



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ROSEANE VERAS DE SOUZA

IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DETECÇÃO SIMULTÂNEA
POR PCR MULTIPLEX DE PATÓGENOS PRESENTES EM
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) ORIUNDO DE
DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO

PALMAS - TO

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ROSEANE VERAS DE SOUZA

IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DETECÇÃO
SIMULTÂNEA POR PCR MULTIPLEX DE PATÓGENOS
PRESENTES EM TAMBACUI (*Colossoma macropomum*)
ORIUNDO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos

Orientador: Cláudia C. Auler do A. Santos

Coorientador: Fernanda M. A. Leal Zimmer

PALMAS - TO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

V476i Veras de Souza, Roseane.

IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DETECÇÃO SIMULTÂNEA POR PCR MULTIPLEX DE PATÓGENOS PRESENTES EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) ORIUNDO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO . / Roseane Veras de Souza. – Palmas, TO, 2022.

64 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2022.

Orientadora : Claudia Cristina Auler do Amaral Santos

Coorientadora : Fernanda Munhoz dos Anjos Leal Zimmer

1. Peixe nativo. 2. Patógenos. 3. Identificação polifásica. 4. mPCR. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ROSEANE VERAS DE SOUZA

IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DETECÇÃO SIMULTÂNEA
POR PCR MULTIPLEX DE PATÓGENOS PRESENTES EM
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) ORIUNDO DE
DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 04 de Fevereiro de 2022, pela Banca

Examinadora constituída pelos membros:



Prof. (ª) Dr. (ª) Aline Silva Mello Cesar

ESALQ/USP



Prof. (ª) Dr. (ª) Juliana Fonseca Moreira da Silva

PPGCTA/UFT



Prof. (ª) Dr. (ª) Claudia Cristina Auler do Amaral Santos

Orientador – PPGCTA/UFT

*À minha avó Terezinha Basílio (in memoriam) e
à minha tia Conceição,
sem elas,
este sonho jamais seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e aos meus protetores, por nunca terem me desamparado, mesmo nos meus maiores momentos de dor e angústia sem saber o que fazer, uma luz e uma solução sempre vieram.

À minha tia Maria da Conceição, por ser minha mãe, irmã, madrinha e amiga de toda uma vida e principalmente por nunca ter soltado minha mão. Devo tudo que sou a ela. Ao meu filho e parceiro Matheus, meu maior amor. Tu és a principal razão de todas as minhas lutas e sonhos, sou e serei sempre por ti.

Ao meu tio Leo e minhas irmãs Vivi e Patrícia, obrigada por todo apoio de sempre e por apoiarem este sonho. Ao meu irmão Deyvison e seu esposo Douglas, vocês foram primordiais na concretização de mais essa etapa na minha vida. Obrigada por todo apoio, ajuda e principalmente por acreditarem que eu seria capaz. Amo vocês!

Agradeço imensamente à minha orientadora Profa. Dra. Claudia Auler, por todo apoio, incentivo, momentos de descontrações e principalmente por ter me ensinado a crescer como profissional. E à minha coorientadora Dra. Fernanda Leal, um anjo que apareceu pra me salvar e fazer eu me apaixonar pela biologia molecular. Ainda tenho muito a aprender, mas a largada já foi dada. Meu muito obrigada às duas!

Às minhas amigas de moradia Gabi, Martina e Lanna por todas as noites de conversas e taças de vinho, vocês fizeram com que minha passagem por Palmas fosse mais leve, bem como um tanto emocionante. Aos meus *Chernofriends* Jéssica, Dheyson, Fabriele e Lara por cada ajuda, crises de risos, choros, fofquinhas edificadoras e muito mais. Vocês foram essenciais nesse ciclo da minha vida, só tenho a agradecer. Contem comigo pra tudo.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial a Sara, nossa técnica “emprestada” que com tamanha sensibilidade tanto nos ajudou. Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFT, que de uma forma ou outra contribuíram nesse processo. Ao Professor Dr. Horllys pela liberação do Laboratório de Biologia molecular e a Profa. Dra. Juliana, pelas inúmeras vezes que me salvou com fornecimento de cepas.

Aos que se fizeram presente, mesmo a longas distâncias. E a todos aqueles que não mencionei aqui, mas que acompanharam minha caminhada, durante todo esse processo, me incentivando e torcendo por mim.

Muito Obrigada!

*[... A academia não é o paraíso, mas o aprendizado,
é um lugar onde o paraíso pode ser criado.*

A sala de aula com todas suas limitações continua sendo ambiente de possibilidades.

*Nesse campo de possibilidades, temos a oportunidade de trabalhar pela liberdade,
exigir de nós e de nossos camaradas uma abertura da mente e do coração
que nos permite encarar a realidade ao mesmo tempo em que, coletivamente,
imaginemos esquemas para cruzar fronteiras, para transgredir.*

Isso é a educação como prática da liberdade...]

HOOKS, 2013.pág. 273

RESUMO

A Região Amazônica se destaca na piscicultura com a produção de espécies nativas, em especial o tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécie nativa de maior produção brasileira. Métodos rápidos e precisos de detecção de patógenos em pescado podem auxiliar no controle de qualidade microbiológica, promovendo a segurança alimentar e o desempenho da piscicultura no país. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar os isolados bacterianos de tambaqui obtido de dois diferentes sistemas de manejo, utilizando análise polifásica. Ademais, adaptou-se um método multiplex de Reação em Cadeia da Polimerase para detecção simultânea das espécies *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* nas amostras de musculatura do pescado. Primeiramente, 470 isolados (181 de tanque-rede e 289 de viveiro escavado) provenientes de amostras de *swab* de pele, musculatura e água de cultivo de tambaqui foram caracterizados morfolologicamente e bioquimicamente, agrupados de acordo com suas características fenotípicas. Dentre os isolados, 85 foram caracterizados e agrupados em 12 grupos distintos: cinco grupos pertencentes ao gênero *Salmonella* spp., dois grupos de *Escherichia* spp, dois de *Staphylococcus* spp. e três grupos característicos da família *Enterobacteriaceae*. De cada grupo, isolados representativos foram confirmados pelo sequenciamento da região 16S-23S rRNA, como pertencentes as espécies *Salmonella tiphymurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburie* e *Pseudomonas aeruginosa*, com similaridade entre 77-100%. O DNA de 30 amostras de musculatura de tambaqui de ambos os sistemas de manejo foi extraído e submetido a PCR multiplex, utilizando os *primers* específicos dos genes *phoA*, *invA* e *nuc* para detecção dos patógenos *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*, respectivamente, de forma simultânea em uma única reação. Na reação, *Salmonella* spp. foi detectada em cinco amostras, duas de tanque-rede e três de viveiro escavado. *E. coli* foi detectada em duas amostras de viveiro escavado. *S. aureus* não foi detectado em nenhuma das amostras. Os resultados obtidos na identificação polifásica dos isolados e na análise de PCR multiplex das amostras de musculatura do pescado, correlacionaram-se, portanto, a metodologia proposta tem potencial para ser utilizada como um método eficaz de detecção simultânea de patógenos, podendo impactar positivamente a cadeia produtiva de pescado nativo, e fornecer de forma rápida e eficiente informações sobre a qualidade microbiológica do mesmo.

Palavras-chave: Peixe nativo; Amazônia; patógenos; identificação polifásica; mPCR.

ABSTRACT

The Amazon region stands out in fish farming with the production of native species, especially the tambaqui (*Colossoma macropomum*), the species with the highest Brazilian production. Fast and accurate methods for pathogens detection in fish can help in microbiological quality control, promoting food safety and fish farming performance in the country. Therefore, the objective of this work was to identify the bacterial isolates of Tambaqui obtained from two different management systems, using polyphasic analysis. Furthermore, a multiplex Polymerase Chain Reaction method was adapted for the simultaneous detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* species in fish musculature samples. First, 470 isolates (181 from net cages and 289 from excavated ponds) from swab samples of skin, musculature, and water from tambaqui culture were morphologically and biochemically characterized, being grouped according to their phenotypic characteristics. Among the isolates, 85 were characterized and grouped into 12 distinct groups: five groups belonging to the genus *Salmonella* spp., two groups of *Escherichia* spp, two of *Staphylococcus* spp., and three characteristic groups of the Enterobacteriaceae family. From each group, representative isolates were confirmed by sequencing the 16S-23S rRNA region as belonging to the species *Salmonella tiphymurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburie*, and *Pseudomonas aeruginosa*, with the similarity between 77-100%. DNA from 30 tambaqui musculature samples from both management systems was extracted and submitted to multiplex PCR, using specific primers for the *phoA*, *invA*, and *nuc* genes to detect the pathogens *E. coli*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*, respectively, simultaneously in a single reaction. In the reaction, *Salmonella* spp. was detected in five samples, two from net cages and three from excavated ponds. *E. coli* was detected in two excavated pond samples. *S. aureus* was not detected in any of the samples. The results obtained in the polyphasic identification of the isolates and the multiplex PCR analysis of the fish musculature samples were correlated. Therefore, the proposed methodology has the potential to be used as an effective method of simultaneous detection of pathogens, which can positively impact the production chain of native fish, and provide quickly and efficiently information on the microbiological quality of fish.

Keywords: Native fish; Amazon; pathogens; polyphasic identification; mPCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Piscicultura no Brasil e na Amazônia Legal	16
2.2 Contaminação microbiológica do pescado	20
2.2.1 <i>Salmonella</i> spp.....	21
2.2.2 <i>Escherichia</i> spp.	22
2.2.3 <i>Staphylococcus</i> spp.....	23
2.4 Métodos de Detecção de Microrganismos em Alimentos	24
2.4.1 Método Convencional de identificação microbiológica (padrão ouro)	24
2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase convencional e multiplex (PCR e mPCR).....	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Origem dos isolados bacterianos	28
4.2 Isolados bacterianos	28
4.3 Identificação polifásica dos isolados	29
4.3.1 Reativação dos isolados e cepas controle	29
4.3.2 Caracterização fenotípica dos isolados.....	30
4.3.3 Identificação Bioquímica <i>E.coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.....	31
4.3.3.1 Teste Tríplice-Açúcar-Ferro (TSI)	31
4.3.3.2 Teste de descarboxilação da Lisina (LIA)	31
4.3.3.3 Teste hidrólise da Ureia (Urease)	31
4.3.3.4 Citrato de Simmons	32
4.3.3.5 Teste do Indol e Motilidade (SIM)	32
4.3.3.6 Voges-Proskauer e Vermelho de Metila (VM-VP)	32
4.3.4 Identificação Bioquímica Estafilococos Coagulase positiva.....	33
4.3.4.1 Teste de Oxidase	33
4.3.4.2 Teste de Catalase	33

4.3.4.3 Teste coagulase.....	34
4.4 Agrupamento e análise genotípica dos isolados	34
4.4.1 Extração de DNA genômico dos isolados	34
4.4.2 Condições de PCR para sequenciamento dos isolados.....	34
4.4.3 Purificação e Quantificação dos isolados	35
4.4.4 Sequenciamento dos isolados	35
4.5 Amostras de musculatura do pescado e aplicação da mPCR.....	35
4.5.1 Extração de DNA das cepas controle (protocolo kit comercial)	36
4.5.2 Extração de DNA das amostras de musculatura e cepas controle (protocolo simples de fervura)	36
4.5.3 Padronização e especificidade dos <i>primers</i> na PCR convencional	36
4.5.4 Definição dos parâmetros para mPCR a partir das cepas controle.....	38
4.5.4.1 Sensibilidade da mPCR.....	38
4.5.4.2 Especificidade da mPCR.....	38
4.5.4.3 mPCR das amostras de musculatura de tambaqui para detecção simultânea de <i>E. coli</i>, <i>Salmonella</i> spp. e <i>S. aureus</i>	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Identificação polifásica dos isolados	40
5.1.1 Caracterização Fenotípica dos isolados.....	40
5.1.2 Caracterização Genotípica dos isolados	42
5.2 Parâmetros da mPCR a partir das cepas controle	48
5.2.1 Qualidade de DNA extraído das cepas de referência	48
5.2.2 Especificidade dos <i>primers</i> na PCR convencional.....	48
5.2.3 Especificidade e Sensibilidade da mPCR.....	49
5.3 mPCR das amostras de musculatura de tambaqui para detecção simultânea de <i>E. coli</i>, <i>Salmonella</i> sp, e <i>S. aureus</i>	51
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Peixe da espécie tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	17
Figura 2: Viveiros escavados utilizados no sistema de produção semi-intensivo.....	19
Figura 3: Tanques-redes circular (à frente) e retangulares (ao fundo) utilizados no sistema intensivo de produção.....	19
Figura 4: Fluxograma de identificação de isolados provenientes de amostras de musculatura, <i>swab</i> de pele e água de cultivo de pescado em tanque-rede e viveiro escavado.....	30
Figura 5: Provas bioquímicas realizadas para caracterização de isolados provenientes de <i>swab</i> de pele, musculatura e água de cultivo de tambaqui cultivado em tanques-rede e viveiros escavados.....	33
Figura 6: Sequência do isolado 104Ms gerada a partir do sequenciamento da região 16S-23S rRNA.....	46
Figura 7: Produtos de PCR convencional das cepas bacterianas de referência visualizados por eletroforese em gel de agarose	48
Figura 8: Especificidade da mPCR utilizando diferentes protocolos de extração de DNA das cepas bacterianas de referência.....	49
Figura 9: Sensibilidade da mPCR para detectar os genes de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> e <i>S. aureus</i> a partir do DNA das cepas controle extraído pelo método simples de fervura.....	50
Figura 10: Produtos de mPCR aplicada à detecção de patógenos em amostras de musculatura de tambaqui cultivados em tanque-rede e viveiros escavados armazenadas em gelo por 0, 4, 8, 12, 16 e 20 dias.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos sistemas de produção da piscicultura.....	20
Tabela 2: quantitativo dos isolados de musculatura, <i>swab</i> de pele e água de cultivo de tambaqui cultivados nos sistemas de manejo tanque-rede e viveiro escavado submetidos a análise polifásica.....	29
Tabela 3: quantitativo das amostras de musculatura de tambaqui dos sistemas de manejo tanque-rede e viveiro escavado submetidos a mPCR.....	35
Tabela 4: Pares de <i>primer</i> selecionados para a reação em cadeia da polimerase multiplex (mPCR).....	37
Tabela 5: Caracterização bioquímica dos isolados de amostras <i>swab</i> de pele, musculatura e água de cultivo de tambaqui cultivados em tanque-rede.....	41
Tabela 6: Caracterização bioquímica dos isolados de amostras <i>swab</i> de pele, musculatura e água de cultivo de tambaqui cultivados em tanque-rede e tanque escavado.....	41
Tabela 7: Identificação genotípica de bactérias isoladas de amostras <i>swab</i> de pele, musculatura e água de cultivo de tambaqui cultivados em tanque rede e viveiro escavado.....	44
Tabela 8: Comparação da detecção de patógenos na musculatura de pescado cultivado em diferentes sistemas de manejo obtida por mPCR com a identificação microbiológica convencional.....	52

1 INTRODUÇÃO

A alta disponibilidade de água e condições climáticas favoráveis no Brasil faz com que o país apresente alto potencial para o desenvolvimento da aquicultura e piscicultura, atividades que vêm crescendo substancialmente nos últimos anos (VALENTI et al., 2021). O tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816), peixe originário dos rios Amazonas e Orinoco (GOULDING e CARVALHO, 1982), é a segunda espécie de maior produção na piscicultura brasileira, ficando atrás apenas da tilápia (com participação de 60,6% na produção total), sendo também cultivada na maioria dos países da América do Sul e Central, no Caribe e Ásia. Os principais métodos de cultivo utilizados na produção dessas espécies são os semiextensivos ou intensivos por meio de viveiros escavados ou tanques-rede (PEIXEBR, 2021; WOYNÁROVICH E VAN ANROOY, 2019).

O pescado é considerado o alimento de origem animal de maior perecibilidade, por seu alto teor de nutrientes, pH próximo à neutralidade e a elevada atividade de água nos tecidos que facilitam o desenvolvimento de microrganismos e a rápida ação deteriorante das enzimas presentes nos seus tecidos e vísceras (YAMADA; RIBEIRO, 2015). Do ponto de vista microbiológico, peixes e produtos relacionados são um risco potencial para a saúde humana, visto que podem abrigar importantes bactérias patogênicas. As infecções bacterianas podem surgir devido ao manuseio inadequado e ao consumo do pescado mal preparado (VALENTI et al., 2021).

Vários gêneros de bactérias, como *Escherichia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Salmonella* foram isolados de pescado e podem indicar contaminação de múltiplas fontes (GUFÉ et al., 2019; COSTA et al., 2020). No Brasil, entre os anos 2009 e 2018, foram notificados 6.809 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's). Dentre os principais agentes envolvidos estão *E. coli* (23,4%), *Salmonella* spp. (11,3%) e *Staphylococcus aureus* (9,4%) (BRASIL, 2019).

A legislação brasileira, por meio da RDC N° 331/2019 e IN n° 60/2019, estabelece os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação para a pesquisa de *Escherichia coli*/g, *Salmonella*/25g e Estafilococos coagulase positiva/g em pescados. A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, amplamente distribuída na natureza, tendo como principal habitat o trato gastrointestinal humano e animal. A *Salmonella* spp., também pertencente à família *Enterobacteriaceae*, causa intoxicação alimentar (Salmonelose) e em casos raros, pode provocar graves infecções e até mesmo a morte (BRASIL, 2019). O gênero *Staphylococcus* é caracterizado por bactérias Gram-positivas, na forma de cocos que

tendem ao agrupamento semelhante a cacho de uvas, pertencente à família *Micrococcaceae*. A espécie de maior interesse médico é a espécie *S. aureus* (WU et al., 2016). Apesar desses microrganismos estarem preconizados na legislação e serem os principais causadores de DTA's no Brasil, no que tange a pesquisa dos mesmos em peixes amazônicos, ainda são escassos os dados na literatura.

Para a identificação de microrganismos em alimentos, conforme o grupo a ser analisado, a IN nº 62/2003 (BRASIL, 2003) dispõe sobre os métodos analíticos em que são empregadas combinações de técnicas, como: pré-enriquecimento; enriquecimento seletivo; semeadura em meio sólido seletivo diferencial; identificação bioquímica e sorológica das colônias suspeitas. Os métodos dependentes de cultivo são trabalhosos e levam vários dias para serem concluídos. Logo, há dificuldade em usar métodos microbiológicos tradicionais para triagem de alto rendimento de um grande número de amostras de alimentos para a presença de um ou mais patógenos (NEMATI et al, 2016).

Os avanços nos métodos moleculares de detecção aumentaram a compreensão da epidemiologia e patogênese de microrganismos em alimentos (BARRETT; FHOGARTAIGH, 2017). A exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a tecnologia mais amplamente aplicada, devido as suas vantagens de curto tempo de análise, baixo limite de detecção, alta especificidade e, na sua maioria, independente de cultivo (FORGHANI et al., 2016; WEI et al., 2018). Em contrapartida, para aumentar as vantagens da PCR, a Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (mPCR) foi desenvolvida para detectar vários patógenos simultaneamente. A tecnologia mPCR é baseada na tecnologia PCR, que pode amplificar múltiplos fragmentos em uma única reação (SINGH et al., 2012; WEI et al., 2018).

Diante das questões levantadas, a pesquisa justifica-se pelo atual cenário em que, para um melhor controle de qualidade em relação às contaminações microbianas em pescados e, conseqüentemente, prevenir os riscos de possíveis intoxicações alimentares, são necessários métodos rápidos e precisos de detecção de patógenos para monitorar efetivamente tais agentes nos alimentos. Embora vários métodos de mPCR tenham sido desenvolvidos para a detecção de *E.coli*, *Salmonella* spp., e *S. aureus* em alimentos, esse é o primeiro estudo desenvolvido, visando a detecção simultânea desses três patógenos em amostras de tambaqui cultivado em diferentes sistemas de manejo. Ademais, considerando a importância do tambaqui para a piscicultura brasileira, ainda pouco estudado, o trabalho visa contribuir com esta lacuna na literatura, adaptando uma metodologia a fim de detectar concomitantemente e mais rapidamente a incidência desses microrganismos, que denotam risco à saúde pública.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Piscicultura no Brasil e na Amazônia Legal

O Brasil já foi considerado o país com maior potencial para o desenvolvimento da pesca e aquicultura. Segundo o último relatório *The State of World Fisheries and Aquaculture* (SOFIA), atualmente o país ocupa a 13ª posição na produção de peixes em cativeiro, sendo o 8º na produção de peixes de água doce (FAO, 2020). Em 2020, a produção brasileira de peixes de cultivo atingiu 802.930 toneladas, representando crescimento de 5,93% em relação ao ano anterior (758.006 t), resultado esse, de grande relevância se analisado pelo contexto da pandemia de Covid-19. Apesar dos desafios enfrentados em decorrência da pandemia, esta foi a segunda melhor produção do país desde 2014, ano em que se iniciou o levantamento. Este aumento prevaleceu no segundo semestre de 2020, em que houve maior demanda pelos produtos e os preços ao produtor tiveram melhor desempenho (PEIXE BR, 2021).

A produção de peixes nativos é realizada por todos os estados brasileiros, com exceção do Ceará. Entretanto, a região amazônica apresenta o protagonismo na piscicultura em relação ao restante do país, no que se refere à produção de espécies nativas, em especial o tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). A região amazônica brasileira contempla nove unidades federativas: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Dentre esses, os estados de Rondônia, Mato Grosso e Maranhão assumem papel de destaque na produção de peixes nativos com 65,5, 42,0 e 40,8 mil toneladas, respectivamente (PEIXE BR, 2021)

2.1.1 Tambaqui e os sistemas de produção

O tambaqui (Fig. 1) e os demais peixes classificados como redondos, apresentam estrutura óssea, corpo robusto e formato arredondado característico. Em conjunto, essas espécies formam o principal grupo de peixes nativos produzido pela aquicultura nacional atualmente. Das três maiores espécies da família *Serrasalminidae* (ou seja, tambaqui, pirapatinga e pacu), o tambaqui é a mais importante em termos de valor comercial nas Américas. É a espécie nativa mais importante da piscicultura brasileira, com grande tamanho corporal, sendo o segundo maior peixe escamoso depois do pirarucu (*Arapaima gigas*). Possui carne muito apreciada para consumo humano, apresenta características zootécnicas de grande interesse para os piscicultores, como por exemplo, o rápido desenvolvimento, a reprodução em laboratório, facilidade de acesso aos alevinos, bem como excelente desempenho para cultivo em diferentes

sistemas de produção (FISHSTAT, 2018; WOYNÁROVICH e ANROOY, 2019; OLIVEIRA et al., 2019). O peixe tambaqui é vendido inteiro ou nos cortes sagital, costelas, posta ou filé. Manipuladores treinados fazem a remoção facilmente dos espinhos em forma de Y durante o processamento, entretanto, essa técnica não é amplamente aplicada, limitando o mercado dessa espécie em algumas regiões do país. O tambaqui desossado é encontrado comumente nas redes de supermercado, peixarias, feiras-livres da região Norte e Nordeste, mas não nas demais regiões (OLIVEIRA et al., 2019). A demanda por tambaqui aumenta constantemente, havendo necessidade de incremento na produção por meio da criação da espécie em cativeiros. Caso a sua oferta dependesse apenas da pesca, o tambaqui seria escasso no mercado e seu valor comercial estaria fora do alcance de grande parte da população (IZEL et al, 2013).

Figura 1: Peixe da espécie Tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Fonte: Panorama da Piscicultura, 2020

Quanto a alimentação da espécie, na piscicultura, essa pode ser feita com a introdução de alimentos naturais e ração balanceada, essa última sendo bastante utilizada atualmente como suporte na piscicultura moderna. O peixe tambaqui apresenta dentes especiais e um aparelho de filtragem, no qual permite que o mesmo ingira e faça uso efetivo de uma variedade, excepcionalmente, ampla de alimentos naturais, como frutas, nozes, grãos e fitoplâncton (produzidos pelo processo de fertilização em viveiros) (WOYNÁROVICH e ANROOY, 2019). A criação de tambaqui é realizada de forma monitorada, desde o início da vida até o momento em que atingem as condições ideais para o consumo e podem ser realizadas em diferentes

sistemas de produção. Quando os peixes atingem o tamanho comercial ideal, é realizado a despesca, definição dada ao processo de retirada dos peixes dos tanques e viveiros.

Os sistemas de produção utilizados na piscicultura são vários, considerando o local, o manejo, as espécies a serem cultivadas e as necessidades do mercado. Entre as formas de produção estão a extensiva, semi-intensiva, intensiva e superintensiva (GERONA, 2021).

O sistema extensivo é caracterizado por uma atividade de subsistência que apresenta baixo custo de implantação e quase nenhuma manutenção. Neste sistema a produção é caracterizada pela pouca influência do homem no processo produtivo, ou seja, o produtor aproveita açudes e/ou represas já existentes em sua propriedade, realizando um manejo simples, no qual aproveitam subprodutos agrícolas para alimentação dos peixes e aproveitam a mão de obra familiar. Nesta forma de criação, o uso de rações e suplementos alimentares é esporádico, logo, os peixes fazem uso do alimento natural presente no corpo d'água (açudes, barragens represas). Geralmente não há renovação contínua de água, bem como não há maiores cuidados quanto a análise da qualidade da água. A taxa de estocagem de peixes é considerada baixa, resultando em baixa produtividade, podendo ser utilizada uma ou mais espécies conjuntamente. As despescas, quando feitas são parciais e por rede de arrasto (SEBRAE, 2016; GERONA, 2021; FARIA e MORAIS, 2019)

O sistema semi-intensivo de produção é caracterizado inicialmente pela criação em tanques escavados (Fig. 2), densidade calculada por área, fertilização para o incremento do alimento natural, uso de ração balanceada, e cuidado com a qualidade da água. Nesse sistema o produtor interfere na forma de construir os tanques, os quais são construídos em formatos que facilitem a despesca, esvaziamento e o manejo geral da produção. Pode ser realizado a criação de várias espécies de peixes ou o policultivo de espécies, o sistema tem renovações hídricas pontuais, para não haja prejuízos à produção, e a produção é para fins comerciais (OLIVEIRA, SOUZA & MELO, 2015; GERONA, 2021). A despesca deve ser realizada utilizando equipamentos adequados como rede de arrasto, puçás e caixas de isopor, e a produtividade pode variar em torno de 8 mil a 10 mil quilos por hectare/ano (FARIA e MORAIS, 2019).

Figura 2: Viveiros escavados utilizados no sistema de produção semi-intensivo



Fonte: NordesteRural, 2015.

Na piscicultura com sistema intensivo de produção (Fig. 3), a água dos tanques recebe altas taxas de renovação, monitoramento da sua qualidade e uso de tecnologias como aeradores para oxigenação da mesma. Esse sistema pode ser realizado em viveiros escavados, se realizado em terra, ou ainda em tanques-rede ou gaiolas em açudes e reservatórios de hidrelétricas. A produção ocorre com apenas uma espécie, ou seja, por monocultura e a ração balanceada é o alimento utilizado para o cultivo dos peixes, não havendo aproveitamento do alimento natural do viveiro. É um dos sistemas mais praticados atualmente, devido ao fácil manejo e rápido retorno do investimento, atingindo produtividade superior a 20 mil quilos por hectare/ano (SEBRAE, 2016; COLDEBELLA, 2018; FARIA e MORAIS, 2019; GERONA, 2021).

Figura 3: Tanques-redes circulares (à frente) e retangulares (ao fundo) utilizados no sistema intensivo de produção



Fonte: Corrêa - EMBRAPA, 2018.

No sistema superintensivo a densidade adotada é muito superior à dos demais sistemas de produção, sendo contabilizada pela biomassa em m^3 . O fornecimento de ração balanceada é alto, o que gera a necessidade de um fluxo contínuo de água e renovação total da água em um curto período, para eliminação de fezes e metabólitos. Os sistemas de criação geralmente são tanques de alvenaria ou tanques-redes, para suportar o alto fluxo de renovação de água (FARIA e MORAIS, 2019; GERONA, 2021). As características, resumidas, dos sistemas de produção estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Características dos sistemas de produção da piscicultura

Características	Extensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Superintensivo
Renovação de água	Normalmente não há renovação de água	De 1% a 5% do volume total do viveiro ao dia (24horas)	De 5% a 10% do volume total ao dia (24 horas)	Mínimo de uma renovação total por hora
Densidade	Em torno de 1 peixe/5m ² de lâmina d'água	Acima de 3 peixes /m ² de lâmina d'água	1 peixe /m ² de lâmina d'agua	Acima de 70 peixes/m ³
Tipo de criação	Policultivo	Mono ou Policultivo	Monocultivo	Monocultivo
Produtividade	Cerca de 1.000 kg/ha/ano	8.000 a 10.000 kg/ha/ano	Acima de 20.000 kg/ha/ano	Acima de 70 kg/m ³ /ciclo de produção
Alimentação	Natural	Natural e ração balanceada regular	Ração com qualidade superior e maior frequência	Ração extrusada com alta intensidade

Fonte: adaptado FARIA e MORAIS, 2019.

2.2 Contaminação microbiológica do pescado

O pescado é considerado uma fonte nutritiva e desejável de proteínas de alta qualidade e um suprimento generoso de minerais e vitaminas constituindo a maior parte da dieta humana (SHOKR et al., 2018). No entanto, apesar dessas vantagens, os peixes em geral podem estar contaminados com microrganismos patogênicos por causa da textura de sua carne, seus hábitos de vida e do habitat que habitam. Peixes vivos e recém-capturados são normalmente considerados estéreis, mas microrganismos são encontrados em todas as suas superfícies externas (pele e guelras) e também no trato gastrointestinal em números variados (SHOKR et al., 2018).

O pescado desde a captura, às suas diferentes etapas de processamento e comercialização está susceptível à contaminação por bactérias patogênicas e presença de parasitas, tornando-se um obstáculo na produção, o qual pode ser superado pela adoção de boas práticas de manejo e de fabricação, tanto nas fazendas quanto nas unidades de processamento (VALENTI et al., 2021).

A presença de microrganismos patogênicos humanos em pescado e produtos pesqueiros pode ser afetada por vários fatores, incluindo práticas culturais, condições ambientais, processamento e distribuição de produtos. A contaminação microbiológica em peixes pode ocorrer também pelo contato direto com um ambiente aquático poluído e à ingestão de bactérias de sedimentos ou alimentos contaminados. A microbiota bacteriana em peixes é composta por dois grupos:

1. Espécies nativas amplamente distribuídas em ambientes aquáticos ao redor do mundo, onde a temperatura da água tem um efeito claramente seletivo. Entre esses grupos estão *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas* spp.;

2. Várias bactérias não nativas *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* como um produto da poluição do ambiente aquático de onde provêm e devido às más condições de produção e manuseio em matéria de higiene (ROMERO-JARERO E NEGRETE-REDONDO, 2011; ALI, 2014; CORTÉS-SÁNCHEZ et al., 2020). Assim, as bactérias detectadas em peixes refletem a condição e a segurança dos ambientes aquáticos. Do ponto de vista da saúde pública, os tipos de bactérias transmitidas pelos peixes que podem causar doenças humanas são importantes.

Salmonella spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão entre as dez bactérias mais comuns que causam Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) notificada globalmente (WHO, 2016) e também estão na lista das principais causas de doenças, hospitalizações e mortes por DTA nos Estados Unidos e no Brasil (CDC, 2016; BRASIL, 2019).

2.2.1 *Salmonella* spp.

A *Salmonella enterica* é um dos principais microrganismos transportados por produtos de origem animal, responsável por DTA. *Salmonella* spp. é um bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, classificado de acordo com o esquema Kauffmann-White em duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Esta última é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e

indica. A subespécie enterica apresenta aproximadamente 2.600 sorotipos, dos quais 99% podem causar infecções em animais e humanos (YOSHIDA et al., 2016).

Em um estudo realizado por Finger et al., (2019), em um levantamento dos surtos de DTA ocorridas no Brasil no período de 2000 a 2018, as bactérias foram a causa mais comuns relatadas no país, sendo a *Salmonella* spp. o segundo patógeno mais frequentemente envolvido. A contaminação dos alimentos por essa bactéria pode ocorrer ao longo da cadeia produtiva. Falhas durante o manuseio dos alimentos, incluindo higiene pessoal e ambiental inadequadas, armazenamento em temperaturas inadequadas e contaminação cruzada podem aumentar o risco de contaminação. Os principais alimentos envolvidos nos surtos de DTA causados por esta bactéria são ovos crus, produtos derivados de ovos, produtos cárneos e vegetais.

Peixes não representam reservatório de *Salmonella* spp., e a presença desse microrganismo nesta matriz pode ser indicativo de contaminação fecal no meio aquático. Além disso, a detecção de *Salmonella* spp. em produtos processados sugere contaminação cruzada durante as etapas de processamento do peixe, como evisceração, corte em bifes grandes, costelas e filés de peixe. De 1996 a 2014, os peixes foram classificados como o principal veículo de microrganismos causadores de DTA de alimentos importados nos Estados Unidos da América (GOULD et al., 2017). A incidência de salmonelose através do consumo de pescado tem se tornado uma preocupação de órgãos de saúde pública em diversos países, devido ao aumento do consumo de pescado e derivados, principalmente de produtos crus, o que aumenta o risco de exposição a patógenos, principalmente em grupos vulneráveis, como os idosos, mulheres grávidas e crianças menores de 5 anos (ZHANG et al., 2015; PAUDYAL et al., 2017).

Vários genes têm sido usados para detectar *Salmonella* spp. em amostras ambientais naturais, bem como em amostras de alimentos e fezes. Genes cromossômicos de virulência incluindo; *invA*, *invE*, *himA*, *phoP* são genes alvo para amplificação por PCR de espécies de *Salmonella*. O gene *invA* contém sequências exclusivas deste gênero e provou ser um alvo adequado de PCR, com potenciais aplicações diagnósticas (SHANMUGASAMY et al., 2011; JAMSHIDI, et.al., 2009; RAHN et al., 1992).

2.2.2 *Escherichia* spp.

O gênero *Escherichia*, que recebeu o nome do pediatra alemão Theodor Escherich, consiste em bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos que pertencem à família *Enterobacteriaceae*. A espécie *Escherichia coli* é amplamente distribuída, sendo o principal bacilo anaeróbio facultativo que habita o intestino grosso de humanos e animais de sangue

quente. Embora a maioria das cepas de *E. coli* sejam não patogênicas, diferentes sorotipos patogênicos de *E. coli* intestinal são oportunistas e podem causar doenças no trato gastrointestinal, urinário ou sistema nervoso central, tanto em indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos (ONMAZ et al., 2020).

Os sorotipos de *E. coli* foram categorizados de acordo com os genes de virulência que possuem, sinais clínicos e modo de transmissão em enteropatogênica (EPEC), enteroagregativas (EAEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) e enterohemorrágica (STEC) (BARRETT; FHOGARTAIGH, 2017). A virulência de *E. coli* está principalmente associada à sua capacidade de danificar células epiteliais intestinais e duas citotoxinas codificadas por fagos chamadas toxinas shiga (*stx1* e *stx2*) (WONG et al., 2000). Outros genes de virulência importantes além das toxinas shiga são o gene de anexação e apagamento (*eaeA*) e o gene de manutenção da fosfatase alcalina (*phoA*) (KONG et al. 1999).

E. coli não ocorre naturalmente na microbiota de peixes, no entanto, pode ser transferida para peixes por meio de ambientes aquáticos contaminados. A presença de *E. coli* nesses organismos está normalmente associada à contaminação fecal da água no local de captura e/ou transporte e manuseio do pescado. Assim, dejetos provenientes de águas residuais de esgoto podem contaminar as águas onde habitam os peixes, acarretando na contaminação destes organismos (CARDOZO et al., 2018).

2.2.3 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* considerados é composto por bactérias Gram positivas na forma de cocos, agrupados em cachos com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , anaeróbios facultativos, catalase positiva, não esporulados e não móveis. Este gênero foi relatado como tendo 32 espécies, 16 das quais são consideradas microrganismos oportunistas. As espécies mais importantes do ponto de vista clínico e de segurança alimentar, são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprococcus saprococcus saprococcus*, *Staphylococcus saprococcus saprococcus saprococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus capitis* subsp. *ureolyticus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *Urealyticum* (ZENDEJAS-MANZO et al., 2014; CORTÉS SÁNCHEZ et al., 2020).

A espécie *S. aureus*, de maior interesse clínico, produz termonuclease. A termonuclease é uma exoenzima que catalisa a hidrólise de DNA e RNA. O reconhecimento do gene *nuc* que codifica a termonuclease é útil para melhorar a detecção de *S. aureus* em diferentes fontes

alimentares (ALARCON et al., 2006; ELKAMOUNY et al., 2020). As fossas nasais foram estabelecidas como seu principal reservatório, juntamente com a garganta, pele e trato intestinal; e estima-se que a taxa de portadores humanos pode ser de 30 a 60% de indivíduos saudáveis, podendo se adaptar para crescer em vários alimentos e causar intoxicação alimentar secretando enterotoxinas (ACHA E SZYFRES, 2001; CORTÉS SÁNCHEZ et al., 2020).

Os microrganismos da pele e o conteúdo gastrointestinal dos peixes em vida não invadem o tecido muscular estéril devido à proteção de suas defesas naturais. Entretanto, quando o animal morre, esses microrganismos penetram na pele e musculatura, causando deterioração e perda de segurança alimentar. A presença de *Estafilococos* coagulase positiva em peixes e produtos pode indicar, principalmente, contaminação da pele, boca e narinas de manipuladores infectados ou portadores saudáveis, durante as fases de captura, transporte, armazenamento, processamento e processos de preparação (ROMERO-JARERO E NEGRETE-REDONDO, 2011; CORTÉS SÁNCHEZ et al., 2020).

2.4 Métodos de Detecção de Microrganismos em Alimentos

2.4.1 Método Convencional de identificação microbiológica (padrão ouro)

O monitoramento é o principal ponto de controle na prevenção de doenças causadas por microrganismos patogênicos. Métodos de detecção eficazes são necessários para controlar a incidência dessas doenças e têm sido realizados através dos tempos pelo uso de métodos microbiológicos convencionais. Esses métodos padrão têm sido uma prática comum por quase um século e continuam a ser prontamente usados para detecção de microrganismos (RAJAPAKSHA et al., 2018). Entretanto, os métodos dependentes de cultura biológica são muitas vezes demorados, caros, demandam diversos equipamentos e exigem trabalho laborioso e qualificado. Geralmente, envolvem um longo processo de coleta de amostras, diluição seriada, plaqueamento em meios seletivos e espera pelo tempo de incubação adequado para obter colônias visíveis. O período de incubação para a maioria dos patógenos bacterianos de origem alimentar é de 18 a 24 horas, embora esse período de tempo possa variar até 72 horas para diferentes cepas bacterianas (HAMEED et al., 2018). Diversos testes bioquímicos também estão disponíveis, sendo usados no processo de identificação de patógenos isolados.

Os métodos bioquímicos envolvem várias abordagens convencionais para a caracterização de patógenos que foram cultivados em meios de cultura geralmente seletivos e diferenciais, o que fornece ao microbiologista informações para a identificação. As bactérias

são classificadas como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido à diferença de construção e composição de sua parede celular. Diferentes características químicas desempenham um papel importante na identificação bacteriana, como fermentação de açúcar, produção de enzimas e resistência a antibióticos, que podem ser facilmente testadas (HAMEED et al., 2018). Testes como indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer, fermentação de carboidratos, utilização de citrato, catalase, oxidase e coagulase têm sido usados para o agrupamento e caracterização de bactérias, podendo ser utilizados para identificação à nível de família ou gênero (APHA, 1998; APHA, 2001; BRASIL, 2003).

2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase convencional e multiplex (PCR e mPCR)

A fim de fornecer maior precisão e especificidade na identificação de microrganismos, métodos de caracterização e identificação baseados em ácido nucleico foram desenvolvidos e têm sido ostensivamente utilizados (SINGH et al., 2013; SARAVANAN et al., 2021). Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma importante ferramenta para detecção e identificação de microrganismos patogênicos em produtos alimentícios, o que melhorou a sensibilidade, especificidade e velocidade das análises (LATHA et al., 2017). A PCR é menos demorada do que outras técnicas convencionais que utilizam cultura e plaqueamento, geralmente leva entre 5 e 24 horas para produzir um resultado. Entretanto, isso depende da variação específica da PCR, podendo ser aplicada após os estágios de pré-enriquecimento ou aplicadas diretamente em amostras, não dependente de cultivo.

A técnica de PCR é usada para amplificar um fragmento de DNA específico. O ensaio de PCR requer DNA molde, primers, nucleotídeos e enzima DNA polimerase termoestável (Taq polimerase). Os nucleotídeos são referidos como adenina, timina, citosina e guanina (A, T, C, G). A técnica ocorre em 3 etapas: na primeira etapa ocorre o aumento da temperatura para desnaturar o DNA da fita dupla alvo, na segunda a temperatura é diminuída para permitir que os primers se emparelhem com suas sequências complementares das fitas de DNA, e por fim, ocorre a fase de extensão, em que a enzima de polimerização termoestável atua alongando o DNA. Subsequentemente, cada novo DNA de fita dupla atua como um alvo para um ciclo subsequente e, portanto, a amplificação exponencial é alcançada. Os primers são estendidos da direção 5' para 3' por uma enzima polimerase para sobrepor as cópias do molde original. A detecção subsequente da sequência amplificada é realizada por eletroforese em gel de agarose (GARIBYAN E AVASHIA, 2013; RAJAPAKSHA ET AL. 2018).

Alguns exemplos de métodos de PCR desenvolvidos para detecção bacteriana são PCR em tempo real, mPCR e PCR com transcriptase reversa. A mPCR é uma variante da PCR que

permite a detecção simultânea de vários organismos através da introdução de diferentes *primers* para amplificar a codificação da região do DNA para genes específicos de cada cepa bacteriana alvo, em uma única reação. Tem o potencial de produzir economias consideráveis de tempo e esforço no laboratório, tornando-se assim uma importante ferramenta para análise de alimentos. A otimização da mPCR pode apresentar várias dificuldades, incluindo baixa sensibilidade e especificidade e/ou amplificação preferencial de determinados alvos específicos. A presença de mais de um par de primers na mPCR aumenta a chance de obtenção de produtos de amplificação inespecíficos, principalmente devido à formação de dímeros de primers. Dessa forma, a otimização da mPCR deve ter como objetivo minimizar tais interações inespecíficas (MARKOULATOS et al., 2002; RAJAPAKSHA et al., 2018; LOPES et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar os isolados bacterianos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) obtido de diferentes sistemas de manejo utilizando análise polifásica e adaptar o método de PCR multiplex para detecção simultânea das espécies *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* em amostras de pescado.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar morfológicamente e bioquimicamente os isolados bacterianos provenientes do *swab* de pele, musculatura e água de cultivo de tambaqui cultivado em tanque rede e viveiro escavado;
- Selecionar isolados bacterianos através do agrupamento por características morfotintoriais e bioquímicas para realização de sequenciamento de região 16S-23S rRNA;
- Identificar polifasicamente os isolados através das características fenotípicas e comparação das sequências obtidas com as depositadas em bancos de dados genéticos;
- Realizar PCR multiplex nas amostras de musculatura de tambaqui cultivado em tanque rede e em viveiro escavado para detecção simultânea de *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus* em uma única reação;
- Avaliar a correlação dos resultados obtidos nos métodos dependentes de cultivos e independentes de cultivo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem dos isolados bacterianos

As bactérias patogênicas alvo neste trabalho foram isoladas de amostras de musculatura, *swab* de pele e água de cultivo da espécie tambaqui, provenientes de um estudo antecedente, denominado: Influência de Sistemas de Cultivo sobre Parâmetros de Qualidade do tambaqui (*Colossoma Macropomum*) (BARBOSA, 2020). O estudo de Barbosa (2020) consistiu na coleta de peixes nativos de tanques-rede e viveiros escavados, sendo realizadas três coletas (repetições) em cada tipo de cultivo, sendo dez peixes coletados em cada repetição, totalizando 60 amostras.

As análises microbiológicas foram realizadas a cada quatro dias até o 20º dia de armazenamento do pescado em gelo. Foram utilizados os métodos analíticos de contagem de coliformes a 45 °C/g pela técnica dos tubos múltiplos, pesquisa de *Salmonella* spp./25g, e análise de Estafilococos coagulase positiva/g pelo método de contagem direta em placas.

Para detecção das bactérias do gênero *Salmonella*, foram utilizados os meios seletivos Ágar Xilose Lisina Desoxicolato KASVI® (XLD), Ágar Bismuto Sulfito KASVI® (BSM) e Ágar Entérico Hektoen ACUMEDIA® (HE). Para enumeração de *E. coli* utilizou-se o meio seletivo Ágar Levine Eosina Azul de Metileno KASVI® (EMB) e para Estafilococos coagulase positiva utilizou-se o meio Ágar Sal Manitol KASVI® (APHA, 1998; APHA, 2001; BRASIL, 1992).

4.2 Isolados bacterianos

Os isolados foram caracterizados por análise polifásica (fenotípica e genotípica), quanto a sua morfologia, características bioquímicas e sequenciamento genético. A relação do número de isolados de musculatura, *swab* de pele e água de cultivo de tambaqui cultivados nos sistemas de manejo tanque-rede e viveiro escavado, obtidos de diferentes meios de cultura, está na Tabela 2.

Tabela 2: Número de isolados bacterianos de musculatura, *swab* de pele e água de cultivo de tambaqui cultivado nos sistemas de manejo tanque-rede e viveiro escavado submetido à análise polifásica.

Sistema de Manejo	Amostras	XLD / BSM / HE	EMB	Sal Manitol	Total (n)
Tanque-rede	Musculatura	42	-	10	181
	<i>Swab</i> de Pele	47	47	-	
	Água de Cultivo	27	8	-	
Viveiro escavado	Musculatura	95	5	5	289
	<i>Swab</i> de Pele	115	25	5	
	Água de Cultivo	39	-	-	
Total (%)		77,66%	18,09%	4,25%	470 (100%)

XLD: Ágar Xilose Lisina Desoxicolato; BSM: Ágar Bismuto Sulfito; HE: Ágar Entérico Hektoen; EMB: Ágar Levine Eosina Azul de Metileno

Fonte: Elaborado pelo autor

Os isolados estão sendo mantidos em tubos criogênicos contendo 750 µL de Caldo Nutriente e 750 µL de solução de glicerol a 40%, com concentração final de 20% de glicerol, no banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins sob temperatura de -20 °C (APHA, 1998; APHA, 2001; BRASIL, 1992).

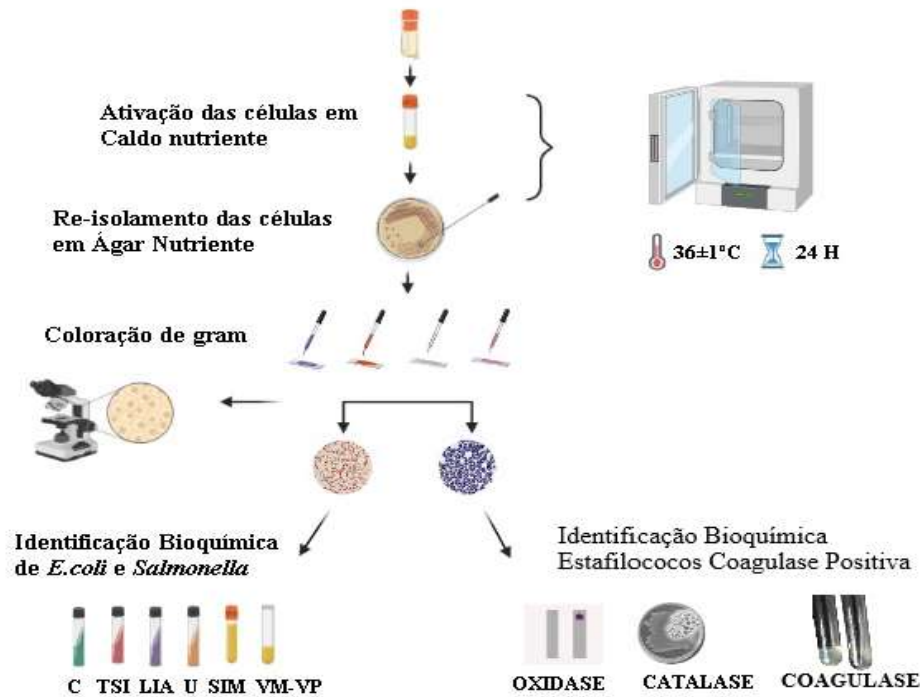
4.3 Identificação polifásica dos isolados

4.3.1 Reativação dos isolados e cepas controle

Para realização dos testes morfológicos e bioquímicos, os 470 isolados mantidos sob congelamento foram primeiramente reativados em 2 mL de caldo nutriente a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 24 h e semeados em estrias compostas em placas contendo Ágar Nutriente KASVI® (AN) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ / 24 h. A fim de verificar a pureza das colônias recém-crescidas, essas foram então avaliadas por coloração de Gram e posteriormente submetidas aos testes bioquímicos (Fig. 4).

Três cepas padrão da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CRMVS, FIOCRUZ -INCQS, Rio de Janeiro, RJ foram utilizadas como controle positivo para todas as técnicas empregadas no presente estudo: *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Figura 4: Fluxograma de identificação de isolados provenientes de amostras de musculatura, *swab* de pele e água de cultivo de pescado em tanque-rede e viveiro escavado.



C = Citrato; TSI = Tríplice-Açúcar-Ferro; LIA = Descarboxilação da lisina; U = Hidrólise da Ureia; SIM = Indol e Motilidade; VM-VP = Vermelho de Metila e Voges-Proskauer.

Fonte: elaboração do autor / biorender.com

4.3.2 Caracterização fenotípica dos isolados

Os 470 isolados foram caracterizados, primeiramente, fenotipicamente por análise morfotintorial e bioquímica para confirmação dos microrganismos *E.coli*, *Salmonella* e *S. aureus*, conforme prevê a legislação brasileira RDC N° 331/2019 e IN n° 60/2019. Isolados que não apresentaram características desses microrganismos (ou da família *Enterobacteriaceae*), não foram inclusos nos resultados.

O teste de coloração diferencial de Gram, método de Hucker (SILVA et al., 2010), foi utilizado com o intuito de separar os isolados Gram-negativos dos Gram-positivos. Este teste baseia-se na verificação das características morfotintoriais do microrganismo. Dada a caracterização como colônias Gram-negativas, essas foram submetidas aos testes de fermentação dos carboidratos em Ágar Tríplice-Açúcar-Ferro (TSI), descarboxilação da lisina (LIA), Hidrólise da Ureia (Urease), Citrato de Simmons, Indol e Motilidade (SIM), Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) (APHA, 1998; APHA, 2001). Bactérias que fazem parte da família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram-negativas, não formadoras de esporos

e quando analisadas apenas pela micromorfologia são consideradas indistinguíveis entre si, logo há necessidade de testes complementares para diferenciá-las.

4.3.3 Identificação Bioquímica *E.coli* e *Salmonella* spp.

4.3.3.1 Teste Tríplice-Açúcar-Ferro (TSI)

Com auxílio de uma alça bacteriológica, as culturas foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de Ágar Tríplice-Açúcar-Ferro HiMedia® inclinados, por picada na base e estrias no bisel. Os tubos foram incubados em estufa a 36 ± 1 °C / 18-24 h, com as tampas levemente afrouxadas, evitando-se a produção excessiva de H₂S. No ágar TSI, estão presentes: glicose (1,0 g/L), lactose (10,0 g/L) e sacarose (10,0 g/L). Como a glicose é um monossacarídeo e está em baixa concentração, é rapidamente fermentada anaerobicamente, formando ácido no fundo do tubo, o que torna o meio amarelo pela viragem do indicador vermelho de fenol (todos os membros da família *Enterobacteriaceae* fermentam a glicose com produção de ácido) (Fig. 4a e 4b). A fermentação aeróbia da glicose, que ocorre na superfície do bisel, resulta em ácido pirúvico, que é posteriormente degradado a CO₂ e água. Algumas cepas família *Enterobacteriaceae* podem fermentar a lactose e sacarose, tornando o bisel do TSI ácido (BRASIL, 2003).

4.3.3.2 Teste de descarboxilação da Lisina (LIA)

Para este teste, uma colônia foi inoculada em tubos contendo 5 mL de Ágar LIA HiMedia®, através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel, incubando-os em seguida a 36 ± 1 °C/24 h. Decorrido o período, observou-se a ocorrência de descarboxilação da lisina pela alcalinização do meio, o que é demonstrado pela não alteração de cor do indicador presente (Fig. 4c) (BRASIL, 2003).

4.3.3.3 Teste hidrólise da Ureia (Urease)

No teste de urease cada cultura foi inoculada por estrias na rampa em um tubo com 5 mL de Ágar Uréia de Christensen KASVI® inclinado e incubado a 37 ± 1 °C / 24 ± 3 h. A ocorrência de viragem alcalina do indicador com alteração da cor do meio de pêssego para cor rosa escuro indica teste positivo e a permanência do meio na cor original, teste negativo (Fig. 4d) (BRASIL, 2003).

4.3.3.4 Citrato de Simmons

Uma colônia foi transferida para tubos contendo 5 mL de ágar Citrato de Simmons Acumedia® inclinado, com estrias na rampa e uma picada no fundo. Os tubos foram incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}/24\pm 3\text{h}$ e foi observado se havia crescimento com viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio de verde para azul (teste positivo). A não alteração do meio indica teste negativo (Fig 4e e 4f) (BRASIL, 2003).

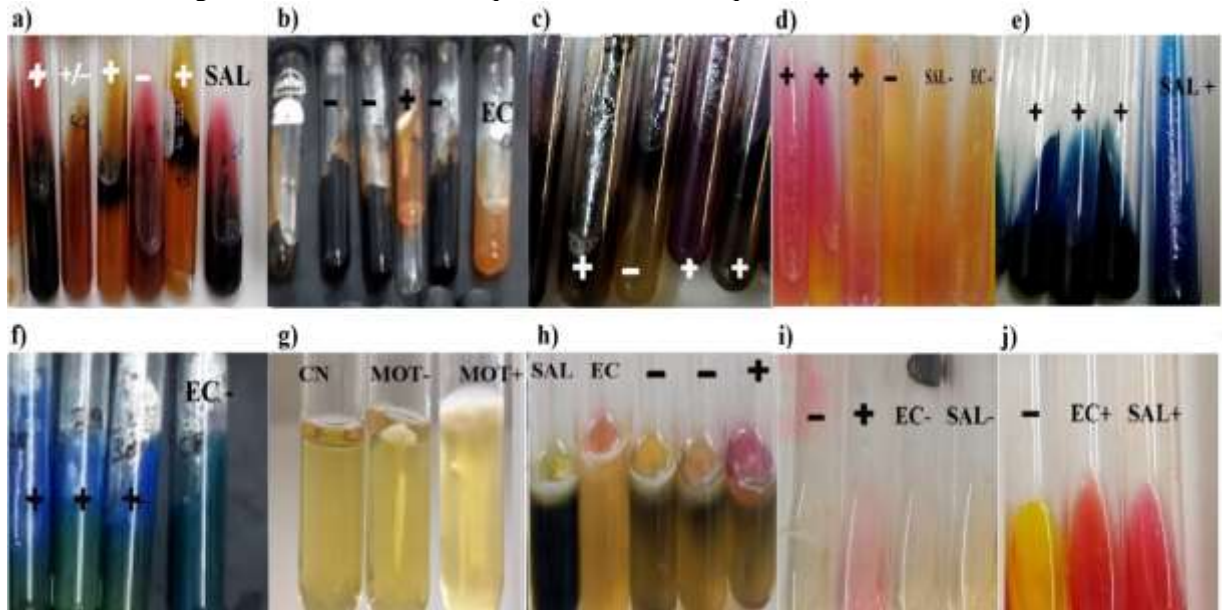
4.3.3.5 Teste do Indol e Motilidade (SIM)

As culturas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo ágar semissólido Indol Sulfeto Motilidade HiMedia® e incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C} / 24 \pm 3 \text{ h}$. Após esse período foi observada a motilidade (Fig. 4g). A motilidade é caracterizada pela difusão do crescimento por todo o meio. Se for restrito à linha de semeadura, indica que o microrganismo é imóvel (BRASIL, 2003). Após a leitura da motilidade, adicionou-se 2 gotas de reativo de Kovac's aos tubos para verificação da produção de indol. O desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura indica teste positivo, enquanto a permanência da cor amarelada indica teste negativo (Fig. 4h) (BRASIL, 2003).

4.3.3.6 Voges-Proskauer e Vermelho de Metila (VM-VP)

Primeiramente, uma colônia foi transferida para os tubos contendo 3 mL de caldo MR-VP (Himedia), incubando-os a $35^\circ\text{C} / 48 \pm 2\text{h}$. Para o teste de VP, foi transferido assepticamente 1 mL da cultura para um tubo de ensaio autoclavado, adicionando 0,6 mL de solução de a-naftol 5% e 0,2 mL de solução de KOH 40%, com agitação entre os reagentes. Deixou-se em repouso e observou-se, periodicamente, por até uma hora, o desenvolvimento de uma cor vermelha ou rosa no meio de cultura (teste positivo). A permanência do meio na cor do reagente (amarelada ou ligeiramente esverdeada) indica teste negativo (Fig. 4i). A cultura remanescente no caldo MR-VP foi reincubada por 48 horas adicionais para realização do teste de VM com 96 horas de incubação. Para a realização do teste, adicionou-se quatro gotas da solução de vermelho de metila, observando imediatamente se o meio adquiriria uma coloração vermelha (teste positivo) ou amarela (teste negativo) (Fig. 4j) (BRASIL, 2003).

Figura 5: Provas bioquímicas realizadas para caracterização de isolados provenientes de *swab* de pele, musculatura e água de cultivo de Tambaqui cultivado em tanques-rede e viveiros escavados.



SAL = controle *Salmonella spp*; EC = controle *E. coli*; CN = controle negativo; MOT = motilidade; + = positivo; - = negativo; a) e b): reações de TSI; c) reações para teste de LIA; d) reações para teste de urease; e) e f): reações de Citrato de Simmons; g) reações em meio SIM para teste de Motilidade; h) reações em meio SIM para teste de indol; i) reações teste de VM; j) reações teste VP.

Fonte: elaboração do autor

4.3.4 Identificação Bioquímica Estafilococos Coagulase positiva

Para caracterização das colônias Gram-positivas, quando na forma de cocos, aplicou-se os testes subsequentes de oxidase, catalase e coagulase.

4.3.4.1 Teste de Oxidase

Utilizando palito de madeira estéril, uma colônia foi coletada do AN e espalhada sobre tiras de papel para teste de oxidase (Laborclin Pinhais, BR). A leitura foi realizada entre 10-20 segundos. Após esse tempo, podem ocorrer reações falso-positivas. O aparecimento das cores azul (N'N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva (BRASIL, 2003).

4.3.4.2 Teste de Catalase

Com auxílio de uma alça de platina, retirou-se uma colônia isolada em AN e transferiu-se para uma lâmina contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Misturou-se o inóculo ao peróxido e observou-se a reação. A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase (BRASIL, 2003).

4.3.4.3 Teste coagulase

Com auxílio de uma alça de platina, retirou-se uma colônia isolada em AN e transferiu-se para um tubo contendo 2 mL de Caldo Cérebro Coração KASVI® (BHI). Este foi incubado a 35°C / 24 ± 2h. Decorrido este período, 0,2 mL de cada cultura obtida em BHI foi transferida para um tubo de ensaio estéril e adicionado 0,5 mL de Coagulase Plasma (plasma de coelho). Os tubos foram misturados em movimentos de rotação, sem agitar os tubos, para não interferir na coagulação. Em seguida os mesmos foram incubados a 35-37 °C e observados periodicamente, durante seis horas, se haveria formação de coágulo (BRASIL, 2003).

4.4 Agrupamento e análise genotípica dos isolados

Os isolados caracterizados foram agrupados com base nos resultados fenotípicos. Utilizando metodologia adaptada de Santos et al., (2012), para cada grupo formado, isolados representativos que o compunha foram selecionados, obtendo a quantidade de isolados para identificação molecular através do sequenciamento.

4.4.1 Extração de DNA genômico dos isolados

O DNA dos isolados foi extraído seguindo metodologia proposta por Myint et al., (2006). Alíquotas de 3 mL das culturas bacterianas, recém-crescidas em caldo nutriente a 37 °C / 18-24 h, foram transferidas para tubos de microcentrífuga, os quais foram centrifugados a 1000 × g por 2 min, para obtenção dos *pellets* celulares. O sobrenadante foi centrifugado a 13800 x g por 10 min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e lavou-se os pellets com 200 µL de água ultra pura, seguido de centrifugação a 13800 x g por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e os sedimentos foram ressuspensos em 100 µL de água ultra pura e submetidos à fervura em banho maria a 100 °C por 10 min. Em seguida, o lisado celular foi imediatamente colocado em gelo até o momento do teste de PCR.

4.4.2 Condições de PCR para sequenciamento dos isolados

Na reação de PCR foram utilizados os *primers* da região espaçadora intergênica de 16S-23S rRNA (LANE et al., 1991). Foi preparado um mix de 25 µL contendo 12,5 µL de GoTaq® Hot Start Green Master Mix, 2x (400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 dCTP, 400 µM dTTP, 4 µM MgCl₂), 9,5 µL de Nuclease-Free Water to, 1 µL (10µM) do primer 27F (5' AGAGTTTGATCCTGG CTCAG3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT3') e 1 µL de DNA de cada isolado. A amplificação ocorreu em um Termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA) com o programa de ciclagem de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos

de 95 °C por 50 s, anelamento a 58 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 50 s, e 5 min a 72 °C para extensão final. Após a amplificação das reações, os fragmentos de DNA foram corados com o corante e intercalador *Safer dye* (KASVI), separados em eletroforese em gel de agarose 0,8% a 100 V por 50 min e visualizados em um Transiluminator UV, modelo L-Pix (Loccus Biotecnologia).

4.4.3 Purificação e Quantificação dos isolados

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à purificação utilizando o Kit de purificação em coluna (MEBEP, Bioscience) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a quantificação, utilizou-se o equipamento Nano-Drop OneC (Thermo Fisher Scientific, Madison, Wisconsin, EUA).

4.4.4 Sequenciamento dos isolados

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger, pela empresa CTGene Análises Moleculares Ltda. Para cada isolado identificado e sequenciado, as sequências do gene 16S-23S rRNA foram alinhadas utilizando a ferramenta EZBioCloud (YOON et al., 2017) e comparadas aos bancos de dados do Genbank

4.5 Amostras de musculatura do pescado e aplicação da mPCR

Uma amostra de 25g da musculatura de cada pescado analisado em todos os tempos (dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20) por Barbosa (2020) foi armazenada em sacos plásticos estéreis com zíper em um freezer a -20 °C para posterior análise na mPCR. A quantidade de amostras de musculatura analisadas está descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Quantidade de amostras de musculatura de tambaqui dos sistemas de manejo tanque-rede e viveiro escavado submetidas à mPCR.

Sistema de Manejo	Amostras	1ª repetição	2ª repetição	3ª repetição	Total (n)
Tanque-rede	Musculatura	-	6	6	12
Viveiro escavado	Musculatura	6	6	6	18
Total (%)					30 (100%)

Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.1 Extração de DNA das cepas controle (protocolo kit comercial)

O DNA das cepas controle utilizadas neste trabalho foi extraído utilizando dois métodos de extração. No primeiro foi utilizado um kit comercial de extração, descrito a seguir. Para recuperação das células, alíquotas de 3 mL das culturas bacterianas, recém-crescidas em caldo nutriente a 37 °C / 18-24 h, foram centrifugadas a $7000 \times g$ por 10 min. Os pellets celulares obtidos foram submetidos à extração de DNA com o Kit illustra™ DNA Extration PHYTOPURE™ (Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA puro foi mantido em armazenamento a -20 °C até o uso. As cepas padrão utilizadas como controle positivo foram *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

O segundo seguiu o protocolo proposto por Myint et al., (2006), utilizado também para extração das amostras de musculatura, descrito no tópico seguinte.

4.5.2 Extração de DNA das amostras de musculatura e cepas controle (protocolo simples de fervura)

Para extração de DNA das amostras de musculatura dos peixes, utilizou-se 25 g das unidades analíticas amostradas no trabalho de Barbosa (2020). As amostras de musculatura foram inoculadas em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (Peptona: 10g; Cloreto de sódio, 5g; Fosfato dissódico, 3,5g; Fosfato Monopotássico, 1,5g; pH Final: $7,0 \pm 0,2$), homogeneizadas em *stomacher* por 1 min e incubadas por 18 - 24 horas a 37 ± 2 °C (APHA, 2001; BRASIL, 1992). Após o período de incubação, o DNA foi extraído de acordo com Myint et al., (2006). As cepas controle também foram inoculadas em caldo nutriente a 37 °C / 18-24 h. Resumidamente, alíquotas de 1 mL das culturas bacterianas foram transferidas para tubos de microcentrífuga, os quais foram centrifugados a $1000 \times g$ por 2 min, para precipitar as partículas de musculatura. O sobrenadante foi centrifugado a $13800 \times g$ por 10 min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e lavou-se os pellets com 200 µL de água ultra pura, seguido de centrifugação a $13800 \times g$ por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e os sedimentos foram ressuspensos em 100 µL de água ultra pura e submetidos à fervura em banho maria a 100 °C por 10 min. Após, as amostras foram incubadas em gelo e armazenadas até o momento dos testes de mPCR.

4.5.3 Padronização e especificidade dos *primers* na PCR convencional

Todos os genes alvo e os iniciadores de oligonucleotídeos (*primers*) utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 4. Os genes alvo selecionados por suas características

foram o *phoA* (fosfatase alcalina) em *E. coli* (KONG et al., 1999), o gene *invA* (proteína de invasão A) em *Salmonella* spp. (GERMINI et al., 2009), e o gene *nuc* (termonuclease) em *S. aureus* (ZHANG et al., 2009). Estes genes foram relatados em publicações como os alvos genéticos mais específicos e confiáveis para os respectivos patógenos (LEE et al., 2014). Além disso, os pares de *primers* direcionados às regiões altamente conservadas do gene 16S rRNA (GERMINI et al., 2009), foram empregados como um controle interno da presença de DNA bacteriano amplificável. Em uma reação de PCR sem um controle interno de amplificação, uma resposta negativa pode significar que não há nenhuma sequência alvo presente, mas também pode significar que a amplificação foi inibida. Por outro lado, com o uso de um controle interno, a ausência de resposta tanto dos genes alvo quanto do sinal do controle interno, significa que a PCR falhou (DIEZ-VALCARCE et al., 2011, ZHANG et al., 2014).

Tabela 4: Pares de *primer* selecionados para a reação em cadeia da polimerase multiplex (mPCR)

Patógeno alvo	Gene	Sequência de <i>primer</i> (5' → 3')	Produto PCR (bp)	Referência
<i>E. coli</i>	<i>phoA</i>	F:GTGACAAAAGCCCGGACACCATAAAATGCCT R:TACACTGTTCATTACGTTGCGGATTTGGCGT	903	Kong et al., 1999
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	F:AATTATCGCCACCACGTTCCGGGCAA R:TCGCACCGTCAAAGGAACC	278	Germini et al., 2009
<i>S. aureus</i>	<i>nuc</i>	F:AAATTACATAAAGAACCTGCGAC R:GCACTTGCTTCAGGACCATA	164	Zhang et al., 2009
DNA bacteriano	16S rRNA	F:CCTACGGGAGGCAGCAGT R:CGTTTACGGCGTGGACTAC	475	Germini et al., 2009

Fonte: Adaptado de Lee, et al (2014).

Para a padronização, primeiramente os pares de *primers* foram diluídos em água ultra pura conforme especificações do fabricante (Integrated DNA Technologies, IDT), com concentração final de 100 µM. Em seguida preparou-se uma solução de trabalho a 10 µM de cada *primer* e realizou-se uma PCR convencional para verificar a especificidade dos mesmos. A PCR foi realizada usando um Termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA) contendo 12,5 µL de GoTaq® Hot Start Green Master Mix, 2x (400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 dCTP, 400 µM dTTP, 4 µM MgCl₂), 9,5 µL de Nuclease-Free Water to, 1 µL de cada *primer* e 1 µL de DNA das cepas ATCC (extraído com kit comercial), com um volume final de 25 µL. Os parâmetros da reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 50 s, anelamento a 58 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 50 s, e 5 min a 72 °C para extensão final. Após a amplificação das reações, os fragmentos de DNA foram corados com o corante e intercalador *Safer dye* (KASVI), separados em eletroforese em gel de agarose 0,8% a

100 V por 50 min e visualizados em um Transiluminator UV modelo L-Pix (Loccus Biotecnologia).

4.5.4 Definição dos parâmetros para mPCR a partir das cepas controle

O ensaio da mPCR foi padronizado pela variação de parâmetros individuais, de acordo com Lee et al., (2014), com algumas modificações. Os parâmetros avaliados foram a sensibilidade pelo limite de detecção, e especificidade pela temperatura de anelamento, concentração final dos *primers* e proporção de DNA para cada patógeno alvo.

4.5.4.1 Sensibilidade da mPCR

Para avaliação da sensibilidade, o limite de detecção foi realizado utilizando diluições seriadas das cepas controle de 10^{-1} a 10^{-8} em solução salina peptonada estéril (Cloreto de sódio, 9g/L; Peptona: 1g/L). A partir dos tubos contendo as diferentes diluições foram transferidos 100 μ L para placas contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) KASVI® através da técnica de plaqueamento em superfície. As placas de PCA foram incubadas a 35 °C / 24 h. Após o período de incubação foi feita a contagem das placas com as diluições que apresentaram melhor visualização, e que continham entre 25 e 250 colônias. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro da amostra foi calculado multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada (APHA, 2001). O DNA das diluições foi extraído utilizando o protocolo do item 4.5.2 e submetidos a mPCR.

4.5.4.2 Especificidade da mPCR

Para avaliação da especificidade da mPCR, primeiramente foram preparados mixes de DNA das três cepas de referência, sendo o DNA extraído pelos métodos simples de fervura e de extração com kit comercial. As proporções de ambos, foram as seguintes:

Mix de DNA – método simples de fervura

Mix 1: 5 μ L /1 μ L /1 μ L para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*, respectivamente;

Mix 2: 10 μ L /1 μ L /1 μ L para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*, respectivamente; e

Mix 3: 15 μ L /1 μ L /1 μ L para *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus*, respectivamente.

Mix de DNA – método de extração com kit comercial

Mix 1: 10 ng/10 ng/10 ng para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*, respectivamente; e

Mix 2: 100 ng/10 ng/10 ng para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*, respectivamente.

Quanto às condições de temperatura, realizou-se um gradiente de temperatura com as amostras de DNA das cepas controle, com o objetivo de averiguar as melhores condições de anelamento, sendo: 51,6; 52,7; 54,5; 56,5; 58,2 e 59 °C.

Os ensaios de mPCR foram realizados com as cepas extraídas pelos dois métodos de extração apresentados, para efeito de comparação quanto a proporção de cada DNA no mix. A mPCR foi realizada usando um Termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA) contendo 12,5 µL de GoTaq® Hot Start Green Master Mix, 2x (400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 dCTP, 400 µM dTTP, 4 µM MgCl₂), 1,75, 2,25, 1,25 e 0,5 µL para os pares de *primers phoA*, *invA*, *nuc* e 16S rRNA, respectivamente e 1 µL de DNA das cepas ATCC. Os *primers* utilizados na reação foram padronizados a 20 µM. Os parâmetros da reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 50 s, anelamento a 59 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 50 s, e 5 min a 72 °C para extensão final. Após a amplificação das reações, os múltiplos fragmentos de DNA foram corados o corante e intercalador *Safer dye* (KASVI) e separados em eletroforese em gel de agarose 2% a 100 V por 50 min e visualizados em um Transiluminator UV modelo L-Pix (Loccus Biotecnologia).

4.5.4.3 mPCR das amostras de musculatura de tambaqui para detecção simultânea de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*

Para a detecção das bactérias alvo do pescado obtido de diferentes formas de manejo foram utilizados os *primers* específicos (Tab. 3) e as amostras de DNA extraídas da musculatura. As reações foram realizadas seguindo as condições de padronização descritas anteriormente. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% a 100 V por 50 min e a visualizados em um Transiluminador UV. Considerou-se positiva a detecção do patógeno alvo quando foi possível observar amplificação de acordo com o tamanho estimado em pares de bases da banda (Tab 3) no gel de agarose. Um marcador de peso molecular (LowRanger 100bp DNA Ladder) foi utilizado como referência para observação do tamanho dos pares de base.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação polifásica dos isolados

5.1.1 Caracterização Fenotípica dos isolados

Dos 181 isolados bacterianos obtidos de *swab* de pele, água de cultivo e musculatura de tambaqui cultivado em tanques-rede, 32 foram agrupados por características fenotípicas, formando 6 grupos distintos (Tab 5), sendo: 1 grupo característico para a família *Enterobacteriaceae* (G1), 3 grupos para *Salmonella* spp. (G2, G3 e G4), 1 para *Escherichia* sp. (G5) e 1 para Estafilococos coagulase positiva (G6).

Dos 289 isolados obtidos de *swab* de pele, água de cultivo e musculatura de tambaqui cultivado em viveiros escavados, 53 foram agrupados por suas características fenotípicas, formando 7 grupos distintos (Tab. 6), sendo: 2 grupos característicos para o gênero *Salmonella* sp. (G7 e G8), 2 grupos para família *Enterobacteriaceae* (G9 e G10), 2 para *Escherichia* sp. (G11 e G12) e 1 para Estafilococos coagulase positiva (G13).

Dos isolados caracterizados como *Salmonella* spp. (Tab. 5: G3 e G4 e Tab. 6: G7), 19 foram positivos para os testes de motilidade, descarboxilação da lisina, citrato, vermelho de metila, e produção de ácido a partir de glicose, enquanto apresentaram-se negativos para consumo de lactose e sacarose, formação do acetilmetilcarbinol (Voges-Proskauer) e produção de urease. Segundo Brasil (2011), tais características são reconhecidas como de isolados de *Salmonella* spp. Em contrapartida, em ambos os sistemas de cultivo, houve incidência de 27 isolados com resultados variáveis para fermentação da lactose e sacarose e produção de gás, os quais foram agrupados e classificados como *Salmonella* sp. atípicas (Tab. 5: G2; Tab. 6: G7 e G8). De acordo com a *Food Drugs Administration* (FDA, 2021), as culturas atípicas que apresentam acidez em ágar LIA, e/ou fermentação da lactose/sacarose em ágar TSI devem ser consideradas como potenciais isolados de *Salmonella* e submetidas a testes sorológicos ou moleculares.

Em relação aos isolados caracterizados como *Escherichia* spp., 2 grupos foram gerados (Tab. 5: G5 e Tab. 6: G11), sendo positivos para os testes de produção de indol, motilidade, teste de vermelho de metila, descarboxilação da lisina, produção de ácido a partir de glicose, lactose e sacarose, e negativos para a reação de Voges-proskauer, produção de urease e utilização de citrato. Tais características são compatíveis com o gênero *Escherichia* sp. segundo Holt et al (1994).

Tabela 5. Caracterização bioquímica dos isolados de amostras *swab* de pele, musculatura e água de cultivo de Tambaqui cultivado em tanque-rede

G. Bioq.	N° isolados	Id. Bioq.	Morf.	Gram	Consumo de Açúcares											
					Gli.	Lac.	Sac.	Gás	Ur.	Mot.	H2S	Ind.	Lis.	Cit.	VP	VM
G1	4	<i>Enterobacteriaceae</i> .	Bacilos	-	+	+	+	+*	-	+	-	-	+*	+	-*	+*
G2	5	<i>Salmonella</i> sp.	Bacilos	-	+	+*	+*	-	-	+	+	-	+	+	-	+
G3	7	<i>Salmonella</i> sp.	Bacilos	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
G4	5	<i>Salmonella</i> sp.	Bacilos	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
G5	4	<i>Escherichia</i> sp.	Bacilos	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
G6	7	Estafilococos coagulase positiva	Cocos	+				Oxi. -					Cat. +			Coag. +

G.Bioq = Grupo Bioquímico; Id.Bioq = Identificação Bioquímica; Morf. = Morfologia; + = positivo; +* = variável; - = negativo; Gli = glicose; Lac = lactose; Sac = sacarose; Ur = urease; Mot = motilidade; Ind = indol; Cit = citrato; Vp = Voges Prousker; VM = Vermelho de Metila; Oxi = oxidase; Cat = catalase; Coag = coagulase.

Tabela 6. Caracterização bioquímica dos isolados de amostras *swab* de pele, musculatura e água de cultivo de tambaqui cultivado em viveiro escavado

G. Bioq.	N° isolados	Id. Bioq.	Morf.	Gram	Consumo de Açúcares											
					Gli.	Lac.	Sac.	Gás	Ur.	Mot.	H2S	Ind.	Lis.	Cit.	VP	VM
G7	7	<i>Salmonella</i> spp.	Bacilos	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
G8	15	<i>Salmonella</i> spp.	Bacilos	-	+	+*	+*	-	-	+	+	-	+	+	-	+
G09	11	<i>Enterobacteriaceae</i>	Bacilos	-	+	-*	-*	+	-	+	-	-	-*	+	-*	-*
G10	3	<i>Enterobacteriaceae</i>	Bacilos	-	+	+*	+*	+	-	+	-	-	+*	+	-*	+*
G11	9	<i>Escherichia</i> spp.	Cocobacilos	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
G12	8	Estafilococos coagulase positiva	Cocos	+				Oxi. -					Cat. +			Coag. +

G.Bioq = Grupo Bioquímico; Id.Bioq = Identificação Bioquímica; Morf. = Morfologia; + = positivo; +* = variável; - = negativo; Gli = glicose; Lac = lactose; Sac = sacarose; Ur = urease; Mot = motilidade; Ind = indol; Cit = citrato; Vp = Voges Prousker; VM = Vermelho de Metila; Oxi = oxidase; Cat = catalase; Coag = coagulase.

As cepas de *Salmonella* sp. e *E. coli* apresentam distintos perfis em meio presuntivo, desta forma, ocorre uma grande variabilidade bioquímica entre si, especialmente em relação a produção de gás a partir da fermentação da glicose, da lactose e sacarose, descarboxilação da lisina e motilidade. A fermentação da lactose, bem como produção de indol são as provas que, usualmente, definem as cepas de *E. coli*. E as provas de fermentação da lactose e sacarose, descarboxilação da lisina e produção de urease são as que definem as cepas de *Salmonella* spp. Esses fatores tornam o processo de identificação bioquímica das espécies de difícil interpretação, sendo necessária uma análise visual detalhada e subjetiva dos resultados. Contudo, para um completo diagnóstico das categorias diarreicogênicas de *E. coli* e sorovares de *Salmonella* spp., faz-se necessário a identificação por sorotipagem e pesquisa de fatores de virulência (BRASIL, 2003).

Quanto aos isolados caracterizados como Estafilococos coagulase positiva é demonstrado que 15 isolados (Tab. 5: G6 e Tab. 6: G12) foram considerados positivos para o gênero, sendo Gram-positivos, oxidase negativa, catalase positiva e coagulase positiva.

Os demais 385 isolados não foram inclusos nos resultados, pois suas características bioquímicas não eram compatíveis com os patógenos alvo deste trabalho. Entretanto, os mesmos permanecem armazenados no banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, podendo serem caracterizados futuramente.

Devido a caracterização bioquímica dos 11 isolados pertencentes aos grupos G1, G9 e G10 terem apresentado considerável variação nos testes em relação ao descrito na literatura, não sendo possível a identificação a nível de gênero, estes foram caracterizados como pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. Como a identificação bioquímica muitas vezes não é suficiente para identificar enterobactérias, o complemento da identificação molecular por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA torna-se importante na identificação de microrganismos, corroborando com a importância da identificação polifásica nesses casos.

5.1.2 Caracterização Genotípica dos isolados

A concentração dos produtos de PCR dos 26 isolados purificados e sequenciados variou de 8,1 ng/μL a 28,6 ng/μL e a qualidade entre 1.62 a 1.92 na absorbância A260/A280 e 0.08 a 1.66 na absorbância A260/230. Para realização do sequenciamento, a concentração da amostra deve estar entre 10-50 ng/μL (ACTGENE, s.d).

A análise da sequência do gene 16S rRNA dos isolados selecionados a partir de cada um dos 13 grupos (Tab. 7) mostrou que os isolados pertencentes ao Grupo 1 (G1) apresentaram similaridade na faixa de 80-88% com as espécies *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter asburiae*.

E. cloacae pode causar infecções do trato urinário e infecções hospitalares. Elas são amplamente distribuídas em seres humanos e animais, assim como na água, no esgoto e no solo. O isolamento dessa bactéria em peixes é indicativo de contaminação fecal, uma vez que esse microrganismo não faz parte da microbiota normal desse animal (ALMEIDA et al., 2017). *Enterobacter asburiae* já foi relatada como possível produtora de histamina em alguns alimentos. A intoxicação por peixes com histamina é uma intoxicação que pode ser causada pelo consumo de diferentes de peixes marinhos. Raramente os peixes de água doce, crustáceos e moluscos podem causar essa doença (LIRA, 2019; RYDER, IDDYA E ABABOUC, 2014). A formação de histamina em peixes requer a presença de microrganismos produtores de descarboxilase, que podem ser introduzidos por contaminação, logo a falta de higiene é provavelmente o principal fator envolvido na formação desses compostos (ZHANG et al., 2018; BIJI et al., 2016; FADHLAOUI-ZID et al., 2012).

Os 39 isolados pertencentes aos Grupos G2, G3, G4, G7 e G8 apresentaram similaridade acima de 94% com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (Tab. 7), tais resultados condizem com os da identificação fenotípica para os isolados, indicando que estes grupos possuem representantes do gênero *Salmonella* sp. Portanto, a incidência de *Salmonella* nos isolados da musculatura, *swab* de pele e água de cultivo dos pescados de tanque-rede e viveiro escavado foi confirmada na identificação polifásica. A contaminação por *Salmonella* em amostras de musculatura pode ser devido a característica filtradora que o pescado possui, influenciada pela contaminação presente na água de cultivo, tendo em vista que essa bactéria não faz parte da microbiota deste animal (ALMEIDA et al., 2013; BARBOSA, 2020). A prevalência de *Salmonella* spp. identificada nos isolados provenientes dos cultivos em tanque-rede e viveiro escavado pode ser explicada, ainda, pela contaminação do meio aquático por esgoto, dejetos animais ou humanos, ou também, pelo processo de manuseio no momento da captura, resultando na contaminação e possível deterioração do pescado (CUNHA-NETO et al., 2019).

A identificação de amostras contaminadas por *Salmonella* spp. representa um perigo para a saúde da população pelo consumo de peixes contaminados. A legislação vigente no Brasil, relacionada aos padrões microbiológicos de alimentos, preconiza que a presença de

Salmonella em 25 g de pescado fresco é suficiente para descartá-lo (BRASIL, 2019). Relatos de peixes abrangendo diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. têm aumentado em vários países na última década. Em uma pesquisa avaliando peixes nativos brasileiros adquiridos de tanques de policultivo de fazendas comerciais, foram detectados sorovares de *Salmonella* nos swab de brânquias e água de cultivo, nos estados da Bahia, Mato Grosso, Tocantins e São Paulo. Os sorovares Panama, Hadar, Saintpaul e Heidelberg detectados foram isolados de carcaças de tambaqui (*Colossoma macropomum*) (SANTOS et al., 2019). Alguns autores sugerem que a presença de *Salmonella* spp. em peixes eviscerados, filés, costelas e bacalhau salgado comercializados em supermercados de cidades das regiões centro-oeste, nordeste e sudeste do Brasil indica contaminação cruzada durante o processamento do pescado (DUARTE et al., 2010; MAYRLA et al., 2017; CUNHA-NETO et al., 2019). Para a identificação dos sorotipos de *Salmonella* spp. é necessária a aplicação de métodos de sorologia, para detecção de antígenos somáticos (O) e flagelares (H).

Tabela 7: Identificação genotípica de bactérias isoladas de amostras swab de pele, musculatura e água de cultivo de tambaqui cultivado em tanque rede e viveiro escavado

Tanque-rede					
G. Bioq.	Nº de isolados sequenciados	Cód. isolado representativo	Identificação Genotípica	Similaridade Genética (%)	Identificação Fenotípica
G1	3	4Ms	<i>Enterobacter</i> sp.	88.29	<i>Enterobacteriaceae</i>
G2	1	172Ac	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	98.88	<i>Salmonella</i> sp.
G3	1	90Sp	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	95.96	<i>Salmonella</i> sp.
G4	1	56Ms	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	95.21	<i>Salmonella</i> sp.
G5	1	124Ac	<i>Escherichia coli</i> strain NBRC 102203 16S ribosomal RNA	95.11	<i>Escherichia</i> sp.
G6	2	104Ms	<i>Staphylococcus aureus</i> strain NBRC 100910 16S ribosomal RNA gene	69.71	<i>Staphylococcus</i> sp.

Cont..

Viveiro Escavado					
G. Bioq.	Nº de isolados sequenciados	Cód. isolado representativo	Identificação Genotípica	Similaridade Genética (%)	Identificação Fenotípica
G7	3	208Sp	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	95.89	<i>Salmonella</i> sp.
G8	6	444Ms	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	95.21	<i>Salmonella</i> sp.
G9	4	280Ms	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92.81	<i>Enterobacteriaceae</i>
G10	1	247Sp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	<i>Enterobacteriaceae</i>
G11	2	465Sp	<i>Escherichia coli</i> strain NBRC 102203 16S ribosomal RNA	95.67	<i>Escherichia</i> sp.
G12	1	484Sp	<i>Staphylococcus aureus</i> strain NBRC 100910 16S ribosomal RNA gene	76.78	<i>Staphylococcus</i> sp.

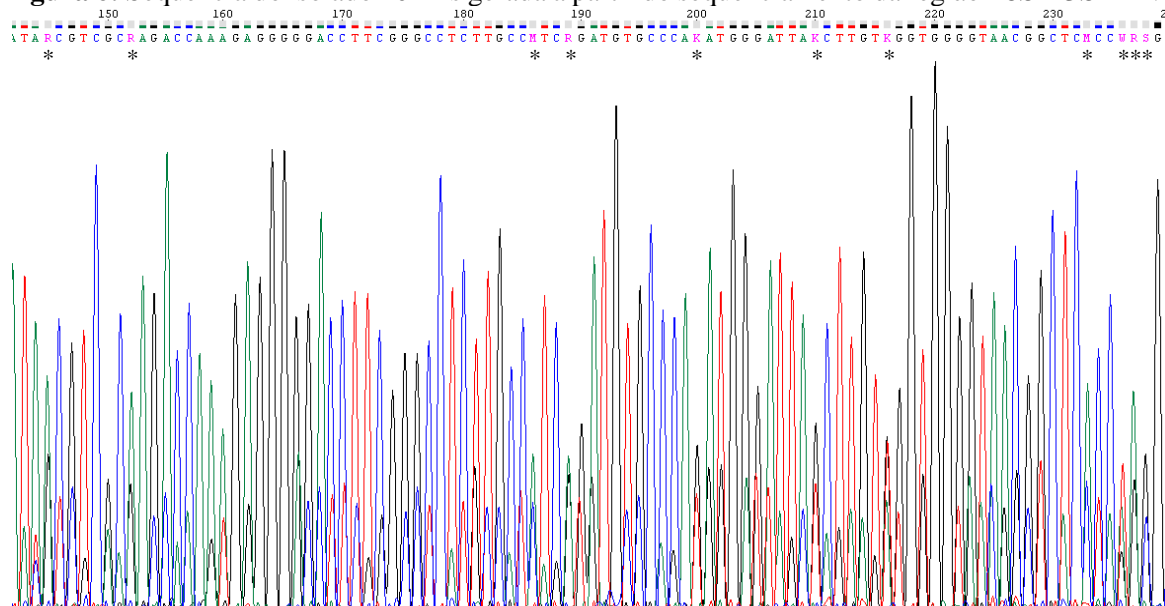
G. Bioq = Grupo bioquímico; Sp = *swab* de pele; Ac = Água de Cultivo; Ms = Musculatura do pescado.

Os isolados representativos dos grupos G5 e G11 (Tab. 7) apresentaram similaridade acima de 94% com *Escherichia coli*. Este resultado corrobora com a identificação fenotípica em nível de gênero para esses isolados. A identificação polifásica de *E. coli* nos isolados de água de cultivo e *swab* da pele do pescado demonstra que há uma possibilidade de os peixes serem contaminados posteriormente em outros pontos relevantes ao longo de sua cadeia de produção, como evisceração, fatiamento, preparação e tratamento (COSTA et al., 2020). Ademais, quanto a essa não identificação de *E. coli* nos isolados de musculatura, supõe-se que as amostras foram analisadas dissecando o animal em condições assépticas para que a musculatura fosse cuidadosamente separada do conteúdo intestinal (BARBOSA, 2020), o que geralmente não ocorre na prática diária dos pescadores e manipuladores. Comumente, é feito um corte entre o ânus e a cabeça do peixe, liberando todo o seu conteúdo intestinal e, levando, nesse processo, a contaminação ao músculo (CARDOSO et al., 2018). Confirmando, novamente, que em condições não higiênicas o alimento por vir a ser contaminado.

Os isolados caracterizados fenotipicamente como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* sp (G6 e G12) apresentaram baixa similaridade com a espécie *S. aureus* (69-76%). Entretanto, tal resultado pode ser explicado pela baixa qualidade das sequências geradas, as quais apresentaram muitos *gaps* (letras aleatórias substituindo os nucleotídeos

ATGC) (Fig. 6), não permitindo inferir sobre a correta identificação genotípica desses isolados. Dessa forma, seria necessário a repetição do sequenciamento, para esses isolados, para obtenção de uma sequência de melhor qualidade.

Figura 6: Sequência do isolado 104Ms gerada a partir do sequenciamento da região 16S-23S rRNA



* = gaps na sequência

Barbosa (2020) encontrou populações de $1,0 \times 10^6$ UFC/cm² nas amostras de *swab* de pele de tanque-rede e em viveiro escavado de $4,2 \times 10^2$ UFC/cm². Entretanto, vinte potenciais isolados *S. aureus* das amostras de água e *swab* de pele perderam viabilidade, logo não foi possível realizar a identificação polifásica dos mesmos. O gênero *Staphylococcus* spp. desempenha importante papel na saúde pública, causando intoxicações alimentares, e ocasionalmente infecções em pacientes cujo sistema imunológico esteja comprometido. É frequentemente encontrado no nariz, trato respiratório, pele do couro cabeludo humano, face, pescoço, orelhas, axilas, períneo e região pubiana, desta forma a manipulação inadequada de alimentos pode ocasionar a sua contaminação por este patógeno (AL SHABEEB et al., 2016).

Os isolados representantes dos Grupos G9 e G10 (Tab. 7), os quais foram caracterizados como pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, foram identificados pelo sequenciamento como *Pseudomonas aeruginosa*, com similaridade entre 92-100%. O teste da oxidase é um teste-chave que permite distinguir esta espécie das enterobactérias (MURRAY, ROSETHAL e PFALLER, 2014). Entretanto, o mesmo não foi utilizado nesse estudo para os isolados caracterizados, no teste morfotintoral, como Gram-negativo, apenas para os caracterizados como Gram-positivo. Espécies de *Pseudomonas* são frequentemente

associadas a peixes, sendo estas bactérias isoladas da pele, brânquias e intestinos de peixes (KLUGA et al., 2017; KAČÁNIOVÁ et al., 2017). A presença de *Pseudomonas* sp. causa rápida deterioração de peixes e produtos pesqueiros, e a dominância deste grupo bacteriano indica que os peixes são propensos à deterioração. Essa bactéria faz parte da microbiota normal dos peixes e é uma das principais causas de septicemia em peixes de água doce, resultando em enormes perdas econômicas nos setores produtores de pescado em todo o mundo. Atualmente, vários estudos são realizados para realizar a detecção adicional de *P. aeruginosa*, considerando não apenas seu impacto econômico, mas também por sua importância para a saúde pública (ROSTAMZADEH et al., 2016; KLUGA et al., 2017).

Dos organismos identificados, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, as bactérias *E. coli* (COWLEY et al., 2016), *S. aureus* (ZHAO et al. 2016), *Salmonella* spp. (WALLACE et al., 2014) e *Enterobacter* (GAO et al., 2021) são considerados patógenos não autóctones, que contaminam pescados ou habitats de pescados (SICHEWO et al., 2014; GUFÉ et al., 2019). Podem ser oriundos de contaminação cruzada durante o manuseio e limpeza dos peixes e se acumulam nas partes comestíveis, representando riscos à saúde dos consumidores (DONE et al., 2015). A poluição da água é outro fator que afeta a contaminação das cadeias alimentares e cadeias alimentares que estão conectadas à água (MANJENGWA et al., 2019). A presença de animais nas bordas dos tanques, descarte de dejetos de esgotos sem o devido processo de tratamento, esterco animal usado para fertilização do solo, ração, bem como o escoamento de fezes de aves e roedores infectados, podem ser os principais vieses de contaminação por material fecal em pescado criado em tanques-rede e viveiros escavados (D'AOUST, 1995; SANTOS et al., 2019).

Uma pesquisa realizada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças mostrou que quase 7% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos na União Europeia estão associadas ao consumo de peixe e produtos derivados de peixe (EFSA; ECDC, 2016). No Brasil, de 2009 a 2018, um total de 6.809 casos de surtos de origem alimentar foram oficialmente notificados, dos quais 2.350 foram confirmados laboratorialmente, e desses últimos, 49 foram causados por pescados, frutos do mar e processados. Infelizmente no País, ainda são poucos os dados de DTA's notificados relacionados com consumo de peixe, pois o sistema de investigação é falho e falta investimento na área (BRASIL, 2019).

5.2 Parâmetros da mPCR a partir das cepas controle

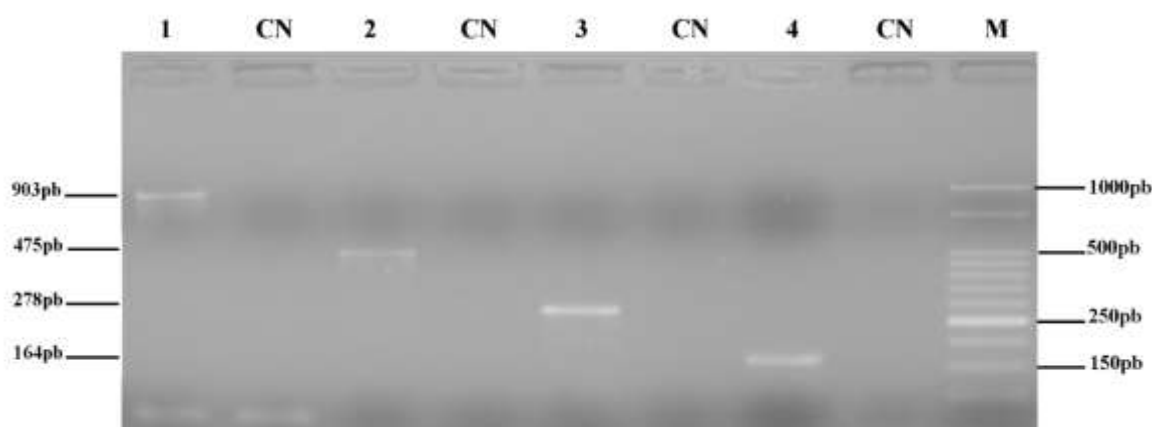
5.2.1 Qualidade de DNA extraído das cepas de referência

A concentração de DNA extraído das cepas de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram de 197,0 ng/μL, 343,3 ng/μL e 38,9 ng/μL, respectivamente. Todas as amostras de DNA apresentaram boa qualidade, com valores entre 1.8 - 2.0 na absorvância A260/A280 e 2.0 - 2.2 na absorvância A260/230. Os quocientes A260/A230 (EDTA, polissacarídeos e etanol) e A260/A280 (proteínas) fornecem uma estimativa da pureza do ácido nucleico. Se a amostra for pura, a proporção deve estar entre 1,8 e 2 e entre 1,8 e 2,2, respectivamente (BARROS, et al., 2018).

5.2.2 Especificidade dos primers na PCR convencional

Na PCR convencional, os resultados mostraram amplificação dos genes *phoA*, *invA* e *nuc* para as culturas bacterianas de *E.coli*, *Salmonella* e *S. aureus*, respectivamente (Fig. 7). O tamanho dos fragmentos amplificados de *E. coli* foi de 903 pb, o de *Salmonella* foi de 278 pb e o de *S. aureus* de 164 pb, conforme esperado. O par de primers do gene 16S rRNA, utilizado para controle interno da presença de DNA bacteriano, também foi visualizado, apresentando banda de tamanho 475 pb, conforme esperado. Cada reação de amplificação por PCR gerou um fragmento de DNA único com o tamanho esperado, sem produzir produtos de PCR inespecíficos, o que indicou que os conjuntos de primers utilizados são específicos para cada espécie testada.

Figura 7: Produtos de PCR convencional das cepas bacterianas de referência visualizados por eletroforese em gel de agarose

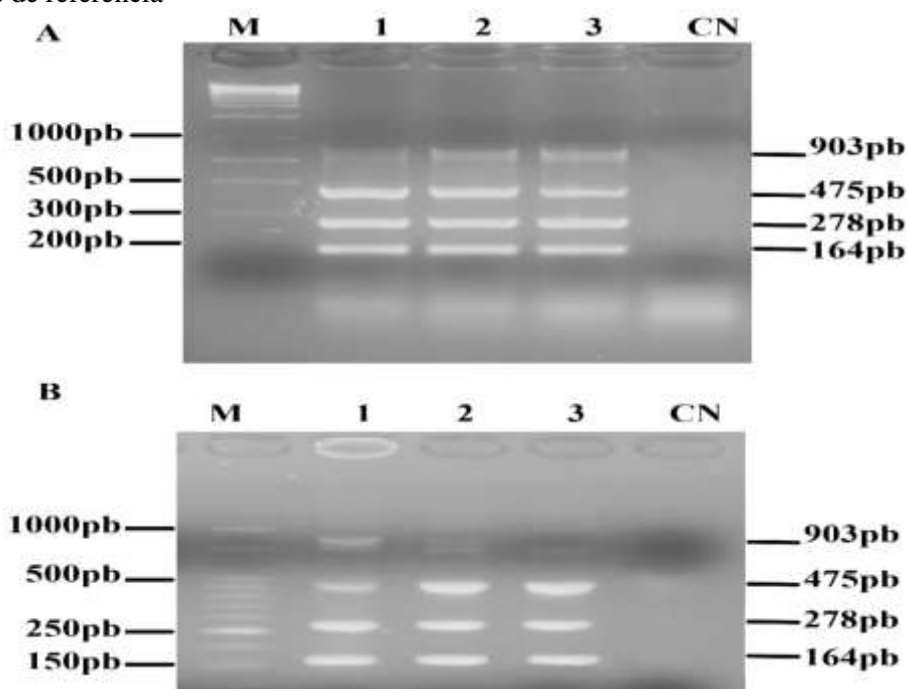


Poço 1-4: são *E. coli*, 16SrRNA; *Salmonella* e *S. aureus*, respectivamente; M = marcador de peso molecular Ladder 50 pb; CN = controle negativo (sem DNA).

5.2.3 Especificidade e Sensibilidade da mPCR

Das concentrações e temperaturas (51,6 °C–59 °C) testadas, as condições ideais para a mPCR foram 20 uM de cada primer (*phoA*, *invA*, *nuc* e *16S* rRNA) a uma temperatura de anelamento a 59 °C. A detecção da mPCR nas culturas foi aplicada para verificar o desempenho correto de cada par de *primer* e o desempenho do método de extração de DNA. Os resultados mostraram que a especificidade da mPCR não foi afetada ao detectar os genes específicos (*phoA*, *invA* e *nuc*) dos três patógenos alvo, em comparação da PCR individual (Fig. 8). Quanto a comparação do ensaio utilizando mixes de DNA das cepas em diferentes proporções, extraído por dois protocolos de extração distintos, a especificidade da reação também não foi afetada (7A e 7B). Esses mixes de DNA, em diferentes proporções, foram realizados devido as dificuldades de padronização da mPCR com as cepas extraídas pelo método simples.

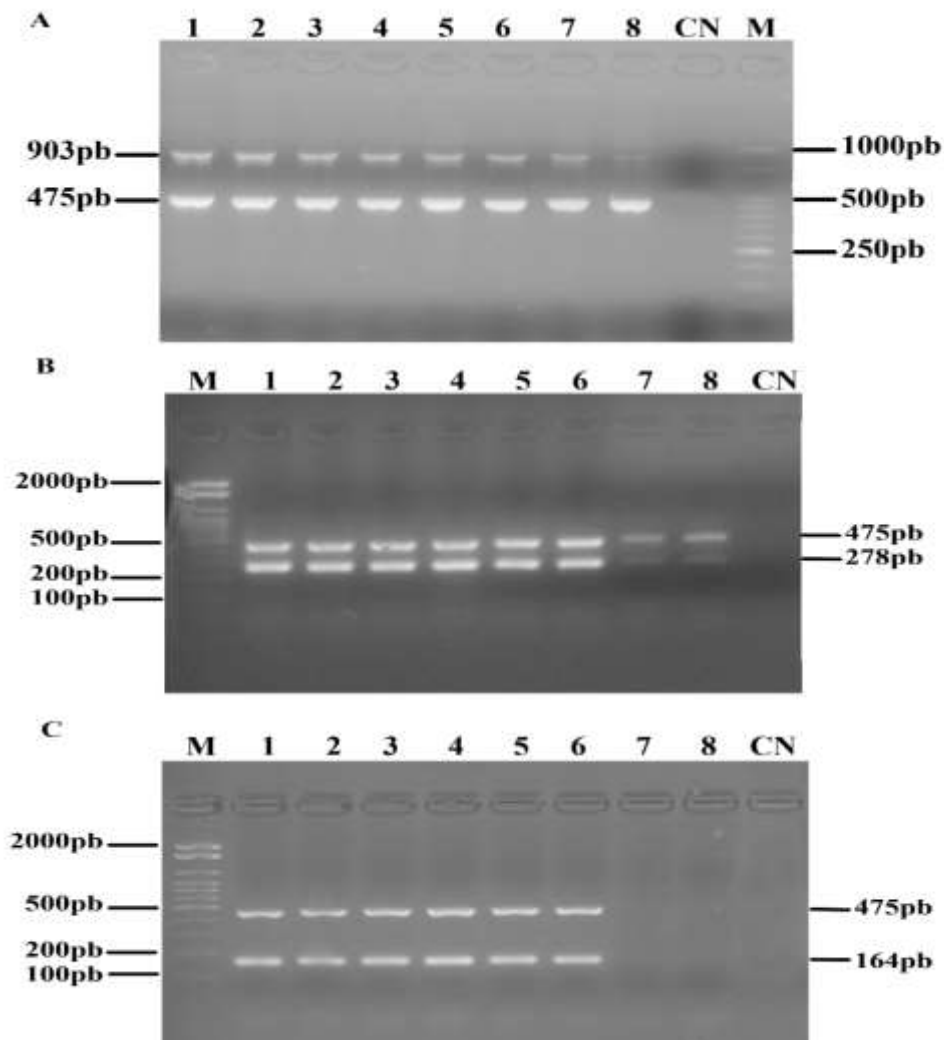
Figura 8: Especificidade da mPCR utilizando diferentes protocolos de extração de DNA das cepas bacterianas de referência



A = mPCR das cepas de referência com DNA extraído pelo método simples de fervura; M = marcador de peso molecular *Ladder* 50; pb; poço 1: mix de DNA nas proporções 5 uL/1uL/1uL para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*, respectivamente; poço 2: mix de DNA nas proporções 10 uL/1uL/1uL para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*, respectivamente; poço 3: mix de DNA nas proporções 15 uL/1uL/1uL para *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus*, respectivamente; CN = controle negativo (sem DNA). B = mPCR das cepas de referência com DNA extraído pelo kit de extração; M = marcador de peso molecular *Ladder* 50 pb; poço 1: mix de DNA nas proporções 15 uL/1uL/1uL para *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus*, respectivamente (extração simples); poço 2: mix de DNA nas proporções 10ng/10ng/10ng para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*, respectivamente; poço 3: concentração de DNA nas proporções 100ng/10ng/10ng para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus*, respectivamente; CN = controle negativo (sem DNA).

O limite de detecção (Fig. 9) do método de mPCR foi de $2,0 \times 10^8$ UFC/ mL para *E. coli*, $5,0 \times 10^8$ UFC / mL para *Salmonella* e $1,0 \times 10^6$ para *S. aureus*. A detecção de *S. aureus* foi caracterizada como menos sensível do que a de *E. coli* e *Salmonella* spp. para os DNA de cultura pura. Wei et al., (2018) ressalta que bactérias Gram-positivas por possuírem uma parede celular mais espessa e resistente que as Gram-negativas, durante o processo de extração de DNA, dependendo do método utilizado, podem ocasionar na liberação incompleta do mesmo. Supõe-se que este fato, pode vir a influenciar em análises dependente de DNA como a PCR.

Figura 9: Sensibilidade da mPCR para detectar os genes de *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus* a partir do DNA das cepas controle extraído pelo método simples de fervura



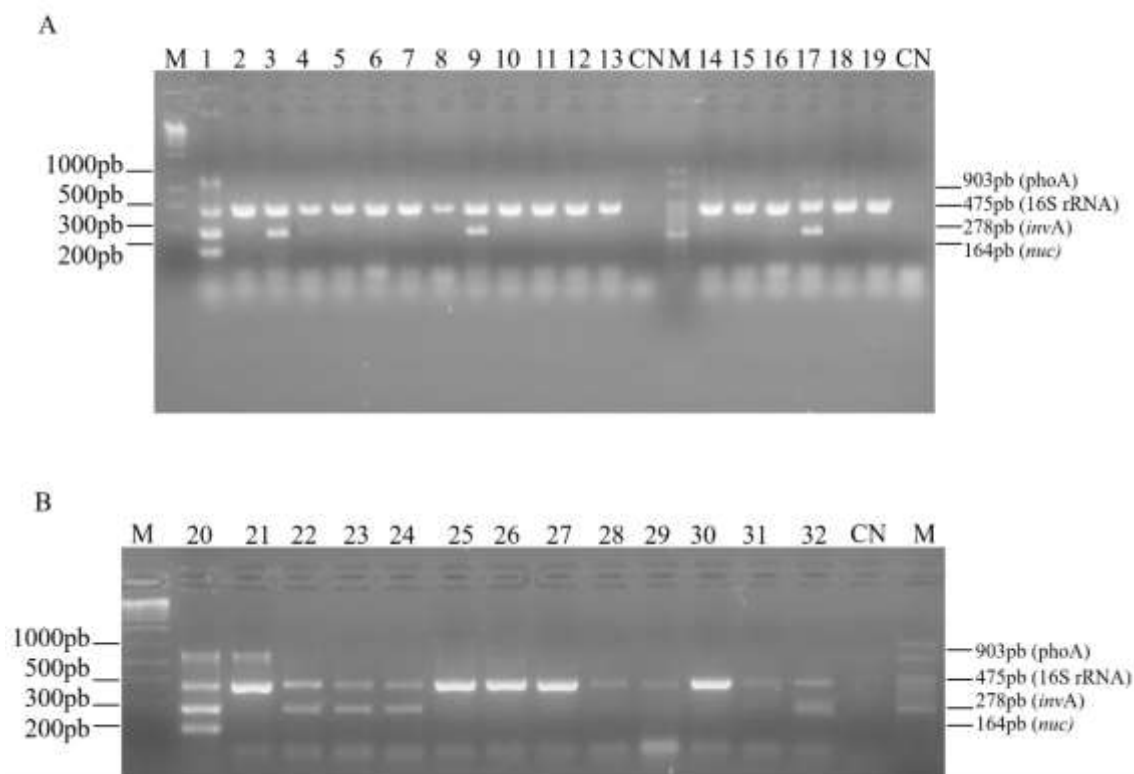
A = Sensibilidade das condições de mPCR para detecção de *E. coli* nas cepas controle. M = marcador de peso molecular LowRanger 100bp; poços 1 – 8: concentrações variáveis de suspensão bacteriana de 10^{-1} – 10^{-8} UFC/ mL; CN: Controle Negativo. B = sensibilidade das condições de mPCR para detecção de *Salmonella* nas cepas controle. M = marcador de peso molecular LowRanger 100bp; poços 1 – 8: concentrações variáveis de suspensão bacteriana de 10^{-1} – 10^{-8} UFC/ mL; CN: Controle Negativo. C = Sensibilidade das condições de mPCR para detecção de *S. aureus* nas cepas controle;

M: = marcador de peso molecular LowRanger 100bp; poços 1 – 8: concentrações variáveis de suspensão bacteriana de 10^{-1} – 10^{-8} UFC/ mL; CN: Controle Negativo.

5.3 mPCR das amostras de musculatura de tambaqui para detecção simultânea de *E. coli*, *Salmonella* sp, e *S. aureus*

Das 12 amostras de musculatura analisadas microbiologicamente nos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20, provenientes do sistema de manejo tanque-rede, submetidas à mPCR, foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em duas amostras, sendo essas do dia 4 das duas coletas (poços 3 e 9 / 2ª repetição e 3ª repetição) (Fig. 10). O tamanho do fragmento gerado pela amplificação do gene *invA* foi de 278 pb. Os genes *phoA* e *nuc* de *E. coli* e *S. aureus* não foram amplificados nas amostras de musculatura de tambaqui cultivados em tanque-rede (Fig. 10A, poços 1-13). O gene de controle interno 16S rRNA foi amplificado em todas amostras, gerando uma banda de 475 pb.

Figura 10: Produtos de mPCR aplicada à detecção de patógenos em amostras de musculatura de tambaqui cultivados em tanque-rede e viveiros escavados armazenadas em gelo por 0, 4, 8, 12, 16 e 20 dias.



A = mPCR das amostras de musculatura de tambaqui do sistema de manejo tanque-rede (poços 1-13); Poço 1: Controle positivo do multiplex com DNA de cepas extraídas pelo método simples; poços 2-7: amostras dos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20 da 2ª repetição, respectivamente; poços 8 – 13: 0, 4, 8, 12, 16 e 20 da 3ª repetição, respectivamente. A/B = mPCR das amostras de musculatura de tambaqui do sistema de manejo viveiro escavado (14-32); poços 14 - 19: amostras dos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20 da 1ª repetição, respectivamente; poço 20: Controle positivo do multiplex com DNA de cepas extraídas

pelo método simples; poços 21-26: amostras dos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20 da 2ª repetição, respectivamente; poços 27 – 32: amostras dos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 da 3ª repetição, respectivamente; M = marcador de peso molecular LowRanger 100bp; CN = controle negativo (sem DNA).

No sistema de manejo tanque escavado, das 18 amostras de musculatura analisadas microbiologicamente nos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20 de armazenamento em gelo, submetidas ao teste mPCR, o gene codificador *invA* de *Salmonella* spp. foi amplificado em cinco amostras, sendo essas pertencentes aos dias 12 (poço 17 / 1ª repetição), 4, 8, 12 (poços 22, 23 e 24 / 2ª repetição) e 20 (poço 32 / 3ª repetição) (Fig. 10). O tamanho do fragmento gerado pela amplificação do gene *invA* foi de 475 pb. *E. coli* foi detectada nas amostras do dia 12 (poço 17 / 1ª repetição) e dia 0 (poço 21 / 2ª repetição) cultivadas em viveiro escavado (Fig. 10), pela amplificação do gene *phoA* de tamanho de 903 pb. O gene *nuc* de *S. aureus* não foi identificado nas amostras de musculatura desse sistema de manejo. O gene de controle bacteriano 16S rRNA foi detectado em todas as amostras de musculatura, e o tamanho dos fragmentos visualizados foram de 475 bp.

Barbosa (2020), em estudo antecedente a este, analisando microbiologicamente as amostras de musculatura de tambaqui, relatou a presença de *Salmonella* spp. nos dias 4 e 12 de armazenamento em gelo de pescado cultivado em tanque-rede; e nos dias 0, 4 e 16 nas amostras de pescado oriundas de viveiro escavado (Tab. 8). Os achados da presença de *Salmonella* spp., no dia 4 (poço 3 / poço 22) em ambos os sistemas de manejo, obtido pela amplificação de gene alvo dessa bactéria (*invA*) na mPCR corroboram com os resultados da análise microbiológica (BARBOSA, 2020). No entanto, a detecção do gene de *Salmonella* spp. nas amostras (viveiro escavado) dos dias 8, 12 e 20 pela análise molecular não corroboram com os resultados das análises microbiológicas, nas quais não se identificou a presença dessa bactéria.

Tabela 8: Comparação da detecção de patógenos na musculatura de pescado cultivado em diferentes sistemas de manejo obtida por mPCR com a identificação microbiológica convencional

Dia da Coleta	Tanque-rede					
	Detecção por mPCR			Análise microbiológica		
	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
0	ND	ND	ND	NI	2,9x10 ¹ ±10 ¹ a	NI
4	Presente	ND	ND	Presente	NI	NI
8	ND	ND	ND	NI	3,3 x10 ¹ ±10 ¹ a	NI
12	ND	ND	ND	Presente	NI	NI
16	ND	ND	ND	NI	NI	NI
20	ND	ND	ND	NI	3,3x10 ³ ±10 ³ a	NI

Tanque escavado						
Dia da Coleta	Detecção por mPCR			Análise microbiológica		
	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
0	ND	ND	ND	Presente	4,2x10 ² ± 10 ² a	NI
4	Presente	ND	Presente	Presente	NI	NI
8	Presente	ND	ND	NI	NI	NI
12	Presente	ND	Presente	NI	NI	NI
16	ND	ND	ND	Presente	1,4x10 ⁴ ± 10 ⁴ a	NI
20	Presente	ND	ND	NI	NI	NI

ND: Não detectado; NI: Não identificado

Fonte: BARBOSA, 2020 (Dados análise microbiológica)

A detecção de um patógeno no método molecular e a sua não identificação nos métodos de cultivos pode ser devido a capacidade do método molecular em detectar tanto células viáveis quanto células mortas (MONTEIRO; CASTRO; BITTENCOURT, 2017). Ademais, uma vantagem da PCR em não distinguir patógenos viáveis de não viáveis em amostras de alimentos, é que mesmo não estando viáveis, há uma possibilidade de causarem intoxicação em decorrência da liberação de endotoxinas nas amostras. A exposição humana a endotoxinas pode levar a muitas complicações de saúde, como choque séptico, desenvolvimento de anormalidades microvasculares, falência de múltiplos órgãos, coagulação intravascular disseminada e necropsia (KALITA et al., 2017; ADEKOYA et., 2019). Os resultados para detecção de *Salmonella* na musculatura de tambaqui, corroboram com a identificação polifásica dos isolados (Tab. 8).

Não foi identificada a presença de *E. coli* na musculatura do pescado em ambos os sistemas de manejo pela análise convencional (Tab. 8) (BARBOSA, 2020). Entretanto, os resultados de mPCR indicaram detecção do gene *phoA* nas amostras de musculatura dos dias 12 (poço 17 / 1ª repetição) e 4 (poço 21 / 2ª repetição) de viveiro escavado (Fig. 10). Conforme apresentado nos resultados da identificação polifásica, foi detectada a presença de *E. coli* dentre os isolados de água de cultivo (tanque-rede) e *swab* da pele (ambos os sistemas) do pescado. Confirmando, mais uma vez, que há uma possibilidade desse microrganismo vir a migrar posteriormente à captura para a musculatura desses peixes, em outros pontos relevantes ao longo de sua cadeia de produção (COSTA et al., 2020). Em contrapartida, a detecção do patógeno nas duas amostras de musculatura do tambaqui cultivado em viveiro escavado, pode ser devido a mPCR em não distinguir patógenos viáveis de não viáveis em amostras de alimentos, ou pelo limite de detecção do microrganismo na análise microbiológica dependente de cultivo.

Na análise microbiológica, a identificação de *Staphylococcus* spp. nas amostras de musculatura foi confirmada por Barbosa (2020) (Tab. 8), em ambos os sistemas de manejos. Na mPCR não ocorreu a amplificação do gene *nuc* em nenhuma das amostras de ambos os sistemas de cultivo. Inicialmente, inferiu-se que um dos possíveis motivos para a não detecção de *S. aureus* na mPCR poderia ser devido a sua menor sensibilidade de detecção ao método do que para *Salmonella* sp. e *E.coli* (apresentado no limite de detecção, Fig. 8). Entretanto, os resultados corroboram com os obtidos pela análise genotípica dos isolados, os quais apresentaram baixa similaridade com o patógeno.

Outra hipótese levantada, para a não detecção desse patógeno na mPCR, poderia ser devido a parede celular de bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, que permitem a imobilização de proteínas em sua superfície, seja por uma ligação covalente da proteína ao peptidoglicano ou pela ligação não covalente da proteína ao peptidoglicano ou polímeros de parede secundária, como os ácidos teicóicos (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999). Essas moléculas têm sido relacionadas com a resistência de células Gram-positivas à lise por tratamento químico, e desse modo, podem resultar em menor sensibilidade para detecção do DNA pela PCR. Além disso, neste estudo, optou-se por usar um método simples de fervura para extração de DNA, pois o mesmo economizou tempo e não onerou economicamente a análise (MYNT et al., 2006; ZHANG et al., 2014). Esse método de extração pode diminuir a sensibilidade de detecção, pois não purifica o DNA a ser testado e não elimina os interferentes das amostras, entretanto, mostrou-se eficaz para detecção das bactérias Gram-negativas. Desse modo, sugere-se para trabalhos futuros a utilização de kits de extração de DNA para as amostras de musculatura ou outro tratamento que possibilite a quebra da parede celular das bactérias gram-positivas, visando melhorar/otimizar a detecção dos patógenos.

A não identificação de genes alvos nas reações de mPCR, pode ser explicada pela ocorrência de agentes inibitórios nas amostras, os quais podem influenciar na sensibilidade da técnica de mPCR. Amostras de musculatura utilizadas nas técnicas de PCR são consideradas como matrizes alimentares complexas, devido a presença de macromoléculas (como gorduras, proteína e carboidratos), que podem dificultar, conseqüentemente, a extração de um DNA mais puro. Além disso, amostras de alimentos cárneos podem conter contaminantes e enzimas ativas que podem inibir a reação de PCR (MONTEIRO; CASTRO; BITTENCOURT, 2017), necessitando assim de tratamento complementares na extração do DNA dessas matrizes. Ademais, a competição devido à melhor eficiência de um *primer* em relação ao outro e diferenças no tempo de anelamento são algumas desvantagens no processo e otimização da mPCR em matrizes complexas de alimentos.

Conforme descrito anteriormente, a sensibilidade do ensaio de mPCR foi avaliada usando o DNA de três cepas de referência. Ainda que a composição da amostra alimentar analisada no presente estudo fosse mais complexa do que ao sistema de cultura pura (cepas controle), e o DNA tenha sido extraído por um protocolo simples de extração, o método mostrou-se eficaz para detecção do pescado contaminado. Os resultados obtidos sugerem que o mPCR apresenta praticidade, confiabilidade e potencial para a detecção de contaminação em amostras de alimentos utilizando um método simples de extração de DNA. Embora a confirmação molecular seja considerada melhor, por ser mais sensível e específica do que a detecção fenotípica, há possibilidades de que a detecção molecular baseada em um gene marcador possa dar resultados falsos negativos. Tendo isso em vista, alguns autores sugerem o uso de marcadores múltiplos para a detecção de alguns microrganismos (GODAMBE; BANDEKAR; SHASHIDHAR, 2017; WEI et al., 2018).

Muitos autores utilizaram o método mPCR para identificação de patógenos em uma variedade de matrizes alimentares (BOUKHAROUBA et al., 2022; DOBARA et al., 2019; WEI et al., 2018; PASTRO et al., 2018). Em estudo realizado por El-Safey (2013), foram encontrados resultados negativos de *Salmonella* spp. em 11 amostras de peixes e camarões frescos quando testados por métodos convencionais, mas atestaram positivos para PCR, indicando a detecção molecular de *Salmonella* spp. mesmo quando não há crescimento em cultivo.

As condições precárias de saneamento básico de um determinado local é um fator que pode influenciar diretamente em resultados como os obtidos neste trabalho. Ressalta-se que os piores índices de saneamento básico do país estão na Região Norte do Brasil, região de maior consumo e produção de peixes nativos (PEIXEBR, 2020), com apenas 21,4% do esgoto tratado e com apenas 13,1% da população dessa região possuindo rede de esgoto. Logo, muitos municípios não apresentam sistemas de drenagem e coleta ou tratamento de esgoto, tendo os seus efluentes lançados nos rios e igarapés (SNIS, 2020). Desta forma, constata-se a extrema importância da fiscalização desse alimento, desde o processo de desembarque até os pontos de venda, tendo em vista também o clima quente e úmido na região, o qual é bastante propício para a proliferação de microrganismos patogênicos. Ademais, faz-se necessário a implementação de políticas públicas voltadas para a capacitação dos produtores, comerciantes e manipuladores, quanto as condições higiênico-sanitárias deste alimento no decorrer de toda sua cadeia produtiva.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise polifásica dos isolados de *swab* de pele, água de cultivo e musculatura de tambaqui permitiu a identificação das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*: *E.coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Isolados que foram caracterizados fenotipicamente como *Staphylococcus* sp., apresentarem baixa similaridade com *S. aureus* na análise genotípica.

O uso da mPCR para detecção simultânea das espécies-alvo *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus* em amostras de musculatura de tambaqui, utilizando um método simples de extração de DNA, foi considerado eficaz, sendo detectada a presença de *E.coli* e *Salmonella* nas amostras de ambos os sistemas de manejo, porém *S. aureus* não foi detectado em nenhuma amostra. A identificação dos microrganismos detectados nos métodos dependentes e independente de cultivo correlacionaram-se.

Os resultados demonstraram a importância de conhecer a microbiota patogênica em pescado típico da região amazônica, ainda pouco estudado microbiologicamente, para gerenciamento da segurança desse alimento. Desta forma, esperamos com os resultados do presente trabalho contribuir com informações relevantes para a determinação do padrão de identidade microbiológica e regulação dos riscos à saúde pública decorrentes da exposição ao consumo de pescado nativo contaminado. Ademais, a metodologia proposta pode ser utilizada como um método rápido e eficiente, auxiliando a cadeia produtiva a adotar melhores práticas de manipulação nas diferentes etapas de produção e comercialização de pescado.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. I – Métodos microbiológicos.** Brasília, 1992. 136p.

_____. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 15 de Novembro de 2019.

_____, Secretaria de Vigilância em Saúde (2011). Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* / Ministério da Saúde. Instituto Adolfo Lutz. – Brasília : Ministério Da Saúde.

_____. Ministério da Saúde. **Salmonella (Salmonelose): o que é, causas, tratamento e prevenção.** Brasília – DF. Disponível em: <<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/Salmonella>>. Acesso em: 11 de Março de 2021.

_____. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** Brasília, DF. 2019. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>> Acesso: 11 de Março de 2021.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B.; Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Bacteriosis y micosis. **Organización Panamericana de la Salud**, 3.ed. vol. 1, 398p. Washington, 2001. (Publicación Científica y Técnica No. 580)

ADEKOYA, I.; OBADINA, A.; OLORUNFEMI, M.; AKANDE, O.; LANDSCHOOT, S.; SAEGER, S.; NJOBEH, P. Occurrence of bacteria and endotoxins in fermented foods and beverages from Nigeria and South Africa, **International Journal of Food Microbiology**, Volume 305, 2019, 108251, ISSN 0168-1605,.

AL SHABEEB, S. S., IBRAHIM, M. A. M., & RAMADHAN, G. H. AL. A Comparative Microbial Quality Assessment among Fishes, Prawns and Cuttlefishes collected from Dammam Fish Market. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 2016

ALARCON, B., VICEDO, B., & AZNAR, R. (2006). PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 352–364. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02768.x

ALMEIDA, A. P.G; BEHR, E. R; BALDISSEROTTO, B. Rastros branquiais em seis espécies de teleósteos: influência do hábito alimentar e tamanho corporal. *Cienc. Rural*. v. 43, n. 12, p. 2208-2214, 2013.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20 ed., Washington, DC: Apha, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, 2001. 676 p.

BARBOSA, R. G.; Influência de Sistemas de Cultivo sobre Parâmetros de Qualidade do tabaqui (*Colossoma macropomum*). 2020. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Tocantins, Palmas – TO. 2020.

BARRETT, J.; FHOGARTAIGH, C. N. I. C.; Bacterial gastroenteritis, **Medicine**, Volume 45, Issue 11, 2017, Pages 683-689, ISSN 1357-3039. Disponível em:

BOUKHAROUBA, A.; GONZÁLEZ, A.; GARCÍA-FERRÚS, M.; FERRÚS, M.A.; BOTELLA, S. Simultaneous Detection of Four Main Foodborne Pathogens in Ready-to-Eat Food by Using a Simple and Rapid Multiplex PCR (mPCR) Assay. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. 2022, 19, 1031.

CARDOZO, M. V., BORGES, C. A., BERALDO, L. G., MALUTA, R. P., POLLO, A. S., BORZI, M. M., DOS SANTOS, L. F., KARIYAWASAM, S., & ÁVILA, F. A. DE. (2018). Shigatoxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in fish for human consumption. **Brazilian Journal of Microbiology**.

CDC, Estimates of Foodborne Illness in the United States – Burden of Foodborne Illness: Findings, **Center for Disease Control and Prevention**, 2016.

COLDEBELLA, A. Effluents from intensive fish farming in excavated nurseries: characterization and dynamics of nutrients. 2018.

COSTA, J. C. C. P.; FLORIANO, B., BASCÓN VILLEGAS, RODRÍGUEZ-RUIZ, I. M.; J. P., POSADA-IZQUIERDO, G. D., ZURERA, G., & PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. Study of the microbiological quality, prevalence of foodborne pathogens and product shelf-life of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from aquaculture in estuarine ecosystems of Andalusia (Spain). **Food Microbiology**. 2020. doi.org/10.1016/j.fm.2020.103498

COWLEY, L. A, Dallman TJ, Fitzgerald S, Irvine N, Rooney PJ, McAteer SP, Dia M, Perry NT, Bono JL, Jenkins C. Short-term evolution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 between two food-borne outbreaks. **Microbial Genom**. Volume 2, Issue 9. 2016.

CUNHA-NETO, A., PANZENHAGEN, P., CARVALHO, L., RODRIGUES, D., CONTE-JÚNIOR, C., & FIGUEIREDO, E.; Occurrence and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from native fish slaughtered and commercialised in Brazil. **Journal of Food Safety and Food Quality**. 2019.

D'AOUST, J. Y. Methods for the detection of foodborne *Salmonella* spp: a review. Southeast Asian J.f Trop. Med. Public Health, v.26, suppl. 2, p.195-208, 1995.

DOBARA, M. A.; EL-SHIHY, E.S.; Simultaneous detection of seven foodborne Enterobacteriaceae pathogens using multiplex PCR. **Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development. D, Environmental Studies.** 2019.

DUARTE, D. A. M., RIBEIRO, A. R., VASCONCELOS, A. M. M., SILVA, J. V. D., ANDRADE, P. L. A. DE, & SANTANA, A. A. P. Ocorrência de salmonella spp. e staphylococcus coagulase positiva em pescado no Nordeste, Brasil. **Arquivos Do Instituto Biológico.** 2010.

ENDEJAS-MANZO, G. S., AVALOS-FLORES, H., & SOTOPADILLA, M. Y. (2014). Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA).; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal.** 2016.

FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.* 2020. Rome.

FARIA, R. H. S.; MORAIS, M.; Manual de criação de peixes em viveiro. Brasília: Codevasf, 2019. 132p.

FINGER, J.A.F.F.; BARONI, W.S.G.V.; MAFFEI, D.F.; BASTOS, D.H.M.; PINTO, U.M. Overview of Foodborne Disease Outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. *Foods* **2019**, 8, 434.

FISHSTAT. 2018 – Global Aquaculture Production, <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/em>.

FORGHANI, F., WEI, S.; OH, D. H. A rapid multiplex real-time PCR high-resolution melt curve assay for the simultaneous detection of Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus in food. **Journal of Food Protection.** 2016.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N.; J. Invest. Dermatol., 2013, 133, e6. 42 J.-Y.

GERMINI A, MASOLA A, CARNEVALI P, MARCHELLI R. Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp., and Listeria monocytogenes by multiplex PCR. **Food Control.** 2009;20:733–738

GERONA, L.N.P.B. Sustainability in fish farming: Analysis of integrated and independent systems in Nova Aurora-PR. (Master's dissertation). Graduate Program in Administration [PPGAdm], State University of West Paraná - UNIOESTE, Cascavel-PR, 122 p. 2021.

GODAMBE, L. P., BANDEKAR, J., & SHASHIDHAR, R. Species specific PCR based detection of Escherichia coli from Indian foods. **3 Biotech.** 2017.

GOULD L H, KLINE J, MONAHAN C, VIERK K (2017): Outbreaks of Disease Associated with Food Imported into the United States, 1996–20141. *Emerg Infect Dis* 23: 525–528

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, characidae): An important amazonian food fish Hemiodus. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 2, p. 107-133, 1982.

GUFE, C., CANAAN HODOBO, T., MBONJANI, B., MAJONGA, O., MARUMURE, J., MUSARI, S., JONGI, G., MAKAYA, P. V.; MACHAKWA, J. Antimicrobial Profiling of Bacteria Isolated from Fish Sold at Informal Market in Mufakose, Zimbabwe. **International Journal of Microbiology**. 2019.

HAMEED, S., XIE, L., & YING, Y. (2018). Conventional and Emerging Detection Techniques for Pathogenic Bacteria in Food Science: A Review. **Trends in Food Science & Technology**. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.020

HOLT J, KREG N, SNEATH P, STALEY J, W. S. **Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition**. European Journal of Paediatric Neurology : EJPN : Official Journal of the European Paediatric Neurology Society. 1994.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F.; Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, Volume 165, Issue 7. 2014.

IZEL, A. C. U.; CRESCÊNCIO, R.; O'SULLIVAN, F.F.L.; CHAGAS, E. C; BOIJINK, C. L.; SILVA, J. I.; **Produção intensiva de Tambaqui em Tanques Escavados com aeração**. EMBRAPA. Manaus / AM. 2013.

JAMSHIDI ABD ELAH*, BASAMI M.R., AFSHARI NIK S. Identification Of Salmonella Spp. And Salmonella Typhimurium By A Multiplex Pcr-Based Assay From Poultry Carcasses In Mashhad- Iran. **Int.J.Vet.Res.** 3,1:43-48,2009.

JAMSHIDI, A., BASSAMI, M.R., AFSHARI-NIC, S. (2009). Identification of Salmonella spp. and *Salmonella* Typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran *Int.J.Vet.Res.* 3,1:43-48,2009.

KIRSCHNIK, P. G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**. v. 16, n. 1, p. 21-30, 2011.

KONG, R. Y. C.; SO, C. L.; LAW, W. F; WU, R. S. S.; A Sensitive and Versatile Multiplex PCR System for the Rapid Detection of Enterotoxigenic (ETEC), Enterohaemorrhagic (EHEC) and Enteropathogenic (EPEC) Strains of *Escherichia coli*. **Marine Pollution Bulletin**. Vol. 38, No. 12, pp. 1207±1215, 1999.

LANE, D.; J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. e Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, **John Wiley and Sons**, Nova York, 115-175. 1991.

LATHA C, ANU CJ, AJAYKUMAR VJ, SUNIL B. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enterica* Typhimurium in

meat and meat products using multiplex polymerase chain reaction. **Vet World**. 2017;10(8):927-931. doi:10.14202/vetworld.2017.927-931

LEE, N., KWON, K. Y., OH, S. K., CHANG, H. J., CHUN, H. S., & CHOI, S. W. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of escherichia coli O157:H7, Bacillus cereus, vibrio parahaemolyticus, salmonella spp., listeria monocytogenes, and staphylococcus aureus in Korean ready-to-eat food. **Foodborne Pathogens and Disease**. 2014. 11(7), 574–580. doi:10.1089/fpd.2013.1638

LITTY. B.; REDDY, P.; MURALI, H. S.; BATRA, H. V. Optimization and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of prominent foodborne pathogens of Enterobacteriaceae. **Annals of Microbiology**. (2013).

LOPES, A. T. S., ALBUQUERQUE, G. R., & MACIEL, B. M. (2018). Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Quantification of Salmonella spp., Escherichia coli, and Staphylococcus aureus in Different Food Matrices: Advantages and Disadvantages. *BioMed Research International*, 2018, 1–12. doi:10.1155/2018/6104015

MALMARUGAN SHANMUGASAMY, THENMOZHI VELAYUTHAM, JOHNSON RAJESWAR. Inv A gene specific PCR for detection of Salmonella from broilers. *Vet. World*, 2011, Vol.4(12):562-564.

MANJENGWA, F.; NHIWATIWA, T.; NYAKUDYA, ELIJAH.; BANDA, PETRONELLA. Fish from a polluted lake (Lake Chivero, Zimbabwe): a food safety issue of concern, **Food Quality and Safety**, Volume 3, Issue 3, August, Pages 157–167. 2019.

MARKOULATOS, P., SIAFAKAS, N., & MONCANY, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51. doi:10.1002/jcla.2058

MAYRLA, C. S. D. O.; YOHANNA, F. A.; JULYANNA, L. M.; IZABEL, C. R. S.; DANIEL, O. F.; DANIELA, C. O. Microbiological evaluation and development of quality index method (QIM) scheme for farmed pintado fish (*Pseudoplatystoma corruscans*). **African Journal of Microbiology Research**. 2017.

MONTEIRO, F. C.; CASTRO, L. A.; BITTENCOURT, J. V. M.; Aplicações das Técnicas de Biologia Molecular na Indústria de Alimentos. In: **Gestão da inovação agroindustrial: diagnóstico molecular**. Curitiba: EDUTFPR, 2017. P. 83–98.

MURRAY P., ROSETHAL K., PFALLER A. (2014). *Microbiologia Médica* (7^a ed.), Acinetobacter, Pseudomonas e Bactérias relacionadas (pp 386-388) Rio de Janeiro: Elsevier.

MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTE, N.L.; HECKERT, R.A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated Salmonella in raw poultry compared to conventional culture, **Food Microbiology**, Volume 23, Issue 6, 2006, Pages 599-604.

NAVARRE, W. W.; SCHNEEWIND, O. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 1999.

NEMATI, M.; HAMIDI, A.; MALEKI, D. S.; JAVAHERZADEH, V.; LOTFIPOUR, F.; An Overview on Novel Microbial Determination Methods in Pharmaceutical and Food Quality Control. **Adv Pharm Bull.** 6(3):301–308. 2016.

OLIVEIRA, C.D.S.T., MOREIRA, R.F.C., SOARES FILHO, A.A. et al. Genetic diversity in natural populations of *Colossomamacropomum* in the Brazilian Amazon region and in populations farmed in Northeast Brazil based on ISSR markers. *Aquacult Int* 27, 1423–1434 (2019).

ONMAZ, N.E.; YILDIRIM, Y.; KARADAL, F.; HIZLISOY, H.; AL, S.; et al. *Escherichia coli* O157 in fish: Prevalence, antimicrobial resistance, biofilm formation capacity, and molecular characterization, *LWT*. Volume 133. 2020.

PASTRO, D. C., MARIOTTO, S., SANTOS, E. C., FERREIRA, D. C., & CHITARRA, G. S. Use of molecular techniques for the analysis of the microbiological quality of fish marketed in the municipality of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Food Science and Technology**. 2019.

PAUDYAL NV. ET AL. Prevalence of foodborne pathogens in food from selected African countries—A meta-analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2017;249:35-43.

PEIXE BR. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário PeixeBR da Piscicultura**. São Paulo/SP. 2020.

RAHN, K., DE GRANDIS, S. A., CLARKE, R. C., MCEWEN, S. A., GALÁN, J. E., GINOCCHIO, C., ... GYLES, C. L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6(4), 271–279. doi:10.1016/0890-8508(92)90002-f

RAJAPAKSHA, P., ELBOURNE, A. J., GANGADOO, S., BROWN, R., COZZOLINO, D., & CHAPMAN, J. (2018). A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *The Analyst*. doi:10.1039/c8an01488d

ROMERO-JARERO, J. M., & NEGRETE-REDONDO, M. D. P. (2011). Presencia de bacterias Gram positivas en músculo de pescado con importancia comercial en la zona del Caribe mexicano. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(2), 599-606.

ROSTAMZADEH Z, MOHAMMADIAN M, ROSTAMZADE A (2016) Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* Resistance Pattern against Antibiotics in Clinical Samples from Iranian Educational Hospital. *Advances in Microbiology* 6: 190-194.

SANTOS, C. C. A. DO A., ALMEIDA, E. G. DE, MELO, G. V. P. DE, & SCHWAN, R. F. Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.010>

SANTOS, R. R.; XAVIER, R. G. C.; OLIVEIRA, T. F.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Occurrence, genetic diversity, and control of *Salmonella enterica* in

native Brazilian farmed fish. **Aquaculture**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.034>

SARAVANAN, A., KUMAR, PS, HEMAVATHY, RV et al. Métodos de detecção de patógenos de origem alimentar: uma revisão. *Environ Chem Lett* 19, 189–207 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01072-z>

SEBRAE. Brazilian Support Service for Micro and Small Enterprises. (2016). Creation of tilapia in excavated nurseries. Technical guide to undertake in the creation of tilapia in nurseries. Brasília-DF.

SHOKR, N.M.; MAHMOUD, A.M.L.; MADIHA S. IBRAHIM. Detection of *E. coli* in Nile Tilapia from retail in Gharbiya Governorate. *AJVS*. Vol. 59 (1): 76-84 Oct. 2018.

SICHEWO, P. R.; GONO, R. K.; MUZONDIWA, J.; MUNGWADZI, W. Isolation and identification of pathogenic bacteria in edible fish : A case study of rural aquaculture projects feeding livestock manure to fish in Zimbabwe. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 2014.

SILVA, N. J.; SILVEIRA, V. C. A.; TANIWAKI, N. F. A.; SANTOS, M. H.; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e Água. In: **Journal of Chemical Information and Modeling**. 2010.

SINGH, J.; BATISH, V. K.; GROVER, S. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products using real time PCR-melt curve analysis. **Journal of Food Science and Technology**. 2012. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0278-3>

SNIS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Esgotamento Sântitório, 2020. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-esgotamento-sanitario>>. Acesso em :26 de janeiro de 2022.

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O.; Aquaculture in Brazil: past, present and future, *Aquaculture Reports*, Volume 19. 2021.

VÁSQUEZ-GARCÍA, A., OLIVEIRA, A. P. S. C. DE, MEJIA-BALLESTEROS, J. E., GODOY, S. H. S. DE, BARBIERI, E., SOUSA, R. L. M.; FERNANDES, A. M. *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil. **Aquaculture**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.062>

WALLACE, F. M.; ANDALORO, B.; FALLON, D.; CORRIGAN, N.; VARKEY, S.; DE MARCO, D.; FARNUM, A.; TADLER, M.; HOELZER, S.; WELLER, J.; DAVIS, E.; ROHRBECK, J.; TICE, G.; BIRD, P.; CROWLEY, E.; FLANNERY, J.; FISHER, K.; HUFFMAN, T.; BOYLE, M.; ... GOINS, D. Detection of salmonella species in a variety of foods by the DuPont™ BAX® system real-time PCR assay for salmonella: First action 2013.02. **Journal of AOAC International**. 2014. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-407>

WEI, C., ZHONG, J., HU, T., & ZHAO, X. (2018). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* by multiplex PCR in milk. **3 Biotech**, 8(1), 76. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1086-5>.

WHO, “WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group (2007-2016),” in *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, 2016.

WONG, C. S.; JELACIC, S.; HABEEB, R. L.; WATKINS, S. L. AND TARR, P. I. (2000): The risk of the hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *New England Journal of Medicine*. 2000; 342:1930-1936.

WOYNÁROVICH, A.; ANROOY, R. V.; **Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816)**. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 624, FAO, Rome (2019) (132 pp.)

WU, S.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; Y.E, H.; GONG, W.; WANG, Z. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**. v.8(7), 2016. <https://doi.org/10.3390/toxins8070176>

YAMADA, T. J. ; RIBEIRO, L. **Avaliação sensorial do pescado pelo método do índice de qualidade**. Revista científica de medicina veterinária - ISSN: 1679 - 7353 Ano XIII- Número 25 – Julho de 2015.

YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H. AND CHUN, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 67:1613-1617.

YOSHIDA, C.; GURNIK, S.; AHMAD, A.; BLIMKIE, T.; MURPHY, S. A.; KROPINSKI, A. M.; NASH, J. H. E.; Evaluation of Molecular Methods for Identification of *Salmonella* Serovars. **J Clin Microbiol**. (2016); 54:1992-1998.

ZENDEJAS-MANZO GS, AVALOS-FLORES H, SOTO-PADILLA MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*. 2014;25(3):129-143.

ZHANG D, ZHANG H, YANG L, GUO J, LI X, FENG Y. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using multiplex PCR method. **J Food Safety**. 2009; 29:348–363.

ZHANG J, ET AL. Prevalence of antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* serovars in retail aquaculture products. *International Journal of Food Microbiology*. 2015; 210:47-52. 26.

ZHANG, Z.; WANG, L.; XU, H.; AGUILAR, Z. P.; LIU, C.; GAN, B.; XIONG, Y.; LAI, W.; XU, F.; WEI, H. Detection of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control. **Food Control**. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.035>

ZHAO X, LIN CW, WANG J, OH DH (2013a) Avanços nos métodos de detecção rápida para patógenos transmitidos por alimentos. **J Microbiol Biotechnol** 24 (3): 297–312. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10013>