origem das amostras não fosse revelada.

### **4.2. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas**

Para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas e a 7°C  $\pm$  1°C por 7 dias para bactérias psicrotróficas. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente, e expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

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

A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que estima a densidade de 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, inoculou-se 1 ml de cada diluição em uma série de 3 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 e a incubou-se a 37°C durante 24-48 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais.

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

**Tabela 2. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.**

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	–

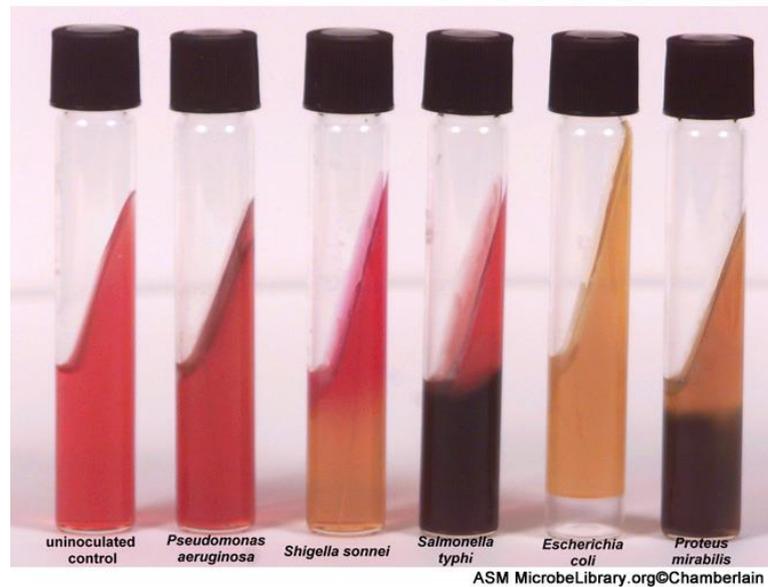
**FONTE:** <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods>

#### 4.4. Pesquisa de *Salmonella* sp.

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

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em ágar Salmonella Shigella 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 1). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de  $H_2S$  como *Salmonella* (ANVISA, 2010). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.



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

#### **4.5. Contagem de *Staphylococcus* sp.**

Para a contagem de *Staphylococcus* sp., as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar Mueller Hinton suplementado com cloreto de sódio 7% (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 fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

#### **4.6. Extração do DNA bacteriano para análise molecular**

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 12 h. 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 6 mL. Foram adicionados 250 µL 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 50 µL 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®).

#### 4.7. 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>, ANEXO 1), 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  $\Delta G$  de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo**

<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Sequência (5' → 3')</b>	<b>Produto estimado</b>	<b>Espécie</b>
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		

#### **4.8. PCR qualitativo**

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

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

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

#### **4.9. Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no 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).

#### **4.10. Método do índice de qualidade (MIQ) para o pintado**

Os experimentos foram feitos entre Novembro de 2014 e Abril de 2015. O pintado fresco de cativeiro foi adquirido na cidade de Brasília, porém foram coletadas amostras com procedência rastreada com origem em uma fazenda produtora localizada no estado de Tocantins. Em todas as etapas do MIQ as amostras de pintado foram adquiridas 3 dias após o abate (contagem assegurada pelo rastreamento da amostra) e a partir daí começou-se a considerar o tempo zero de estocagem no gelo. Foram adquiridos 4 peixes inteiros e eviscerados para a observação inicial, 4 peixes para o treinamento e 4 peixes para o estudo de validação do MIQ. Os peixes tinham um peso entre 2,3 e 2,7 quilos. Os peixes foram mantidos em gelo (potável e filtrado) dentro de caixas, que foram armazenadas dentro de um refrigerador. Diariamente ou a cada 2 dias foi adicionado gelo fresco nas caixas para repor o gelo derretido.

Para desenvolver o esquema preliminar do MIQ do pintado mantido em gelo, na primeira etapa foram selecionados dois avaliadores com experiência em microbiologia de pescado e avaliação sensorial. A cada dois dias, os peixes foram escolhidos aleatoriamente e examinados por um intervalo de tempo de até 16 dias após o abate. As principais alterações sensoriais nos peixes foram selecionadas e descritas em detalhe no esquema preliminar (Tabela 10). A pontuação de 0 a 3 ou 2 pontos de demérito foi dada para cada mudança de parâmetro avaliado. As observações foram realizadas sob condições padronizadas e em temperatura ambiente.

Na segunda etapa, o desenvolvimento do MIQ incluiu o treinamento de 4 avaliadores. O esquema preliminar foi explicado aos avaliadores e estes realizaram várias sessões de avaliação sensorial para observar o pintado estocado por diferentes períodos no gelo (entre 3 e 21 dias após o abate). No final desta etapa, foi elaborada

a versão final do esquema do MIQ. As observações foram realizadas sob condições padronizadas e em temperatura ambiente.

Na terceira etapa, para a validação do MIQ, os 4 avaliadores treinados avaliaram os peixes escolhidos aleatoriamente e de acordo com o esquema do MIQ, para estabelecer a correlação entre o IQ e o tempo de estocagem no gelo. Durante esse período foram realizadas análises microbiológicas com contagem total de mesófilos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas no pintado fresco e resfriado

De acordo com a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos – ICMSF (2002), a quantificação de microrganismos mesófilos e psicotróficos é um bom indicador microbiológico utilizado no controle de qualidade de alimentos. Apesar da legislação atual (BRASIL, 2001) não estabelecer valores limites na quantificação desses microrganismos nos alimentos em geral, um número elevado desses microrganismos indica um risco aumentado da presença de patógenos e da fase inicial de deterioração, com perdas de qualidade sensorial e nutricional do alimento (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A Tabela 5 apresenta as contagens totais de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas seis amostras de pintado fresco analisadas neste estudo. Os resultados foram expressos como médias de unidades formadoras de colônias por grama de pescado (UFC/g) e como log de UFC/g com o desvio padrão.

**Tabela 5. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de pintado fresco.**

Amostras	Bactérias mesófilas		Bactérias psicotróficas	
	UFC/g	log UFC/g ± DP	UFC/g	log UFC/g ± DP
Amostra 1	9,7x10 <sup>4</sup>	4,98 ± 0,03	2,2x10 <sup>5</sup>	5,34 ± 0,16
Amostra 2	6,9x10 <sup>6</sup>	6,83 ± 0,11	9,3x10 <sup>7</sup>	7,96 ± 0,02
Amostra 3	8,6x10 <sup>3</sup>	3,93 ± 0,62	6,9x10 <sup>6</sup>	6,83 ± 0,11
Amostra 4	2,2x10 <sup>5</sup>	5,34 ± 0,26	1,9x10 <sup>6</sup>	6,27 ± 0,14
Amostra 5	9,2x10 <sup>2</sup>	2,96 ± 0,48	1,7x10 <sup>4</sup>	4,23 ± 0,04
Amostra 6	2,2x10 <sup>4</sup>	4,34 ± 0,28	2,8x10 <sup>6</sup>	6,44 ± 0,08

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

De acordo com FRANCO e LANDGRAF (2008) contagens de bactérias mesófilas na carne crua entre  $10^3$  e  $10^6$  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 somente a amostra 2 apresentou alta contagem de mesófilos ( $6,9 \times 10^6$  UFC/g). Segundo a ICMSF (1986), a contagem de mesófilos no pescado acima de  $10^6$  UFC/g é usualmente um indicador de matéria prima velha, com longo período de estocagem no gelo ou abuso de temperatura durante a estocagem. As outras amostras mostraram contagens baixas ou aceitáveis de mesófilos (entre  $9,2 \times 10^2$  e  $2,2 \times 10^5$  UFC/g).

Já para a contagem de microrganismos psicrotróficos, todas as amostras apresentaram valores mais elevados, sendo que as amostras 2, 3, 4 e 6, ou seja, 66,67% das amostras tiveram altas contagens de psicrotróficos (entre  $1,9 \times 10^6$  a  $9,3 \times 10^7$ ). As bactérias psicrotróficas são um grupo de microrganismos com crescimento visível a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  em 07 a 10 dias. Os microrganismos aeróbios psicrotróficos em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira dos alimentos refrigerados, por constituírem seus principais deterioradores (APHA, 2001). Muitos microrganismos tem a capacidade de deteriorarem o pescado por ações de enzimas proteolíticas e lipolíticas, mesmo estando em baixas temperaturas de estocagem, logo, a proliferação de microrganismos psicrotróficos influencia diretamente o frescor do pescado e sua vida de prateleira (LANZARIN et. al., 2011).

Os resultados de algumas amostras neste estudo podem ser comparados ao estudo de COSTA (2009), onde o filé de pintado coletado em uma indústria de processamento de pescado mostrou contagem de mesófilos de  $2,7 \times 10^5$  UFC/g e contagem de psicrotróficos de  $3,2 \times 10^4$  UFC/g. Já no estudo de LANZARIN et. al. (2011), que realizaram uma estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado fresco, mantido em embalagem de polietileno e estocado em câmara frigorífica (0 a  $3^\circ\text{C}$ ) por 37 dias, as contagens de psicrotróficos foram baixas ou nulas no período inicial da estocagem. As contagens de psicrotróficos se mantiveram zeradas até o 8º dia de estocagem, havendo aumento progressivo a partir do 11º dia de estocagem, variando de 1,12 a 6,54 log UFC/g.

## 5.2. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes no pintado fresco e resfriado

Coliformes totais são bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, conhecidos por serem anaeróbios facultativos não esporulados, com capacidade de crescer em presença de sais biliares e principalmente, produzir gás e ácidos a partir do processo de fermentação de lactose, em temperaturas de 35-37°C no período de 24-48 horas. Contagens elevadas de coliformes totais evidenciam possíveis problemas higiênicos no processamento, possíveis contaminações pós-sanitização ou pós-processo e provável presença de microrganismos patogênicos entéricos (FRANCO e LANDGRAF, 2008; SOUSA, 2006).

Coliformes termotolerantes são considerados subgrupo dos coliformes totais, os quais fermentam lactose também com produção de gás em temperaturas mais elevadas (44,5 a 45,5°C) no período de 24-48 horas (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A análise de coliformes termotolerantes tem objetivo de indicar a presença de material fecal na amostra, e a partir disso, ser possível a avaliação da presença de patógenos que ofereçam risco de toxinfecção alimentar. Uma contagem elevada de coliformes termotolerantes indica deficiência no processo de manipulação e higiene dos alimentos (SANTOS, 2013). A Tabela 6 apresenta os resultados deste estudo para a determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de pintado fresco.

**Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de pintado fresco.**

Amostras	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes
	NMP/g	NMP/g
Amostra 1	$0,9 \times 10^1$	$0,4 \times 10^1$
Amostra 2	$2,4 \times 10^2$	ausente
Amostra 3	$0,6 \times 10^1$	ausente
Amostra 4	$5,7 \times 10^1$	$0,6 \times 10^1$
Amostra 5	$2,3 \times 10^1$	$0,6 \times 10^1$
Amostra 6	$1,6 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$

Os resultados foram expressos como média de medidas em duplicata

Neste estudo, a amostra 6 teve a maior enumeração de coliformes totais e de coliformes termotolerantes ( $1,6 \times 10^1$  UFC/g). As outras amostras mostraram um número baixo de coliformes totais e de termotolerantes. No estudo posterior de biologia molecular, 2 culturas isoladas (coliformes termotolerantes) foram testadas e foram geneticamente confirmadas como *E. coli* patogênica. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabelece valores limites para coliformes termotolerantes no pescado “in natura” resfriado. A ICMSF (1986) preconiza um limite máximo de  $5,0 \times 10^2$  UFC/g para *E. coli* no pescado fresco ou congelado.

Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por DELBEM et. al. (2010), que verificaram enumeração de  $2,1 \times 10^1$  NMP/g para coliformes a 45°C no tempo zero de estocagem no gelo em amostras de pintado (peixe inteiro) coletadas de pescadores artesanais da cidade de Corumbá-MS, no Rio Paraguai. No entanto, após 3 dias de estocagem no gelo a enumeração de coliformes termotolerantes subiu para  $5,0 \times 10^2$  NMP/g, mostrando que esse pescado se tornou inadequado para consumo humano.

### **5.3. Contagem de *Staphylococcus* sp. no pintado fresco e resfriado**

Pertencentes à família *Micrococcaceae*, bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem células esféricas, são gram positivas imóveis não esporuladas e possuem um metabolismo fermentativo e respiratório. Dentro deste gênero, *Staphylococcus aureus* é a espécie contaminante mais comum encontrada em alimentos, sendo um dos principais responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade destas bactérias em produzir e liberar enterotoxinas causadoras de intoxicações (LORENZON, 2009).

Conhecidas como enterotoxinas estafilocócicas, estas tem características termoestáveis e podem ser encontradas no alimento mesmo após o processo de cozimento, o que é um agravante para a ocorrência de quadros de intoxicações alimentares, sendo que, vários estudos apontam os manipuladores do alimento como principais responsáveis pela transmissão deste microrganismo (NETO, SILVA e STAMFORD, 2002).

A Tabela 7 apresenta os resultados da contagem de bactérias *Staphylococcus* sp. nas amostras de pintado fresco.

**Tabela 7. Contagem das colônias no ágar sal, das colônias fermentadoras de manitol no ágar sal manitol e de *Staphylococcus aureus*, após coloração de gram nas amostras de pintado fresco.**

Amostras	Agar sal	Agar Sal Manitol	Coloração de gram
	(total de colônias)	(colônias amarelas)	( <i>S.aureus</i> )
	UFC/g	UFC/g	UFC/g
Amostra 1	1,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>
Amostra 2	1,5x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>
Amostra 3	6,6x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>	5,6x10 <sup>2</sup>
Amostra 4	2,0x10 <sup>2</sup> *	2,0x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>
Amostra 5	2,6x10 <sup>3</sup> **	8,0x10 <sup>2</sup>	7,0x10 <sup>2</sup>
Amostra 6	5,3x10 <sup>2</sup>	5,3x10 <sup>2</sup>	5,3x10 <sup>2</sup>

Os resultados no ágar sal foram expressos como média de medidas em triplicata; \* somente uma placa apresentou colônias; \*\* duas placas apresentaram colônias e o resultado foi expresso como média.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece o valor limite de 1,0x10<sup>3</sup> UFC/g para contagem de *Staphylococcus aureus* no pescado “in natura”, refrigerado, que não será consumido cru. A contagem de *S. aureus* em números inferiores a 1,0x10<sup>3</sup> UFC/g, normalmente, indica condições higiênicas inapropriadas e/ou processamento deficiente, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada (SIMON e SANJEEV, 2007). Os resultados deste estudo mostraram que as seis amostras de pintado, ou seja, 100% das amostras apresentaram cepas de *S. aureus* indicando condições higiênicas inapropriadas. Porém todas as amostras estavam de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001), com contagem de colônias de *S. aureus* inferiores a 1,0x10<sup>3</sup>UFC/g. No estudo posterior de biologia molecular, algumas amostras foram testadas e foram geneticamente confirmadas como *S. aureus*.

Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por RIBEIRO et al. (2009), onde a partir da análise de 74 amostras de pescado processado, 100% das amostras apresentaram cepas de *S. aureus*, sendo que 73 amostras apresentaram contagens menores que 1,0x10<sup>2</sup> UFC/g e apenas 1 amostra apresentou contagem de 1,0x10<sup>3</sup> UFC/g. No estudo de DELBEM, et al (2010), não foram identificadas colônias características de *S. aureus* em amostras de pintado (peixe inteiro) coletadas de

pescadores artesanais da cidade de Corumbá-MS, no Rio Paraguai e estocadas no gelo.

#### **5.4. Pesquisa de *Salmonella* spp. no pintado fresco e resfriado**

Microrganismos do gênero *Salmonella* são pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, morfologicamente são bacilos gram negativos, e bioquimicamente, podem fermentar glicose e produzir gás, e geralmente são sacarose e lactose negativos (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A *Salmonella* spp. é a principal bactéria envolvida em casos de toxinfecções alimentares, sendo um problema atual de saúde pública, daí sua importância nos estudos de controle de qualidade de alimentos (GUIMARÃES, et al. 2001).

O pescado pode ser uma fonte de contaminação potencial de espécies de *Salmonella* spp. O habitat da *Salmonella* spp. é o 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 ou humanos portadores da bactéria e/ou pelo contato com águas poluídas. A presença de *Salmonella* sp. pode indicar falha em qualquer das etapas de processamento do alimento, comprometendo a qualidade, sendo que, as consequências para a saúde do consumidor podem ir desde uma toxinfecção até a morte oriunda de complicações (D' Aoust, 2007; RIBEIRO et al. 2009).

A Tabela 8 apresenta os resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de pintado fresco.

**Tabela 8. Pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de pintado fresco.**

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

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

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece que a carne de pescado “in natura”, resfriada ou congelada deve estar livre de *Salmonella* spp. em 25g. Neste estudo, as amostras 1 e 2, ou seja, 33,34% das amostras estavam impróprias para o consumo humano, pois apresentaram cepas de *Salmonella* sp.

DELBEM et al., (2010) obtiveram resultados ausentes de *Salmonella* em amostras de pintado (peixe inteiro) coletadas de pescadores artesanais da cidade de Corumbá-MS, no Rio Paraguai e estocadas no gelo. No entanto, trabalhos que analisaram o pescado proveniente de cultivo obtiveram *Salmonella* spp. em algumas das amostras analisadas. No trabalho de LORENZON et al. (2010) foi detectada a presença de bactéria do gênero *Salmonella* em uma amostra de músculo e em duas amostras de trato gastrintestinal de peixes de pesque-pagues situados na microbacia do Córrego Rico, SP. A presença do microrganismo no trato gastrintestinal de peixes pode ser justificada pelo contato com águas contaminadas. LINDER et al. (2011) detectaram *Salmonella* em 5,7% de peixes analisados de alguns pesqueiros no Estado de São Paulo. Segundo AMPOFO e CLERK (2003) bactérias do gênero *Salmonella* têm sido frequentemente associadas ao trato intestinal dos peixes e também são capazes de sobreviver e multiplicar no muco e tecidos do peixe.

## **5.5. Análises moleculares**

No presente estudo, algumas colônias isoladas suspeitas de serem *S. aureus* provenientes das amostras 1, 2 e 5 foram testadas, sendo que após as análises

moleculares todas as amostras foram geneticamente confirmadas como *S. aureus* (Figura 2). Duas colônias suspeitas de serem *E. coli* provenientes da amostra 1 e da amostra 6 foram analisadas, sendo que após as análises moleculares as amostras foram geneticamente confirmadas como *E. coli* O157:H7 (Figura 3). E por fim, as duas colônias suspeitas de serem *Salmonella* spp. provenientes da amostra 1 e da amostra 2 foram analisadas e após as análises moleculares foram geneticamente confirmadas como *Salmonella enteritidis* (Figura 4).

A Tabela 9 apresenta a identificação das colônias isoladas através de PCR e as amostras de pintado de onde essas bactérias foram isoladas.

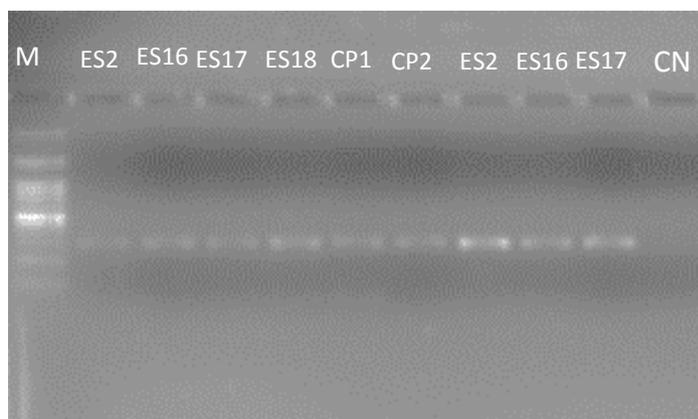
**Tabela 9. Identificação através de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de pintado fresco e resfriado**

Número da colônia	Amostra de pintado	Resultado molecular
ES16	1	<i>Staphylococcus aureus</i>
ES17	2	<i>Staphylococcus aureus</i>
ES18	5	<i>Staphylococcus aureus</i>
EC 14	6	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
EC 15	1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
S 12	1	<i>Salmonella enteritidis</i>
S 13	2	<i>Salmonella enteritidis</i>

A Figura 2 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*. A região gênica da coagulase (CoA) possui repetições polimórficas que podem ser usadas para diferenciar material isolado de *S. aureus*, sendo que, a proteína coagulase é considerada um fator de virulência importante para *S. aureus*. A positividade para proteína coagulase é utilizada para indicar a patogenicidade de um material isolado toxigênico, sugerindo, então, ser um

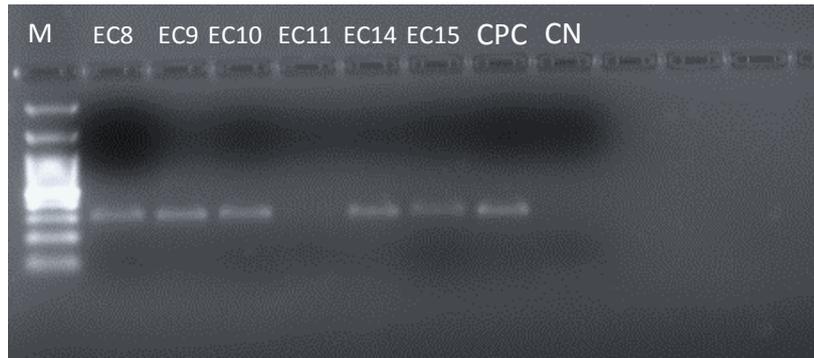
indicador confiável para enterotoxigenicidade. Sabe-se ainda que, toxinas produzidas por *S. aureus* apresentam geralmente resistência à penicilina e outros antibióticos. (SHOPSIN et. al. 2000 & LUZ, 2008)



**Figura 2. 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 de *S. aureus* cedida por ARAÚJO (2015); ES16, ES 17 e ES 18 = amostras deste estudo com fragmentos de CoA (303 pb) obtidos a partir de DNA de *S. aureus*; CP1 e CP2= Controle Positivo (cepa ATCC 25923 *S. aureus*); CN = Controle Negativo.**

A Figura 3 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*. Vários estudos relatam a resistência microbiana de alguns genes de *E. Coli*. a aminoglicosídeos, sulfonamidas e tetraciclinas. A região gênica tetB é frequente responsável por resistência microbiana a tetraciclina. (PYATOV, 2014)



**Figura 3. 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 suspeitas de *E. coli* cedidas por ARAÚJO (2015); EC 14 e EC 15 = amostras deste estudo com fragmentos de tetB (302 pb) obtidos a partir de DNA de *E. coli* O157:H7; CPC = Controle Positivo (cepa ATCC 35218 *E. coli*); CN = Controle Negativo.**

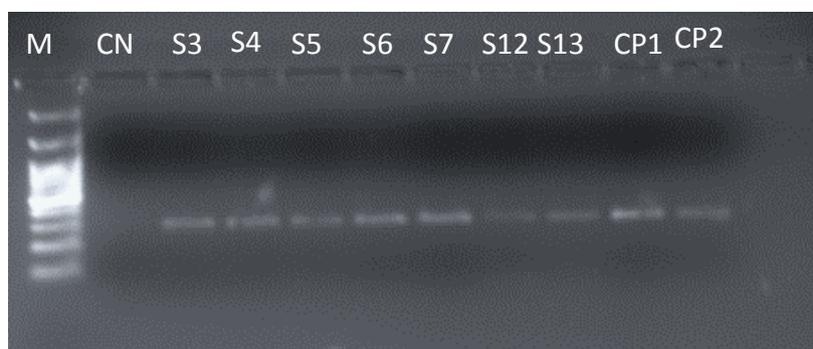
*Escherichia coli* O157:H7 é um sorotipo muito estudado nos Estados Unidos. Sua transmissão se dá através dos alimentos contaminados, principalmente em produtos de origem animal como carne crua ou mal cozida e leite cru, mas pode também ser disseminada através de água não clorada. O principal reservatório é o trato gastrointestinal de bovinos e a bactéria se encontra nas fezes dos bovinos. (WHO, 2011).

Esse sorotipo de *E. coli* é extremamente virulento, necessitando menos de 100 células para infecção e tem seu principal fator de virulência na produção da verotoxina ou toxina tipo Shiga. Na maioria dos casos, a doença é auto-limitada, mas estima-se que em até 10% dos casos, essa enterite pode ser complicada pela síndrome uremica hemolítica, caracterizada por anemia hemolítica e insuficiência renal aguda, com taxa de mortalidade de 3-5%, especialmente em crianças pequenas e idosos. No geral, a síndrome uremica 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 sequela renal, geralmente leve, em torno de 50% dos sobreviventes (SODERSTROM, 2008; WHO, 2011).

A Figura 4 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* ssp.. 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 lócus 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 4. 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 suspeitas de *Salmonella* spp. cedidas por ARAUJO (2015); S12 e S13 = amostras deste estudo com fragmentos de *invA* (298 pb) obtidos a partir de DNA de *Salmonella enteritidis*; CP1= Controle Positivo 1 (amostra cedida por MAFRIN, 2013), CP2= Controle Positivo 2 (amostra cedida por BARBOSA, 2014); CN = Controle Negativo.**

## 5.6. Método do índice de qualidade (MIQ) para o pintado de cativeiro (peixe inteiro)

Na primeira etapa estabelecida para desenvolver o esquema preliminar do MIQ, os peixes foram fotografados. Não foi possível estabelecer os olhos como parâmetro de avaliação nesta etapa, pois, durante a observação das amostras, os olhos não apresentaram mudanças consideráveis. Estabeleceu-se o esquema preliminar do MIQ do pintado (Tabela 10), atingindo-se pontuação máxima do índice de qualidade (IQ) de 13 pontos de demérito, com descrição de 5 atributos sensoriais para o aspecto geral, além da cor das guelras e aspecto do abdômen.

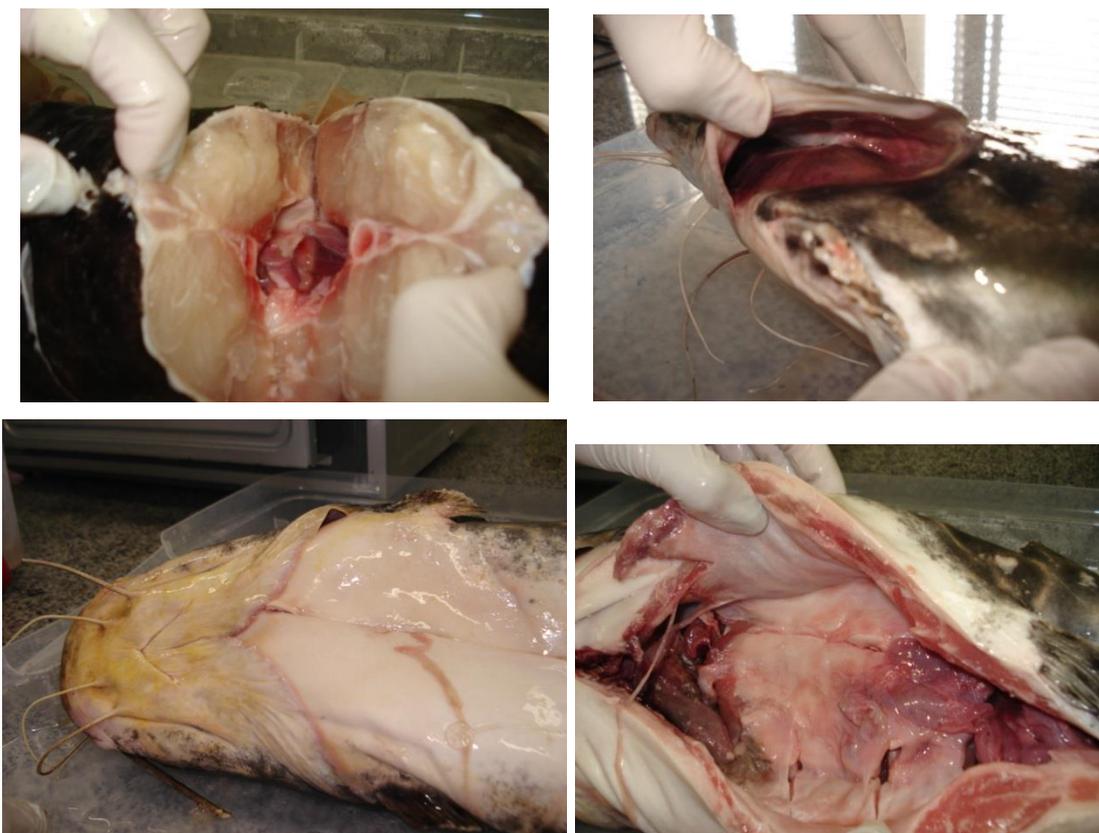
**Tabela 10. Esquema preliminar do MIQ do pintado de cativeiro (peixe inteiro)**

Parâmetros de qualidade		Descrição	Pontos
ASPECTO GERAL	Aparência da pele	Pele intacta, com as manchas bem definidas	0
		Pele machucada, com cor mais escura	1
		Pele machucada, com cor mais escura e manchas menos definidas.	2
	Odor	Odor de peixe fresco	0
		Odor azedo quando abre a caixa, depois odor se dissipa.	1
		Azedo	2
		Pútrido	3
	Musculatura	Textura normal, carne brilhante, cor rosa claro	0
		Textura normal, carne opaca, cor rosa velho ou “cor de carne de coxa de frango”	1
		Carne amolecida, opaca, cor rosa velho, com gordura esfarelado	2
	Aspecto do dorso	Bem branco	0
		Cor amarelada	1
	Muco na pele	Sem muco	0
		Leve viscosidade na pele, muco claro, aquoso.	1
	GUELRAS	Cor	Vermelho vivo
Vermelho escuro			1
Marrom a descorado			2
ABDÔMEN	Aspecto	Normal, rosa claro, brilhoso.	0
		Opaco, rosa velho	1
		Opaco, rosa velho e com odor azedo	2
<b>PONTUAÇÃO MÁXIMA DO ÍNDICE DE QUALIDADE (IQ)</b>			<b>13</b>

As figuras 5 e 6 mostram uma amostra fresca, com IQ zero e as alterações sensoriais de uma amostra deteriorada com IQ de 13 pontos de demérito.

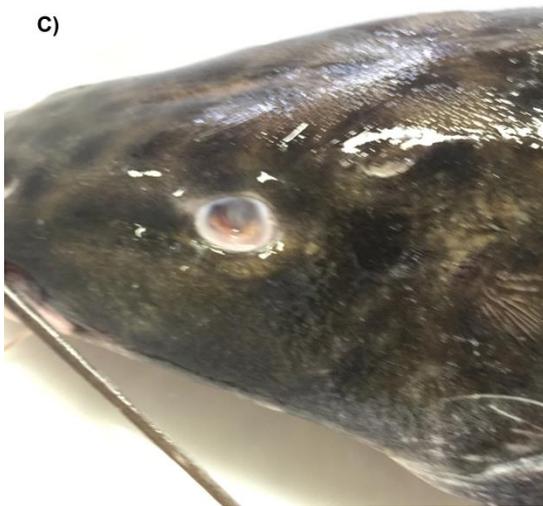


**Figura 5 - Amostra com IQ ZERO – Pele intacta, com as manchas bem definidas. Odor de peixe fresco. Musculatura com textura normal, carne brilhante, cor rosa claro. Dorso bem branco. Pele sem muco. Guelras com cor vermelho vivo. Abdômen com aspecto normal, rosa claro, brilhoso.**



**Figura 6 - Amostra com IQ 13 - Pele machucada, com cor mais escura e manchas menos definidas. Odor muito azedo. Musculatura com carne amolecida, opaca, cor rosa velho, com gordura esfarelado. Dorso amarelado. Pele com leve viscosidade, muco claro, aquoso. Guelras com cor marrom a descolorado. Abdômen opaco, rosa velho e com odor azedo.**

Na segunda etapa estabelecida para treinamento dos avaliadores e desenvolvimento do esquema final do MIQ, os olhos foram incluídos como parâmetro de avaliação. Após discussão dos avaliadores o odor do peixe deteriorado foi alterado de pútrido para muito azedo. O esquema final do MIQ do pintado (Tabela 11) atingiu pontuação máxima do IQ de 16 pontos. A figura 7 mostra o IQ dos olhos do pintado.



**Figura 7 – IQ dos olhos do pintado: A) IQ zero - Olhos salientes, pupila negra e viva, córnea transparente; B) IQ 1 - Olhos planos, pupila negra, córnea ligeiramente opaca; C) IQ 2 - Olhos achatados, córnea opaca, pupila opaca; D) IQ 3 - Olhos afundados, córnea opaca, pupila opaca.**

**Tabela 11. Esquema final do MIQ do pintado de cativoiro (peixe inteiro)**

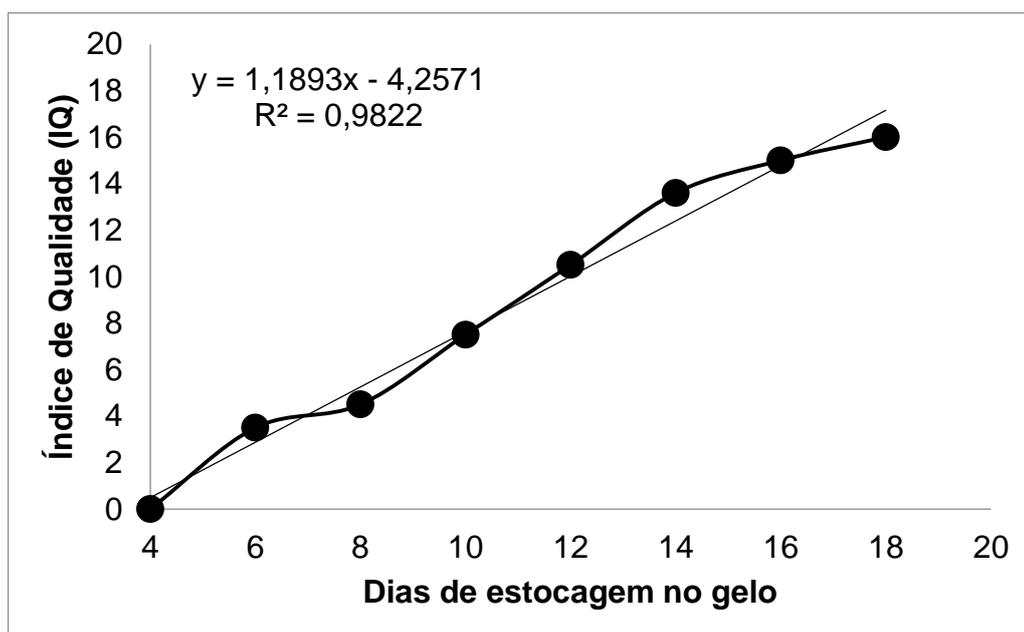
Parâmetros de qualidade		Descrição	Pontos
<b>ASPECTO GERAL</b>	<b>Aparência da pele</b>	Pele intacta, com as manchas bem definidas	<b>0</b>
		Pele machucada, com cor mais escura	<b>1</b>
		Pele machucada, com cor mais escura e manchas menos definidas.	<b>2</b>
	<b>Odor</b>	Odor de peixe fresco	<b>0</b>
		Odor azedo quando abre a caixa, depois odor se dissipa.	<b>1</b>
		Azedo	<b>2</b>
		Muito azedo	<b>3</b>
	<b>Musculatura</b>	Textura normal, carne brilhante, cor rosa claro	<b>0</b>
		Textura normal, carne opaca, cor rosa velho ou “cor de carne de coxa de frango”	<b>1</b>
		Carne amolecida, opaca, cor rosa velho, com gordura esfarelado	<b>2</b>
	<b>Aspecto do dorso</b>	Bem branco	<b>0</b>
		Cor amarelada	<b>1</b>
	<b>Muco na pele</b>	Sem muco	<b>0</b>
		Leve viscosidade na pele, muco claro, aquoso.	<b>1</b>
<b>OLHOS</b>	<b>Aspecto</b>	Olhos salientes, pupila negra e viva, córnea transparente	<b>0</b>
		Olhos planos, pupila negra, córnea ligeiramente opaca	<b>1</b>
		Olhos achatados, córnea opaca, pupila opaca	<b>2</b>
		Olhos afundados, córnea opaca, pupila opaca	<b>3</b>
<b>GUELRAS</b>	<b>Cor</b>	Vermelho vivo	<b>0</b>
		Vermelho escuro	<b>1</b>
		Marrom a descolorado	<b>2</b>
<b>ABDÔMEN</b>	<b>Aspecto</b>	Normal, rosa claro, brilhoso.	<b>0</b>
		Opaco, rosa velho	<b>1</b>
		Opaco, rosa velho e com odor azedo	<b>2</b>
<b>PONTUAÇÃO MÁXIMA DO ÍNDICE DE QUALIDADE (IQ)</b>			<b>16</b>

Na terceira etapa, para a validação do MIQ, os 4 avaliadores treinados avaliaram os peixes escolhidos aleatoriamente e de acordo com o esquema do MIQ, para estabelecer a correlação entre o IQ e o tempo de estocagem no gelo (Tabela 12 e Figura 8). Durante esse período foram realizadas análises microbiológicas com contagem total de mesófilos. Em todas as etapas do MIQ as amostras de pintado foram adquiridas 3 dias após o abate e a partir daí começou-se a considerar o tempo zero de estocagem no gelo.

**Tabela 12. Índice de qualidade (IQ) e tempo de estocagem em gelo (em dias) para o esquema do MIQ do pintado de cativoiro (peixe inteiro)**

Tempo de estocagem no gelo em dias	Tempo após abate em dias	IQ	Classificação do frescor
0	3	0	Extra fresco, com alta qualidade
2	5	0	Extra fresco, com alta qualidade
4	7	0	Extra fresco, com alta qualidade
6	9	3,5	Fresco, com boa qualidade
8	11	4,5	Menos fresco, qualidade satisfatória
10	13	7,5	Menos fresco, no limite de consumo
12	15	10,5	Rejeitado
14	17	13,6	Rejeitado
16	19	15	Rejeitado
18	21	16	Rejeitado

Os resultados do IQ foram expressos como a média da avaliação de 4 peixes feita pelos 4 avaliadores que participaram da validação do MIQ.



**Figura 8. Relação linear entre o índice de qualidade (IQ) e o tempo de estocagem em gelo (em dias) para o esquema do MIQ do pintado de cativoiro (peixe inteiro)**

O valor de  $R^2$  de 0,98 mostrou boa relação linear entre o IQ e o tempo de estocagem em gelo. O pintado se manteve extra fresco, com alta qualidade e IQ zero por até 4 dias de estocagem no gelo ou 7 dias após o abate. A partir do sexto dia de

estocagem no gelo a média do IQ foi de 3,5 e já foi possível observar as guelras de cor vermelho escuro, a pele machucada e com a cor mais escura e os olhos planos com a córnea ligeiramente opaca (alguns avaliadores já detectaram uma leve viscosidade na pele), mas o odor ainda se manteve neutro.

O prazo de validade comercial do pintado de cativoiro (peixe inteiro) ficou estabelecido entre 8 e 10 dias de estocagem no gelo ou entre 11 e 13 dias após o abate. Nesse período a média do IQ ficou entre 4,5 e 7,5 pontos de demérito. Várias alterações sensoriais foram observadas como o começo do odor azedo ao abrir a caixa, que se dissipava completamente ao manusear os peixes, as guelras de cor vermelho escuro, a pele machucada e com a cor mais escura, os olhos achatados, com a córnea e a pupila opaca, leve viscosidade na pele e o abdômen começando a ficar com aspecto de velho (opaco, rosa velho). A partir de 12 dias de estocagem no gelo ou 15 dias de abate o pescado já estava rejeitado, com odor azedo e a carne com aspecto de velho (opaca, rosa velho). Entre 14 e 18 dias de estocagem no gelo as alterações sensoriais típicas da deterioração progrediram rapidamente, com o aparecimento de odor muito azedo bastante perceptível no abdômen, a carne ficou com a textura amolecida e a gordura se desfazendo, esfarelado e o dorso ficou com uma cor amarelada na área entre a boca e as guelras.

Existem na literatura estudos semelhantes utilizando a carne do pintado (*Pseudoplatystoma corruscan*), como o realizado por DELBEM et al. (2010) que concluíram que amostras de pintado frescas e estocadas em gelo devem ser consumidas até o 9º dia de estocagem. Neste estudo foram consideradas análises microbiológicas feitas durante o período de estocagem para determinação da validade, estas evidenciaram a proliferação de microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes a partir deste período, causando assim a deterioração da carne do peixe. Apesar da ausência da metodologia do MIQ neste estudo, notou-se a correlação direta do prazo de validade comercial com resultados microbiológicos e sensoriais.

Já ANDRADE et al. (2012) aplicaram o método de índice de qualidade (MIQ) para estabelecimento do prazo de validade comercial de duas espécies diferentes de sardinha (sardinha verdadeira e sardinha boca torta), sendo que, seus valores de IQ variavam de 0 a 19 para sardinha verdadeira e de 0 a 23 para sardinha boca torta, confirmando a que a pontuação deve ser elaborada de forma específica para cada

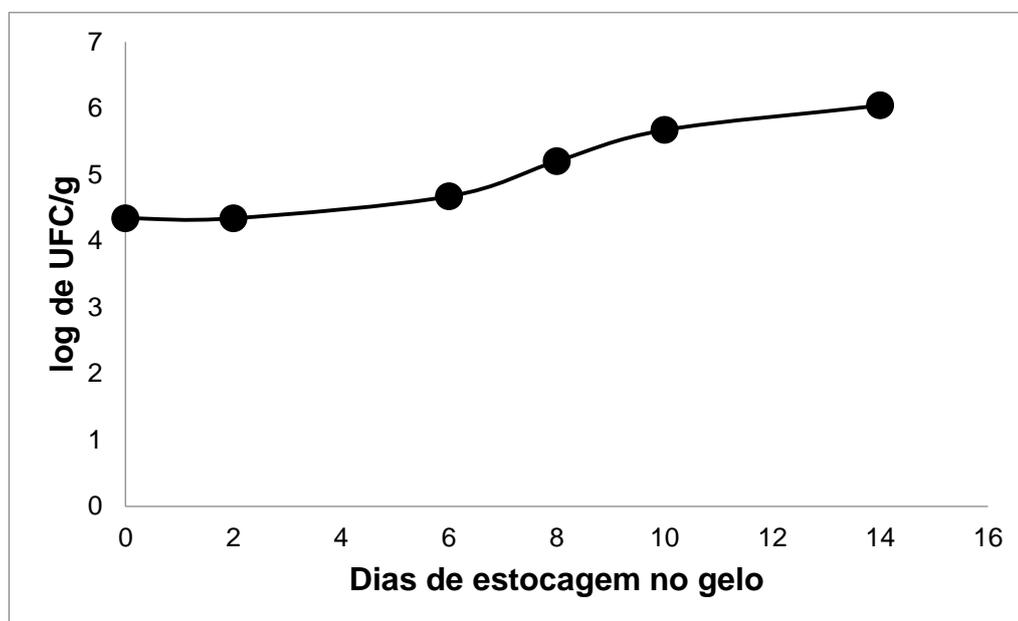
espécie. Os autores concluíram que o prazo de validade comercial para a sardinha verdadeira é de nove dias, e para a sardinha boca torta é de dez dias.

A Tabela 13 e a Figura 9 apresentam os resultados das análises microbiológicas com contagem total de microrganismos mesófilos no período de estocagem do pintado em gelo.

**Tabela 13. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras de pintado mantidas em gelo por 21 dias**

Tempo de estocagem no gelo em dias	Tempo após abate em dias	IQ	Bactérias mesófilas UFC/g	Bactérias mesófilas log UFC/g
0	3	0	$2,2 \times 10^4$	4,34
2	5	0	$2,2 \times 10^4$	4,34
6	9	3,5	$4,7 \times 10^4$	4,67
8	11	7,5	$1,6 \times 10^5$	5,20
10	13	10,5	$4,7 \times 10^5$	5,67
14	19	15	$1,1 \times 10^6$	6,04

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata



**Figura 9. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas no período de estocagem do pintado em gelo.**

A contagem de mesófilos manteve-se entre  $2,2 \times 10^4$  e  $4,7 \times 10^4$  UFC/g até o 6º dia de estocagem no gelo, enquanto o pescado ainda se apresentava fresco, com boa qualidade. Entre 8 e 10 dias de estocagem no gelo quando o pescado estava menos fresco e no limite de consumo a contagem de mesófilos aumentou para  $1,6 \times 10^5$  a  $4,7 \times 10^5$  UFC/g. E em 14 dias de estocagem no gelo, quando o pescado já estava rejeitado pela análise sensorial, a contagem de mesófilos atingiu  $1,1 \times 10^6$  UFC/g. Outros trabalhos (ANDRADE et al., 2012; SANT'ANA, et al., 2011) também evidenciaram o aumento da contagem de bactérias durante o período de estocagem no gelo no desenvolvimento do MIQ para outras espécies de pescado.

No trabalho de ANDRADE et al. (2012), que aplicaram o método de índice de qualidade (MIQ) para estabelecimento do prazo de validade comercial da sardinha boca torta, a contagem inicial de mesófilos variou de 4,09 a 4,34 log UFC/g entre 0 e 4 dias de estocagem no gelo. No 10º dia de estocagem no gelo, quando o pescado foi rejeitado, a contagem de mesófilos aumentou para 5,91 log UFC/g e atingiu 7,48 log UFC/g em 18 dias de estocagem no gelo. Já no trabalho de SANT'ANA, et al., (2011) que aplicaram o método de índice de qualidade (MIQ) para o pargo manchado, um peixe marinho, a contagem de bactérias inicial ficou em  $10^3$  UFC/g, entre 0 e 4 dias de estocagem no gelo. Após 4 dias, o crescimento bacteriano tornou-se evidente e no 8º dia a contagem de bactérias aumentou para  $10^6$  UFC/g. Em 12 dias de estocagem no gelo, quando o pescado foi rejeitado, a contagem de bactérias aumentou para  $10^7$  UFC/g.

## 8. CONCLUSÃO

Neste trabalho, os resultados da avaliação microbiológica de 6 amostras de pintado fresco e exposto ao consumo nos supermercados da cidade de Brasília, mostraram que 2 amostras estavam impróprias para o consumo, devido à presença da bactéria *Salmonella* spp. (confirmada geneticamente). Apesar do número baixo de coliformes totais e de coliformes termotolerantes em todas as amostras, *E. coli* O157:H7 foi identificada através de PCR nas amostras 1 e 6. Também foi verificado que todas as amostras mostraram condições higiênicas insatisfatórias por apresentarem bactérias *Staphylococcus aureus*, uma bactéria relacionada com falta de higiene durante a manipulação.

A presença de patógenos entéricos importantes em doenças de origem alimentar como *Salmonella* entérica e *Escherichia coli* O157:H7 nas amostras de pintado, sugere que água dos criatórios deve estar contaminada com material fecal. Portanto, o monitoramento da qualidade da água dos criatórios é de suma importância para garantir a produção de peixes com boa qualidade e segurança alimentar. Já a presença de bactérias *Staphylococcus aureus* e de contagens elevadas de microrganismos psicrófilos na maioria das amostras analisadas são indicadores de pouca higiene de processamento, manipulação e falha no armazenamento do pintado.

Através da aplicação do Método do Índice de Qualidade (MIQ) foi possível concluir que, o prazo de validade comercial do pintado fresco, conservado em gelo é de 10 dias de estocagem (máximo 13 dias de abate), pois após esse tempo o peixe adquiriu características sensoriais que o tornaram insatisfatório para consumo. A adaptação seguida da aplicação do MIQ para esta espécie foi considerada satisfatória, visto que, os resultados pontuados mantiveram coerência com o grau de deterioração das amostras, reafirmando a aplicabilidade do método para a espécie estudada.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA FILHO, R. L.; HONORATO, C. A.; ALMEIDA, L. C.; USHIZIMA, T. T., SANTAMARIA, F.M. Nutrição de surubim (*Pseudoplatystoma sp.*) – desafio para aquicultura, **Revista Eletrônica Nutritime**, v.9, n.5, p. 1995, 2010.

ALMEIDA, N. M.; BATISTA, G. M.; KODAIRA, M.; LESSI, E. Alterações post-mortem em tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier, 1818), procedente da piscicultura e conservado em gelo. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p. 1288-1293, 2006.

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.

AMPOFO, J. A.; CLERK, G. C. Diversity of bacteria in sewage treatment plant used as fish culture pond in southern Ghana. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 667-675, 2003.

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](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.

ANDRADE, S. C. S et al. Validade comercial de sardinhas inteiras e refrigeradas avaliada por análises físico-químicas, bacteriológicas e sensorial. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p.1901-1907, 2012.

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.

APHA – American Public Health Association. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 676p, 2001.

ARAÚJO, Y. F. de. Avaliação da qualidade do gelo de manutenção e da tilapia do nilo (*Oreochromis niloticus*) fresca e resfriada comercializada na cidade de Brasília - Distrito Federal. 90f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia. Brasília-DF, 2015.

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.

BERNARDI, D. C.; MÁRSICO, E. T.; FREITAS, M. Q. Quality Index Method (QIM) to assess the freshness and shelf life of fish. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 587-598, 2013.

BOMBARDELLI, R. A.; SYPERRECK, M. A.; SANCHES, E. A. Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, n.2, p. 181-195, 2005.

BONILLA, A. C.; SVEINSDOTTIR, K.; MARTINSDOTTIR, E. Development of Quality Index (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. **Food Control**, v. 18, p. 352-358, 2007.

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

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](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01_rde.htm). Acesso em 24 de abril de 2015.

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, Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=670>. Acesso em 08 de março de 2015.

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, K. F. Tempo de deterioração bacteriana de files de Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.) produzidos por frigorífico de pescado de Manacapuru. 2009. 17 f. Artigo de Pesquisa (PAIC), Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), 2009.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, 2002.

DELBEM, A. C. B.; GARBELINI, J. S.; LARA, J. A. F. Avaliação Microbiológica do Pintando (*Pseudoplatystoma corruscan*) obtido no Rio Paraguai (Pantanal) e conservado em gelo. **SIMPAN**, Corumbá – MS, 2010.

DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; VALLE, S. F.; PILLOTO, F.; RODEMBUSH, C.; WALD, V. B.; CANAL, C. W.; NASCIMENTO, V. P. Análise comparativa entre microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteridis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango

contaminada artificialmente. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 5-10, 2005.

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

FAGUNDES, M. Estudos fisiológicos e metabólicos do estresse de manejo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). 139 p. Tese de doutorado, Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo, 2009.

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.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L.; MARQUES, C.; MAKINO, L.; SENHORINI, J. A. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* x cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 49-55, 2007.

FENG, P; WEAGENT, SD; GRANT, MA. Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, 2002. Disponível em: <[www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web\\_root/collection/available/etd04102005-213953/unrestricted/etd.pdf](http://www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web_root/collection/available/etd04102005-213953/unrestricted/etd.pdf)>. Acesso em 10 de março de 2015.

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

FREIRE, C. E. C.; GONÇALVES, A. A. G. Diferentes métodos de abate do pescado produzido em aquicultura, qualidade da carne e bem estar do animal. **HOLOS**, v. 6, p. 33-41, 2013.

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

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

GOMES, L. M. Influência das condições de manuseio e conservação na qualidade do pescado. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto Qualittas de Medicina Veterinária, São Paulo, 2006.

GUIMARÃES, A. G.; LEITE, C. C.; TEXEIRA, L. D. S.; SANTANNA, M. E. B.; ASSIS, P. N. Detecção de *Salmonella* spp. em pacientes e manipuladores envolvidos em um surto de infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 12, p. 1-4, 2001.

GUZMÁN, M. C.; BISTONI, M. A.; TAMAGNINI, L. M.; GONZÁLEZ, R. D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenysia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research** 38, 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 – Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 2: Sampling for microbiological analysis – Principles and specific applications. Ed. Blackwell Scientific Publications, 1986. Disponível em: <http://www.icmsf.org/pdf/icmsf2.pdf>. Acessado em 26 de março de 2015.

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](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2013/default_pdf.shtm)>. Acesso em 22 de Março de 2015.

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.

LANZARIN, M.; FILHO, E. S. A.; RITTER, D. O.; MELLO, C. A.; CORRÊA, G. S. S.; IGNÁCIO, C. M. S. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e microrganismos psicrótróficos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) mantidos sob refrigeração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1541-1546, 2011.

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.

LORENZON, C. S.; GATTI JUNIOR, P.; NUNES, A. P.; PINTO, F. R.; SCHOLTEN, C.; HONDA, S. N.; AMARAL; L. A. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do estado de São Paulo, **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n. 4, p. 617-624, 2010.

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

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.

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.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010. Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br>, Acesso em 18 de abril de 2015.

NETO, A. C.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia**, v. 2, n. 1, p. 71-89, 2009.

PYATOV, V.; VRTKOVA, I.; KNOLL, A. Detection of Aminoglycoside, Sulfonamide and Tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from bovine milk samples. **Mendel net**, Mendel University in Brno Zemedelska 1, 613 00 Brno. 2014

QIM EUROFISH, Principle QIM, 2008. Disponível em: [www.qim-eurofish.com](http://www.qim-eurofish.com), Acesso em 18 de abril de 2015.

RIBEIRO, A. L. M. S.; OLIVEIRA, G. M.; FERREIRA, V. M.; PEREIRA, M. M. D.; SILVA, P. P. O. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 109-112, 2009.

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

RODRIGUES, T.P. Estudo de critérios para a avaliação da qualidade da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivada, eviscerada e estocada em gelo. 116 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 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, E. C. B. Métodos de abate e qualidade da tilápia do Nilo. 97 p., Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP, 2013.

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

SCORVO FILHO, J. D. Desempenho produtivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, submetidos a diferentes densidades de estocagem em dois sistemas de criação: intensivo e semi-intensivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 2, p. 181-188, 2008.

SHOPSIN, B.; GOMEZ, M.; WADDINGTON, M.; RIEHMAN, M.; KREISWIRTH, B. N. Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J Clin Microbiol**. Sep; 38(9): 3453–3456, 2000.

SILVA, M. C. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate. 87 p. Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura – USP, Piracicaba, 2002.

SIMAT, V. et al. Differences in chemical, physical and sensory properties during shelf life assessment of wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Journal of Applied Ichthyology**, v.28, p.95-101, 2012.

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.

SODERSTROM, A., OSTERBERG, P., LINGQUIST, A., JOHNSON, B., LINBERG, A., et al. A larger *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. **Foodborne Pathogenic Diseases**, v. 5, p. 339–349, 2008.

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

SVEINSDOTTIR, K.; HYLDIG, G.; MARTINSDÓTTIR, E. Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Food Quality and Preference**, v.14, p. 237-245, 2003.

TEIXEIRA, M.; BORGES, A.; FRANCO, R.; SÃO CLEMENTE, S.; FREITAS, M. Método de índice de Qualidade (MIQ): desenvolvimento de um protocolo sensorial para corvina (*Micropogonias furnieri*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 83-88, 2009.

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.

VELLOSO, E.A. Avaliação sensorial e físico-química de filés de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*) refrigerados e submetidos à radiação gama. 67 p. Monografia de curso de especialização. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

**Anexo 1. 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
FNMLKVAGQSQLTINNWMEIVSHPASVILLIIFILSVAFLIYVEFSLLYVMVYAGFD
RQIITFKSIFKNAFVNVKRLIGVPVIFVVIYMLMIPIANLGLSSVLTKNIIYIPKFLT
EELMKTTKGIIYGTFMIAVFILNFKLIFTLPLTILNRQSLFKNMRLSWQITKRNKFR
LVIEIVILELIIGAILTLIISGATYLAICVDEEGDKFLVSSILFVVLKSSLFFYYLFT
KLSLISVVLVHLKQENVLDQPGLEFKYKPKPKRSRFFIISMVLAVTCFIGYNMYLLYN
NTINTNISIIHRGFEDKGVENSIPSLKAAAKANVEYVELDTIMTKDKQFVSHDNNL
KRLTGVNKNISESNFKDVVGLKMRQNGHEAKLVSLDEFIETAKQSNVLLVELKPHGK
EPADYTQRVIDILKKHGVEHQYRVMSLDYDVMTKLKKEAPYLKCGYIIPLQFGHFKET
SLDFFVIEDFSYSPRLVNQAHLNKEVYTWTINGEEDLTKYLQTNVDGIITDDPALAD
QIKEEKKDETYFDRSIRIIFE"
CDS        complement (1928..2272)
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="hypothetical protein"
            /protein_id="BAH66221.1"
            /db_xref="GI:238549874"

/translation="MTTQMKIPTYLVAGIKAALLDTTGIKLASKSETTSHTYQHQUALV
DQLHELIANTDLNKLKSYLNLDAYQKRDILAAHYIAKSAIRTKNLDQMTKAKHRLESIY
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="MKKQIISLGALAVASSLFTWDNKADAIIVTKDYSGKSQVNAGSKN
GTLIDSRYLNSALYYLEDYIIYAIGLTKNYEYGDNIYKEAKDRLLEKVLREDQYLLER
KKSQYEDYKQWYANYKKENPRITDLKMANFHKYNLEELSMKEYNELQNALKGALDDFHR
EVKDIKDKNSDLKTFNAAEEDKATKEVYDLVSEIDTLVVSYYGDKDYGEHAKELRAKL
DLILGDTDNPHKITNERIKKEMIDDLNSIIDDFMETKQNRPNISITKYDPTKHNFKKEK
SENKPNFDKLVVEETTKAVKEADNSWKTKTVKTYGEAETKAHVVKEEKVENPQLPKVG
NQQEVETTVDKAEAEATQPVAQPLVKIPQGTITGEIVKGPDYLTMENKTLQGEIVQGPD
FPTMEQNRPSLSDNYTQPTTPNPILKGIENSSKLEIKPQGTESTLKGIQGESDIEV
KPQATETTEASQYGPRPQFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYEARPRFNKPSSETN
AYNVTTNQDGTVSYGARPTYNKPSETNAYNVTTTHGNGQVSYGARPTQNKPSSETNAYNV
TTHANGQVSYGARPTQNKPSKTNEYNVTTTHANGQVSYGARPTYKKPSETNAYNVTTTHA
NGQVSYGARPTQNKPSSETNAYNVTTTHGNGQVSYGARPTQNKPSKTSAYNVTTTHANGQV
SYGARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYGARPTYKKPSETNAYNVTTTHADGTATYGP
RVTK"
```

```
CDS complement(5281..6465)
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="acetyl-CoA acetyltransferase homologue"
/protein_id="BAH66223.1"
/db_xref="GI:238549876"
```

```
/translation="MQEAYIVAYGRSAAAKAKQGALFHERPDDVAAKVLQGVVKRIDG
KFNKNMIEDVIVGTAFPEGLQGQNIARTIALRTGLSDTVPGQTVNRYCSSGLQTI AIA
ANQIMAGQGDILVAGGVELMSAVPMGGNEPTNNTLQYDDIGVSYPMGLTAENVASQF
DVSREDQDAYAVRSHQRAFDAQRDGRFKDEIIPIQVNSVEYTNAGPKVHTNIFDQDEF
IRPDTTMEALAKLRVFKADGTVTAGTSAPLSDGAGFVVLMSGDKVKELGVTPIARFV
GYKAVGVDPKIMGIGPAYAIPVLSLSNLSVEDIDLIELNEAFASQTIASIKEVGLDI
SRTNVNGGAIALGHPLGATGAMLTARLLNEMGRRPDSRYGMVTMCIGVGMGAAAI FEY
VR"
```

ORIGIN

1	cgtttttagca	ttaatgcctt	actattgcag	ttgatcatga	tttttattag
51	tagtacatac	ttaattttac	tatttaatat	gatgtaaana	gtagctgggc
101	aaagccaact	tacgattaac	aattggatgg	aatcgtaag	tcaccctgcc
151	agtgtagatac	ttcttattat	attcatatta	agtgttgcct	ttctgattta
201	tgtagagttt	tcattgtag	tttatatggt	ttatgccggc	tttgatcgac
251	agattattac	atntaaatcc	atnttttaaaa	atgccctttgt	aaatgtgcgt
301	aaactcatag	gtgtaccagt	tattttcttt	gtcatttatt	taatgttaat
351	gatacccatt	gccaacctag	gactaagttc	agtattaaca	aaaaatatnt
401	acatacctaa	atnttttaacg	gaagaactta	tgaaaacgac	gaaaggtata
451	atcattttacg	gtacctttat	gattgctgta	tttatattaa	actntaaatt
501	aatattttacc	ttaccgttaa	cgattnttaaa	ccgtcagttc	ttattntaaa
551	atatgagact	aagttggcaa	attacgaagc	gaaataagtt	tcggcttggt
601	atagaaatag	ttatatgga	actcatcatt	ggtgagattt	taacattaat
651	tatttcagga	gcaacataatc	ttgctatttg	tgtagatgaa	gaaggagata
701	agttnttttagt	ctcatcaatt	ttatttggtg	tattgaaaag	ctcattgttc
751	ttctattatt	tattttacgaa	attatcatta	atcagtggtg	tagtactgca
801	ctntaaaacia	gagaatgtat	tagaccaacc	gggcttagaa	ttntaaatacc
851	caaaaccgaa	acggaagtct	aggttctnta	taattntcaat	ggtgcttgca
901	gtgacatggt	ttatcggnta	taacatgtac	ttactnttaca	ataatactat
951	caatacaaat	atctccatta	ttggatcatcg	tggtnttcgaa	gataaaggcg
1001	ttgaaaattc	tattccgntca	ttgaaagctg	ctgcaaaaagc	gaatgtcga
1051	tacgnttgagt	tagatacaat	tatgacgaaa	gataaacaat	ttgntgnttag
1101	tcatagataac	aattntgaaac	gntntaacagg	tgnttaataaa	aatattntctg
1151	aatctaatnt	caaagatgtc	gtcggntntga	aatgacgntca	aatggacat
1201	gaagcaaaac	ttgtatcctt	agacgaattt	attgaaacgg	ctaaacaatc
1251	aatgtggaag	ctactagtag	agntntaaagcc	acatggntaaa	gaaccagcag
1301	attatacaca	acgtgnttatt	gatattntntga	aaaagcagtg	tgnttgaacat
1351	caatatacgtg	tgatgtcatt	ggattatgat	gtgatgacta	agnttgaaaa
1401	agaagcgcga	tatctcaagt	gtggnttatat	cataccgntta	cagntntggntc
1451	atntntaaaga	aacatcatta	gattntctnttg	tcatacgaaga	ttntntctntat
1501	tcgccgagac	ttgntntaatca	agcacacttg	gaaaataaag	aagtctatac
1551	ttggaccatt	aacggagaag	aagattntaac	gaaatactnta	caaaccaatg
1601	ttgatggntat	tatcacagat	gaccagcagat	tagctgatca	gattaaagaa
1651	gaaaagaaag	acgaaacata	ctntcgatcgt	tctataagaa	taatattntga
1701	ataataaaaa	caaagacctc	taaagnttatc	aagacgatac	ttntcagaggt
1751	ctntntntaacg	ttgcctntcta	tggggnttaggc	aatcgtntntca	ttcgtntntata
1801	atcatalgac	aagntatnttat	aagntntaatnt	ggcgtcataa	acactntacat
1851	gattntatntgg	tgaattatta	atntgntntntgt	gaatgcaaaag	ggnttagaaat
1901	tgaatcgtaa	atactntntcta	atctatgntnt	cgctntntagntc	atnttgatcca

1951	aatTTTTtagt	gcgtatagca	gatttttgcaa	tatagtgtgc	agctaaaata
2001	tgcgcgctttt	gatacgcattc	taaatttagg	tacgataatt	tatttaagtc
2051	agtgttttgct	attaattcat	gtaattgatc	tacaagcgct	tgatgttgat
2101	acgtatgtga	tgtagtttca	gatttgcttg	ctaatttaat	accagtcgta
2151	tcaaggagcg	ccgctttaat	accagcaact	aaatatgttt	tgattttcat
2201	ttgtgttgtc	atgctttggt	actcctttga	tgtacattaa	tcaaaaaaat
2251	tatacactat	tgtatattgc	aaagctaatt	aactataaca	aaaagatagt
2301	taatgctttg	tttattctag	ttaatatata	gttaatgtct	tttaatat
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	tatattat	ggaagactat	ataatttatg
2601	ctataggatt	aactaataaa	tatgaatatg	gagataatat	ttataaagaa
2651	gctaaagata	ggttggtgga	aaaggatta	agggagatc	aatatctttt
2701	ggagagaaag	aaatctcaat	atgaagatta	taaacaatgg	tatgcaaatt
2751	ataaaaaaga	aaatcctcgt	acagatttaa	aatggctaa	ttttcataaa
2801	tataat	aagaactttc	gatgaaagaa	tacaatgaac	tacagaatgc
2851	attaaagga	gcactggatg	at	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	ttaaattcaa	ttattgatga
3151	tttctttatg	gagactaaac	aaaatagacc	gaattctata	acaaaatag
3201	atccaacaaa	acacaat	aaagagaaga	gtgaaaataa	acctaatt
3251	gataaattag	ttgaagaaac	aaaaaaagca	gttaaagaag	cagataattc
3301	ttggaaaact	aaaactgtca	aaacatatgg	tgaagctgaa	acaaaagcac
3351	atggtgtaaa	agaagagaag	aaagttgaaa	accctcaatt	acctaagtt
3401	ggaaaccaac	aagaggttga	aactacagtt	gataaagctg	aagaagcaac
3451	acaaccagtg	gcacagccat	tagttaa	tccacagggc	acaattacag
3501	gtgaaattgt	aaaaggtccc	gactatctaa	cgatggaaaa	taaaacgtta
3551	caaggtgaaa	tcgttcaagg	tcttgatttc	ccaacaatgg	aacaaaacag
3601	accatcttta	agcgataatt	atactcaacc	gacgacaccg	aaccctatt
3651	taaaaggat	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	tggaacattt	ggatatgaag	cgagaccaag
3901	attcaataag	ccatcagaaa	caaacgcata	caacgtaacg	acaaaccaag
3951	atggcacagt	atcatacggc	gctcgccccga	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	gaaacgaatg
4251	catataacgt	aacaacacat	gcaaacggcc	aagtatcata	tggcgctcgc
4301	ccaacacaaa	acaagccaag	tgaaacgaac	gcatataacg	taacaacaca
4351	cggaaatggc	caagtatcat	atggcgctcg	cccaacacaa	aacaaccaa
4401	gtaaaacaag	tgcatataac	gtaacaacac	atgcaaacgg	ccaagtatca
4451	tacggagctc	gcccgacaca	aaacaagcca	agcaaaacaa	acgcatataa
4501	cgtaacaaca	catgcaaatg	gccaagtatc	atacggagct	cgtcgcgacat
4551	acaagaagcc	aagtgaaacg	aatgcataca	atgtaacaac	acatgcagat
4601	ggtactgcga	catatggctc	tagagtaaca	aaataagttt	ataactctat
4651	ccatagacat	acagtcaata	caaaacatta	tgtatcttta	caacagtaat
4701	catgcattcg	atgatgcttc	taactgaatt	aaagcatcga	acaatcggaa
4751	gcatatcttct	aaattattta	ttcattatag	tcttaaacat	aacatgacct
4801	aatatattac	taacctatta	aaataaacca	cgcacatcta	tgtgatatac
4851	gacaatcaca	gcaataataa	ttgctttaga	aagtcgtacc	gaactggaac
4901	ttacaagtct	agttcgaaca	cactgatgtg	agtgggtttc	tttattttaa
4951	acatgaacaa	tcagataagt	tacttgcatt	agcaaatatt	attaatcaa
5001	agggcttcga	ttcataaaat	ttaaacaat	gattagaatt	agacgtgtaa
5051	atgttaaatt	ctaaaacgga	aatacccgct	atcctattaa	actactatct
5101	tgttcgatca	ctatatttca	cacagcttca	ataataaaac	gaaactgctt
5151	caatctgctt	caacttcagc	ctacttcatt	caataacaaa	acgaatccgc
5201	ttcatccaaa	atcaaccatt	ctaacgcaca	tactcaataa	tagcagctgc
5251	accataccg	acaccaatac	acatcgtaac	catgccgtaa	cgactatcgg
5301	gacgtctacc	catttcatta	agtaaacgcg	cggttaacat	tgcccctgta
5351	gcacctaatg	gatgacctaa	agcaatagcg	ccaccattca	cattcgtacg
5401	tgatatatct	agacctactt	ctttaataga	tgcaatcggt	tgagaagcaa
5451	atgcttcggt	caattcgatc	aaatcaatgt	cttcaacaga	tagattgctg
5501	agtgacaata	cttcaggaat	cgcatatgca	ggccaatac	ccataatctt
5551	cgggtcaacg	cctactgcct	tataaccaac	gaatcgtgca	ataggtgtca
5601	cgccgagttc	tttcacttta	tctccagaca	ttaaaactac	aaatcctgca
5651	ccatcagaaa	gtggggcaga	tgttcctgca	gtcacagtgc	cgtcagcttt
5701	aaatactgta	cgtaatttgg	ctaatgcctc	cattgtgggtg	tcaggtcgta
5751	taaattcatc	ttgggtcaaag	atatttgtgt	gtacttttgg	tcctgcgttt
5801	gtatattcaa	ctgagtttac	ttgtattgga	ataatttcat	ctttgaaccg
5851	accatcacgt	tgtgcgtaa	aggcacggtg	atgacttctg	acagcataag
5901	catctt <b>gac</b>	<b>ttcgcgtgat</b>	<b>acgtcaaatt</b>	<b>gggatgctac</b>	<b>atcttcagca</b>
5951	<b>gttaaacc</b>	<b>taggatatga</b>	<b>cacacctata</b>	<b>tcatcatatt</b>	<b>gtaaggtagg</b>
6001	<b>attgttt</b>	<b>ggctcgttgc</b>	<b>caccattgg</b>	<b>tacggcactc</b>	<b>atcaattcaa</b>

6051	<b>cgccaccagc</b>	<b>tacaagtata</b>	<b>tctccttgac</b>	<b>cagccataat</b>	<b>ttgattggct</b>
6101	<b>gcaatcgca</b>	<b>tggtttgtaa</b>	<b>tctgatgag</b>	<b>cagtagcgat</b>	<b>tcactgtttg</b>
6151	<b>accggtacc</b>	<b>gtgtcagata</b>	<b>atccgtacg</b>	<b>caatgcaatc</b>	<b>gttcgtgcaa</b>
6201	<b>tgttttgtcc</b>	ttgtaatcct	tctggaaaag	ccgtaccaac	aatgacatct
6251	tcaatcatat	tcttattgaa	ttttccgtca	atacgtttca	atacgccttg
6301	taatactttg	gctgcgacat	catcaggctc	ttcgtggaat	aatgcgctt
6351	gctttgcttt	cgctgcggt	gaacgcccat	aagctacaat	gtatgcttct
6401	tgcat				

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

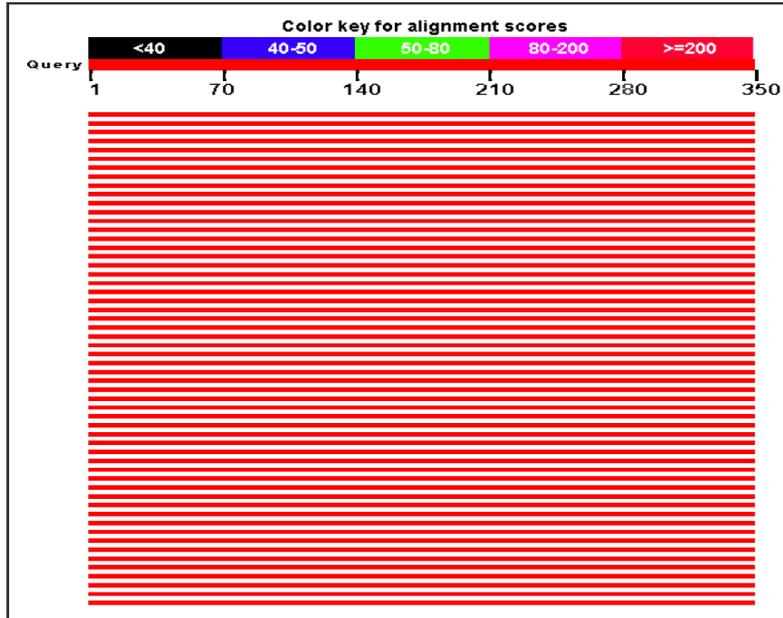
[NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - PFBV4ZET014](#)  
[Formatting options](#)  
[Download](#)  
[Blast report description](#)

Nucleotide Sequence (350 letters)

<b>RID</b>	<a href="#">PFBV4ZET014</a> (Expires on 05-30 08:14 am)	<b>Database Name</b>	nr
<b>Query ID</b>	Ic Query_53479	<b>Description</b>	Nucleotide collection (nt)
<b>Description</b>	None	<b>Program</b>	BLASTN 2.2.31+
<b>Molecule type</b>	nucleic acid		
<b>Query Length</b>	350		

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



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

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

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

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

## 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 CATCTTGATCTTCGCGTGATACGTCAAATTGGGATGCTACATTTTCAGCAGTTAAACCCA 60

```

Sbjct 5961 CATCTTGATCTTCGCGTGATACGTCAAATGGGATGCTACATTTTCAGCAGTTAAACCCA 6020
Query 61 TAGGATATGACACACCTATATCATCATATTGTAAGGTAGGATTGTTTGTGGGCTCGTTGC 120
Sbjct 6021 TAGGATATGACACACCTATATCATCATATTGTAAGGTAGGATTGTTTGTGGGCTCGTTGC 6080
Query 121 CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATTCACGCCACCAGCTACAAGTATATCTCCTTGAC 180
Sbjct 6081 CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATTCACGCCACCAGCTACAAGTATATCTCCTTGAC 6140
Query 181 CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCCTGATGAGCAGTAGCGAT 240
Sbjct 6141 CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCCTGATGAGCAGTAGCGAT 6200
Query 241 TCACGTGTTTGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA 300
Sbjct 6201 TCACGTGTTTGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA 6260
Query 301 TGTTTTGCCTTGTAACTCTTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 350
Sbjct 6261 TGTTTTGCCTTGTAACTCTTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 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	CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATTCACGCCACCAGCTACAAGTATATCTCCTTGAC	180			
Sbjct 216689	CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATTCACGCCACCAGCTACAAGTATATCTCCTTGAC	216748			
Query 181	CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCCTGATGAGCAGTAGCGAT	240			
Sbjct 216749	CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCCTGATGAGCAGTAGCGAT	216808			
Query 241	TCACGTGTTTGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA	300			
Sbjct 216809	TCACGTGTTTGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA	216868			
Query 301	TGTTTTGCCTTGTAACTCTTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 350				
Sbjct 216869	TGTTTTGCCTTGTAACTCTTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 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	CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATTCACGCCACCAGCTACAAGTATATCTCCTTGAC	180			
Sbjct 210244	CACCCATTGGTACGGCACTCATCAATTCACGCCACCAGCTACAAGTATATCTCCTTGAC	210303			
Query 181	CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCCTGATGAGCAGTAGCGAT	240			
Sbjct 210304	CAGCCATAAATTTGATTGGCTGCAATCGCGATGGTTTGTAACTCCTGATGAGCAGTAGCGAT	210363			
Query 241	TCACGTGTTTGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA	300			
Sbjct 210364	TCACGTGTTTGACCCGGTACCGGTGTCAGATAATCCCGTACGCAATGCAATCGTTCGTGCAA	210423			
Query 301	TGTTTTGCCTTGTAACTCTTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 350				
Sbjct 210424	TGTTTTGCCTTGTAACTCTTGGAAAAGCCGTACCAACAATGACATCT 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="MNSSTKIALVITLLDAMGIGLIMPVLPVLLREFIASEDIANHFG
```

```

VLLALYALMQVIFAPWLGKMSDRFGRRPVLLLSLIGASLDYLLLFSSALWMLYLGRLL
LSGITGATGAVAASVIADTTTSASQRVKWFGWLGASFGLGLIAGPIIGGFAGEISPHSP
FFIAALLNIVTFLVVMFWFRETKNTRDNTDTEVGVETQNSVYITLFKTMPILLIYF
SAQLIGQIPATVWVLFTEENRFGWNSMMVGFSLAGLGLLHVSFQAFVAGRIATKWGEKT
AVLLGFIADSSAFAFLAFISEGWLVPVLILLAGGGIALPALQGVMSIQTKSHQQGAL
QGLLVSLTNATGVIGPLLFAVIYNHSLPIWDGWIWIIGLAFYCIILLSMTFMLTPQA
                                QGSKQETSA"
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"

/translacion="MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWH
VKNKRALLDALAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLG
TRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERET
                                PTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLFGLLELIICGLEKQLKCESGS"
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"

/translacion="MANLIRKEVTFESSIAAIGAAMSDISRKILSALMDGRAWTATE
LSSVANISASTASSHLSKLLDCQLITVVAQGKHRYFRLAGKDIAELMESMMGISLNHG
VHAKVSTPVHLRKARTCYDHLAGEVAVKIYDSLCCQQWITENGSMITLSGIQYFHEMG
IDVPSKHSRKICCACLDWSERRFHLGGYVGAALFSLYESKGWLTRHLGYREVTITEKG
                                YAAFKTHFHI"
ORIGIN

```

1	tgaagctaaa	tcttcctttat	cgtaaaaaat	gccctcttgg	gttatcaaga
51	gggtcattat	atctcgcgga	ataacatcat	ttggtgacga	aataactaag
101	cacttgtctc	ctgtttactc	ccctgagctt	gaggggttaa	catgaaggtc
151	atcgatagca	ggataataat	acagtaaaac	gctaaaccaa	taatccaat
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	ccaagaccgg
551	ctaatgaaaa	gccaaccatc	atgctattcc	atccaaaacg	atcttcggta
601	aatagcaccc	acaccgttgc	gggaatttgg	cctatcaatt	gcgctgaaaa
651	ataaataatc	aacaaaatgg	gcatcgtttt	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	<b>caaaa acttgcccct</b>
901	<b>aaccaaccga</b>	<b>accacttcac</b>	<b>gcgttgagaa</b>	<b>gctgaggtgg</b>	<b>tatcggcaat</b>
951	<b>gaccgatgcc</b>	<b>gcgacagccc</b>	<b>cagtagctcc</b>	<b>tgtgatccct</b>	<b>gaaagcaaac</b>
1001	<b>ggcctaaata</b>	<b>cagcatccaa</b>	<b>agcgcacttg</b>	<b>aaaagccag</b>	<b>caataagtaa</b>
1051	<b>tccagcgatg</b>	<b>cgctattaa</b>	<b>tgacaacaac</b>	<b>agcactgggc</b>	<b>gccgaccaa</b>
1101	<b>tcggtcagac</b>	<b>atctttccaa</b>	<b>gccaaaggagc</b>	<b>aaagataacc</b>	<b>tgcattaacg</b>
1151	<b>cataaagtgc</b>	<b>aagcaataag</b>	<b>ccaaagtggg</b>	<b>tagcg</b>	atatac ttcggaagca
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	gcatgtaaaa	aataagcggg	ctttgctcga	cgcttagcc
1551	attgagatgt	tagataggca	ccatactcac	ttttgccctt	tagaagggga
1601	aagctggcaa	gattttttac	gtaataacgc	taaaagtttt	agatgtgctt
1651	tactaagtca	tcgcatgga	gcaaaagtac	atttaggtac	acggcctaca
1701	gaaaaacagt	atgaaactct	cgaaaatcaa	ttagcctttt	tatgccaaca
1751	aggtttttca	ctagagaatg	cattatatgc	actcagcgt	gtggggcatt
1801	ttacttttagg	ttgcgtattg	gaagatcaag	agcatcaagt	cgctaaagaa
1851	gaaagggaaa	cacctactac	tgatagtatg	ccgccattat	tacgacaagc
1901	tatcgaatta	ttgatcacc	aaggtgcaga	gccagccttc	ttattcggcc
1951	ttgaattgat	catatgcgga	ttagaaaaac	aacttaaatg	tgaaagtggg
2001	t				

Left Primer 2:

Primer\_1\_F

Sequence: ataacaccggtgcattggt

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: tttcattagcgggtcttgg

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)

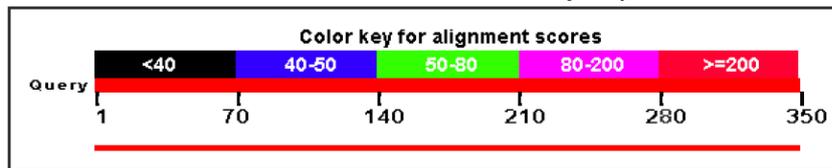
RID [PFDG4DZY014](#) (Expires on 05-30 08:42 am)

Query ID lcl|Query\_1439  
 Description None  
 Molecule type nucleic acid  
 Query Length 350

Database Name nr  
 Description Nucleotide collection (nt)  
 Program BLASTN 2.2.31+

### 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%	<a href="#">HQ018801.1</a>

### 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	AACCACCAATAATAGGCCCGCTATTAAACCAAGCCCAAACCTGCCCTAACCAACCGA	60
Sbjct	6850	AACCACCAATAATAGGCCCGCTATTAAACCAAGCCCAAACCTGCCCTAACCAACCGA	6909
Query	61	ACCACTTCACGCGTTGAGAAGCTGAGGTGGTATCGGCAATGACCGATGCCGCGACAGCCC	120
Sbjct	6910	ACCACTTCACGCGTTGAGAAGCTGAGGTGGTATCGGCAATGACCGATGCCGCGACAGCCC	6969
Query	121	CAGTAGCTCCTGTGATCCCTGAAAAGCAAACGGCCTAAATACAGCATCCAAAAGCGCACTTG	180
Sbjct	6970	CAGTAGCTCCTGTGATCCCTGAAAAGCAAACGGCCTAAATACAGCATCCAAAAGCGCACTTG	7029
Query	181	AAAAAGCCAGCAATAAGTAATCCAGCGATGCGCCTATTAATGACAACAACAGCACTGGGC	240
Sbjct	7030	AAAAAGCCAGCAATAAGTAATCCAGCGATGCGCCTATTAATGACAACAACAGCACTGGGC	7089
Query	241	GCCGACCAAAATCGGTGAGACATTTTCCAAGCCAAGGAGCAAAGATAACCTGCATTAAACG	300
Sbjct	7090	GCCGACCAAAATCGGTGAGACATTTTCCAAGCCAAGGAGCAAAGATAACCTGCATTAAACG	7149
Query	301	CATAAAGTGCAAGCAATACGCCAAAGTGGTTAGCGATATCTTCCGAAGCA	350
Sbjct	7150	CATAAAGTGCAAGCAATACGCCAAAGTGGTTAGCGATATCTTCCGAAGCA	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/](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
set;
Annotation Method    Pipeline
                   :: Best-placed reference protein
Annotation Software revision :: GeneMarkS+
                   :: 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"

/translation="MIPGSTSGISFSRILSRQTSHQDATQHTDAQQAEIQQAEDSSP
GAEVQKFVQSTDEMSAALAQFRNRRDYEKSSNLSNSFERVLEDEALPKAKQILKLIS
VHGGALEDFLRQARSLFPDPSDLVVLVRELLRRKDLEEIVRKKLESLLKHVEEQTDPK
TLKAGINCALKARLFGKTLKPGLLRASYRQFIQSESHEVEIYSDWIASYGYQRRLV
VLDFIGSLLTDIDANDASCSRLEFGQLLRRLTQLKMLRSADLLFVSTLLSYSFTKAF
NAEESWLLLMLSLQOPHEVDSLLADIIGLNALLLSHKEHASFLQIFYQVCKAIPSS
        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"

/translation="MLLSLLNSARLRPELLIIVLMVMIISMFVIPLPTYLVDFLIALN
IVLAILVFMGSFYIDRILSFSTFFPAVLLITTLFRLALSISTSRLILIEADAGEI IATF
GQFVIGDSLAVGFVVSIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDGM PGKQMSIDADLK
AGIIDADAARERRSVLERESQLYGSFDGAMKFIKGD A IAGII IIFVNF IGGISVGMTR
HGMDLSSALSTY TMLTIGDGLVAQIPALLIAISAGFIVTRVNGSDNMGRNIMTQLLN
NPFVLVV TAILTISMGTLPGFPLPVFVILSVVLSVLFYFKFREAKRSAAKPKTSKGEQ
PLSIEEKEGSSLGLIGDLKVDSTETVPLILLVPKSRREDLEKAQLAERLRSQFFIDYG
VRLPEVLLRDGEGLD DNSIVLLINEIRVEQFTVYFDLMRVVNYSDEVVSFGINPTIHQ
QGSSQYFWVTHEEGEKLRELGYVLRNALDELYHCLAVTLARNVNEYFGIQETKHM LDQ

```

LEAKFPDLLKEVLRHATVQRRISEVLQRLLSERVSVRNMKLIMEALALWAPREKDVINL

VEHIRGAMARYICHKFANGGELRAVMVSAEVEDVIRKGIHQTSGSTFLSLDPEASANL

MDLITLKLDDLLIAHKDLVLLTSVDVRRFIKKMIEGRFPDLEVL SFGEIADSKSVNVI  
KTI"

ORIGIN

1 tgaatcacat gaagtggaga tttactctga ctggatagcc agttatggct atcaacgtcg  
61 actgggtggta ctggatttta ttgaggggtc gctattaacc gatattgacg cgaatgacgc  
121 cagttgttcg cgcctggagt ttggccagct tttacgacgc ctgacgcaac ttaaaatggt  
181 gcgctccgct gacctactgt ttgtgagtac attgttgctg tattcgttta ccaaagcggt  
241 taatgctggag gagtcgtcgt ggctactact gatgctttcg ctattgcaac agccacatga  
301 agtggattcg ctgtagccg atattataggt tttgaatgag ttattgctta gtcataaaga  
361 acatgcatcc tttttgcaga tattttatca agtatgtaa gccataacct cttcactctt  
421 ttatgaagaa tattggcagg aagaattggt aatggcgta cgtagatga ccgatattgc  
481 ctacaagcat gaaatggcag aacagcgtcg tactattgaa aagctgtctt aatttaatat  
541 taacaggata cctatagtgc tgctttctct acttaacagt gctcgttac gacctgaatt  
601 actgattctg gtactaatgg tgatgatcat ttctatggtc gtcattccat tacctaccta  
661 tctggttgat ttctgatcg cactgaatat cgtactggcg atattggtgt ttatggggtc  
721 gttctacatt gacagaatcc tcagtttttc aacgtttctt gcggtactgt taattaccac  
781 gctctttcgt ctggcattat cgatcagtac cagccgtctt atcttgattg aagccgatgc  
841 cggtgaaatt atcgccacgt tcgggcaatt cgttattggc gatagcctgg cggtggtttt  
901 tgttgctctt tctat **tgtca** **ccgtgggtcca** **gtttatcggt** **attaccaaag** **gttcagaacg**  
**961 cgtcgcggaa** **gtcgcggccc** **gattttctct** **ggatggtag** **ccgggtaaac** **agatgagtag**  
**1021 tgatgccgat** **ttgaaggccg** **gtattattga** **tgccgatgct** **gcgcgcgaac** **ggcgaagcgt**  
**1081 actggaaaag** **gaaagccagc** **ttacggttc** **ctttgacggt** **gcatgaagt** **ttatcaaagg**  
**1141 tgacgtatt** **gccggcatca** **ttattatctt** **tgtgaacttt** **attggcggt** **tttcggtggg**  
**1201 gatgaccgc** **catggtatgg** **attgtcctc** **cgct** ctgtct acttatacca tgctgacct  
1261 tggatgatgg cttgtcgccc agatccccgc attgttgatt gcgattagtg ccggttttat  
1321 cgtgactcgc gtaaatggcg atagcgataa tatggggcg aatatcatga cgcagctggt  
1381 gaacaacca tttgtattgg ttgttacggc tattttgacc attcaatgg gaactctgcc  
1441 gggattcccg ctgccggtat ttgtatttt atcggtggtt ttaagcgtac tcttctattt  
1501 taaattccgt gaagcaaac gtagcgcgc caaacctaaa accagcaaag gcgagcagcc  
1561 gcttagtatt gaggaaaaag aagggtcgtc gttgggactg attggcgatc tcgataaagt  
1621 ctctacagag accgtaccgt tgatattact tgtgccgaag agccggcgtg aagatctgga  
1681 aaaagctcaa cttgcggagc gtctacgtag tcagttctt attgattatg gcgtgcgcct  
1741 gccggaagta ttgttacgcg atggcgagg cctggacgat aacagcatcg tattgttgat  
1801 taatgagatc cgtgttgaa aatttacggt ctattttgat ttgatgcgag tggtaaatta  
1861 ttccgatgaa gtcgtgtcct ttggtattaa tccaacaatc catcagcaag gtagcagtca  
1921 gtattttctg gtaacgcag aagaggggga gaaactccg gagcttggt atgtgttgcg  
1981 gaacgcgctt gatgagcttt a

Pair 2:

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...

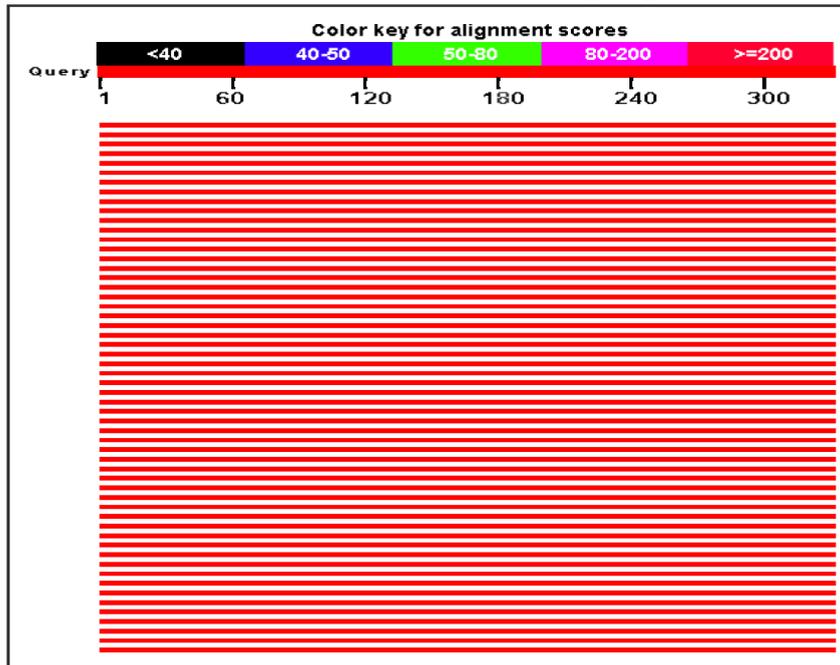
RID [PFF8X8BC014](#) (Expires on 05-30 09:13 am)

Query ID |Id|Query\_12307  
Description None  
Molecule type nucleic acid  
Query Length 331

Database Name nr  
Description Nucleotide collection (nt)  
Program BLASTN 2.2.31+

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



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

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



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

## 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	
<b>Features:</b>					
<b>type III secretion system protein InvA</b>					
Query 2	TCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAA				61
Sbjct 994910	TCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAA				994969
Query 62	GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGAT				121
Sbjct 994970	GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGAT				995029
Query 122	TTGAAGGCCCGTATTATTGATGCGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAAGG				181
Sbjct 995030	TTGAAGGCCCGTATTATTGATGCGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAAGG				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	
<b>Features:</b>					
<b>Type III secretion system protein InvA</b>					
Query 2	TCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAA				61
Sbjct 2968113	TCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAGAACGCGTCGCGGAA				2968054
Query 62	GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGAT				121
Sbjct 2968053	GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGAT				2967994
Query 122	TTGAAGGCCCGTATTATTGATGCGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAAGG				181
Sbjct 2967993	TTGAAGGCCCGTATTATTGATGCGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAAGG				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		