

RAQUEL RIBEIRO DIAS SANTOS

**OCORRÊNCIA, TIPAGEM MOLECULAR e CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DE
AMOSTRAS DE *Salmonella enterica* EM PEIXES NATIVOS.**

**Belo Horizonte - MG
Escola de Veterinária - UFMG
Dezembro/2015**

RAQUEL RIBEIRO DIAS SANTOS

OCORRÊNCIA, TIPAGEM MOLECULAR e CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Salmonella enterica* EM PEIXES NATIVOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

Coorientadores: Prof.^a Lilian Viana Teixeira

Prof. Carlos Augusto Gomes Leal

Belo Horizonte - MG/Brasil
Escola de Veterinária – UFMG
Dezembro/2015

Santos, Raquel Ribeiro Dias, 1981-
S237o Ocorrência, tipagem molecular e capacidade de colonização de amostras de
Salmonella enterica em peixes nativos / Raquel Ribeiro Dias Santos. – 2015.
86 p. : il.
Orientador: Rômulo Cerqueira Leite

Coorientadores: Lilian Viana Teixeira, Carlos Augusto Gomes Leal
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Salmonela – Teses. 2. Alimentos – Contaminação – Teses. 3. Peixe – Teses.
4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Teixeira,
Lilian Viana. III. Leal, Carlos Augusto Gomes. IV. Universidade Federal de Minas
Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 614.31

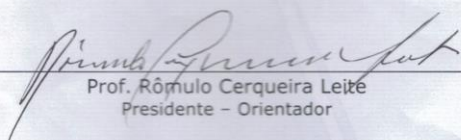
FOLHA DE APROVAÇÃO

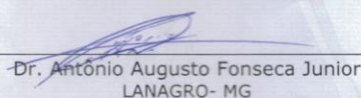
FOLHA DE APROVAÇÃO

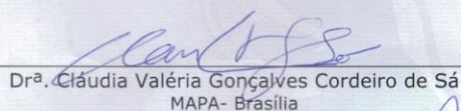
RAQUEL RIBEIRO DIAS SANTOS

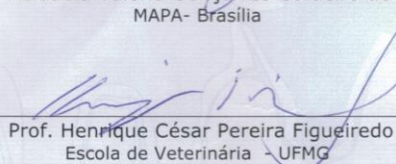
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

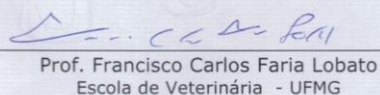
Aprovada em 21 de Dezembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Presidente - Orientador


Dr. Antônio Augusto Fonseca Junior
LANAGRO- MG


Dr. Cláudia Valéria Gonçalves Cordeiro de Sá
MAPA- Brasília


Prof. Henrique César Pereira Figueiredo
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Escola de Veterinária - UFMG

Dedico esse trabalho ao meu Vovô Júlio que desejava tanto uma neta doutora.

AGRADECIMENTOS

“Viver é desenhar sem borracha” Millôr Fernandes

Nesses quase quatro anos eu pude aprender novas técnicas, errar, obter conhecimentos, chorar, ter alegrias, me desesperar, conhecer pessoas, fazer grandes amizades, mas pude principalmente aprender que na vida efêmera em sua natureza o importante mesmo é o valor das pessoas em nossas vidas, dessa forma agradeço:

A Deus por me proteger e me abençoar todos os dias, por ter me permitido realizar um sonho de estudar na UFMG.

A Nossa Senhora e a Santo Antônio por me proteger nos milhares de quilômetros percorridos, e por me dar perseverança e força de vontade para estudar e trabalhar.

Ao papai pelo exemplo de bondade, caridade e resignação. Por ser sempre uma pessoa positiva, me mostrando e enxergando pontos positivos em todos os momentos. Pela ajuda financeira e pelo auxílio em todos os momentos de estresse, e pelo amparo com os problemas de informática.

A mamãe pelas orações, pelo carinho, exemplo de força. Pela ajuda financeira, por me acompanhar nas coletas à campo, por me ajudar a tabular os dados, e viajar comigo nos momentos de muito cansaço. E por me ensinar que nós mulheres devemos ser fortes e independentes.

A Sarah pelo carinho, amor, amizade e cumplicidade, pela ajuda com os gráficos e por me presentear com o Pedro (PP), tornando a minha vida mais alegre.

Ao PP por me mostrar o amor mais puro, verdadeiro e singelo.

A minha família, em especial aos meus avós (*in memoriam*) que me amparam estejam onde estiverem.

A minha prima Gabi pela amizade, carinho e torcida, e aos meus amigos e amigas em especial à Raquelzinha, Débora Sacramento, Sheyla e Karol.

A Gleis, amiga de todas as horas, por escutar as minhas lamentações, me ajudar, torcer por mim e ser um exemplo de pesquisadora, mãe e mulher.

A Fabrizia que me apoiou lá no início dessa caminhada, me mostrando que eu seria capaz.

Ao Prof. Rômulo que aceitou me orientar sem conhecer meu trabalho, e com que aos poucos criei uma cumplicidade. Meu respeito a esse verdadeiro mestre possuidor das maiores qualidades que um professor e uma pessoa pode ter. Por me apoiar em trabalhar durante o doutorado em Formiga e mais ainda quando assumi a coordenação do curso de Medicina Veterinária em Bom Despacho.

A Prof.^a Lilian pela amizade, pelos conselhos, atenção, por escutar as minhas queixas e me apoiar.

Ao Prof. Carlos pelas sugestões e orientações.

Ao Prof. Henrique por permitir que fizesse parte da equipe Aquavet. E pela concessão da bolsa de estudos.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, em especial a Graziela e Agda pelo período em que trabalhei com o cultivo celular.

A Luzete, secretária da Pós-Graduação pela ajuda e orientações.

A Anna Carolina Brasileiro, pela amizade, conversas e risadas.

A Júnia por toda ajuda na manipulação dos equipamentos do laboratório e nas análises de PCR.

A todos da equipe do Laboratório Retrolab, em especial a Fernanda por dividir comigo suas experiências, expectativas e por me ouvir.

Ao Guilherme Campos, amigo querido que nunca poupou esforços para me ajudar, com quem pude contar na coleta de animais para experimento, dividir minhas dúvidas teóricas, minhas angústias, por me ajudar nas análises, e me socorrer nos momentos de máximo estresse.

A Gabizinha que tanto me ajudou no laboratório e me presenteou com a sua alegria, espontaneidade, carinho e amizade.

A Sabine pelo carinho, respeito e torcida. E pelas inúmeras risadas.

A Lilian Xavier pela imensa ajuda na condução dos experimentos.

Ao Leon pela ajuda no experimento com os tabaquis.

Ao Guilherme Queiroz por tornar o dia a dia no laboratório mais leve e divertido.

Ao Fred pelos conselhos e amizade.

A todos da equipe Aquavet/Aquacen em especial à Fernanda e Alex.

Ao Prof. Antônio Marcos (Totonho) por me incentivar a prosseguir na carreira acadêmica.

A Empresa Colpani pela doação de exemplares de pintado, e ao amigo Thiago Colpani pela torcida e amizade.

Aos meus alunos queridos, por muitas vezes sacrificados por uma rotina pesada de viagens, trabalho e estudo agradeço pela torcida.

A todos do Centro Universitário de Formiga pelo apoio, em especial ao amigo Clésio e a Ywia, ao meu coordenador Glaucio e ao meu ex-coordenador Dênio.

A todos da Faculdade Alis de Bom Despacho que em tão pouco tempo me acolheram e torceram por mim em especial ao Fabrício, Diogo, Samira e Marcelo.

A Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade.

A FAPEMIG pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos amigos do curso de Doutorado em Ciência Animal.

A todos que embora não citados contribuíram para a execução desse trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
INTRODUÇÃO GERAL	17
Objetivos	18
1 Capítulo 1 – Revisão de literatura	19
1.1 Panorama da aquicultura no brasil e no mundo	19
1.2 Gênero <i>Salmonella</i>	17
1.2.1 Nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i>	20
1.3 Principais sorotipos de <i>Salmonella enterica</i>	21
1.4 <i>Salmonella</i> spp. como agente patogênico veiculado em alimentos	23
1.5 Ocorrência de <i>Salmonella</i> em pescado e derivados	25
1.6 Microbiota bacteriana nos peixes.	26
1.7 A <i>Salmonella</i> spp. em peixes e crustáceos.	26
1.8 Fontes de infecção.	27
1.9 Tipificação de <i>Salmonella</i> spp.	29
1.9.1 Sorotipificação	29
1.9.2 Tipagem de sequências de multilocus (MLST)	28
CAPÍTULO 2 - OCORRÊNCIA E SOROTIPAGEM MOLECULAR DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> ISOLADA EM PEIXES NATIVOS NO BRASIL	32
2.1 Introdução	32
2.2 Material e Métodos	32
2.2.1 Delineamento epidemiológico	32
2.2.2 Caracterização das regiões estudadas	33
2.2.3 Caracterização das pisciculturas comerciais estudadas	33
2.2.4 Processamento das amostras	34

2.2.5	Extração de DNA	34
2.2.6	Identificação dos isolados por Reação de cadeia de Polimerase (PCR)	34
2.2.7	Sorotipificação antigênica	35
2.2.8	Realização do MLST	35
2.3	Resultados e Discussão	36
2.3.1	Ocorrência de <i>Salmonella enterica</i> em amostras de fazendas nos Estados do Tocantins, Mato Grosso e São Paulo.	36
2.3.2	Sorotipificação	40
2.3.3.	Tipagem de sequências de multilocus (MLST)	44
2.4	Conclusões	47
	CAPÍTULO 3 - INFECÇÃO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO, PERSISTÊNCIA E TEMPO DE ELIMINAÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> EM PINTADO AMAZÔNICO (<i>LEIARIUS MARMORATUS</i> X <i>PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM</i>), PIAU (<i>LEPORINUS FRIDERICI</i>) E TAMBAQUI (<i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i>)	48
3.1	Introdução	48
3.2	Material e Métodos	48
3.2.1	Animais utilizados	48
3.2.2	Desenvolvimento do protocolo de infecção experimental – ensaio piloto	49
3.2.3	Amostras bacterianas e preparação do inóculo	49
3.2.4	Ensaio experimentais	50
3.2.5	Extração de DNA	51
3.2.6	Reação em Cadeia de Polimerase – PCR	51
3.2.7	Tabulação dos dados	52
3.3	Resultados e Discussão	52
3.4	Conclusões	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais espécies de peixes produzidas em KG no Brasil no ano de 2014.	19
TABELA 2	Subespécies de <i>Salmonella enterica</i>	20
TABELA 3	Distribuição dos cinco sorotipos mais frequentemente encontrados em amostras isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente em diferentes países no Mundo no período de 2001 a 2007, segundo a OMS.	21
TABELA 4	Sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> encontrados em peixes e produtos derivados do pescado em diferentes regiões do mundo	22
TABELA 5	Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp. em diferentes produtos e os respectivos Estados Brasileiros e autores.	24
TABELA 6	Exemplos de classificação para os principais sorotipos pelo esquema de Kauffam & White	30
TABELA 7	Características dos fragmentos dos genes utilizados na reação de MLST para <i>Salmonella enterica</i>	31
TABELA 8	Estados de localização das propriedades utilizadas no estudo.	33
TABELA 9	Sequência de <i>primers</i> utilizados para a amplificação do DNA via PCR segundo Amavisit <i>et al.</i> (2001)	35
TABELA 10	Gene alvo e iniciadores utilizados no MLST para determinação do tipo genético	36
TABELA 11	Frequência de amostras positivas para <i>Salmonella enterica</i> por Fazenda amostrada.	37
TABELA 12	Sorotipificação das amostras de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de suabes de TGI e brânquias de peixes, água de tanques de cultivo de peixes e fezes de animais encontradas próximas aos tanques e identificadas pelo LABENT.	42
TABELA 13	Características e frequências dos isolados de <i>Salmonella enterica</i> listados de acordo com a sequência tipo, sorotipagem, e complexo clonal (CC).	44
TABELA 14	Amostras de <i>Salmonella enterica</i> utilizadas para as infecções experimentais	49
TABELA 15	Sequência de primers utilizados para amplificação do DNA via PCR segundo Amavisit <i>et al.</i> (2001)	52
TABELA 16	Resultados da infecção experimental por via oral em Pintado, Piau e Tambaqui e as respectivas doses experimentais, e a quantidade em dias de recuperação do patógeno pós- infecção oral em amostras de suabes de TGI e da água dos aquários	52
TABELA 17	Resultados das análises qualitativas de <i>Salmonella enterica</i> em vísceras e músculo de Pintado Amazônico nos grupos experimentais após 35 dias de inoculação por via oral	55
TABELA 18	Avaliação da presença de <i>Salmonella</i> Heidelberg em amostras de suabes de TGI em peixes do grupo 1, Experimento II.	56
TABELA 19	Avaliação da presença de <i>Salmonella</i> Heidelberg em amostras de suabes de TGI em peixes do grupo 2, Experimento II.	56
TABELA 20	Avaliação da presença de <i>Salmonella</i> Hadar em suabes de TGI em peixes do grupo 1, Experimento III.	57

TABELA 21	Resultado das análises qualitativas de <i>Salmonella enterica</i> em vísceras e músculo de tambaqui no grupo experimental após 40 dias de inoculação por via oral.	57
TABELA 22	Quantidade de amostras coletas nas cinco fazendas localizadas nos Estados de Mato Grosso, Tocantins e São Paulo.	73
TABELA 23	Frequência de amostras positivas para <i>Salmonella enterica</i> em cinco fazendas localizadas nos Estados de Mato Grosso, Tocantins e São Paulo.	74
TABELA 24	Resultados Gerais da Sorotipificação	75
TABELA 25	Resultados do perfil de alelos das amostras de <i>Salmonella</i>	77
TABELA 26	Resultado das análises de PCR das coletas de fezes e águas do Experimento I	81

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Amostras positivas para <i>Salmonella enterica</i> pelo método de PCR	38
GRÁFICO 2	Sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> identificados no LABENT	40
GRÁFICO 3	Avaliação da quantidade de animais positivos ao longo de 35 dias de infecção experimental nos quatro grupos experimentais do ensaio experimental I.	54
GRÁFICO 4	Avaliação de animais positivos ao longo de 40 dias de infecção experimental nos grupo 1 do ensaio experimental II	82
GRÁFICO 5	Gráficos ilustrativos demonstrando a avaliação dos animais ao longo de 40 dias de infecção experimental no grupo 2 do ensaio experimental II	83
GRÁFICO 6	Gráficos ilustrativos demonstrando a avaliação de animais positivos ao longo de 40 dias de infecção experimental nos Grupo 1 do ensaio experimental III.	85
FIGURA 1	Diagrama de eburst para <i>Salmonella enterica</i>	79
FIGURA 2	Dendograma ilustrando a relação filogenética dos isolados	80

LISTA DE ABREVIATURAS

FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América
OMS	Organização Mundial da Saúde
DVA	Doenças Veiculadas por Alimentos
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
UFC	Unidade Formadora de Colônia
EFSA	Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos
MLST	Tipagem de sequências de multilocus
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
ST	Sequencia tipo
CC	Complexo clonal
AQUACEN	Laboratório Oficial Central da Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura
TGI	Trato gastrointestinal
PCR	Reação em cadeia de polimerase
LABENT	Laboratório de Enterobactérias
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
AGAR HK	Agar Entérico de Hektoen
Px	Peixe

LISTA DOS NOMES CIENTÍFICOS DAS ESPÉCIES DE PEIXES

Nome popular	Nome científico da espécie
Anchichã	<i>Micropterus salmoides</i>
Bagre amarelo	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>
Bagre do canal	<i>Hypostomus plecostomus</i>
Bagres	<i>Ictalurus punctatus</i>
Carpa capim	<i>Ctenopharyngodon idella</i>
Carpa comum	<i>Cyprinus carpio</i>
Cascudo	<i>Hypostomus plecostomus</i>
Catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>
Curimba	<i>Prochilodus lineatus</i>
Matrinxã	<i>Brycon sp.</i>
Pacu, pacu caranha, caranha	<i>Piaractus mesopotamicus</i>
Panga	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>
Peixe pregado	<i>Scophthalmus maximus</i>
Piau	<i>Leporinus friderici</i>
Piaçu	<i>Leporinus macrocephalus</i>
Pintado amazônico	<i>Leiariius marmoratus</i> x <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>
Piraputanga	<i>Brycon microlepis</i>
Salmão do Atlântico	<i>Salmo salar</i>
Tambaqui	<i>Colossoma macropomum</i>
Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>
Truta arco-íris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Tucunaré	<i>Cichla ocellaris</i>

RESUMO

As bactérias do gênero *Salmonella* são um dos principais patógenos transmitidos por alimentos causando grandes impactos econômicos e de saúde pública. A capacidade de colonização e disseminação de *Salmonella spp.* em peixes tropicais é pouco compreendida. O objetivo desse estudo foi prospectar a ocorrência e fontes de infecção de *S. enterica* em criações de peixes nativos no Brasil, bem como realizar a sorotipagem convencional e a molecular pela técnica de MLST e desenvolver protocolos de infecção experimental para determinação da capacidade de colonização, persistência e tempo de eliminação das amostras de *Salmonella enterica* em peixes. Para tanto, 569 amostras de carcaças, ração e matérias primas para ração, água dos tanques, suabes de brânquias e suabes de TGI de tambaqui, matrinxã, piau, pintado amazônico, curimba e caranha foram coletadas nos Estados de Tocantins, Mato Grosso e São Paulo. As amostras foram isoladas em Ágar HK e identificadas por PCR. A sorotipagem foi realizada pelo método convencional e por MLST. 39 isolados de *S. enterica* foram obtidos, sendo um da subespécie *arizonae* e 38 da *enterica*. Esses últimos foram classificados como sorotipos Brandenburg (n=4), Hadar (n=20), Heidelberg (n=7), Panama (n=3), Saintpaul (n=3) e uma amostra de *S. enterica subsp enterica* (O:4, 5:b:-). No MLST, 21 novos tipos genéticos (ST) (“*Sequence types*”) foram caracterizados, sendo 3 novos STs do sorotipo Brandenburg, 5 do Hadar, 7 do Heidelberg, 1 do Panama, 3 do Saintpaul, 1 ST da amostra não sorotificável e 1 ST para *Salmonella arizonae*. Cinco STs conhecidos foram caracterizados ST24, ST50, ST 112, ST33 e ST 614. A ampla diversidade de sorotipos e STs dos isolados de *S. enterica subsp enterica* de peixes nativos no Brasil sugerem múltiplas fontes de infecção e ausência de amostras hospedeiro-específicas. Na infecção experimental em pintado amazônico, piau e tambaqui, foi possível detectar a bactéria em fezes após inoculação oral em todas as espécies, dessa forma conclui-se que a *Salmonella enterica* é capaz de colonizar o trato gastrointestinal das espécies citadas acima.

Palavras – chave: *Salmonella*, diversidade genética, peixes nativos.

ABSTRACT

The bacteria of the genus *Salmonella* are one of the main pathogens transmitted by food. The ability of colonization and dissemination of *Salmonella sp.* in tropical fish is little understood. The purpose of this study was to prospect the occurrence and sources of infection of *S. enterica* in native fish creations in Brazil as well, perform the conventional serotyping and molecular by MLST technique. The study also intend to develop experimental infection models that determine the capacity for colonization, persistence and time of disposal of specimens of *Salmonella enterica*. For that 569 samples of carcasses, feed / raw materials, water tanks, suabes of gills and feces of tambaqui, matrinxã, piau, Pintado Amazonico, curimba and caranha were collected in states of Tocantins, Mato Grosso and Sao Paulo. Samples were isolated in Agar HK and identified by PCR. Serotyping was performed by the conventional method and by MLST. Through samples of water and fish excreta 39 trials of *S. enterica* were obtained where one of subspecies *arizonae* and 38 of *enterica*. These ones were classified as serotype Brandenburg (n = 4), Hadar (n = 20), Heidelberg (n = 7), Panama (n = 3), Saintpaul (n = 3) and a non-serotyped sample. In MLST, 21 new Sequence types were characterized, 3 new STs of Brandenburg, 5 ST

of Hadar, 7 ST of Heidelberg, one of Panama, 3 ST of Saintpaul, 1 ST sample not serotipificável and 1 ST for *Salmonella arizonae*. Five known STs were characterized ST 24, ST 50, ST 112, ST 33 and ST 614. The wide diversity of serotypes and STs of *S. enterica* isolates of native fish in Brazil suggest multiple sources of infection and absence host - specific samples. Experimental infection was carried out for painted Amazon and piau and tambaqui. It was possible to detect the bacteria in faeces after oral inoculation in all species thus concluded that *Salmonella enterica* are able to persist in the gastrointestinal tract carried over the above species.

Keywords: Salmonella, genetical diversity, native fish.

INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é o ramo da produção animal que mais cresce no mundo. De acordo com dados do Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura do Ministério da Pesca no ano de 2011 (Brasil, 2015) a produção Brasileira de Pescado atingiu 1.431.974,4 toneladas. Em 2014 a produção aquícola mundial foi de 66,6 milhões de toneladas (State..., 2014). No Brasil tendência semelhante tem sido verificada nas últimas décadas. A produção total de peixes foi 474,33 toneladas em 2014, o que representou um aumento de 20,9% em relação ao ano anterior (Produção..., 2014). As principais espécies de peixes produzidas no país são as tilápias, tambaqui, tambacu, carpa e pintado. (Produção..., 2014). Os Estados com maior produção de peixes no Brasil são Rondônia, Mato Grosso, Paraná e Ceará. Minas Gerais ocupa a 10ª posição e foi responsável pela produção de 16.530.509 quilos no ano de 2014 (Produção..., 2014).

A ocorrência de doenças infecciosas é caracterizada como um dos principais entraves para o desenvolvimento da aquicultura mundial (State..., 2012). No Brasil não existem levantamentos epidemiológicos sobre os principais agentes etiológicos causadores de doenças na piscicultura (Figueiredo e Leal, 2012). Além dos impactos diretos ocasionados pelas doenças, a presença de patógenos no pescado representa risco para o consumidor e conseqüentemente para a viabilidade da cadeia produtiva a médio e longo prazo. Na aquicultura, alguns micro-organismos como bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Listeria* apesar de não estarem associadas a doenças nos peixes durante o cultivo, são fonte de preocupação. Essas podem contaminar o pescado ou seus produtos processados nos frigoríficos, tornando-se um risco potencial de contaminação para os consumidores. Além disso, a ocorrência desses micro-organismos acarreta problemas para a comercialização dos produtos e tem sido associada a embargos da exportação de pescado produzido no Brasil (Pires, 2012).

As bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas um dos principais patógenos transmitidos por alimentos na atualidade. A *Salmonella* spp. é capaz de colonizar diversos hospedeiros, e em geral a transmissão, a seres humanos, ocorre via ingestão de alimentos contaminados, principalmente em produtos de origem animal (Pires, 2012). Bartolomeu *et al.*, (2011) detectaram a presença de *Salmonella* spp. em indústrias de processamento de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) localizada na região metropolitana de Curitiba-PR. Em outro estudo realizado na região metropolitana de São Paulo ao verificar a qualidade de tilápias de 30 pesqueiros, 70% dos estabelecimentos pesquisados apresentaram contagem de Coliformes e *Salmonella* spp. em desacordo com o exigido pela legislação brasileira (Liuson, 2003). A ocorrência de *Salmonella* spp. em pescado apresenta maior risco para os consumidores que outras carnes, pois a carne de peixe em várias preparações culinárias é utilizada crua (Martins, 2006).

Os procedimentos térmicos utilizados usualmente para preparação dos alimentos eliminam ou reduzem a infectividade desses microrganismos. Em contrapartida, a ingestão de pescado cru contaminado com essas bactérias, como por exemplo, na forma de *sushi* e *sashimi*, podem potencializar a infectividade desses patógenos para os seres humanos (Huss *et al.*, 2000). No Brasil alguns inquéritos realizados detectaram a presença de contaminação por *Salmonella* em estabelecimentos comercializadores de pescado cru. Em Fortaleza (CE) a presença de *Salmonella* spp. foi detectada em amostras provenientes de diferentes estabelecimentos que comercializam *sushi* e *sashimi* em 2006 (Pinheiro *et al.*, 2006). De maneira semelhante à bactéria foi encontrada em oito de 64 amostras (12,5%) de *sushi* coletadas em restaurantes na cidade do Rio de Janeiro (Malavota, 2009). Nenhum dos estudos supracitados determinou os

principais sorotipos detectados, bem como, avaliou especificamente a ocorrência do patógeno em peixes nativos. Adicionalmente, a fonte de infecção desses produtos é desconhecida.

Na literatura existem poucos estudos sobre as fontes de contaminação por *Salmonella* para peixes e para os derivados processados. Estudo realizado na Noruega demonstrou que esse patógeno não é parte da microbiota de diferentes espécies de peixes marinhos, sendo a ocorrência muito baixa naquele país (Assessment..., 2006).

A capacidade de colonização, persistência e disseminação de *Salmonella spp.* em peixes expostos por via oral é ainda pouco compreendida, principalmente em peixes tropicais (Assessment..., 2006).

OBJETIVOS

- Determinar a ocorrência de *Salmonella spp.* em peixes nativos de diferentes Estados do Brasil;
- Realizar a tipificação molecular por meio do método de MLST (“Multi-locus Sequence Typing”) e a sorotipificação para amostras de *Salmonella enterica subsp. enterica* isoladas de diferentes espécies de peixes nativos, água dos tanques de pisciculturas e amostras de fezes encontradas próximas aos tanques de cultivo.
- Avaliar a diversidade genética das amostras por meio do cálculo do Índice de Diversidade de Simpson;
- Desenvolver um protocolo de infecção experimental para determinação da capacidade de colonização, persistência e tempo de eliminação de amostras de *Salmonella enterica subsp. enterica* em espécies de peixes nativos de interesse comercial.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Panorama da aquicultura no Brasil e no mundo

A aquicultura principalmente em países em desenvolvimento encontra-se em expansão, e para a FAO, o Brasil é um dos países com maiores condições de suprir a produção de pescado. Isto é possível principalmente por seu potencial de desenvolvimento da criação de organismos aquáticos proporcionado pelo clima e fartura de recursos hídricos (State..., 2014).

Segundo o Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura (2014), o Brasil ocupa a 19ª posição mundial na produção total de pescado, com 1.264.765 t, sendo a China o líder mundial com 63.495.197 t, seguido pela Indonésia e Índia com 11.662.343 e 9.348.063 t respectivamente.

Em relação à produção de peixes em cativeiro o Brasil ocupa a 17ª posição com uma produção de 479.399 t em 2010, a China é o líder mundial responsável por 60% da produção mundial (47.829.610 t), seguida pela Indonésia e Índia. (Anuário ..., 2014).

O Estado do Rondônia é o maior produtor de peixes em cultivo no Brasil com 75.023.145 quilos, seguido pelo Estado do Mato Grosso com 60.946.144 quilos, em terceiro lugar está o Estado do Paraná com 57.340.461 quilos (Produção..., 2014). No período de 2000 a 2009, observou-se o crescente consumo do pescado no Brasil na ordem de 30% chegando à média 10 kg/Hab/Ano (Anuário ..., 2014).

O Brasil possui mais de três mil espécies de peixes, a grande maioria com um enorme potencial para utilização na piscicultura (Anuário ..., 2014). Dentre as principais espécies produzidas no Brasil estão a tilápia, tambaqui, tambacu, carpa, pintado e pacu (Tabela 1).

TABELA 1

Principais espécies de peixes produzidas em Kg no Brasil no ano de 2014.

Espécie ou grupo de peixes	Total (Kg)
Tilápia	198.664.464
Tambaqui	139.209.130
Tambacu e tambatinga	40.266.557
Carpa	20.886.062
Pintados, cacharas e surubim.	20.437.237
Pacu e Patinga	14.553.069
Pirarucu	11.762.850
Matrinxã	10.717.744

Fonte: Adaptado de Produção... (2014).

1.2 Gênero *Salmonella*

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, catalase positivo e oxidase negativo. Pertencem à família *Enterobacteriaceae* são considerados organismos não exigentes, capazes de multiplicar-se em diversas condições ambientais (Germano e Germano, 2015).

1.2.1 Nomenclatura do gênero *Salmonella*

A nomenclatura das bactérias do gênero *Salmonella* é bastante complexa e diversas atualizações foram realizadas ao longo dos anos, todavia a uniformidade da nomenclatura é necessária para correta comunicação entre os microbiologistas, profissionais da área de saúde e pelos órgãos oficiais (Brenner *et al.*, 2000).

Até a década de 70 o conceito de espécie no gênero era baseado em características bioquímicas, da estrutura antigênica, além de informações baseadas na epidemiologia. Desta forma os nomes de espécies eram atribuídos de maneira aleatória, muitas das vezes relacionados à síndrome, ou a especificidade do hospedeiro. A partir da década de 70, após estudos de hibridização de DNA ficou demonstrado que as estirpes de *Salmonella* formavam um único grupo de hibridização, com sete subgrupos (Crosa *et al.*, 1973). Em seguida, estudos realizados por Reeves *et al.* (1989), utilizando a técnica de análise de eletroforese de enzimas multilocus confirmaram a existência de subgrupos consistentes com os estudos anteriores com uma exceção, que conduziu a criação de uma outra espécie, *Salmonella bongori*.

Dessa forma, o sistema recomendado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC) para os membros do gênero *Salmonella* são baseados em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Sendo a *Salmonella enterica* subdividida em seis subespécies (Tabela 2)

TABELA 2

Subespécies de <i>Salmonella enterica</i> .	
I	<i>enterica</i>
II	<i>salamae</i>
IIIa	<i>arizonae</i>
IIIb	<i>diarizonae</i>
IV	<i>houtenae</i>
V	<i>indica</i>

A utilização de nomes para os sorotipos foram mantidos apenas para os sorotipos da subespécie *enterica* e a utilização de fórmulas antigênicas para as demais subespécies descobertas após 1966. Os nomes dos sorotipos normalmente referem-se à localização geográfica onde o sorotipo foi isolado, e esses nomes não devem ser indicados em itálico, mas devem apresentar a primeira letra em maiúsculo (Brenner *et al.*, 2000).

1.3 Principais sorotipos de *Salmonella enterica*.

Atualmente são descritos mais de 2.650 sorotipos (Salmonela..., 2015). De forma geral os sorotipos Typhimurium e Enteritidis são os mais prevalentes em países desenvolvidos, embora outros sorotipos predominam em regiões específicas tais como a Stanley e Weltevreden na Ásia (Hendriksen *et al.*,2009). Estas diferenças podem ser justificadas devido a mudanças na forma de criação dos animais e do grande fluxo de comércio entre diferentes países (D'Aoust, 1994).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) criou em janeiro de 2000 o Programa Global de Controle de *Salmonella* com o objetivo de detectar, controlar e prevenir os surtos alimentares. Dessa forma, laboratórios em todo mundo são capacitados para diagnosticar o agente e os países participantes anualmente reportam os 15 sorotipos mais frequentemente encontrados (Hendriksen *et al.*,2011).

TABELA 3

Distribuição dos cinco sorotipos mais frequentemente encontrados em amostras isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente em diferentes países no Mundo no período de 2001 a 2007, segundo a OMS.

Países	Sorotipos
Senegal, República dos Camarões, Tunísia	Enteritidis Typhimurium Livingsstone Corvallis Typhi
Japão, República da Coreia, Malásia, Tailândia	Enteritidis Weltevreden Typhi Stanley Typhimurium
Bulgária, Croácia, Finlândia, Alemanha, Grécia, Israel, Itália, Luxemburgo, Espanha	Enteritidis Typhimurium Hadar Virchow Infantis
Canadá e EUA	Typhimurium Enteritidis Newport Heidelberg Javiana
Austrália e Nova Zelândia	Typhimurium Enteritidis Virchow Saintpaul Infantis
Argentina, Chile, Colômbia, Costa Rica, Paraguai, Peru, Uruguai e Brasil.	Enteritidis Typhimurium Typhi Agona Paratyphi

Fonte: Adaptado de Hendriksen *et al.* (2011)

Diversos sorotipos já foram detectados em peixes e produtos derivados do pescado (Tabela 4), o sorotipo mais comumente encontrado é Worthington seguido pelo Weltevreden (FAO..., 2010).

TABELA 4

Sorotipos de *Salmonella enterica* encontrados em peixes e produtos derivados do pescado em diferentes regiões do mundo.

Sorotipo	Índia/ Ásia	África	América Central	Caribe	Europa	México	América do Norte	América do Sul
S. Agona	+					+		+
S. Anatum	+			+	+	+		+
S. Arizonae	+					+		+
S. Bradford	+							
S. Enteritidis	+	+				+	+	+
S. Hadar	+					+		
S. Heidelberg	+							+
S. Infantis	+		+					
S. Montevideo	+							
S. Muenchen	+					+		
S. Javiana	+							+
S. Newport	+		+			+		+
S. Panama								+
S. Saintpaul	+					+	+	+
S. Typhi	+							
S. Typhimurium	+		+	+		+	+	+
S. Worthington	+							
S. Weltevreden	+		+		+	+		+

Fonte: Adaptado de FAO... (2010).

1.4 *Salmonella* spp. como agente patôgeno veiculado em alimentos.

A salmonelose é uma zoonose de importância para a saúde pública em todo mundo e a *Salmonella* spp. é um patógeno responsável por graves intoxicações alimentares, sendo o agente mais descrito como responsável por surtos em vários países (Maijala *et al.*, 2005).

O primeiro surto de salmonelose registrado na literatura ocorreu na Alemanha em 1888, quando após o consumo de 800 gramas de carne crua, 59 pessoas ficaram doentes e uma morreu (Evangelista, 2002). A partir de então diversos casos foram descritos ao longo do tempo em diferentes países. As mudanças nos hábitos alimentares e aumento do consumo de alimentos pré-preparados e produzidos fora da residência são condições apontadas como fatores de risco para a ocorrência dos surtos (Cardoso e Araújo, 2003).

Em sua maioria os surtos de gastroenterite causados pela bactéria ocorrem sem a necessidade de internações em hospitais, esse fato contribui para a subnotificação de casos de salmonelose, assim como ausência de dados como alimentos consumidos, tempo decorrente da infecção e outros importantes fatores a serem considerados para traçar medidas de prevenção e controle (Shinohara *et al.*, 2008). Segundo Germano e Germano (2015), apenas 10% do total de casos de surtos de origem alimentar são notificados no país, em consequência das falhas no sistema de notificação.

Segundo dados do Ministério da Saúde no período de 2000 a 2015, ocorreram no Brasil 10.666 surtos de doenças transmitidas por alimentos, totalizando 209.240 doentes e 154 óbitos, desses 58,1% não tiveram o agente etiológico identificado e 14% foram causados por *Salmonella* spp., o agente com maior índice seguido por *Staphylococcus aureus* com 7,7 %. A região Sudeste representa 39,9% dos surtos ocorridos no período seguido pela região Sul com 35,3%. A região Norte apresenta menor índice por região com um percentual de 4,1% dos surtos ocorridos entre 2000 a 2015 (Análise..., 2015).

Em um estudo realizado em Minas Gerais com o objetivo de determinar o agente causador de doença diarreica aguda no período de 2006 a 2008, na Fundação Ezequiel Dias (Funed) foram realizadas 2.478 coproculturas, sendo 13,1% dessas culturas positivas para algum agente patogênico e dessas amostras 76,23 % identificadas como *Salmonella* spp. (Alves, 2009).

De acordo com dados do CDC, a cada ano a *Salmonella* spp. é responsável por um milhão e duzentos mil doentes, 19.000 hospitalizações e 450 mortes nos Estados Unidos da América (Salmonella..., 2015).

Na França, as internações resultantes de doenças veiculadas por alimentos (DVA) resultam entre 10.000 a 18.000 hospitalizações por ano, a maioria causada pela *Salmonella* spp. cerca de 5.700 a 10.200 casos. A mortalidade está entre 92 a 535 óbitos (Vaillant *et al.*, 2005).

A China é um país que enfrenta problemas relacionados às DVA, estudos realizados demonstraram que os principais surtos ocorrem por *Vibrio parahaemolyticus*, seguido por *Salmonella* spp. (Wang *et al.*, 2007).

Os custos decorrentes da salmonelose são elevados, nos EUA estima-se que esses variaram entre 1,3 a 4,0 bilhões de dólares por ano decorrentes de despesas médicas, diminuição na produtividade e ausência ao trabalho (Shinohara *et al.*, 2008). No Brasil segundo o Ministério da Saúde no período de 1999 a 2007 foram detectados 5.699 surtos com 114.302 doentes, os custos com os casos de internações por doenças transmitidas por alimentos (DTA) no mesmo período chegam a 280 milhões de reais (Barbosa *et al.*, 2009).

Uma variedade de produtos pode ser contaminada por *Salmonella* spp. em especial aqueles que possuem um alto teor de umidade, proteínas e carboidratos como os produtos de origem animal, assim como os chamados produtos mistos além das frutas e alimentos minimamente processados. (Tabela 3)

Nos surtos ocorridos no Brasil no período de 2000 a 2015, os principais alimentos responsáveis por DTA são os alimentos mistos (14,2%), ovos e produtos a base de ovos (8,1%), água (6,2%), doces e sobremesas (4,2%). É importante destacar que 50,5% dos alimentos responsáveis por surtos de DTA nesse período não foram identificados (Análise..., 2015).

TABELA 5

Ocorrência de *Salmonella* spp. em diferentes produtos e os respectivos Estados Brasileiros e autores.

Estado	Alimento	Amostras analisadas	Ocorrência (%)	Autores
Ceará	Sushi e Sashimi	32	28,12%	Menezes <i>et al.</i> (2007)
Sergipe	Queijo coalho	60	26,67	Santana <i>et al.</i> (2008)
São Paulo	Vegetais minimamente processados	512	0,4%	Sant'Ana (2011)
São Paulo	Ovos brancos	340	1,17 %	Campello (2012)
Rio Grande do Norte	Queijos de coalho	11	9%	Feitosa <i>et al.</i> (2013)
São Paulo	Carcaça bovina	300	3%	Matos <i>et al.</i> (2013)
Paraná	Carne mecanicamente separada	390	11,02	Yamaguchi <i>et al.</i> (2013)
Paraná	Leite em pó	255	1,57	Yamaguchi <i>et al.</i> (2013)
Paraná	Carne de suíno	100	3%	Turci, Begotti e Merlini (2013)
Rio Grande do Norte	Carne ovina	20	5%	Brito <i>et al.</i> (2015)

1.1 Ocorrência de *Salmonella* em pescado e derivados

O pescado é um componente nutricionalmente relevante na dieta humana e seu consumo está associado a benefícios como desenvolvimento do sistema neurológico na gestação e na infância e diminuição dos riscos de doenças do coração (Iwamoto *et al.*, 2010). O consumo de peixes e derivados tem aumentado nos últimos anos, de acordo com dados da FAO nos Estados Unidos o consumo é de 24,05 kg/per capita/ano, na União Europeia de 22,03 kg/per capita/ano. O Japão é o maior consumidor com 60,78 kg/per capita/ano (State..., 2014). No Brasil segundo dados do Anuário da Pesca e Aquicultura (2014) o consumo é de 10 kg/capita/ano.

No entanto, mesmo com os diversos benefícios para a saúde humana o consumo de peixes e derivados apresenta riscos de contaminação química, física e biológica (Iwamoto *et al.*, 2010). A *Salmonella* spp. tem sido identificada como agente causador de surtos relacionados ao consumo de pescado na Europa, EUA e em diferentes países do mundo (Amagliani *et al.*, 2012).

De acordo com o relatório intitulado de “Sínteses sobre as Tendências e Origens de Zoonoses, Agentes Zoonóticos e Surtos Alimentares de 2013” da União Europeia, houve 82.694 casos em humanos confirmados de salmonelose nos 27 países membros no ano de 2013, um decréscimo de 7,9% quando comparado ao ano de 2012. Os dois sorotipos mais frequentemente reportados foram a *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. A *Salmonella* spp. foi o agente mais frequente nos

casos de surtos alimentares, sendo responsável por 22,5% do total. Os surtos de salmonelose veiculados por água e alimentos representaram um total de 1.168 casos. Os crustáceos, moluscos e outros mariscos representaram 1,0% dos alimentos responsáveis pelos surtos enquanto peixes e seus derivados por 0,6% (European..., 2015).

O CDC (Salmonella..., 2013) relatou a ocorrência de 7.307 casos de *Salmonella* no ano de 2013, com 30 mortes nos EUA. Os sorotipos mais isolados foram Enteritidis (19%), Typhimurium (14%) e Newport (11%).

De acordo com o relatório do “Centro da Ciência para Interesse Público” localizado em Washington no período de 2002 a 2011, o pescado e derivados foram a segunda maior categoria responsável por surtos com um total de 602 e 5.317 doentes, os peixes, moluscos e pratos baseados em frutos do mar são os produtos descritos como responsáveis pelos casos (Review..., 2014). Em julho de 2015 o CDC registrou um surto de *Salmonella* Java em 11 Estados dos EUA, sessenta e duas (62) pessoas foram infectadas e 11 (onze) hospitalizadas após o consumo de atum congelado (Salmonella..., 2015).

No Brasil de janeiro a maio de 2015, foram registrados 139 surtos, com 2.680 doentes. Avaliando a série histórica de 2000 a 2015, do total de 10.666 surtos, 0,9% ocorrem após o consumo de peixes, frutos do mar e produtos processados a base de pescado (Análise..., 2015).

Diversos autores relataram a ocorrência de *Salmonella* spp. em peixes e derivados no Brasil. Pinheiro *et al.* (2006), constataram a presença da bactéria em sushi e sashimi coletados em cinco estabelecimentos em Fortaleza no período de 2002 a 2003 o sorotipo encontrado foi *S. Newport*, o terceiro maior sorotipo correlacionado a surtos por pescado e derivados nos EUA (Salmonella..., 2015)

Resultado semelhante foi encontrado por Malavota *et al.* (2009), ao verificarem a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* spp., em sashimi comercializados em restaurantes no município do Rio de Janeiro, detectando a presença de oito amostras positivas para *Salmonella* spp. (12,5%) das 64 amostras pesquisadas. Souza *et al.* (200-), em pesquisa realizada no município de Niterói no Rio de Janeiro, para determinar a presença de *Salmonella* spp. em 17 amostras de carne de cação fresca, observou a presença em 41,2% das amostras.

Duarte *et al.* (2010) ao verificarem a ocorrência de *Salmonella* spp. em peixes e crustáceos na região Nordeste do país, observaram que das 143 amostras coletadas de peixes e crustáceos (camarão congelado e cauda de lagosta), 5% apresentaram-se positivas para a bactéria. Nunes *et al.* (2013) ao verificarem a qualidade do camarão salgado e seco e da farinha de peixe (piracuí), comercializados em mercados varejistas da cidade de Belém no estado do Pará. Das 27 amostras coletadas 13 de camarão e 14 de farinha de peixe, cinco (18,5%) amostras foram positivas para a *Salmonella* spp., demonstrando que é possível o desenvolvimento desse agente bacteriano em alimentos com alta concentração de sal e baixo teor de umidade.

Rall *et al.* (2011) avaliaram 33 amostras de peixes frescos comercializados na cidade de Botucatu, e detectaram a *S. enterica* em 3% das amostras. Onyango *et al.* (2009) ao avaliarem amostras de carne de tilápias também determinaram a presença do patógeno em 120 amostras coletadas no Quênia, 9 (14,3%) apresentaram *Salmonella* Typhimurium, 7 (11,1%) amostras de *S. Typhi* e 4 (6,3%) de *S. Enteritidis*.

1.2 Microbiota bacteriana nos peixes

Diversos estudos são encontrados na literatura sobre a microbiota dos peixes e crustáceos. Alguns demonstram aspectos quantitativos relacionados ao número de bactérias no muco e pele de peixes marinhos e de água doce, bem como estudos qualitativos que descrevem sobre os principais gêneros de bactérias encontradas nesses animais.

Esses estudos demonstram que diversos aspectos podem interferir na quantidade e qualidade das bactérias encontradas na microbiota dos peixes (Floris, 2010), entre eles a qualidade, temperatura e salinidade da água (Sugita *et al.*, 1989), as variações sazonais (Pujalte *et al.*, 2003), a dieta dos animais (Ringø e Gatesoupe, 1998), as diferentes regiões e anatomias do trato gastrointestinal dos peixes avaliados (Ringo *et al.*, 2006), assim como os estágios de desenvolvimento dos animais (larva, juvenil ou adulto) (Campbell e Buswell, 1983) e as espécies de peixes (Cahill, 1990).

O número de bactérias do muco e da pele de peixes marinhos podem variar de 100 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) a vários milhões/cm² (Frazier e Westhoff, 1998). Segundo Trust e Sparrow (1974), as brânquias podem ter um alto percentual de bactérias, valores muitas vezes maiores que 10⁶ UFC/cm². Os músculos e órgão internos são considerados por muitos autores como estéreis (Apun *et al.*, 1999), embora estudos realizados na espécie de peixe pregado (*Scophthalmus maximus*) demonstrem a presença de bactérias no rim e fígado de animais sadios (Toranzo *et al.*, 1993).

Vieira (2004) descreve os gêneros predominantes em trato gastrointestinal nos peixes tais como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Moraxella*, *Klebsiella*, além de *Vibrio*, *Bacillus* e *Micrococcus*.

Em estudo realizado na China em bagre amarelo, espécie muito comum de água doce na Ásia, foi possível detectar *Plesiomonas*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Shewanella*, *Aeromonas* e *Vibrio* na mucosa intestinal (Wu *et al.*, 2010). Já em pesquisa realizada para verificar a microbiota normal da pele, brânquias e intestino da carpa comum, os microorganismos dominantes foram *Flavobacterium* e *Vibrio* na pele e nas brânquias e *Flavobacterium* no intestino (Mahmound *et al.*, 2004).

Yaghobi *et al.*, (2014) ao avaliarem a microbiota intestinal do Panga identificaram as bactérias *Pseudomonas fluorescense*, *Micrococcus luteus*, *Aeromonas caviae*.

1.3 A *Salmonella* spp. em peixes e crustáceos.

O principal habitat das salmonelas é o trato gastrointestinal de aves, répteis e seres humanos (Carvalho, 2006), e embora ela já tenha sido encontrada no intestino de diferentes espécies de peixes tropicais tais como carpa comum, cascudos e bagre do canal (Gaertner *et al.*, 2008), não é considerada como parte da microbiota intestinal normal dos peixes (Janssen e Meyers, 1968).

Alguns questionamentos sobre o aumento da incidência da *Salmonella* têm sido realizados, entre eles a utilização de tanques escavados de terra ou reservatórios de águas sem proteção para o cultivo de peixes e moluscos (Linder, 2002), normalmente esses tanques estão expostos à contaminação ambiental por esgotos urbanos e fezes de aves e roedores infectados (D'Aoust, 1995).

Em um estudo realizado no Quênia, em uma lagoa com elevada contaminação ambiental, foi verificado que de 120 Tilápias de vida livre coletadas, 20 foram positivas para *Salmonella* spp. (Awuor *et al.*, 2011).

O isolamento desse patógeno tem ocorrido tanto em águas poluídas como em águas naturais não poluídas. A *Salmonella* ssp. foi isolada em 16,7% das amostras de lagos e 20,3% das amostras de rios, em estudo realizado na Grécia (Arvanitidou *et al.*, 1995).

No Brasil em pesquisa realizada em Botucatu – SP, com o intuito de estudar a microbiota intestinal de 221 peixes de água doce, criados em sistemas extensivos (77 peixes) e 144 amostras de sistemas intensivos. Foram isolados diferentes micro-organismos entre eles a *Salmonella* Typhimurium em 2,2% dos peixes criados em sistema extensivo e 2,1% no sistema intensivo (Langoni *et al.*, 2000).

Linder (2002) com o objetivo de determinar a presença de *Salmonella* spp. no conteúdo intestinal de peixes de água doce tais como pacu, tambaqui, matrinxã, piraputanga, tilápia, carpa, piauçu entre outras espécies, avaliou 211 animais (105 oriundos de criatórios e 106 de pesqueiros), a presença de *Salmonella* foi detectada em seis (5,6%) amostras do conteúdo intestinal de peixes de pesqueiros. Os sorotipos isolados foram Panama em pacu e carpa capim, Muenchen em pacu e Saintpaul em tilápia do Nilo e piauçu.

Em estudo realizado em fazendas de cultivo de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) no estado do Ceará, foi possível detectar a presença de *Salmonella* em três (5,3%) das 56 amostras analisadas, os sorotipos encontrados foram Newport e Saintpaul (Parente *et al.*, 2011), demonstrando que, apesar de baixa, a presença de bactérias entéricas em ambientes de cultivo de camarões é preocupante para a cadeia produtiva pelos riscos à saúde humana.

1.4 Fontes de infecção

Atualmente o cultivo de peixes, moluscos e crustáceos baseado na utilização de tanques escavados na terra, ou em reservatórios de água desprotegidos ou mesmo em sistema de recirculação propicia a ocorrência de diversos fatores de risco para o crescimento e proliferação de salmonela, entre eles podemos citar a contaminação das águas por redes de esgoto, contaminação por fezes de animais reservatórios do patógeno entre outros.

O isolamento de *Salmonella* spp. em águas poluídas tem sido frequentemente relatado. Rodrigues *et al.* (1989) identificaram a presença da bactéria em 22 praias na cidade do Rio de Janeiro destacando os sorotipos Typhimurium, Agona e Oranienburg. Martins *et al.* (1988) ao avaliar a presença de *Salmonella* spp. em ambientes aquáticos no Estado de São Paulo, observou que das 412 amostras coletadas em diferentes praias, 51,7% eram positivas para o patógeno.

Em estudo realizado na Espanha no período de 1992 a 1996, para avaliar a incidência de *Salmonella* em três diferentes ambientes aquáticos, foram coletadas 3.164 amostras, dessas 823 foram positivas para o patógeno, dos 55 diferentes sorotipos identificados, o mais prevalente foi Enteritidis, mais comumente encontrado em água do mar (Polo *et al.*, 1999).

Diversos sorotipos já foram isolados de águas superficiais tais como Anatum, Newport, Saintpaul, Muenchen e Braenderup (Haley *et al.*, 2009). Em estudo realizado na Flórida nos EUA com o objetivo de determinar a qualidade das águas superficiais da região central do estado, de um total de 202 amostras avaliadas, 165 (81,7%) foram positivas para *Salmonella*.

Trinta e três sorotipos foram identificados, sendo os mais frequentes Muenchen, Rubislaw, Anatum e Gaminara. A quantidade e variedade de sorotipos confirmam relatos prévios que em águas superficiais é comum encontrar uma diversidade de sorotipos em um único ambiente (McEgan, 2014).

A presença de *Salmonella* spp. em ambientes de extração de ostras também foi relatado por Silva *et al.*, (201-), ao avaliarem diferentes pontos do estuário de São Francisco de Conde –BA. Das 23 amostras coletadas, 10 (47,4%) foram confirmadas como *Salmonella* spp.

Setti *et al.* (2009) ao avaliarem 801 amostras de mexilhões, água do mar e sedimento marinho em Morocco na África, encontraram 7,1% das amostras positivas para *Salmonella*, sendo a maior prevalência em mexilhões, seguido pelo sedimento e pela água do mar.

Nos pesqueiros, também conhecidos como pesque-pague a situação não é diferente. Linder (2002) ao avaliar o perfil microbiológico do sedimento dos tanques de pesqueiros do interior de São Paulo, encontrou cinco amostras positivas das 13 pesquisadas (38,4%), os sorotipos encontrados foram Hadar, Newport e Muenchen. O fato pode ser justificado pelo hábito dos produtores utilizarem a cama de frango, material que naturalmente têm a presença de enterobactérias, inclusive a *Salmonella*, como adubo para o crescimento e desenvolvimento do fitoplâncton (Tavares, 1988).

A utilização dos dejetos de suínos como fertilizantes na piscicultura é habitual há alguns anos esse consórcio suíno-peixe é uma forma de minimizar o impacto ambiental, além de diminuir custos de produção (Palhares, 2006), nesse sistema há um maior desenvolvimento das algas que serão utilizadas na alimentação dos peixes. Todavia, já foi observada uma alta ocorrência de suínos portadores assintomáticos de salmonelas (Bessa *et al.*, 2004), com descrição de sorotipos importantes na saúde humana (Michael *et al.*, 2002), resultando em comprometimento da qualidade do pescado.

Outro fator de risco amplamente conhecido é a presença de aves e animais silvestres e domésticos próximos aos tanques ou criatórios de peixes.

Hidasi *et al.* (2015) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a ocorrência de *Salmonella enterica* em pombo (*Columba livia*) e em águia-de-asa redonda (abutres) (*Atratus atratus*), aves comuns de serem encontradas no Brasil e conhecidas por alimentarem-se de carcaças e outras matérias orgânicas. O índice de amostras positivas foi alto, 13% (26/200) das amostras fecais coletadas de pombo comum. O sorotipo de maior prevalência foi Schwarzengrund, seguido por Typhimurium. Na águia-de-asa redonda 5/60 (8,3%) das amostras foram positivas. Dessa forma ficou demonstrado que os sorotipos encontrados nas aves não são específicos das mesmas, e podem se adaptar a outros animais, tais como outras aves, peixes e mamíferos representando um fator de risco para a disseminação da bactéria no ambiente.

A ocorrência de *Salmonella* em animais silvestres foi registrada por Lins (1970) no estado do Pará ao avaliar 1.380 amostras e identificar a *S. Sandiego* em roedores (*Oryzomys capito*), marsupiais (*Philander opossum*) e répteis (*Ameiva ameiva*). A *Salmonella* Morehead em roedores (*O. capito*), edentatos (*Choloepus didactylus*) e répteis (*Ameiva a. ameiva*), além da *S. Christiansborg* e *S. Wassenaar* isoladas também em répteis (*Ameiva a. ameiva*).

Répteis são considerados reservatórios naturais da *Salmonella* e na maioria das vezes assintomáticos, com baixo índice de doenças reportadas (Onderka e Finlayson, 1985). Lucak *et al.* (2015), determinaram a prevalência de *Salmonella* spp. em répteis na Croácia. Das 292 amostras de pele, secreção da mucosa (suabes) da cloaca e amostras fecais de lagartos, cobras, quelônios, 26 amostras (8,9%) foram positivas para *Salmonella*. Todas as subespécies isoladas

pertencem à espécie *Salmonella enterica*. Sendo que os sorotipos mais frequentes foram Halle, Kisarawe, Senftenberg.

Segundo EFSA (European..., 2008) na “Avaliação de riscos microbiológicos em alimentos destinados a animais de produção”, a *Salmonella spp.* foi determinada como o maior risco microbiológico presente nas rações de animais.

Alguns estudos demonstraram que a *Salmonella spp.* tem a capacidade de sobreviver por meses a anos em rações estocadas a temperatura ambiente (D’Aoust, 1994). No meio ambiente e em superfícies orgânicas a bactéria tem a capacidade de formar biofilmes que a protegem do stress do ambiente (Donlan e Costerton, 2002).

Em estudo realizado em Minas Gerais com o intuito de verificar a qualidade microbiológica de farinhas de carne e osso utilizadas para produção de ração animal, 90% (9/12) das amostras apresentaram contaminação por *Salmonella* (Santos *et al.*, 2000), outros autores também determinaram a presença de *Salmonella* em níveis que variaram de 5 a 96,67% em farinhas de origem animal (Giorgi *et al.*, 1971; Silva *et al.*, 1973; Miranda *et al.*, 1978; Girão *et al.*, 1983; Prestes *et al.*, 1983; Berchieri Júnior, 1989; Saitanu e Jerngklinchan, 1994; Veldman, 1995; Bosquiroli, 1996).

1.9 Tipificação de *Salmonella spp.*

A tipificação de *Salmonella spp.* é um instrumento da epidemiologia que possibilita a caracterização e a diferenciação de estirpes de uma mesma espécie, permitindo aos pesquisadores compreender sobre a propagação, patogenia e filogenia das bactérias (Foxman *et al.*, 2005).

Existem inúmeras metodologias para tipificação das bactérias baseados em características fenotípicas e genotípicas. Os métodos fenotípicos distinguem as estirpes através da caracterização dos produtos da expressão gênica, tais como a presença de antígenos na superfície celular ou o perfil de suscetibilidade dos antimicrobianos (Tenover *et al.*, 1995), já os métodos genotípicos baseiam-se na análise da estrutura genética dos micro-organismos tais como as enzimas de restrição, a amplificação de ácidos nucleicos e o sequenciamento de nucleotídeos (Yan *et al.*, 2003).

Existem diversas técnicas para realizar a tipificação de *Salmonella spp.* entre eles a sorotipificação, fagotipificação e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos que são métodos fenotípicos e o perfil plasmidial, tipagem de sequências de multilocus (MLST), a eletroforese em campo pulsado (PFGE) que são considerados métodos genotípicos.

1.9.1 Sorotipificação

A sorotipificação é uma técnica tradicional, e importante ferramenta epidemiológica na identificação de *Salmonella*. É utilizada há anos e permite determinar prevalência, identificar surtos, analisar as fontes de infecção e as vias de transmissão (Olsen *et al.*, 1993).

A técnica é baseada na identificação dos antígenos somáticos, flagelares e capsulares presentes na superfície celular, permitindo a identificação dos sorotipos através do esquema de Kauffmann & White (Silva *et al.*, 2007).

O esquema denominado Kauffmann & White divide o gênero *Salmonella* em sorotipos, baseando-se na sua composição antigênica. Os antígenos somáticos (O) são carboidratos que estão presentes na parte externa dos lipossacarídeos da parede celular e são designados por números arábicos (CDC, 2011). Os antígenos flagelares (H) compõem o flagelo das estirpes móveis das *Salmonellas*, são designados por letras minúsculas e por números arábicos e ocorrem em duas fases chamadas de fase um e fase dois (CDC, 2011). Na fase um os antígenos são identificados por letras minúsculas do alfabeto e na fase dois são identificados por números arábicos. Os antígenos capsulares ocorrem apenas nos sorotipos Typhi, Paratyphi e Dublin (Silva *et al.*, 2007).

O esquema é representado em forma de tabela, que contém o conjunto das características antigênicas, na 1ª coluna está a estrutura somática, os sorotipos que apresentam as mesmas características são identificados por letras maiúsculas. E as outras colunas (2ª e 3ª) apresentam as estruturas flagelares (Tabela 6) (Silva *et al.*, 2007)

TABELA 6

Exemplos da classificação para os principais sorotipos pelo esquema de Kauffmann & White.

Grupo	Sorotipo	Antígeno O	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
A	S. Paratyphi A	1, 2,12	a	-
	S. Paratyphi B	1,4,5,12	b	1,2
	S. Java	1,4,5,12	b	(1,2)
	S. Typhimurium	1,4,5,12	i	1,2
B	S. Agona	4,12	f,g,s	-
	S. Brandenburg	4,12	I, v	e, n, z ₁₅
	S. Heidelberg	1,4,5,12	r	1,2
	S. Paratyphi C	6,7	c	1,5
C ₁	S. Choleraesuis	6,7	c	1,5
	S. Montevideo	6,7	g,m,s	-
C ₂	S. Newport	6,8	e,h	1,2

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2007)

1.9.2 Tipagem de sequências de multilocus (MLST)

O método de “Multi locus sequence typing” (MLST) foi proposto por Maiden *et al.* (1998) para a bactéria *Neisseria meningitidis*, como uma alternativa para as metodologias tradicionais por apresentar alta reprodutibilidade.

A metodologia é baseada no sequenciamento de genes essenciais ou de manutenção conhecidos como *housekeeping*, como a mesma avalia mais de um gene tem um poder discriminatório maior quando comparado a outras técnicas. Dessa forma é um método de tipagem muito usado para rastreamento de surtos de infecções, reconhecimento de clones hipervirulentos, estabelecimento da relação clonal e no controle e erradicação das doenças (Olive e Bean, 1999).

Para *Salmonella enterica* o MLST é realizado para sete genes *housekeeping* de aproximadamente 500 pares de bases (Tabela 7), a primeira descrição da utilização do método para a espécie ocorreu em 2002, por Kidgell e colaboradores, desde então algumas atualizações na metodologia foram descritas. Em 2012, uma descrição completa do esquema e uma revisão das estirpes de *Salmonella enterica* subs. *enterica* foi publicado com o intuito de propor a substituição da utilização do método de sorotipificação antigênica pelo MLST, os resultados iniciais sugerem haver uma correlação entre os sorotipos e as sequências tipos, com algumas exceções. (Achtman *et al.*, 2012)

TABELA 7

Características dos fragmentos dos genes utilizados na reação de MLST para *Salmonella enterica*.

Fragmento do gene	Produto gênico	Amplicon (pb)	Fragmento sequenciando (pb)
<i>thrA</i>	Aspartato quinase homoserina desidrogenase	852	501
<i>purE</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	510	399
<i>sucA</i>	Alfa-cetoglutarato desidrogenase	643	501
<i>hisD</i>	Histidinol-desidrogenase	894	501
<i>aroC</i>	Corismato sintase	826	501
<i>hemD</i>	Uroporfirinogênio III co-sintetase	666	432
<i>dnaN</i>	Subunidade Beta da DNA-polimerase	833	501

Fonte: Protocols... [200-]

A técnica baseia-se no sequenciamento de genes essenciais, após essa etapa as sequências são depositadas em um banco de dados on line (<http://www.pubmlst.org/databases>), onde cada sequência corresponde a um alelo. O conjunto de alelos de cada amostra é conhecido como *sequence typing* ou sequência tipo (ST) (Maiden *et al.*, 2006).

Os dados gerados pelo banco podem ser compartilhados por pesquisadores em todo mundo, permitindo comparar o perfil dos isolados com os depositados no banco. Como existem muitos alelos para cada um dos sete genes, é difícil que os isolados tenham o mesmo perfil alélico por acaso, dessa forma quando isso ocorre os mesmos podem ser considerados como membros do mesmo clone (Maiden *et al.*, 1998; Spratt, 1999; Deurenberg e Stobberingh, 2008).

O algoritmo BURST (<http://www.eburst.mlst.net>) foi desenvolvido para utilizar os dados produzidos pelo MLST, ele possibilita o estudo de evolução e população de um grande número de bactérias, dividindo os dados em isolados relacionados de um mesmo grupo em complexos clonais (CC) ou de singletons (ST que não se agrupam em CC) (Deurenberg e Stobberingh, 2008).

CAPÍTULO 2

OCORRÊNCIA E SOROTIPAGEM DE *Salmonella enterica* ISOLADA EM PEIXES NATIVOS NO BRASIL.

2.1 Introdução

Salmonella é uma bactéria causadora de inúmeros surtos alimentares no Brasil e no Mundo, capaz de colonizar diversos hospedeiros. É em geral transmitida aos seres humanos por ingestão de alimentos contaminados, principalmente em produtos de origem animal (Pires, 2012).

A ocorrência do patógeno em pescado e produtos derivados já foi determinada em alguns estudos (Liuson, 2003; Alvares *et al.*, 2008; Dantas *et al.*, 2012), embora as fontes de infecção não foram determinadas e os inquéritos em sua maioria foram realizados em restaurantes, supermercados e lanchonetes. Desta forma a contaminação pode estar relacionada à falta de higiene na manipulação, transporte e armazenamento dos produtos.

Embora a presença de *Salmonella enterica* em peixes tropicais já tenha sido relatada em pescueiros no Estado de São Paulo (Linder, 2002), na literatura não existem estudos sobre a ocorrência de *Salmonella* em peixes nas pisciculturas comerciais de alta produção no país.

A determinação da ocorrência, bem como das fontes de infecção são essenciais para a implementação de medidas de controle e mitigação da infecção ainda nas fazendas, evitando ou minimizando a contaminação dos produtos no processamento. Portanto o objetivo desse trabalho foi determinar a ocorrência de *Salmonella* em peixes nativos no Brasil em fazendas de alta produção e realizar a sorotipagem e genotipagem dos isolados.

2.2 Material e métodos

2.2.1. Delineamento epidemiológico

No ano de 2012 após confirmação de casos de contaminação por *Salmonella* spp. em pescado em frigoríficos fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) em parceria com Laboratório Oficial Central da Rede de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura (AQUACEN) realizaram visitas técnicas a fazendas de alta produção de peixes nativos no Brasil para coleta de material.

As coletas foram realizadas no período de 2012 a 2015, sendo realizadas cinco coletas de amostras de insumos (ração e matérias primas utilizadas para produção da ração), água dos tanques de cultivo de peixes, suabes de brânquias e suabes da região posterior do trato gastrointestinal de tambaquis, matrinxã, piau, pintado amazônico, caranha e tilápia.

Também foram coletadas fezes de animais encontradas próximo aos tanques de cultivo, e músculo de tambaquis, matrinxã e pintado amazônico em cinco pisciculturas comerciais. (Anexo II)

2.2.2 Caracterização das regiões estudadas

O estudo foi realizado nos Estados de Mato Grosso, Tocantins e São Paulo. O Estado do Mato Grosso está localizado na região Centro-Oeste do país e no ano de 2014 foi o segundo maior produtor de peixes com uma produção de 60.946.144 mil quilos, sendo responsável por 15,8% da produção total do Brasil (Produção..., 2014

O Estado de São Paulo foi o sexto maior produtor de peixes no mesmo ano com uma produção de 27.441.700 mil quilos. O Estado do Tocantins, localizado na região Norte é 15° na produção de peixes com uma produção de 9.613.291 mil quilos (Produção..., 2014).

2.2.3 Caracterização das pisciculturas comerciais estudadas

As coletas foram realizadas em cinco pisciculturas comerciais de alta produção, os Estados de localização das fazendas podem ser acompanhados na tabela 8.

TABELA 8
Estados de localização das propriedades utilizadas no estudo.

Propriedades	Localização da Propriedade
Fazenda A	Mato Grosso
Fazenda B	Tocantins
Fazenda C	Tocantins
Fazenda D	Mato Grosso
Fazenda E	São Paulo

A Fazenda A, possui uma área total de 225 hectares e 112,5 de área construída, capacidade de produção de cinco milhões de alevinos por ano, possui 83 tanques escavados de alevinagem e 45 tanques escavados de engorda. Entre as espécies produzidas na piscicultura estão o pintado amazônico, o tambaqui e a tilápia. A empresa possui um frigorífico próprio, com capacidade de abater 22.500 kg por dia, entre os produtos processados estão filé de pintado, costela de tambaqui e filé de tilápia.

A Fazenda B possui 800 hectares de lâmina d'água, com produção de 300 toneladas por mês e cultivo de tambaqui, pintado, matrinxã, caranha e piau. Os animais são mantidos em represas em sistema de policultivo, as mesmas são abastecidas com água proveniente da chuva, não havendo renovação de água durante o ciclo de produção. A empresa possui um frigorífico com capacidade de produção de peixes inteiros, frescos e eviscerados. A Fazenda C está localizada no município de Brejinho do Nazaré-TO e é fornecedora dos alevinos para a Fazenda B.

A Fazenda D pertence a um grupo empresarial, com produção anual de 15 milhões de alevinos, entre as espécies produzidas estão tambaqui, tambacu, pacu, pintado amazônico, a piraputanga. A empresa possui 300 hectares de lâmina d'água e realiza a produção dos animais em grandes lagos. A empresa possui frigorífico com capacidade de abate de 40 toneladas/dia, os principais produtos produzidos são filé de peixe inteiro, peixe eviscerado sem escamas, bolinhos de peixe, costelinha de peixe, hambúrguer de peixe empanado e linguiça.

A última propriedade denominada Fazenda E tem a produção de alevinos de pintado, matrinxã, patinga, pirarucu e tilápia em tanques escavados e realiza venda e comercialização dos mesmos em todo o país. Possui frigorífico próprio e os principais produtos são o filé de tilápia, costelas de tambaqui e postas de pintado.

2.2.4. Processamento das amostras

As amostras de suabes de brânquias e de trato gastrointestinal foram transportadas em meio seletivo Rappaport-Vassiliadis. As amostras de água, insumos, fezes de animais e músculo foram acondicionadas em tubos estéreis tipo Falcon de 50 ml até o AQUACEN.

No laboratório as amostras de suabes de TGI e brânquias foram enriquecidas em meio seletivo Rappaport-Vassiliadis por 24 horas a 37°C. Posteriormente, 10 µl do caldo foram plaqueados em Ágar Entérico de Hektoen para isolamento seletivo de *Salmonella*.

As amostras de água dos tanques de cultivo dos peixes, ração, fezes coletadas próximo aos tanques e músculo foram enriquecidas em água peptonada 1% por 24 horas e posteriormente 10 µl foram plaqueados em Ágar Entérico de Hektoen para isolamento seletivo de *Salmonella*. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Colônias com morfologia sugestiva de *Salmonella* spp. foram coletadas e replaqueadas em Ágar Entérico de Hektoen.

2.2.5 Extração de DNA

Das colônias com características sugestivas de *Salmonella* spp. foi extraído o DNA utilizando o kit para extração de tecidos e culturas “Maxweel® 16 Tissue DNA Purification Kit” e o equipamento Maxwell® 16 MDx Research Instrument (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de DNA extraído foi quantificada por espectrofotometria com o equipamento Nanodrop® (ThermoScientific).

2.2.6 Identificação dos isolados por Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

O diagnóstico por PCR foi realizado de acordo com o descrito por Amavisit *et al.*, (2001). A reação consistiu de 50 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada primer (Tabela 9) e 1U *Taq* polimerase para um volume final de 25 µL de reação. Foi utilizado 50 ng de DNA template (2 µL).

A amplificação foi realizada através do processo descrito a seguir: 1 ciclo a 95°C por 15 minutos; 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e a extensão final a 72°C por 7 minutos. A PCR foi realizada em termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems, EUA). Os produtos da PCR foram revelados com brometo de etídeo e visualizados em gel de agarose a 1,5%.

TABELA 9

Sequência de *primers* utilizados para a amplificação do DNA via PCR segundo Amavisit *et al.*, (2001).

Primer	Sequencia 5' - 3'
S18	ACCGCTAACGCTCGCCTGTAT
S19	AGAGGTGGACGGGTTGCTGCCGTT

2.2.7 Sorotipificação antigênica

As amostras consideradas positivas pela PCR foram repicadas em ágar Muller Hilton incubados a 37°C por 24 horas e encaminhadas para realização da sorotipificação antigênica no Laboratório de Enterobactérias - LABENT da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

2.2.8 Realização do MLST

A técnica de MLST para determinação dos sorotipos de *Salmonella* é baseada no sequenciamento e avaliação de regiões internas de sete genes conservados (“housekeeping”) (thrA-aspartato quinase homoserina desidrogenase; purE-phosphoribosylaminoimidazole carboxylase; sucA-alfa-cetoglutarato desidrogenase; hisD-histidinol-desidrogenase; aroC-corismato sintase; hemD-uroporfirinogênio III co-sintetase; e dnaN-subunidade Beta da DNA-polimerase III). (Tabela 10)

Essa técnica foi realizada de acordo com metodologia descrita por Achtman *et al.*, (2012). Os iniciadores (“primers”) utilizados nas reações de PCR estão apresentados na tabela 10. Um volume de 25 µl de mistura compôs o mix de cada análise de PCR, contendo 0,2 µg de DNA, 2,5 mM MgCl₂, 250 µg de dNTP, 25 pmol de cada primer e 1 U de Taq polimerase.

As condições da PCR foram: 10 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C e 5 minutos a 72°C. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems, EUA).

Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose a 1,5% e revelados com brometo de etídio 0,5 mg/mL. Imagens dos géis foram capturadas utilizando o equipamento L-PIX (Loccus Biotecnologia, Brasil).

TABELA 10

Gene alvo e iniciadores utilizados no MLST para determinação do tipo genético *Salmonella*.

Gene Alvo	Sequência dos Iniciadores	Amplicon (pb)
<i>thrA</i>	F 5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3' R 5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3'	852 pb
<i>purE</i>	F 5'-GACACCTCAAAAGCAGCGT-3' R 5'-AGACGGCGATACCCAGCGG-3'	510 pb
<i>sucA</i>	F 5'-CGCGCTCAAACAGACCTAC-3' R 5'-GACGTGGAAAATCGGCGCC-3'	643 pb
<i>hisD</i>	F 5'-GAAACGTTCCATTCCGCGC-3' R 5'-GCGGATTCGGCGACCAG-3'	894 pb
<i>aroC</i>	F 5'-CCTGGCACCTCGCGCTATAC-3' R 5'-CCACACACGGATCGTGGCG-3'	826 pb
<i>hemD</i>	F5'-GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG-3' R5'- TCAGCGACCTTAATATCTTGCCA-3'	666 pb
<i>dnaN</i>	F5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3' R1 5'-CCGCGGAATTTCTCATTGAG-3'	833 pb

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Purelink Preps (Life Technologies, EUA).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit BigDye™ Terminator Cycle sequencing (Life Technologies, EUA) e o equipamento ABI 3730XL Genetic Analyzer (Life Technologies, EUA).

As sequências foram alinhadas e os contigs gerados com o uso do programa Bioedit (Thompson *et al.*, 1994). Para a análise de MLST, cada gene foi analisado individualmente para determinação dos alelos e posteriormente os sete genes de cada isolado avaliados conjuntamente para determinação do tipo genético (“ST-Sequence Type”) por meio de ferramentas disponíveis no site (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). A diversidade genética dos isolados foi calculada pelo Índice de Diversidade de Simpson (ISD) (Hunter e Gaston, 1988).

O programa eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net>) foi utilizado para identificar complexos clonais de *Salmonella* dos diferentes isolados. Para a construção da árvore filogenética as sequências foram concatenadas com o uso do programa Bioedit (Thompson *et al.*, 1994), as matrizes de distância geradas foram baseadas no modelo de substituição Kimura 2-parâmetros e construído o dendograma através do método de Neighbor-Joining no programa MEGA 6 versão 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1. Ocorrência de *Salmonella enterica* em amostras de fazendas nos Estados do Tocantins, Mato Grosso e São Paulo.

Foram coletadas 569 amostras (Tabela 11 e Anexo II e III) de cinco fazendas dos Estados do Tocantins, Mato Grosso e São Paulo. Dessas, 39 (6,85%) isolados de *Salmonella enterica* (Gráfico 1).

TABELA 11Frequência de amostras positivas para *Salmonella enterica* por Fazenda.

Identificação da propriedade	Número de amostras coletadas	Número de amostras positivas	Frequencia de amostras positivas (%)
Fazenda A	49	4	8,16 %
Fazenda B	257	23	10, 22%
Fazenda C	77	12	15, 58%
Fazenda D	5	-	-
Fazenda E	181	-	-
Total	569	39	6,85%

As amostras positivas foram detectadas nas Fazendas A, B e C. Na fazenda A localizada no Mato Grosso, foram coletadas amostras de suabes de TGI de tambaqui e pintado, suabes de brânquia de pintado e tambaqui, intestino de tambaqui, água dos tanques de cultivo dos peixes e fezes de animais encontradas próximos aos tanques. Houve amostras positivas para suabes de TGI de tambaqui (2) e pintado (1) e amostras da água dos tanques de cultivo dos peixes (1). Na Fazenda A ocorre a produção de grande parte dos alevinos utilizados, entretando os alevinos de tilápia e tambaqui são adquiridos de empresas do Paraná e Rondônia, respectivamente. A Fazenda D também é um fornecedor de alevinos para a Fazenda A, e nessa não foi encontrada nenhuma amostra positiva para *Salmonella enterica*.

A Fazenda B é especializada na produção, processamento e comercialização de peixes nativos, principalmente tambaqui, pintado amazônico, matrinxã, curimba e piau. Os alevinos são adquiridos da empresa C localizada no município de Brejinho de Nazaré-TO. Em ambas as empresas foi possível detectar a presença de amostras positivas para *Salmonella enterica*.

Na fazenda E não foi detectada nenhuma amostra positiva para *Salmonella*. A quantidade de amostras positivas podem ser vistas no gráfico 1.

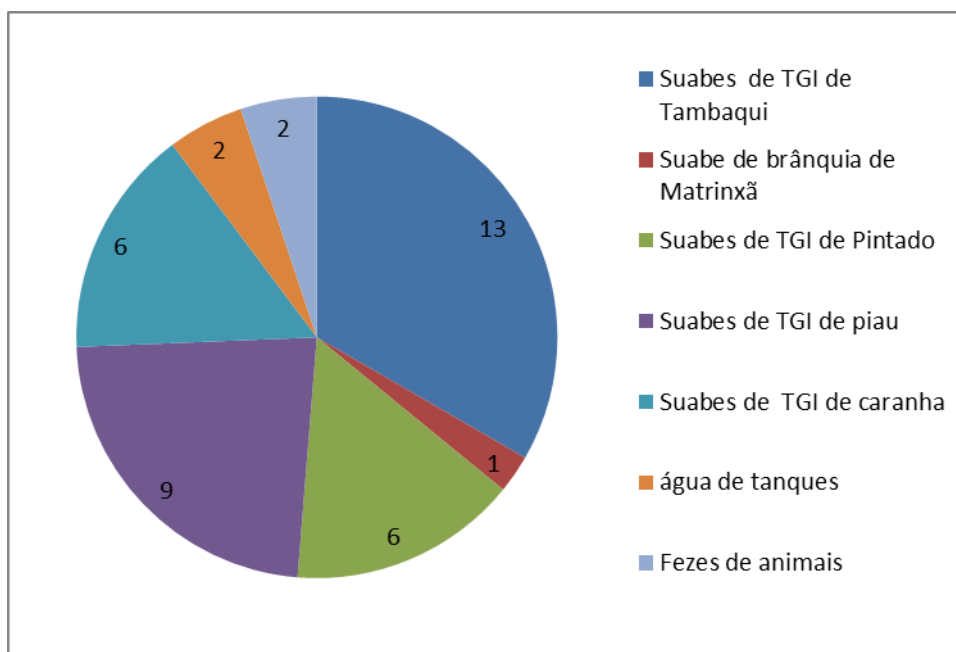


GRÁFICO 1. Amostras positivas para *Salmonella enterica* pelo método de PCR.

Quatrocentos e trinta e uma amostras (431) foram coletas de suabes de trato gastrointestinal de tambaqui, matrinxã, piau, pintado, tilápia e caranha, sendo 7,88% (34) das amostras positivas para *S. enterica*. Resultados próximos foram descritos por Lorezon (2009) ao relatar a presença de *Salmonella spp.* em duas (4,44%) amostras de TGI de peixes. Linder (2002) ao avaliar o conteúdo do TGI de peixes tropicais no Estado de São Paulo encontrou amostras positivas para *Salmonella enterica* em pacu, carpa comum, carpa capim, tilápia do Nilo e Piaçu.

Youssef *et al.* (1992) também verificaram a presença de *Salmonella* em 3,9% das amostras de trato gastrointestinal de tilápias.

A presença de *Salmonella* no TGI dos peixes já foi descrita na literatura, alguns autores sugerem que os peixes são possíveis portadores de *Salmonella* em seus intestinos por um curto período de tempo, outros que os peixes podem ser ativamente infectados pelo patógeno (Pullela, 1997). Pouco se sabe sobre a persistência e a disseminação da *Salmonella* em peixes expostos a bactéria por via oral (Nesse *et al.*, 2005).

Ao avaliar as fezes de animais encontradas próximas aos tanques de criação, foi detectada a presença de duas amostras positivas das nove amostras avaliadas. Sugere-se que as fezes encontradas eram de capivara devido às características das mesmas. Bandarra *et al.* (1995) descreveram a ocorrência de um caso de septicemia por *Salmonella spp.* em uma capivara fêmea adulta na cidade de Londrina – Paraná. Nogueira (1998) identificou três estirpes de *Salmonella* em fezes de capivara, sendo uma do sorotipo Belem e as outras do sorotipo Paratyphi B, sendo esse de ocorrência rara em animais domésticos e silvestres.

As brânquias exercem papéis vitais para os peixes, são responsáveis por troca gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido básico e excreção de compostos nitrogenados (Machado, 1999). A brânquia é a principal superfície de contato com o ambiente externo, e alvo dos

poluentes encontrados na água devido a sua extensa área superficial (Wong e Wong, 2000). É sabido que o ambiente aquático constitui um dos maiores reservatórios de *Salmonella* e os produtos derivados do pescado são reconhecidos como os maiores transportadores de agentes patogênicos de origem alimentar (Kamat *et al.*, 2005; Upadhyay *et al.*, 2010).

Foram coletadas 23 amostras de suabes de brânquias de tambaqui (13), matrinxã (2), piau (2) e pintado (6). Apenas uma amostra de suabe de brânquia de matrinxã foi positiva para *Salmonella enterica*. A ocorrência de *Salmonella* spp. em brânquias de peixes já foi relatada por Nwiyi e Onyeabor (2011), que identificaram a presença do patógeno em 12 (40 %) amostras de brânquias de tilápia do Nilo das 30 avaliadas.

Yagoub (2009) ao avaliar tilápias frescas relatou que das 150 amostras coletadas, duas (1,2%) amostras de brânquias foram positivas para *Salmonella* spp. além de detectar a presença do patógeno em intestino e músculo.

A qualidade das águas dos viveiros e tanques pode influenciar a qualidade microbiológica dos peixes e seus produtos (Pal e Dasgupta, 1992). A ocorrência de bactérias entéricas em tanques de aquicultura determina a necessidade de cuidados e rígido controle higiênico durante o manejo e a evisceração dos animais, com o objetivo de evitar a transferência das bactérias da água e do trato gastrointestinal dos animais para o músculo dos peixes (Lorezon *et al.*, 2010).

Nesse estudo 43 amostras de água dos tanques de criação de peixes foram avaliadas para a presença de *Salmonella enterica*, sendo duas (4,65%) positivas para o patógeno. O isolamento da *Salmonella* spp. já ocorreu em águas de cultivo de peixes em pesqueiros no Brasil (Linder, 2002; Liuson, 2003; Eler *et al.*, 2006), e em rios (Paula, 2011).

Os sedimentos dos tanques são caracterizados por uma mistura de partículas do solo e diferentes estágios de decomposição da matéria orgânica (Tavares, 1995). Nesse estudo foram avaliadas duas amostras de sedimentos e não foi encontrada a presença de *S. enterica*. Linder (2002) por sua vez verificou a presença de *Salmonella* spp. em 38,46% das amostras de sedimento coletadas em tanques no interior do Estado de São Paulo. Os sorotipos identificados foram Muecnchen, *S. enterica* subespécie *enterica* sorotipo 4,5,12:b, Hadar e Newport.

A ração é conhecida como um veículo de transmissão de *Salmonella*, sendo que a bactéria tem a capacidade de sobreviver por períodos prolongados que podem variar de meses até anos como demonstrado por D'Aoust (1995). Embora essa seja uma fonte de infecção conhecida para os animais de forma geral, os resultados da presença da bactéria nas rações e farinhas de produto de origem animal variam 5 a 96,67% (Bosquiroli, 1996). Segundo os padrões higiênicos sanitários brasileiros as farinhas de vísceras, penas e carne devem apresentar ausência de *Salm*

Das 569 amostras coletadas 41 eram de rações e insumos para produção de rações (farinhas de peixe, carcaça, vísceras, sangue, carne e ossos e farinha de frango), nenhuma das amostras foi positiva para *Salmonella enterica*. Resultado similar foi encontrado por Linder (2002) ao avaliar 44 amostras de rações de pesqueiros e criatórios de peixes tropicais no Estado de São Paulo, não encontrando nenhuma amostra positiva em sua avaliação.

Um dos fatores que podem influenciar nesses resultados é a dificuldade de obtenção de uma amostra representativa de ração, seja nas fazendas ou nas fábricas de ração (Funk *et al.*, 2001; Kich *et al.*, 2005), outra questão é falta de capacidade de comparação entre os métodos de detecção e amostragem, de forma geral os estudos são realizados qualitativamente sendo raros os estudos que quantificam o micro-organismo (Davies *et al.*, 2000). O tamanho das alíquotas coletadas, assim como a frequência e a intensidade são fatores que podem influenciar nos

resultados, embora não haja na literatura recomendações quanto a isso (Davies *et al.*, 2000; Malorny *et al.*, 2008).

Os ingredientes e a ração animal são produtos de baixa atividade de água (Aw). Dessa forma as células de *Salmonella* quando presentes permanecem desidratadas, assim é necessário que os métodos de isolamento em ração sejam capazes de recuperar e multiplicar células lesadas, investindo em etapas de enriquecimento seletivo, entretanto é necessário lembrar que a sensibilidade desses meios é influenciada pela concentração do agente e pela presença de micro-organismos competidores (Davies *et al.*, 2000; Malorny *et al.*, 2008).

Foram coletadas seis amostras de carnes (músculo) de tambaqui, pintado e matrinxã, nenhuma amostra foi considerada positiva para *Salmonella enterica*, a legislação brasileira preconiza ausência de *Salmonella spp.* em 25 gramas em pescado resfriados ou congelados segundo a RDC n°12 (Brasil, 2001). Mus *et al.* (2014) ao avaliarem a qualidade de peixes, mexilhões e camarões na Turquia, relataram que das 100 amostras avaliadas nenhuma apresentou contaminação por *Salmonella*.

2.3.2. Sorotipificação

As 39 amostras positivas para *Salmonella* foram encaminhadas para o LABENT na Fiocruz para a realização da sorotipificação antigênica (Anexo IV), 37 amostras foram identificadas como *Salmonella enterica subs. enterica*, uma amostra como *S. enterica subsp. enterica* (O:4, 5:b:-) nessa última não sendo detectável estrutura flagelar e uma amostra de *Salmonella enterica subs. arizonae*. (Gráfico 2)

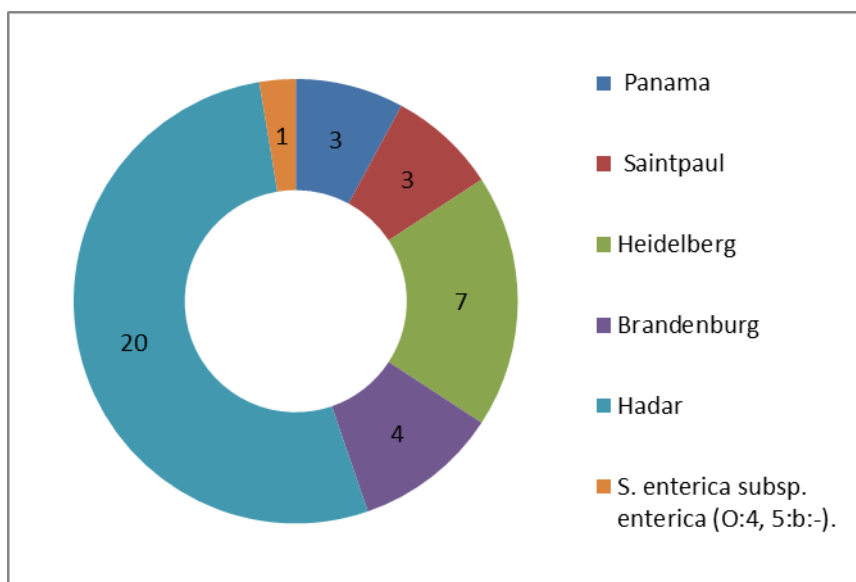


GRÁFICO 2. Sorotipos de *Salmonella enterica subs. enterica* identificados pelo Laboratório de Enterobacterias (LABENT)

No Brasil os sorotipos Panama, Saintpaul, Heidelberg estão listados entre os 20 sorotipos mais frequentemente encontrados em humanos, ambiente, animais e produtos de alimentação para humanos, no período de 2001 a 2007 (Hendriksen *et al.*, 2011). Os sorotipos Heidelberg, Saintpaul, Hadar estão listados entre os 20 sorotipos mais encontrados no período de 2007 a 2012 nos EUA (Salmonella..., 2015).

Os sorotipos encontrados nesse estudo são descritos como importantes agentes causadores de surtos em humanos nos últimos anos. O sorotipo Hadar foi responsável por surto de salmonelose nos EUA em 2015 afetando 78 pessoas em 30 estados, 29 pessoas foram hospitalizadas (Salmonella..., 2015). Em 2014 um surto em uma maternidade e unidade neonatal foi descrito na Inglaterra, o mesmo ocorreu após a admissão de uma mãe com sintomas de diarreia, 11 pessoas foram contaminadas incluindo bebês de até três meses de vida, foi a primeira descrição de *Salmonella* Hadar envolvendo neonatais. (Deshpande *et al.*, 2015)

Em 2014 um total de nove pessoas foram infectadas por *Salmonella* Heidelberg no Tennessee, duas foram hospitalizadas após o consumo de produtos a base de carne mecanicamente separada de frango (Salmonella..., 2015). Um surto internacional associado à *Salmonella* Heidelberg foi descrito em 2014 em um grupo de 32 passageiros irlandeses ao retornar em voo comercial da Tanzânia, ao realizar a investigação foi determinado que o surto estava relacionado a outros 25 casos adicionais ocorridos na Irlanda, Noruega, EUA e Canadá, todos os casos ocorreram após consumo de omelete e torta a base de leite servidos em voos comerciais. (Rebolledo *et al.*, 2014),

Em 2013, o sorotipo Saintpaul foi agente causador de salmonelose em 84 pessoas após o consumo de pepino em 18 estados nos EUA, 28 % das pessoas foram hospitalizadas e nenhuma morte foi reportada (Salmonella..., 2015).

Em 2014, outro surto de salmonelose pelo sorotipo Saintpaul foi descrito nos EUA após o consumo de alfafa, um total de 37 pessoas foram acometidas (Pot, 2014), o mesmo sorotipo foi responsável por um surto nos EUA em 2008 após o consumo de tomates crus, 1500 pessoas foram infectadas, dessas 21% foram hospitalizadas e 2 morreram (Behravesch *et al.*, 2011).

O sorotipo Panama foi responsável por surto em 2011 após o consumo de melão proveniente de uma única fazenda produtora na Guatemala um total de 20 pessoas adoeceram nos EUA. (Salmonella..., 2015).

O sorotipo Brandenburg é o terceiro maior causador de surto de salmonelose na Nova Zelândia sendo isolado de 90 amostras de humanos doentes no período de 2002 a 2007 de um total de 1560. (Broughton, 2010)

Uma amostra de TGI de tambaqui foi sorotipificada como *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, essa subespécie é comumente encontrada em estômagos de répteis, sendo as cobras os principais reservatórios, casos de doenças em humanos são raros e quando ocorrem estão relacionados a crianças e indivíduos imunossuprimidos. Em 2003, uma criança portadora de microcefalia veio a óbito na Índia, após apresentar febre e diarreia com muco e sangue por 20 dias. Após a realização de exames laboratoriais foi identificada a *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* nas fezes do paciente, realizado um inquérito epidemiológico descobriu-se que o pai da criança era um encantador de cobras e possuía uma interação profissional com répteis em sua residência (Mahajan *et al.*, 2003).

Com o acréscimo do hábito de possuir répteis como animais de estimação aumentou o número de casos de infecções por *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (Bhatt *et al.*, 1989), casos foram descritos nos EUA e no México, nesse último país muitas das vezes pelo consumo de produtos

a base de cobras como cápsulas a base de pó de cobra esmagada utilizadas como alternativa de tratamento medicamentoso (Casner e Zuckerman, 1990).

Na Itália um caso recente foi descrito na literatura, um homem de 43 anos de idade, imunodeprimido devido à hiperglobulinemia apresentou febre, diarreia com muco e dores abdominais, ao diagnóstico foi determinado o isolamento da *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, no inquérito epidemiológico o homem relatou não ter contato com répteis, dessa forma conclui-se que a salmonelose ocorreu devido a ingestão de alimentos contaminados (Bella *et al.*, 2011), a espécie já havia sido encontrada na Inglaterra em pasta italiana importada nos anos 90 (Hall e Rowe, 1990) e em um tipo de queijo tradicional produzido na região central da Itália (Chaves-López *et al.*, 2006). Demonstrando dessa forma que embora rara, a infecção em humanos por *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* pode ocorrer pelo contato com répteis e também por via oral através da ingestão de alimentos contaminados.

Não houve relação entre a espécie de peixe e a origem da amostra e o sorotipo, sendo detectado em uma mesma fazenda diferentes sorotipos, assim como diferentes sorotipos na mesma espécie de peixe. (Tabela 12)

TABELA 12

Sorotipificação das amostras de *Salmonella enterica* subs. *enterica* isoladas de suabes de TGI e brânquias de peixes, água de tanques de cultivo de peixes e fezes de animais encontradas próximas aos tanques.

Local de coleta	Material coletado	Sorotipo encontrado	Número de isolados
	Pintado	<i>S. enterica</i> subsp <i>enterica</i> (O:4, 5:b:-).	1
Fazenda A	Tambaqui	Saintpaul	1
	Tambaqui	Heidelberg	1
	água dos tanques	Panama	1
	Subtotal		4
Fazenda B	Matrinxã	Panama	1
	Piau	Heidelberg	3
	Piau	Hadar	4
	Piau	Brandenburg	2
	Pintado	Heidelberg	2
	Pintado	Brandenburg	1
	Pintado	Saintpaul	2
	Tambaqui	Heidelberg	1
	Tambaqui	Hadar	2
	Tambaqui	Panama	1
	água dos tanques	Brandenburg	1
Fezes de animais	Hadar	2	
	Subtotal		22
Fazenda C	Tambaqui	Hadar	6
	Caranha	Hadar	6
	Subtotal		12
	Total		38

Na Fazenda A foram identificados quatro sorotipos. As amostras são provenientes de TGI de peixes e água de tanques de cultivo.

Na Fazenda B foram encontrados cinco sorotipos de amostras de água dos tanques de cultivo dos peixes, suabes do TGI, suabes de brânquias e fezes de animais encontradas próximas aos

tanques. Nessa fazenda o mesmo sorotipo encontrado na água (Brandenburg) foi encontrado em TGI de pintado amazônico e piau.

A qualidade microbiológica da água dos tanques de piscicultura influencia a qualidade microbiológica do pescado (Pal e Dasgupta, 1992). Guzmán *et al.* (2004) sugerem que a maioria das bactérias entéricas encontradas nas águas de cultivo são recuperadas no tratogastro intestinal dos peixes.

A água é importante veículo na propagação das salmoneloses e conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das doenças ocorridas em países em desenvolvimento são decorrentes de contaminações provenientes das águas (Health..., 1997).

Polo *et al.* (1999) ao realizarem um levantamento sobre a incidência de *Salmonella enterica* em rios no norte da Espanha durante o período de 1992 a 1996, encontraram 55 sorotipos em 823 amostras positivas, entre essas a presença de 28 amostras do sorotipo Brandenburg e oito amostras do sorotipo Panama. Loureiro (2007) ao avaliar 694 amostras de águas de diferentes origens (rio, igarapé, baías, praias e córregos) de 11 municípios do Estado do Pará identificou 77 sorotipos de salmonela, destacando-se os sorotipos Saintpaul, Panama, Hadar e Agona.

O mesmo sorotipo das fezes encontradas próximas aos tanques foi encontrado no TGI de piau e tambaqui, sugerindo uma fonte de infecção por contaminação dos tanques por amostras de fezes. Pelas características das fezes encontradas conclui-se que as fezes eram de capivaras. A *Salmonella enterica* já foi isolada em capivaras (Nogueira, 1998), mas não há relatos na literatura da descrição do sorotipo Hadar nesse mamífero.

As fezes de humanos e animais são os materiais biológicos descritos como mais importantes na transmissão e propagação de uma variedade de doenças transmissíveis entre elas à febre tifoide, febre paratifoide, as salmoneloses e o cólera (Feachem *et al.*, 1983)

Na fazenda C houve a ocorrência de apenas um sorotipo sendo o mesmo encontrado em TGI de tambaqui e caranha. A fazenda C é fornecedora de alevinos para a Fazenda B, e o mesmo sorotipo (Hadar) foi encontrado em ambas as fazendas.

Os cinco sorotipos encontrados no estudo foram descritos em peixes e produtos derivados. O sorotipo Panama já havia sido encontrado em peixes na América do Sul, a *Salmonella* Saintpaul foi descrita na Índia, México, América do Norte e América do Sul, a *Salmonella* Heidelberg em pescado na Índia e na América do Sul e o sorotipo Hadar em produtos à base de peixes na Índia e América do Sul (FAO..., 2010). O sorotipo Brandenburg mais comumente encontrado em ovelhas, foi descrito em peixes na Malásia (Tunung *et al.*, 2007).

Na literatura não há muitos relatos descrevendo a presença de *Salmonella enterica* em TGI de peixes nativos, e tropicais no Brasil. A maioria dos artigos descrevem sobre a presença desse patógeno em produtos como filé de peixe, peixe fresco ou preparações a base de pescado, entretanto em estudo realizado em Botucatu-SP, estudando a microbiota do conteúdo intestinal de 221 peixes de água doce criados em sistemas extensivo e intensivo, foi possível isolar *S. Typhimurium* em 2,28% dos peixes criados em sistema extensivo e 2,11% no sistema intensivo (Langoni *et al.*, 1999).

Em estudo realizado por Linder (2002) em peixes tropicais coletados de pesqueiros e criatórios de peixes no Estado de São Paulo, avaliando o TGI de pacu, carpa comum, carpa capim, tilápia do Nilo e piaçu. Foram encontrados os sorotipos Panama em TGI de pacu e carpa capim, e o sorotipo Saintpaul em Tilápias do Nilo e Piaçu. Nesse estudo segundo o autor não foi possível

determinar a fonte de infecção para os animais, mas o mesmo descreve a presença de animais domésticos (cães, gatos e bovinos) próximo aos tanques de criação, assim como de aves, roedores, répteis e anfíbios.

Lorezon *et al.* (2010), determinaram a presença de *Salmonella spp.* em duas amostras de TGI de peixes provenientes de pesqueiros situados na região nordeste do Estado de São Paulo.

Gaertner *et al.* (2008) encontraram *Salmonella enterica* no intestino de quatro espécies de peixes tropicais. O sorotipo Thompson e Rbislaw em intestinos de bagre do canal, Berta e Mississippi em intestino de catfish, o sorotipo Typhimurium na espécie de peixe conhecido como anchichã e os sorotipos Duesseldorf e Give em intestinos de carpa comum.

2.3.3 Tipagem de sequências de multilocus (MLST)

As amostras positivas para *Salmonella* foram submetidas à genotipagem bacteriana pelo método de Tipagem de Sequências de Multilocus (MLST). Dados obtidos da análise das sequências estão sintetizados na Tabela 13.

TABELA 13

Características e frequências dos isolados de *Salmonella enterica* listados de acordo com a sequência tipo, sorotipagem, e complexo clonal (CC)

ST	Perfil de alelos	Nº de isolados no ST (%)	Sorotipo	Faz.	Material coletado	CC
24	13,12, 17, 16, 13, 16,4	2 (5,12%)	Panama	A, B	água, TGI de tambaqui.	17
50	5, 21, 18, 9, 6, 12,17	1 (2,56%)	Brandenburg	B	Piau	14
112	41, 42, 43, 58, 9, 12,2	1(2,56%)	Hadar	B	Tambaqui	8
33	2, 5, 6, 7, 5, 7,12	12 (30,76%)	Hadar	B,C	Tambaqui, caranha	22
614	10, 7, 21, 14, 185, 12,12	2 (5,12%)	Hadar	B	Fezes de animais	3
NST01	13, 12, 17, 16, 13, 16,4	1 (2,56%)	Panama	B	Matrinxã	17
NST02	46, 122, 3, 130, 6, 19,1	1 (2,56%)	<i>S. enterica subsp enterica</i>	A	Pintado	155
NST03	1, 18, 18, 130, 8, 7,1115	1 (2,56%)	Saintpaul	A	Tambaqui	Singleton
NST04	46, 430,18,130,8,42,115	1 (2,56%)	Heidelberg	A	Tambaqui	*Novo grupo
NST05	5, 21, 2, 9, 505, 358,17	1 (2,56%)	Brandenburg	B	água	Singleton
NST06	46,430,18,130,8,324,115	1 (2,56%)	Heidelberg	B	Tambaqui	*Novo grupo
NST07	46,122,18,188,42,115	1 (2,56%)	Heidelberg	B	Pintado	Singleton
NST08	13,12,18,16,13,342,4	1(2,56%)	Heidelberg	B	Piau	Singleton
NST09	10,7,21,14,185,300,12	1 (2,56%)	Hadar	B	Piau	3
NST10	15,430,18,130,6,7,115	1 (2,56%)	Heidelberg	B	Piau	Singleton
NST11	5,21,18,9,6,7,17	1 (2,56%)	Heidelberg	B	Pintado	14
NST12	5,21,18,9,8,12,17	1 (2,56%)	Brandenburg	B	Pintado	14
NST13	2,5,6,7,5,7,5	1 (2,56%)	Hadar	B	Piau	22
NST14	11,10,25,13,10,355,5	1 (2,56%)	Brandenburg	B	Piau	Singleton
NST15	5,5,18,9,6,12,17	1(2,56%)	Saintpaul	B	Pintado	14
NST16	15,148,18,9,8,7,102	1 (2,56%)	Hadar	B	Piau	Singleton
NST17	5,21,18,44,8,160,5	1 (2,56%)	Saintpaul	B	Pintado	Singleton
NST18	33,21,30,144,283,87,134	1 (2,56%)	<i>S.enterica Arizonae</i>	B	Tambaqui	220

NST19	1,5,6,7,8,7,12	1 (2,56%)	Hadar	B	Piau	Singleton
NST20	2,5,2,7,5,7,12	1 (2,56%)	Hadar	C	Caranha	22
NST21	46,430,6,130,8,7,12	1 (2,56%)	Heidelberg	B	Piau	Singleton

*Faz. Fazenda em que foi coletado o material

Novo grupo formado por amostras que se diferem por SLV (Single locus variation)

Foram encontrados 21 novos ST e cinco STs conhecidos, ST 33 (n=12), ST 24 (n=2), ST 614 (n=2), ST50 (n=1) e ST112 (n=1), sendo a primeira descrição dos mesmos em peixes.

Apenas nos isolados pertencentes aos ST 24 e ST 33 foi possível verificar uma correlação entre a sequência tipo e o sorotipo descrito no banco de MLST.

O ST 24 foi isolado em duas amostras das fazendas A e B, em ambas sorotipificado como sorotipo Panama, resultados semelhantes foram descritos por Torpdahl *et al.* (2005) e Achtman *et al.* (2013) ao determinarem a associação do sorotipo e sequência tipo em amostras de origem veterinária e humana respectivamente. No banco de MLST há ainda registros desse ST com os sorotipos Javiana e Eastbourne isolados de répteis, ambiente e humanos. (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>)

Os isolados classificados como ST 33 foram identificados como sorotipo Hadar, resultados similares aos encontrados por Torpdahl *et al.* (2005), que também descreveram essa associação para outras espécies.

Os isolados pertencentes aos ST 50, ST 112, ST 614 foram identificados na sorotipificação como Brandenburg, Hadar e Hadar respectivamente, sendo esta a primeira descrição da associação entre os sorotipos e as sequências tipos. Ademais esses ST já foram descritos para outras espécies inclusive humanos, ambiente e alimentos.

A amostra pertencente ao ST 50 foi sorotipificada como Brandenburg e encontrada em TGI de Piau da Fazenda B. Em estudo realizado por Torpdahl *et al.* (2005), há descrição da associação entre a sequência tipo e o sorotipo Saintpaul em amostras de origem humana. No banco de MLST para esse ST há registros dos sorotipos Kingston e Saintpaul encontrados em alimento, humanos, répteis e marsupiais. (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>)

Já o ST 614 foi determinado nas duas amostras de fezes de animais encontradas próximas aos tanques de cultivo, o banco de MLST possui um único registro como sorotipo Newport isolado de bovino no Reino Unido. (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>.)

O ST 112 em nosso estudo foi sorotipificado como Hadar originário da fazenda A. No banco de MLST existem diversos depósitos sendo o mesmo descrito em isolados de alimento, répteis, suínos, ambiente e humanos, todos sorotipificados como sorotipo Muenchen (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>), o mesmo foi descrito por Achtman *et al.* (2013) ao relatar a associação ST e sorotipo em amostras de origem humana na França, México e USA.

Os resultados obtidos (Tabela 13) sugerem não haver relação entre os ST e a espécie de peixe, assim como a fazenda de origem da amostra. Na Fazenda B foram encontradas 17 sequências tipos novas e cinco previamente descritas. Isso pode estar relacionado ao fato da propriedade ser de recria e engorda de diferentes espécies de peixes podendo receber alevinos de origens distintas, possíveis reservatórios da bactéria.

Para a análise de MLST o índice de diversidade de Simpson (IDS) foi de 0.9176, o que demonstrou um alto nível de discriminação para *Salmonella enterica* isoladas de peixes.

Para a análise de eBurst (Anexo VI) foram utilizados o perfil dos alelos obtidos nos isolados deste estudo e nos isolados do Banco de dados do MLST. Foram selecionados os STs do banco

relacionados aos isolados do estudo segundo as informações geradas pelo site <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>.

A análise demonstrou uma heterogeneidade entre os isolados, os quais foram divididos em 18 populações distintas, sete complexos clonais (CC17, CC14, CC8, C22, CC3, CC220, C155), e 10 singletons: NST3, NST5, NST7, NST8, NST10, NST14, NST16, NST17, NST19, NST21 e um novo grupo constituído por duas amostras identificadas com *S. Heidelberg* (NST4 e NST6), de origens geográficas distintas que embora não classificados em um CC específico, são um novo grupo formado por duas amostras que se diferem em um SLV (single locus variation).

Os demais isolados foram inseridos em complexos clonais conhecidos constituídos por amostras originadas de diferentes origens.

De acordo com Achtman *et al.* (2012), muitos STs de *Salmonella* estão dispostos juntos em grupos de ebursts (eBGs), essa terminologia é sugerida pelos autores em substituição a complexo clonais ou complexos de ST. Ao avaliar 4.257 isolados os autores concluíram que os mesmos estavam distribuídos em 138 (eBGs), entre eles o eBG 155 ou CC155 constituído pelos ST404 e ST679 ambos sototipificados como Paratyphi B var Java. O complexo clonal foi encontrado nesse estudo e o NST02 pertence ao mesmo. A *Salmonella* Paratyphi B var Java é o agente etiológico da febre entérica (Shinohara *et al.*, 2008), causadora de febres e gastroenterites e em alguns casos complicações como meningites e septicemia principalmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Nagano *et al.*, 2006).

Em 2011 na Espanha um surto de febre entérica ocorreu após o contato de crianças e adultos com tartarugas e águas de aquários de tartarugas, foi a primeira descrição da associação desse sorotipo e do contato com répteis. Dessa forma sendo necessários cuidados após o manuseio dos animais e água dos aquários dos mesmos (Hernández *et al.*, 2012).

O CC14 possui em sua formação quatro isolados da fazenda B, sendo composto pelo ST50 e pelos novos ST (NST11, NST 12 e NST15), o mesmo complexo clonal foi descrito por Achtman *et al.* (2013), e sorotipificadas como Saintpaul provenientes de amostras de humanos dos EUA e da França. Os autores ainda indentificaram o CC8, CC3, CC17, os mesmos encontrados em nosso estudo.

O NST18 foi sorotipificado como *Salmonella enterica* subs. *arizonae* pertence ao CC220 que é composto por STs de isolados de répteis de diferentes países e todos sorotipificados como *Salmonella enterica* subs. *diarizonae*. (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>).

De acordo com o dendograma gerado (Figura 2, Anexo VII), os isolados de peixes de *Salmonella enterica* estão agrupados em diferentes grupos. O NST18, sorotipificado como *Salmonella arizonae* está incluído no mesmo clado dos membros do CC220, todas as amostras como dito anteriormente são da subespécie *diarizonae*.

O NST 14 foi sorotipificado como do sorotipo Brandenburg, na análise de eBurst foi caracterizado como singleton e na análise de neighbor joining mostrou-se uma amostra distinta, diversa geneticamente das demais.

Os isolados ST 24, NST01, NST08 pertencem ao mesmo clado, na análise eBurst o NST08 foi caracterizado como singleton, e no dendograma foi considerado como ancestral de diversos STs do CC17. O ST24 encontrado em dois isolados e sorotipificado como Panama é próximo geneticamente do ST175 e ST 2909. O ST 175 no banco de MLST é sorotipificado como sorotipo Javiana e proveniente de réptil, já o ST 2909 não há descrição de detalhes como sorotipo, hospedeiro e local de isolamento no banco de MLST. (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>.)

O NST21 na análise de eBurst foi caracterizado como singleton e no dendograma é ancestral das amostras do CC3. Na análise de eBurst as amostras dos ST614 e NST09 foram agrupadas no CC3, ambas sorotipificadas como Hadar, as amostras do ST614 foram isoladas de fezes de capivara e a amostra NST09 de TGI de piau, todas da Fazenda B, no dendograma a análise demonstrou uma alta similaridade entre as amostras.

Os isolados do CC22 foram caracterizados como de um mesmo clado, descendentes do NST13. O NST 19 na avaliação de eBurst foi definido como singleton, e no dendograma é ancestral dos ST327, ST33, ST12. A análise evidenciou a similaridade do NST 20 e ST 1817, isolado de aves na Ásia em 2012. (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>.)

Já o ST 112 foi avaliado como de alta similaridade do ST2769 e não há no banco de MLST detalhes sobre esse isolado.

O NST2 foi caracterizado como ancestral de dois grupos o primeiro dos ST 404, ST 679 e o segundo dos ST1838 e ST2358. No primeiro grupo os STs são caracterizados como do sorotipo Paratyphi B var Java isolados de ambiente e humanos. (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>.)

Os NST03, NST10, NST04, NST06 foram caracterizados como de um mesmo clado demonstrando uma similaridade entre as amostras. Assim como o NST 5 e NST 17 que descendem de um mesmo nó e são amostras de água do tanque de cultivo dos peixes e de TGI de pintado da fazenda B.

Por fim o ST50 e ST 12 descrito como amostra de aves do sorotipo Hadar isolada da Europa são próximos geneticamente do ST 2084, e não há descrição no banco de MLST de detalhes desse ST.

2.4 Conclusões

Foi possível determinar a ocorrência de *Salmonella enterica* em peixes nativos de diferentes Estados no Brasil. É importante ressaltar que essa infecção foi determinada em grandes fazendas produtoras de espécies amplamente comercializadas no país, responsáveis pela produção de filés, peixes inteiros, e produtos à base de pescado tais como empanados, bolinhos de peixe entre outros. Além da produção e venda de alevinos comercializados em todo o país.

As amostras foram encontradas em trato gastrointestinal, portanto é necessário cuidado ao realizar a evisceração dos peixes de modo geral, evitando assim contaminação da carne dos animais.

A ampla diversidade genética e fenotípica dos isolados de *S. enterica* de peixes nativos no Brasil sugerem múltiplas fontes de infecção e ausência de amostras hospedeiro-específicas.

Não houve relação entre sorotipo, espécie de peixe e origem bem como não foi possível determinar a fonte de infecção para os animais nas fazendas, mas é possível determinar que a presença de animais silvestres é importante na propagação da *Salmonella*.

CAPÍTULO 3

INFECÇÃO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO, PERSISTÊNCIA E TEMPO DE ELIMINAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Salmonella enterica* EM PINTADO AMAZÔNICO (*LEIARIUS MARMORATUS* x *PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM*), PIAU (*LEPORINUS FRIDERICI*) E TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*).

3.1 Introdução

Salmonella é uma bactéria intracelular facultativa que pode infectar uma diversidade de animais incluindo o homem, mamíferos, répteis entre outros. A bactéria não é considerada um patógeno causador de doença em peixes com exceção de um relato de caso de septicemia em Pirarucu por *S.arizonae* (Kodama *et al.*, 1987). Entretanto os peixes podem ser expostos a *Salmonella* através de ração contaminada ou permanência em águas com o patógeno (Nesse *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que esse patógeno não é parte da microbiota de diferentes espécies de peixes marinhos (Assessment..., 2006).

A capacidade de colonização, persistência e disseminação de *Salmonella spp.* em peixes expostos por via oral é ainda pouco compreendida, principalmente para os peixes tropicais (Assessment..., 2006).

A investigação da capacidade dessa bactéria colonizar e persistir na microbiota do trato gastrointestinal dos peixes nativos brasileiros é imprescindível para o entendimento da dinâmica de infecção nos animais, portanto o objetivo desse trabalho foi realizar a infecção experimental para determinação da capacidade de colonização, persistência e tempo de eliminação de amostras de *Salmonella enterica subsp. enterica* em Pintado Amazônico, Piau e Tambaqui.

3.2 Material e métodos

Projeto aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA- UFMG, nº processo 104/2014 (Anexo I).

3.2.1. Animais utilizados

Para os ensaios experimentais foram utilizados alevinos de pintado amazônico, piau e tambaqui adquiridos de pisciculturas comerciais e mantidos em condições laboratoriais. Os peixes foram alojados em aquários de vidro de 57 litros, com fluxo contínuo e taxa de renovação de 0,5 L de água/h e mantidos sob fotoperíodo de 12:12h luz/escurecimento, com temperatura média da água de 30°C. Os alevinos foram alimentados três vezes ao dia com ração comercial.

Antes do início dos ensaios experimentais foram realizadas três coletas de amostras de fezes a cada três dias para determinação da ausência de *Salmonella* nas fezes desses animais. Somente

após a confirmação do status de livre da bactéria os animais foram utilizados para os ensaios *in vivo*.

3.2.2 Desenvolvimento do protocolo de infecção experimental – ensaio piloto

Com o intuito de desenvolver um protocolo de infecção experimental para *Salmonella enterica* por via oral foi realizado um ensaio piloto. Nesse foram usados oito exemplares de pintado amazônico com peso médio de 50g. Foram realizados dois grupos experimentais, o grupo 1 animais que receberam o inóculo e o grupo controle.

Foi utilizada a amostra Sal 14 sorotificada como sorotipo Heidelberg. Esta foi descongelada e cultivada em ágar HK a 37° C durante 24h. Após esse período uma colônia foi transferida para 200 ml de caldo TSB e mantida a 37°C sob agitação (150 rpm) por aproximadamente cinco horas. O inóculo foi ajustado a uma absorbância de 0,4 correspondente a 10⁷ UFC/ml. Foi preparado um caldo TSB para utilização no grupo controle.

Os animais foram desafiados oralmente, o inóculo foi introduzido com auxílio de uma seringa. A dose infectante foi 7 x 10⁵ UFC por peixe. Os animais foram acompanhados por 13 dias sendo as coletas realizadas em 1, 2, 3, 4, 7, 10 e 13 dias pós-infecção. Em nenhuma coleta foi possível recuperar a *Salmonella enterica* em suabes de TGI e na água do aquário. Dessa forma os ensaios seguintes foram realizados com a utilização de sonda intragástrica e com a dose infectante superior como descrito a seguir.

3.2.3 Amostras bacterianas e preparação do inóculo

Foram utilizadas amostras previamente isoladas das espécies de peixes (Anexo IV e V) e escolhidas de forma aleatória (Tabela 14).

Estas foram descongeladas e cultivadas em ágar HK a 37° C durante 24h. Após esse período uma colônia foi transferida para 200 ml de caldo TSB e mantida a 37°C sob agitação (150 rpm) por aproximadamente cinco horas. O inóculo foi ajustado a uma absorbância de 0,4 correspondente a 10⁷ UFC/ml. Foi preparado um caldo TSB para utilização no grupo controle em cada experimento.

TABELA 14

Amostras de *Salmonella enterica* utilizadas para as infecções experimentais.

Experimento	Grupos	Identificação da amostra utilizada	Sorotipo	Espécie de peixe
	Grupo 1	Sal 14	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Pintado amazônico
I *	Grupo 2	Sal 19	<i>Salmonella</i> Brandenburg	Pintado amazônico
	Grupo 3	Sal 25	<i>Salmonella</i> Saintpaul	Pintado amazônico
II *	Grupos 1 e 2	Sal 15	<i>Salmonella</i> Heidelberg	Píau
III*	Grupo 1	Sal 30	<i>Salmonella</i> Hadar	Tambaqui

*para cada ensaio experimental foi usado um grupo controle.

3.2.4 Ensaio experimentais

Foram realizados três ensaios experimentais, o primeiro (Experimento I) em pintado amazônico, o segundo (Experimento II) em piau e o terceiro (Experimento III) em tambaqui.

A) Experimento I

Cada grupo experimental foi composto por seis peixes com peso médio de 150g, o desafio foi realizado em quatro grupos experimentais, sendo um o grupo controle (Tabela 14). O desafio ocorreu por via oral, onde 20 ml do inóculo foi misturado a 5 gramas de ração farelada e com auxílio de uma sonda intragástrica foi inoculado 0,2 mL de inóculo bacteriano nos peixes.

No grupo controle foi administrado 0,2 mL de TSB estéril. Os peixes desafiados foram monitorados três vezes ao dia por um período de 35 dias.

Foram realizadas coletas de suabes da região posterior do trato gastrointestinal dos animais durante 35 dias, sendo essas realizadas nos seguintes dias pós-infecção: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 26, 31 e 35.

Os suabes foram mantidos em meio seletivo Rappaport-Vassiliadis em anaerobiose por 24 horas a 37°C, e então plaqueados em ágar Entérico de Hektoen para isolamento seletivo de *Salmonella*.

Amostras de águas dos aquários foram coletadas a cada dia de coleta e incubadas em água peptonada 1% por 24 horas e posteriormente 10 µl do caldo foram plaqueados em Ágar Entérico de Hektoen para isolamento seletivo de *Salmonella*.

As placas foram incubadas em anaerobiose por 24 horas a 37°C. Colônias com morfologia sugestiva de *Salmonella spp.* foram coletadas e replaqueadas ágar Entérico de Hektoen.

Posteriormente ao final do período experimental os animais foram sacrificados por overdose em benzocaína (100 mg/l) e amostras de rim, fígado, baço, coração, cérebro, estômago, intestino e musculatura foram coletadas e enriquecidas em meio seletivo Rappaport-Vassiliadis por 24 horas a 37°C, e então plaqueados em ágar Entérico de Hektoen para isolamento seletivo de *Salmonella*. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Colônias com morfologia sugestiva de *Salmonella spp.* foram coletadas e replaqueadas.

B) Experimento II

Cada grupo experimental foi composto por cinco peixes com peso médio de 25g, os animais foram marcados com um corte nas nadadeiras que permitiu a identificação dos mesmos para acompanhamento da coleta de fezes durante todo o experimento.

O desafio foi realizado em três grupos. O grupo 1 recebeu o inóculo misturado à ração farelada, o grupo 2 recebeu o inóculo puro. E o grupo 3 (controle) recebeu TSB estéril, por via oral. No grupo 1 a infecção ocorreu por via oral, onde 20 ml de inóculo foi misturado a 5 gramas de ração farelada e com auxílio de uma sonda intragástrica foi inoculado 0,2 mL de inóculo bacteriano em cada peixe. No grupo 2, a infecção ocorreu por via oral com auxílio de uma sonda intragástrica com 0,2 mL de inóculo bacteriano por peixe. No grupo 3 foi administrado 0,2mL de TSB estéril. Os peixes desafiados foram monitorados três vezes ao dia por um período de 40 dias.

Foram realizadas coletas de suabes da região posterior do trato gastrointestinal dos animais durante 40 dias e da água dos aquários sendo essas realizadas nos seguintes dias pós-infecção:

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40. As amostras foram processadas conforme descrito anteriormente.

C) Experimento III

Cada grupo experimental foi composto por sete peixes com peso médio de 100g, os animais foram marcados com um corte nas nadadeiras que permitiu a identificação dos mesmos para acompanhamento da coleta de fezes durante todo o experimento.

O desafio foi realizado em dois grupos experimentais, sendo um o grupo controle (Tabela 15). O desafio ocorreu por via oral, onde 20 ml do inóculo foi misturado a 5 gramas de ração farelada e com auxílio de uma sonda intragástrica foi inoculado 0,2 mL de inóculo bacteriano nos peixes.

No grupo controle foi administrado 0,2 mL de TSB estéril. Os peixes desafiados foram monitorados três vezes ao dia por um período de 40 dias.

Foram realizadas coletas de suabes da região posterior do trato gastrointestinal dos animais durante 40 dias e água dos aquários sendo essas realizadas nos seguintes dias pós-infecção: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40. As amostras foram processadas conforme descrito anteriormente.

3.2.5 Extração de DNA

Das amostras sugestivas de *Salmonella* spp. foi extraído o DNA utilizando o kit para extração de tecidos e culturas “Maxweel® 16 Tissue DNA Purification Kit” e o equipamento Maxwell® 16 MDx Research Instrument (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de DNA extraído foi quantificada por espectrofotometria com o equipamento Nanodrop® (ThermoScientific).

3.2.6 Reação de cadeia de polimerase – PCR

O diagnóstico por PCR foi realizado de acordo com o descrito por Amavisit, *et al.* (2001). A reação consistiu de 50 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada primer (Tabela 15) e 1,0 U *Taq* polimerase para um volume final de 25 µL de reação. Foi utilizado 50 ng de DNA template (2 µL).

A amplificação foi realizada por meio do processo descrito a seguir: 1 ciclo a 95°C por 15 minutos; 30 ciclos – 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e a extensão final a 72°C por 7 minutos.

A PCR foi realizada em termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems, EUA). Os produtos da PCR foram revelados com brometo de etídeo e visualizados em gel de agarose a 1,5%.

TABELA 15

Sequência de *primers* utilizados para a amplificação do DNA via PCR segundo Amavisit *et al.* (2001)

Primer	Sequencia 5' - 3'
S18	ACCGCTAACGCTCGCCTGTAT
S19	AGAGGTGGACGGGTTGCTGCCGTT

3.2.7 Tabulação de dados

Os dados foram tabulados com auxílio do programa Excel.

3.3 Resultados e discussão

Em todos os grupos infectados por viar oral por *Salmonella enterica* foi possível recuperar o patógeno nas fezes. Os dados gerais dos ensaios experimentais estão sintetizados na Tabela 16.

TABELA 16

Resultados da infecção experimental por via oral em Pintado, Piau e Tambaqui e as respectivas doses experimentais, e a quantidade em dias de recuperação do patógeno pós- infecção oral em amostras de *suabes* de TGI e da água dos aquários.

Nº experimento	Grupo	Especie de peixe	Sorotipo	Dose Infectante	Recuperação da Salmonella nas fezes pós- infecção	Recuperação da Salmonella na água dos aquários
I*	1	Pintado	Heidelberg	1,2 x 10 ⁸ UFC/peixe	31 dias	9 dias
	2	Pintado	Brandenburg	1,8 x 10 ⁸ UFC/peixe	31 dias	12 dias
	3	Pintado	Saintpaul	8 x 10 ⁷ UFC/peixe	9 dias	7 dias
II*	1	Piau	Heidelberg	1,4 x 10 ⁸ UFC/peixe	9 dias	5 dias
	2	Piau	Heidelberg	1,4 x 10 ⁸ UFC/peixe	20 dias	----
III*	1	Tambaqui	Hadar	1,4 x 10 ⁸ UFC/peixe	40 dias	20 dias

* Para cada ensaio experimental foi utilizado um grupo controle.

Com execução do grupo 2 do experimento II, foi possível recuperar o patógeno em águas dos aquários, na literatura os dados de infecção experimental por *Salmonella* em peixes não demonstram a avaliação da água dos aquários, entretanto há presença da bactéria na água é de grande importância para manutenção da infecção e possível recontaminação dos animais. Além disso, demonstra que se há presença de animais contaminados pelo agente estes podem contaminar as águas e assim outros animais e humanos que utilizarem a mesma.

Estudos demonstram que *Salmonella* isolada de uma espécie pode infectar outras espécies de peixes quando em um mesmo ambiente e o patógeno pode multiplicar-se nas vísceras dos

animais (Morse *et al.*, 1978) e podem ser detectadas nas fezes dos mesmos (Lesel e LeGac, 1983).

A recuperação da *Salmonella* após infecção oral já havia sido descrita por outros autores em truta arco íris, carpa comum e tilápia do Nilo (Hagen, 1966; Heuschmann-Brunner, 1974; Baker e Smitherman, 1983; Buras *et al.*, 1985).

Ao avaliar a quantidade de dias pós-infecção em que foi possível detectar a presença do patógeno nas fezes, verifica-se que houve diferenças entre os grupos em um mesmo experimento e também entre os três ensaios experimentais.

Os trabalhos demonstram que o período de tempo após a infecção oral em que é possível recuperar a bactéria nas vísceras é variável. Heuschmann-Brunner (1974) reportou a presença de amostras positivas em ciprinídeos em mais de 60 dias após administração de rações infectadas por *S. Enteritidis* e mais de 50 dias após a administração oral de rações infectadas por *S. Typhimurium*, as doses nesse experimento não foram determinadas.

Hagen (1966) descreveu que em truta arco íris alimentadas com rações com alta dosagem de *Salmonella Typhimurium* por 24 horas foi possível encontrar amostras positivas em intestinos após cinco dias. Baker e Smitherman (1983), ao administrar oralmente *Salmonella Typhimurium* no estômago de tilápias no Nilo, demonstraram que foi possível recuperar o patógeno nas vísceras 15 dias após a infecção.

Em estudo realizado por Nesse *et al.* (2005) para verificar a persistência da administração oral em Salmão do Atlântico pelos sorotipos Agona e Montevideo, foi possível detectar a presença da bactéria no trato gastrointestinal após quatro semanas da administração oral. Esse último estudo foi o único a avaliar a presença em músculos, pele, órgãos e trato gastrointestinal após administração de doses variadas e os autores concluíram que a persistência da *Salmonella* em peixes é altamente dependente da dose administrada.

Em outras espécies animais a administração oral de salmonela é amplamente reportada, os estudos demonstram que o sorotipo utilizado para o desafio está intimamente relacionado à capacidade de recuperar o patógeno nas fezes. Em infecção experimental em suínos com os sorotipos Typhimurium e Enteritidis foi possível verificar uma maior quantidade de isolamento nas fezes em infecções por sorotipo Typhimurium (Volf *et al.*, 2012). Em aves ao comparar a excreção nas fezes dos sorotipos Montevideo e Typhimurium, *Salmonella* Montevideo persistiu no intestino de frangos e foi excretada por um período maior quando comparado ao outro sorotipo (Turner *et al.*, 1998), isso pode ocorrer porque os diferentes sorotipos podem possuir características distintas tais como presença ou não de flagelo (Pan *et al.*, 2012) e expressão de genes de virulência (Vieira, 2009).

Além disso, outros fatores como a imunidade do hospedeiro, a exclusão competitiva e o pH estomacal são fatores que podem intervir na colonização intestinal (Barrow e Wallis, 2007; Foley e Lynne, 2008).

Nos ensaios experimentais foram utilizadas espécies de peixes de hábitos carnívoros (pintado) e onívoros (piauí e tambaqui). Os peixes classificados como carnívoros alimentam-se de itens de origem animal em geral de invertebrados de menor tamanho e outros peixes, já os onívoros alimentam-se de itens de origem animal e vegetal (Rotta, 2003). Embora o pH estomacal dos carnívoros seja em torno de 2,4 a 4,6 (Baruah *et al.*, 2007), um fator que poderia dificultar a colonização e invasão do epitélio intestinal pela bactéria, não há nenhum estudo na literatura comparando a ação da *Salmonella enterica* em espécies de peixes de hábitos alimentares distintos, embora em aves a presença de ácido clorídrico na moela e no proventrículo é descrita

como um fator importante para inviabilizar a sobrevivência do patógeno, entretanto estudos relatam que após a ingestão do alimento ocorre uma elevação do pH e a barreira química deixa de existir (Chappell *et al.*, 2009).

Outro fator descrito na literatura é a capacidade de bactérias de pH neutro como *Salmonella* sobreviverem a pH ácidos através da indução de tolerância a acidez, esse processo é dividido em duas fases o primeiro denominado de síntese de sistemas de emergência de homeostase de pH, que em momentos de pH ácido extremo alcaliniza o citoplasma, e a segunda fase onde cerca de 50 proteínas de choque ácido são ativadas para reparar os danos macromoleculares, esse sistema foi descrito em *Salmonella Typhimurium* e identificado como lisina descarboxilase (CadA) (Bearson *et al.*, 1997)

No ensaio experimental II, foram utilizados dois grupos experimentais, no grupo 1 o inóculo foi misturado à ração comercial farelada e fornecida aos animais, no segundo grupo foi administrado o inóculo puro. No grupo 2 foi possível recuperar o patógeno por 20 dias. Sugere-se que ao administrar o inóculo puro a bactéria tenha maior facilidade em aderir e proliferar no intestino. Na literatura é descrito que em alimentos com alto teor de lipídeos como chocolate e ovos, a salmonela fique protegida dentro dos glóbulos de gordura, não sendo afetadas pela acidez gástrica e pelas enzimas digestivas, desta forma reduzindo a dose infectante (Forsythe, 2002).

Em todos os ensaios experimentais foi possível verificar uma intermitência da presença do patógeno nas fezes. No experimento I os animais não foram identificados individualmente e avaliou-se a quantidade total de animais positivos em cada grupo durante os 35 dias. A intermitência foi detectada em todos os grupos em momentos distintos. (Gráfico 3 e Anexo VIII).

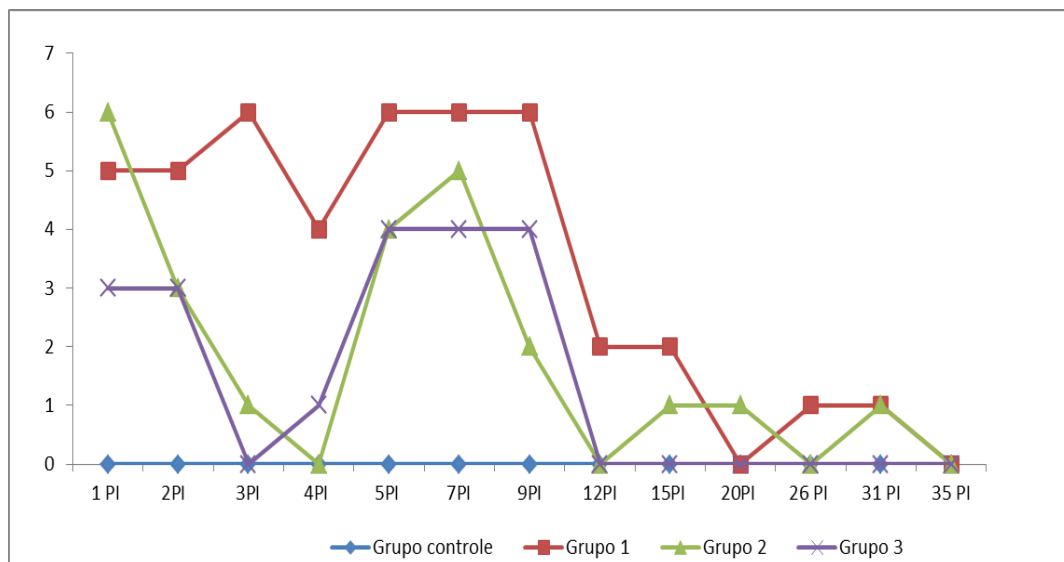


GRÁFICO 3. Avaliação da quantidade de animais positivos ao longo de 35 dias de infecção experimental nos quatro grupos experimentais do ensaio experimental I.

Legenda: No eixo X encontram-se os dias de coleta de material (dias pós-infecção), e no eixo Y a quantidade de animais positivos. No grupo controle não houveram animais positivos em nenhum momento do experimento.

Após a finalização do experimento I os animais foram sacrificados e os órgãos e a musculatura avaliada para a presença de *Salmonella enterica*. Foi possível recuperar o patógeno em fígado, estômago, rim, baço e coração de diferentes peixes nos grupos experimentais (Tabela 17).

TABELA 17

Resultados das análises qualitativas de *Salmonella enterica* em vísceras e músculo de Pintado Amazônico nos grupos experimentais após 35 dias de inoculação por via oral.

		Cérebro	Rim	Baço	Fígado	Coração	Estômago	Intestino	Músculo
Grupo 1	Px 1	-	-	-	-	-	+	-	-
	Px 2	-	-	-	-	-	+	-	-
	Px 3	-	-	-	-	-	+	-	-
	Px 4	-	-	-	-	-	+	-	-
	Px 5	-	-	-	+	-	+	-	-
	Px 6	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 2	Px 1	-	-	-	-	-	-	+	-
	Px 2	-	-	-	-	-	-	+	-
	Px 3	-	-	-	-	-	+	-	-
	Px 4	-	+	+	+	+	-	-	-
	Px 5	-	-	-	-	-	-	+	-
	Px 6	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 3	Px 1	-	-	-	-	-	-	-	-
	Px 2	-	-	+	+	-	-	-	-
	Px 3	-	-	-	-	-	-	-	-
	Px 4	-	-	-	-	-	-	-	-
	Px 5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Px 6	-	-	-	-	-	-	-	-

Resultados semelhantes foram observados por Nesse *et al.* (2005) em Salmão do Atlântico sendo possível detectar a bactéria em vísceras após administração oral de *S. Montevideo* em dosagem de 10^8 UFC/peixe, no entanto não foi determinado quais órgãos foram avaliados.

No experimento II, os animais foram identificados e foi possível avaliar a excreção da *Salmonella* Heidelberg nas fezes de maneira individual nos grupos 1 e 2. No grupo 1 apenas o peixe 1 apresentou-se negativo após 5 dias de infecção oral, e voltou a apresentar a bactéria nas fezes por mais três coletas até negativar. No grupo 2 a intermitência de positividade foi maior. O peixe 2 apresentou-se negativo nas duas primeiras coletas, mas mostrou-se positivo após três dias de infecção oral. No peixe 5 também foi possível perceber esse resultado mesmo após três coletas negativas o animal apresentou-se positivo após 20 dias de infecção. (Tabelas 18 e 19 e anexo IX e X).

Após a finalização do experimento II os animais foram sacrificados e os órgãos e a musculatura avaliada para a presença de *Salmonella enterica*. O patógeno foi detectado apenas em uma amostra de cérebro do peixe dois do grupo 1.

TABELA 18

Avaliação da presença de *Salmonella* Heidelberg em amostras de suabes de TGI em peixes do grupo 1, Experimento II.

Dias Pós-infecção	PX 1	PX 2	PX 3	PX 4	PX 5
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-

TABELA 19

Avaliação da presença de *Salmonella* Heidelberg em amostras de suabes de TGI em peixes do grupo 2, Experimento II.

Dias Pós-infecção	Px 1	Px 2	Px 3	Px 4	Px 5
1	+	-	+	+	+
2	-	-	+	+	+
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	-
6	+	-	-	+	+
7	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	-
12	-	+	+	-	-
15	-	+	-	-	-
20	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-

No experimento III, os animais foram identificados e foi possível avaliar a excreção da *Salmonella* Hadar nas fezes de maneira individual nos grupo 1. No grupo controle não foi possível encontrar amostras positivas para a bactéria em nenhum momento.

Nesse ensaio experimental em muitos dias de coleta os animais não apresentavam fezes, como pode ser verificado no terceiro, quarto e quinto dia pós-infecção. Dessa forma as coletas do sexto e sétimo dia foram suspensas e retomadas no nono dia. A intermitência também foi observada nesse ensaio experimental (Tabela 20 e anexo XI).

TABELA 20

Avaliação da presença de *Salmonella* Hadar em suabes de TGI em peixes do grupo 1, Experimento III.

Dias Pós-infecção	Px 1	Px 2	Px 3	Px 4	Px 5	Px6	Px 7
1	-	+	-	+	-	-	s/fezes
2	-	s/fezes	+	+	+	+	+
3	s/fezes	s/fezes	s/fezes	s/fezes	s/fezes	s/fezes	s/fezes
4	s/fezes	s/fezes	-	s/fezes	-	-	s/fezes
5	s/fezes	s/fezes	-	s/fezes	-	-	s/fezes
9	+	+	+	-	+	-	+
12	+	-	-	-	-	+	+
15	+	-	-	+	+	s/fezes	-
20	s/fezes	s/fezes	+	s/fezes	-	+	+
25	-	+	-	+	-	-	+
30	+	s/fezes	-	+	-	-	+
35	+	+	-	+	s/fezes	s/fezes	-
40	-	+	-	+	-	-	-

Após a finalização do experimento os animais foram sacrificados e os órgãos e a musculatura avaliada para a presença de *Salmonella enterica* (Tabela 21).

TABELA 21

Resultado das análises qualitativas de *Salmonella enterica* em vísceras e músculo de tambaqui no grupo experimental após 40 dias de inoculação por via oral.

Grupo 1	Cerebro	Rim	Baço	Fígado	Coração	Estômago	Intestino	Músculo
Px1	-	+	-	-	-	-	-	-
Px2	-	-	-	-	-	+	+	-
PX3	-	-	-	-	-	+	+	-
PX4	-	-	-	-	-	-	+	+
PX5	-	+	-	-	-	-	+	-
Px6	-	-	+	-	-	-	+	+
Px7	-	-	-	-	-	-	-	-

Nesse ensaio experimental foi possível detectar a *Salmonella* Hadar em vísceras e músculo. Resultado semelhante foi encontrado por Nesse *et al.* (2005) em Salmão do Atlântico sendo

possível detectar a bactéria em vísceras após administração oral de *S. Montevideo* em dosagem de 10^8 UFC/peixe, nesse mesmo estudo foi possível determinar a presença da *S. Agona* em músculo quando utilizada a dose infectante de 10^8 UFC/peixe.

A patogenia da doença em peixes não é conhecida, sabe-se que em suínos é decorrente da invasão do epitélio intestinal e colonização, podendo disseminar-se por órgãos periféricos e causar a septicemia (Kich e Cardoso, 2012), em aves a forma sistêmica também pode ocorrer após o agente ingressar em capilares sanguíneos (Sato *et al.*, 1997).

A recuperação de *Salmonella* em vísceras e músculo representa um grande risco para a saúde pública. No momento da evisceração na indústria podem ocorrer contaminações devido a cortes acidentais e extravasamento do conteúdo do trato gastrointestinal. Outro grave problema é prática de venda em todo país de peixes não eviscerados frescos ou congelados além do consumo dos peixes em preparações cruas ou mal cozidas. A recomendação da legislação brasileira é ausência de *Salmonella* em 25g de pescado (Regulamento..., 2006).

A intermitência de positividade em amostras de *Salmonella* também foi relatada por Nesse *et al.* (2005) em Salmão do Atlântico. Os autores demonstraram amostras negativas em pele e trato gastrointestinal e vísceras em *S. Agona* após duas semanas de desafio oral e positividade das amostras após quatro semanas.

Em aves a coleta de fezes para isolamento de *Salmonella* também ocorre através de suabes da região do TGI ou direto do reto do animal (Hyatt e Weese, 2004), é comum que as amostras não sejam homogêneas ou que a microbiota não esteja distribuída uniformemente, dessa forma mesmo em animais infectados não é possível isolar o patógeno, sendo necessário um grande número de amostras (Smyser, Snoeyenbos, 1969). A falta de sucesso em amostras de fezes de aves pode ocorrer devido ao intervalo entre o esvaziamento cecal e reenchimento, sendo necessário um determinado tempo para que as unidades formadoras de colônia consigam se restabelecer em nível de serem isoladas através de suabes (Heres *et al.*, 2003), outra questão é que o fluxo contínuo de alimento do TGI das aves possa remover fisicamente o patógeno antes do mesmo ser capaz de multiplicar-se (Barrow e Wallis., 2004).

3.4 Conclusões

Após o desenvolvimento do protocolo de infecção experimental para peixes nativos conclui-se que para a realização da infecção experimental por via oral é necessário a utilização da sonda intragástrica para introdução do inóculo, e a persistência da infecção é altamente dependente das doses utilizadas nas infecções.

Salmonella spp. é capaz de permanecer no trato gastrointestinal de pintado, piau e tambaqui mesmo que de forma transiente, sendo possível detectar a presença da bactéria nas fezes dos animais. Este é um importante fator para a contaminação do ambiente e propagação da mesma.

A persistência da infecção está relacionada aos sorotipos utilizados.

As espécies de peixes acima citadas são capazes de contaminar-se através da ingestão oral de *Salmonella*, dessa forma é necessário evitar a utilização de rações contaminadas pelo patógeno nas pisciculturas no país.

É possível encontrar a bactéria em água dos aquários que abrigam peixes infectados oralmente pela *Salmonella* evidenciando que é fácil a propagação do patógeno no ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTMAN, M.; HALE, J.; Murphy, R.A. *et al.* Population structures in the SARA and SARB reference collections of *Salmonella enterica* according to MLST, MLEE and microarray hybridization. Infections, genetics and evolution. *Infect, Genet Evol.*, v.16, p.314-35, 2013.
- ACHTMAN, M.; WAIN, J.; WELL, F.X. *et al.* Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.*, v.8, n.6, e 1002776, 2012.
- ÁLVARES, P.P.; MARTINS, L.; BORGHOFF, T. *et al.* Análise das características higiênic-sanitárias e microbiológicas de pescado comercializado na grande São Paulo. *Rev. Hig. Alim.*, v.22, n.161, p.88-93, 2008.
- ALVES, C.F.M. *Bactérias enteropatogênicas envolvidas em doenças transmitidas por alimento e diarreia agudas em Minas Gerais no período de 2006 a 2008*. 2009. 82f. Monografia (Pós-Graduação em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte, MG
- AMAGLIANI, G; BRANDI, G; SCHIAVANO, G.F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Res. Int.* v.45, n.2, p.780-788, 2012.
- AMAVISIT, P.; BROWNING, G.F.; LIGHTFOOT, D. *et al.* Rapid PCR detection of salmonella in horse faecal samples. *Vet. Microbiol.*, v.79, n.1, p.63-74, 2001.
- ANÁLISE epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. ,2015b. Disponível em <http://porta.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/sutos_dta.pdf>. Acesso em: 04 de agosto de 2015.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PESCA E AQUICULTURA 2014. Disponível em <http://www.formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf>. Acesso em: 01 de agosto de 2015.
- APUN, K.; YUSOF, A.M.; JUGANG, K. Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. *Int. J. Environ. Health Res.*, v.9, n.4, p.285-292, 1999.
- ARVANITIDOU, M. STATHOPOULOS, G.A.; CONSTANTINIDIS, T.C.; KATSOUYANNOPOULOS, V. The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Yersinia* spp. in river and lake waters. *Microbiol. Res.*, v.150, p.153-158, 1995.
- ASSESSMENT of the risk from *Salmonella* occurring in feeding stuffs and feed production process. Panel on animal health and animal welfare. [s.l.]: Norwegian Scientific Committee for Food Safety, 2006.
- AWUOR, W.S.; MIRUKA, O.D.; ELIUD, W.N. Characterisation of *Salmonella* Isolated from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) along Lake Victoria Beaches in Western Kenya. *Int. J. Biol. Med. Sci.*, v.1, p.51-56, 2011.
- BAKER, D.A.; SMITHERMAN, R.O. Immune response of *Tilapia aurea* exposed to *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.46, n.1, p.28-31, 1983.
- BANDARRA, E.P.; SILVA, C.A.; LANGONI, H.; UIEDA, W. Septicemia por *Salmonella* sp. em capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Semina Ciênc. Agr.*, v.16, n.1, p.153-155, 1995.

- BARBOSA, T.C.R. *Surtos de algumas doenças transmitidas por alimentos no Brasil*. 2009. 28f. Monografia (Pós Graduação em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BARROW, P. A.; WALLIS, T.S. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: WRAY, C. (Ed.) *Salmonella in domestic animals*. Oxford: CAB International, 2007. p.323-339.
- BARROW, P.A.; BUMSTEAD, N.; MARSTON, K. *et al.* Faecal shedding and intestinal colonization of *Salmonella enterica* in in-bred chickens: the effect of host-genetic background. *Epidemiol. Infect.*, v.132, n.1, p.117-126, 2004.
- BARTOLOMEU, D.A.F.S; DALLABONA, B.R.; MACEDO, R.E.F; KIRSCHNIK, P.G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Arch. Vet. Sci.*, v.16, n.1, p.21-30, 2011.
- BARUAH, K.; SAHU, N.P.; PAL, A.K. *et al.* Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. *Aquacult. Res.*, v.38, n.2, p.109-120, 2007.
- BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J.W. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.147, n.2, p.173-180, 1997.
- BEHRAVESH, B.C. 2008 outbreak of salmonella saintpaul infections associated with raw produce. *N. Eng. J. Med.*, v.364, p.918-927, 2011
- BELLA, S.D.; CAPONE, A.; BORDI, E. *et al.* *Salmonella enterica ssp. arizonae* infection in a 43-year-old Italian man with hypoglobulinemia: a case report and review of the literature. *J. Med. Case Rep.*, v.5, p.323, 2011.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; ADACHI, S.Y.; CALZADA, C.T. *et al.* Farinha de carne como fonte de Salmonella em granja avícola. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.9, n.1/2, p.9-12, 1989.
- BESSA, M.C; COSTA, M. CARDOSO, M. Prevalencia de Salmonella sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.24, n.2, p.80-84, 2004
- BHATT B.D.; ZUCKERMAN, M.J.; FOLAND, J.A. *et al.* Disseminated Salmonella Arizona infection associated with rattlesnake meat ingestion. *Am. J. Gastroenterol.*, v.84, p.433-435, 1989
- BOSQUIROLI, S.L. *Estudo epidemiológico sobre ocorrência de salmonelas em uma empresa de integração de frangos de corte*. 1996. 58f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária ANVISA. Resolução - RDC. n12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília: 10 jan. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução normativa n.34 de 28 mai 2008. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 05 set. 2015.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura: Brasil 2015. MPA, 2015a. Disponível em:

<http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADStico%20MPA%2.pdf>. Acesso em: 25 de agosto de 2015.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J. *et al.* Salmonella nomenclature. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

BRITO, C.R.F.; CAMPÊLO, M.C.S.; MEDEIROS, J.M.S. *et al.* Qualidade microbiológica de carne ovina comercializada em Mossoró - RN. *Rev. Higiene Alimentar*, v.29, n.242/243, p.2924-2928, 2015.

BROUGHTON, E.I. Salmonella enterica serotypes and antibiotic susceptibility in New Zealand, 2002-2007. *Epidemiol. Infect.*, v.138, n.3, p.322-329, 2010.

BURAS, N., L.; DUEK, L.; NIV, S. *et al.* Reactions of fish to microorganisms in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* v.50, n.4, p.989-995, 1985.

CAHILL M.M. Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.*, v.19, n.1, p.21-41. 1990.

CAMPBELL A. C., BUSWELL J.A. The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *J. Appl. Bacteriol.*, v.55, n.2, p.215-223, 1983.

CAMPELO, P.L. *Salmonella spp.* em ovos brancos para consumo humano. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, Sp.

CARDOSO L, ARAÚJO WMC. Parâmetros de qualidade em produtos prontos para consumo imediato e congelados artesanais comercializados no distrito Federal no período de 1997-2001. *Hig. Alim.*, v.17, n.109, p.40-44. 2003

CARVALHO, F. C. T. *Influências exógenas na qualidade bacteriológica da água, solo e camarão (Litopenaeus vannamei), em quatro fazendas de camarão do Estado do Ceará.* 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

CASNER, P.R.; ZUCKERMAN, M.J. Salmonella arizonae in patients with AIDS along the U.S.-Mexican border. *N. Engl. J. Med.*, v.323, n.3, p.198-199. 1990

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P. *et al.* The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.128, n.1-3, p.53-59, 2009.

CHAVES-LÓPEZ, C.; DE ANGELIS, M.; MARTUSCELLI, M. *et al.* Characterization of the enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *J. Appl. Microbiol.*, v.101, n.2, p.353-360, 2006.

CROSA, J.H.; BRENNER, D.J.; EWING, W.H.; FALKOW, S. Molecular relationships among the Salmonellae. *J. Bacteriol.*, v.115, n.1, p.307-315, 1973.

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.

DANTAS, L.I.S.; ROCHA, F.A.G.; SOUZA, J.A.B. *et al.* Presença e isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* provenientes de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo nerival araujo, Currais novos/RN. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 7., 2012, Palmas. Disponível em <<http://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/view/1453/1600>>. Acessado em 07 de setembro de 2015

- D'AOUST, J.Y. Salmonella and the international food trade. *Int. J. Food Microbiol.* v.24, n.1-2, p.11–31, 1994.
- DAVIES, P.R.; TURKSON, P.K.; FUNK, J.A. *et al.* Comparasion of methods for isolating Salmonella bactéria from faeces of naturally infected pigs. *J. Appl. Microbiol.*, v.89, n.1, p.169-177, 2000.
- DESHPANDE, A.; CURRAN, E.T.; JAMDAR, S. Historical outbreak of *Salmonella Hadar*. *J. Hosp. Infect.*, v.91, n.2, p.171-175, 2015
- DEURENBERG, R.H, STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect., Genet. Evol.*, v.8, n.6, p.747-763, 2008
- DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.15, n.2, p.167–193, 2002.
- DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M. *et al.* Ocorrência de *Salmonella spp. e Staphylococcuscoagulase* positiva em pescado no nordeste do Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, n.4, p.711-713, 2010.
- ELER, M.N.; ESPÍNDOLA, E.L.; ESPÍNDOLA, E.A. *et al.* Avaliação da qualidade da água e sedimento dos pesque-pague: análises físicas, químicas biológicas e bioensaios de toxicidade. In: ELER, M.N.; ESPÍNDOLA, E.A. *Avaliação dos impactos de pesque-pague: Uma análise da atividade na bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu*. São Carlos: Rima. 2006. p.101-144.
- EUROPEAN Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA J.*, v.13, n.1, p.3991, 2015.
- EUROPEAN Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2008. *EFSA J.*, v.11, n.4, p.3129, 2008.
- EVANGELISTA J. *Tecnologia de alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2002.
- FAO EXPERT WORKSHOP ON THE APPLICATION OF BIOSECURITY MEASURES TO CONTROL *SALMONELLA* CONTAMINATION IN SUSTAINABLE AQUACULTURE, Mangalore, India, 2010. *Report...* Rome: FAO, 2010. (FAO Fisheries and Aquaculture Report, n.937).
- FEACHEM,R.G., BRADLEY,D.J., GARELICK,H., MARA,D.D. *Sanitation and disease, health aspects of excreta and wastewater management*.Washington,USA, John Wiley & Sons, 1983. 501p.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G..Infecções por Streptococcus spp. em peixes. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. *Patologia e sanidade de organismos aquáticos*. Maringá: Ed. Massoni, 2012. p.275-292.
- FLORIS, R. *Microbial ecology of the intestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata Linnaeus*, 1758)*. 2010. 133f. Tesi (Dottorato in Scienze e Tecnologie Zootecniche) - Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari, Scuola di Dottorato di Ricerca, Università degli Studi di Sassari.
- FOLEY, S. L.; LYNNE, A.M. *et al.* Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.*, v.86, n.14, suppl., p.193–187, 2008
- FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre. Artmed. 2002. 424p.

- FOXMAN, B.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J.S. *et al.* Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol. Perspect. Innov.*, v.2, p.10, 2005.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Food microbiology*. New York: Mc Graw - Hill, 1988. 681 p.
- FUNK, J.A.; DAVIES, P.R.; NICHOLS, M.A. *et al.* Longitudinal study of salmonella enterica in growing pigs reared in multiple swine production systems. *Vet. Microbiol.* v.83, n.1, p.45-60, 2001.
- GAERTNER, J.; WHEELER, P.E.; OBAFEMI, S. *et al.* Detection of *Salmonella* from fish in a natural river system. *J. Aquat. Anim. Health*, v.20, n.3, p.50–157, 2008.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. 5.ed. Barueri: Manole, 2015. 1077p.
- GIORGI, W.; OHASHI, K.; ARAUJO, W.P. Farinha de carne e farinha de peixe como fontes de salmonelas para animais. *Arq. Inst. Biol.*, v.38, n.2, p.59-62, 1971.
- GIRÃO, F.G.F.; OLIVEIRA, R.L.; FERREIRA, H.B.C.; NOGUEIRA, R.U.G. Isolamento de *Salmonella* a partir de amostras de matérias-primas e rações e de materiais provenientes de aves. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA; CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 8., Camboriú, 1983. *Anais...* Camboriú: UBA, 1983. v.2, p.469-476.
- GUZMÁN, M.C.; BISTONI, M.A.; TAMAGNINI, L.M.; GONZÁLEZ, R.D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. *Water Res.*, v.38, p.2368–2374, 2004.
- HAGEN, O. The occurrence of Salmonellas in rainbow trout insalmonella infected milieu. *Nord. Vet. Med.*, v.18, p.513–516. 1966.
- HALEY, B.J., COLE, D.J., LIPP, E.K. Distribution, diversity, and seasonality of waterborne salmonellae in a rural watershed. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, n.5, p.248–1255, 2009.
- HALL M.L, ROWE B. *Salmonella arizonae* in the United Kingdom from 1966 to 1990. *Epidemiol. Infect.*, v.108, n.1, p.59-65, 1992
- HENDRIKSEN, R.S.; BANGTRAKULNONT, A.; PULSRIKARN, C. *et al.* Risk factors and epidemiology of the ten most common *Salmonella* serovars from patients in Thailand: 2002–2007. *Foodborne Pathog. Dis.*, v.6, n.8, p.1009–1019, 2009.
- HENDRIKSEN, R.S.; VIEIRA, A.R.; KARLSMOSE, S. *et al.* Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog. Dis.*, v.8, n. 8, p.887-900, 2011
- HERES, L.; ENGEL, B., VAN KNAPEN, F. *et al.* Fermented liquid feed reduces susceptibility of broilers for *Salmonella enteritidis*. *Poult. Sci.*, v.82, n.4, p.603-611, 2003.
- HERNÁNDEZ, E.; RODRIGUEZ, J.L.; HERRERA-LEÓN, S. *et al.* *Salmonella* Paratyphi B var Java infections associated with exposure to turtles in Bizkaia, Spain, September 2010 to October 2011. Surveillance and Outbreaks reports. *Eurosurveillance*, v.17, n.25, nDisponível em <<http://www.eurosurveillance.org>> Acesso em 29 de novembro de 2015.
- HEUSCHMANN-BRUNNER, G. Experimentelle untersuchungenu "ber mo"glichkeiten und verlauf einer infektion mit *Salmonella enteritidis* und *Salmonella typhimurium* bei Su"bwasserfischen. *Zentralbl. Bakteriol.*, v.158, p.412–431, 1974.

- HIDASI, H.W.; ANDRADE, M.A.; LINHARES, G.F.C. *et al.* Detection of *Salmonella enterica* in synanthropic birds in the metropolitan area of Goiania-GO. *Clin. Microbiol.*, v.4, n.3, 2015. Disponível em: <<http://www.esciencecentral.org/journals/detection-of-salmonella-enterica-in-synanthropic-birds-in-the-metropolitan-areaof-goianiago-2327-5073-1000202.pdf>>. Open access.
- HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, v.26, n.11, p.2465–2466, 1988.
- HUSS, H.H.; REILLY A.; BEMBAREK P.K. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, v.11, n.2, p.149-156, 2000.
- HYATT, D.R.; WEESE, J.S. *Salmonella* culture: sampling procedures and laboratory techniques. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, v.20, n.3, p.577-585, 2004
- IWAMOTO, M.; AYERS, T.; MAHON, B.E.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of seafood associated infections in the United States. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.23, n.2, p.399–411, 2010.
- JANSSEN, W.A.; MEYERS, C.D. Fish: serologic evidence of infection with human pathogens. *Science*, v.159, n.3814, p.547–548. 1968
- KAMAT, A.S.; BANDEKAR, J.R.M.; KARANI, S. *et al.* Microbiological quality of some major fishery products exported from India. Determination of human pathogen profiles in food by quality assured microbial assays. In: DETERMINATION of human pathogen profiles in food by quality assured microbial assays; Final research coordination meeting, 2002, México City. *Proceedings...* Vienna, IAEA, 2005.
- KICH, J.D.; CARDOSO, M. Bacterioses: salmonelose. In: SOBESTIANSKY, Y.; BARCELLOS, D. *Doenças dos suínos*. Goiania: Canône Editorial, 2012. p.257-264.
- KICH, J.D.; MORES, N.; VIDAL, C.E.S. *et al.* Fatores de risco associados com a prevalência sorológica de *Salmonella* em granjas comerciais de suínos no Sul do Brasil. *Ciênc. Rural*, v.35, n.2, p.398-405, 2005.
- KODAMA, H.; NAKANISHI, Y.; YAMAMOTO, F. *et al.* *Salmonella arizonae* isolated from a Pirarucu, *Arapaima-Gigas* Cuvier, with septicemia. *J. Fish Dis.*, v.10, n.6, p.509–512, 1987.
- LANGONI, H. *et al.* Flora microbiana intestinal aeróbica de peixes de diferentes hábitos alimentares. *Boletim técnico do CEPTA- IBAMA*, 2000.
- LESEL, R.; LEGAC, P., Transit of enterobacteria originating from homeotherms in fish living at low temperature. *Aquaculture*, v.3, n.1, p.109- 115. 1983.
- LINDER, E.C. *Salmonella spp. em sistema intensivo de criação de peixes tropicais de água doce*. 2002. 61f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP.
- LINS, Z.C. Studies on enteric bacteria in the lower Amazon region: I.Serotypes of *Salmonella* isolated from wild forest animals in Pará State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.64, n.3, p.439-443, 1970.
- LIUSON, E. *Pesquisa de coliformes totais, fecais e Salmonella spp em tilápias de pescadores da região metropolitana de São Paulo*. 2003. 93f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

- LORENZO, C.S. GATTI JUNIOR, P.; NUNES, A.P. *et al.* Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, n.4, p.617-624, 2010
- LORENZO, C.S. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do Estado de São Paulo. 2009. Dissertação (Mestrado). UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP, 2009.
- LOUREIRO, E.C.B. *Epidemiologia descritiva de Salmonella em ecossistemas aquáticos de diferentes áreas do Estado do Pará.* 2007. 162f. Tese (Doutorado Epidemiologia descritiva de Salmonella em ecossistemas aquáticos de diferentes áreas do Estado do Pará.) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.
- LUCAK, M.; PEDERSEN, K.; PRUKNER-RADOVIC, E. Prevalence of salmonella in captive reptiles from Croatia. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.46, n.2, p.234-240, 2015.
- MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *Ciênc. Biol. Saúde da UNOPAR*, v.1, n.1, p.63-76, 1999.
- MAHAJAN, K.R.; KHAN, S.A.; CHANDEL, D.S. *et al.* Fatal case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Gastroenteritis in an Infant with Microcephaly. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n.12, p.5830-5822, 2003.
- MAHMOUD, S.M.; YAMAZAKI, K.; MIYASHITA, K. *et al.* Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiol.*, v.21, n.6, p.657-666, 2004
- MAIDEN, M.C.; BYGRAVES, J.A.; FEIL, E. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.95, n.6, p.3140-3145, 1998.
- MAIDEN, M.C.J. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.60, p.561-588 2006.
- MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E. The efficiency of the Finnish Salmonella Control Programme. *Food Control*, v.16, n.6, p.669-675, 2005.
- MALAVOTA M.C.L.; COSTA, J.C.B., JARDIM, M.F. *et al.* Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* spp. em “sashimis” comercializados em restaurantes no município do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.16, n.2, p.89-94, 2009.
- MALORNY, B.; LÖFSTRÖM, C.; WAGNER, M, *et al.* Enumeration of *Salmonella* in food and feed samples by real time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.74, n.5, p.1299-1304, 2008.
- MARTINS, F.O. *Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (“sushi” e “sashimi”) à base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo.* 2006. 142f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- MARTINS, M.T.; PESSOA, G.V.A.; SANCHEZ, P.S. *et al.* Isolamento de *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. *Rev. Microbiol.*, v.19, n.1, p.29-39, 1988.
- MATOS A.V.R.; NUNES, C.; VIANNA, T.L.B *et al.* *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores em carcaças bovinas para exportação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.4, p. 981-988, 2013

- McEGAN, R.; CHANDLER, J.C.; GOODRIDGE, L.D.; DANYLUK, M.D. *et al.* Diversity of Salmonella isolates from Central Florida surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.80, n.21, p.6819–6827, 2014.
- MENEZES, F.G.R.; SILVA, C.M.; CARVALHO, F.C.T. *et al.* Salmonella e Staphylococcus coagulase positiva em sushi e sashimi preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. *Bol. Téc. Cient. CEPENE*, v.15, n.1, p.9-14, 2007.
- MICHAEL, G.B.; SIMONETI, R.; CARDOSO, M.R.I.; COSTA, M. *et al.* Sorotipos de Salmonella isolados em uma propriedade de suínos de terminação no sul do Brasil. *Ciênc. Rural*, v.32, n.3, p.525-527, 2002.
- MIRANDA, J.B.N.; ESSOA, G.V.A.; IRINO, K.; CALZADA, C.T. Ocorrência de Salmonella em farinhas utilizadas como matérias-primas na composição de rações animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.32, p.157-160, 1978.
- MORSE, E.V.; GREENWOOD, D. E.; MEYERS, E. P. *et al.* Experimental Salmonella infections in *Curassius auratus* (goldfish). *J. Environ. Sci. Health*, v.13A, n.4, p.325-335. 1978
- MUS, T.E.; CETINKAYA, F.; CELIK, U. Occurrence of Vibrio, Salmonella and Staphylococcus aureus in retail fresh fish, mussel and shrimp. *Acta Vet. Brno*, v.83, p.75–78, 2014.
- NAGANO, N.; OANA, S.; NAGANO, Y.; ARAKAWA, Y. A severe *Salmonella* enterica serotype Paratyphi infection in a child related to a pet turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Jpn. J. Infect Dis.* v.59, n.2, p.132-134, 2006
- NESSE L.L.; LØVOLD, T.; BERGSJØ, B, *et al.* Persistence of orally administered Salmonella enterica serovars Agona and Montevideo in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), *J. Food Prot.*, v.68, n.7, p.1336–1339,2005.
- NOGUEIRA, M. F. *Avaliação da presença de Enterobacteriaceae, Aeromonas, Campylobacter e Cryptosporidium em fezes de capivara, Hydrochoerus hydrochaeris hydrochaeris (L. 1766), e determinação do perfil de susceptibilidade bacteriana frente a diferentes drogas.* 1998. 132f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP.
- NUNES, E.S.C.L.; BITTENCOURT, R.H.F.P.M.; SILVA, M.C. *et al.* Avaliação da qualidade do camarão salgado seco (aviú) e da farinha de peixe (piracuí) comercializados em mercados varejistas da cidade de Belém, Pará. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. v.72, n.2, p.147-54,2013.
- NWIYI, P.; ONYEABOR, A. Occurrence of *Salmonella* spp from fresh fish (tilapia nilotica linn) using improved isolation methods. *J. Anim. Feed Res.*, v.2. n.6, p 475-478, 2011.
- OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.6, p.1661-1669 ,1999.
- OLSEN, J. E.; BROWN, D.J.; SKOV, M.N.; CHRISTENSEN, J.P. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Vet. Q.*, v.15, n.4, p.125-135, 1993.
- ONDERKA DK, FINLAYSON MC. Salmonellae and salmonellosis in captive reptiles. *Can J Comp Med.*,v.49, n.3, p.268–270,1985.

- ONYANGO, D.M.; WANDILI, S.; KAKAI, R.; WAINDI, E.N. *et al.* Isolation of Salmonella and Shigella from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya. *J. Infect. Dev. Ctries*, v.3, n.2, p.99-104, 2009.
- PAL, D.; DASGUPTA, C. Microbial pollution in water and its effect on fish. *J. Aquat. Anim. Health*, v.4, n.1, p. 32–39, 1992.
- PALHARES, J.C.P. Criação integrada entre piscicultura e suinocultura. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 5., Florianópolis, 2006. *Anais...* Florianópolis: AVESUI, 2006. p.15-26.
- PAN, Z.; CONG, Q., GENG, S *et al.* Flagellin from recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a fundamental role in chicken innate immunity. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.19, n.3, p.304-312, 2012.
- PARENTE, L.S.; COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F. *et al.* Bactérias entéricas presentes em amostras de água e camarão marinho *Litopenaeus vannamei* oriundos de fazendas de cultivo no Estado do Ceará, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.48, n.1, p.46-53, 2011.
- PAULA, M.S. *Qualidade da água do rio Dourados-MS parâmetros físico-químicos, microbiológicos e higiênico sanitários*. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.
- PINHEIRO, H.M.C.; VIEIRA, R.H.S.F.; CARVALHO, F.C.T. *et al.* *Salmonella sp.* e coliformes termotolerantes em sushi e sashimi comercializados na cidade de Fortaleza- Ceará . *Bol. Téc. Cient. CEPENE*, v.14, n.1, p.23-31, 2006.
- PIRES, T.E. *Principais bactérias presentes em doenças transmitidas por alimentos*. 2012. 118f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- POLO, F.; FIGUERAS, M.J.; INZA, I. *et al.* Prevalence of Salmonella serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. *Antonie Leeuwenhoek*, v.75, n.4, p.285–292, 1999.
- POT, B. Analysis of Salmonella Saintpaul outbreak using genome mapping. *International J. Infect. Dis.*, v.21, supl.1, p.1-460, 2014
- PRESTES, A.A.; SILVA, E.N.; ITO, N.M. *et al.* Salmonelas em matérias-primas de origem animal destinadas à fabricação de rações. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA; CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICUL-TURA, 8., 1983, Camboriú. *Anais...* Camboriú: UBA, 1983. p.440-446.
- PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, 2014. Rio de Janeiro: IBGE, v.52, p.1-39, 2014. Disponível em: <biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf> . Acesso em 28 de setembro de 2015
- PROTOCOLS used for MLST of *Salmonella enterica*. Warwick: Warwick Medical School, [20--]. Disponível em: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html>. Acessado em: setembro de 2015.

- PUJALTE M.J.; SITJÀ-BOBADILLA, A., MACIÁN, M.C. *et al.* Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured Dentex, Gilthead Sea Bream and European Sea Bass. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.26, n.2, p.284-292, 2003.
- PULLELA, S.V.S. *Aquaculture of Pacu (Piaractus mesopotamicus) and a comparison of its quality: microbiological, sensory and proximate composition.* 1997. 191f. Dissertation (Master of Science in Food Science and Technology) - Virginia Polytechnic Institute and State University.
- RALL, V.L.M.; CARDOSO, K.F.G.; XAVIER, C. Qualidade microbiológica de pescado comercializado na cidade de Botucatu, SP. *Rev. Hig. Alim.*, v.25, n.192/193, p.123-125, 2011.
- REBOLLEDO, J.; GARVEY, P.; RYAN, A. *et al.* International outbreak investigation of Salmonella Heidelberg associated with in-flight catering. *Epidemiol. Infect.*, v.142, n.4, p.833-842, 2014.
- REEVES, M.W.; EVINS, G.M.; HEIBA, A.A. *et al.* Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other Salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori comb. nov. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, n.2, p.313-320, 1989.
- REVIEW of foodborne illness in America from 2002 -2011. Outbreak Alert! CSPI, 2014. Disponível em: <http://cspinet.org/new/pdf/outbreak_alert_2014_report_final.pdf> Acesso em 24 de Agosto de 2015
- RINGØ E.; SPERSTAD, S.; MYKLEBUST, R. *et al.* Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): the effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, v.261, n.3, p.829-841. 2006.
- RINGØ, E.; GATESOUBE, F.J. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, v.160, n.3-4, p.177-203. 1998
- RODRIGUES, D.P.; SOLARI, C.A.; RIBEIRO, R.V. *et al.* Salmonella em água de praias no município de Rio de Janeiro, RJ. *Rev. Microbiol.*, v.20, n.1, p.12-17, 1989.
- ROTA, M.A. *Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura.* Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC53.pdf>>. Acessado em: setembro de 2015.
- SAITANU, K.; JERNGKLINCHAN, J. Isolation of Salmonella from poultry feed and feed ingredients in Thailand. *J. Vet.*, v.6, n.1, p.21-24; 1994.
- SALMONELLA surveillance: annual summary, 2013. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2013. Disponível em <<http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>> Acesso em 24 de Agosto de 2015
- SALMONELLA surveillance: annual summary, 2015. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2015. Disponível em <<http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>> Acesso em 24 de Agosto de 2015.
- SANT'ANA, A.S. *Avaliação quantitativa do risco de salmonella e listeria em vegetais minimamente processados.* 2011. 273f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

- SANTANA, R.F.; SANTOS, D.M.; MARTINEZ, A.C.C.; LIMA, A.S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.
- SANTOS, E.J.; CARVALHO, E.P.; SANCHES, R.L.; BARRIOS, B.E.B. *et al.* Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no Estado de Minas Gerais para produção de ração animal. *Ciênc. Agrotec.*, v.24, n.2, p.425-433, 2000.
- SATO, Y.S.G.; SATO, G.; TUCHILI, L. *et al.* Status of *Salmonella galinarum pullorum* infections in poultry in Zambia. *Avian Dis.*, v.41, n.2, p.490-495, 1997.
- SETTI, L.; RODRIGUEZ-CASTRO, A., PATA, M.P. *et al.* Characteristics and dynamics of *Salmonella* contamination along the coast of Agadir, Morocco. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, n.24, p.7700–7709. 2009.
- SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C. *et al.* *Salmonella spp.* importante patogênico veiculado em alimentos. *Ciênc.Saúde Coletiva.*, v.13, n.5, p.1675 – 1683, 2008.
- SILVA, E.N.; REIS, R.; OLIVEIRA, R.L.; ÁVILA, F.A. Salmonelas em farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.25, n.2, p.169-173, 1973.
- SILVA, I.P.; PEREIRA, A.F.; SILVEIRA, C.S.; BARRETOI, N.S.E. *Presença de Salmonella spp. em um ambiente natural de extração de ostras.* 2015. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/site/higienistas/trabalhos/10492.pdf>> Acesso em 15 de agosto de 2015.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *et al.* *Salmonella*. In: _____. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.* 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. Cap.19, p.253-285.
- SMYSER, C.F.; SNOEYENBOS, G.H. Evaluation of several methods of isolating salmonellae from poultry litter and animal feedstuffs. *Avian Dis.*, v.13, n.1, p.134-141, 1969.
- SOUZA, A.L.M.; CALIXTO, F.A.A.; MESQUITA, E.F.M. *et al.* *Pesquisa de Salmonella spp. em carne de cação anequim (Isurus oxyrinchus) (Elasmobranchii: laminidae) comercializada no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.* [200-]. Disponível em <<http://www.fiperj.rj.gov.br/index.php/arquivo/download/53>>. Acessado em: 15 de agosto de 2015.
- SPRATT B.G. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.2, n.3, p.312-316. 1999.
- STATE of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>>. Acessado em: 07 de setembro 2015.
- STATE of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO, 2014 Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>>. Acessado em: 07 de setembro 2015
- SUGITA H., IWATA, J.; MIYAJIMA, C. *et al.* Changes in microflora of a puffer fish *Fugu niphobles*, with different water temperatures. *Marine Biol.*, v.101, n.3, p.299–304. 1989.
- TAMURA K.G.; STECHER, G.; PETERSON, D. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis. Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, v.30, n.12, p.2725 -2729, 2013.
- TAVARES, L.H.S. *Limnologia aplicada à aquíicultura.* Jaboticabal ; FUNEP, 1995. 70p.

- TAVARES, L.H.S. *Utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes*. 1988. 191f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial typing. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.9, p.2233–2239, 1995
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v.22, n.22, p.4673–4680. 1994.
- TORANZO, A.E., BARREIRO, S., CASAL, J.F. *et al.* Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*, v.99, n.1-2, p 1-15, 1993.
- TRUST, T.J., SPARROW, R.A.H. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Can. J. Microbiol.* v.20, n.9, p.1219– 1228, 1974.
- TUNUNG, R.; CHAI, L.C.; USHA, M.R. *et al.* Characterization of *Salmonella enterica* isolated from street food and clinical samples in Malaysia. *ASEAN Food J.*, v.14, n.3, p.161–173, 2007.
- TURCI, R.C.; BEGOTTI I.L.; MERLINI, L.S. Incidência de *Salmonella sp.* em carne de suíno comercializada no município de Imuarama-PR– Brasil. *Enciclopédia biosfera*, v.9, n.16, p.2748-2753, 2013.
- TURNER, A.K.; LOVELL, M.L.; HULME, S.D. *et al.* Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. *Infect. Immun.*, v.66, n.5, p.2099-2106, 1998.
- UPADHYAY, B. P.; UTRARACHKIJ, F.; THONGSHOOB, J. *et al.* Detection Of *Salmonella inva* Gene in Shrimp Enrichment Culture By Polymerase Chain Reaction. *Southeast Asian J. Trop Med. Public Health*, v.41, n.2, p.426-435. 2010
- VAILLANT, V.; VALK, H.; BARON, E. *et al.* Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog. Dis.*, v.2, n.3 p.221–232, 2005.
- VELDMAN, A.; VAHL, H.A.; BORGGREVE, G.J.; FULLER, D.C. A survey of incidence of *Salmonella* species and enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Vet. Rec.*, v.136, n.7, p.169-172, 1995.
- VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. *Mundo Saúde*, v.33, n.4, p.406-414, 2009.
- VIEIRA, R.H.S.F. Pescado comercializado cru, congelado ou cozido. In: VIEIRA, R.H.S.F *et al.* (Eds.). *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado*. São Paulo: Editora Varela, 2004. p.67-78.
- VOLF, J.; STEPANOVA, H.; MATIASOVIC, J. *et al.* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis infection of pigs and cytokine signaling in palatine tonsils. *Vet. Microbiol.*, v.156, n.1-2, p.127-135, 2012.
- WANG, S.; DUAN, H.; ZHANG, W. Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in China between 1994 and 2005. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* v.51, n.1, p.8 – 13, 2007.
- WONG, C.K.; WONG, M.H. Morphological and biochemical changes in the gills of *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicol.*, v.48, p.517-527, 2000.

- WU, S.; GAO, T.; ZHENG, Y. *et al.* Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, v.303, p.1–7, 2010.
- YAGHOBI, M.; PAYKAN HEYRATI, F.; AKHLAGHI, M. *et al.* Intestinal microbiota of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) fed on dietary nucleotide. *Iran. J. Ichthyol.* v.1, n.4, p. 274–280, 2014.
- YAGOUB, S.O. Isolation of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* from raw fish sold in fish market in Khartoum state. *J. Bacteriol. Res.*, v.1, p.085-088, 2009
- YAMAGUCHI, M.U.; ZANQUETA, E.B.; MOARA, J.F. *et al.* Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: pesquisa de Salmonella e Listeria. *Rev. Agronegócios Meio Ambiente*, v.6, n.3, p.417-434, 2013.
- YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELA-RIDDER, B. *et al.* An overview of Salmonella typing: public health perspectives. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, v.4, n.3, p.189-204, 2003.
- YOUSSEF, H.; EL-TIMAWY, A.K.; SHABAN, A. *et al.* Role of aerobic intestinal pathogens of freshwater fish in transmission of humans diseases. *J. Food Protection*, v.55, n.9, p.739-740, 1992.

ANEXO I

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n°. 104 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Sorotipagem molecular, capacidade de colonização e métodos de mitigação da infecção por Salmonella enterica em peixes nativos”, que tem como responsável CARLOS AUGUSTO GOMES LEAL, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 23/10/2014. Este certificado expira-se em 23/10/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol n°. 104 / 2014, related to the Project entitled “Molecular serotyping, colonization, and control methods of Salmonella enterica subsp. enterica in native Brazilian fish species”, under the supervision of CARLOS AUGUSTO GOMES LEAL, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 23/10/2014. This certificate expires in 23/10/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 23/10/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II

TABELA 22

Quantidade de amostras coletas nas cinco fazendas localizadas nos Estados de Mato Grosso, Tocantins e São Paulo.

Nome da Propriedade	Tipo de amostra	Quantidade
Fazenda A	Suabes de TGI de tambaqui	9
	Suabes de TGI de Pintado	8
	Suabes de branquia de Pintado	6
	Intestino de Tambaqui	6
	Água dos tanques	10
	Fezes de animais encontradas próximos aos tanques	2
	Suabes de branquia de Tambaqui	6
	Suabes de TGI tilápia	2
Subtotal		49
Fazenda B	Ração	21
	Farinha de peixe	7
	Musculo de tambaqui	3
	Músculo de Pintado	2
	Músculo de Matrinxã	1
	Água dos tanques	27
	Suabes de Branquia de Tambaqui	7
	Suabes de Branquia de Matrinxã	2
	Suabes de Branquia de Piau	2
	Suabes de TGI de Tambaqui	90
	Suabes de TGI de Matrinxã	22
	Suabes de TGI de Piau	35
	Suabes de TGI de pintado	13
	Sedimentos	2
	Fezes de animais encontradas próximos aos tanques	7
	Farinha de vísceras	3
	Farinha de carcaça	2
	Farinha de frango	2
Farinha de carne e ossos	2	
Farinha de sangue	2	
Água dos caminhos	5	
Subtotal		257
Fazenda C	Suabes de TGI de caranha	14
	Suabes de TGI de tambaqui	63
Subtotal		77
Fazenda D	Ração	2
	Intestino de Tambaqui	3
Subtotal		5
Fazenda E	Suabes de TGI de pintado	95
	Suabes de TGI de matrinxã	80
	Água dos tanques de cultivo	6
Subtotal		181
Total		569

ANEXO III

TABELA 23

Frequência de amostras positivas para *Salmonella enterica* em cinco fazendas localizadas nos Estados de Mato Grosso, Tocantins e São Paulo.

Descrição de material	Quantidade de amostras coletadas	Amostras positivas	Frequência (%)
Ração	23	-	-
Farinha de peixe	7	-	-
Carne de Tambaqui	3	-	-
Carne de Pintado	2	-	-
Carne de Matrinxã	1	-	-
Suabes de branquia de Tambaqui	13	-	-
Suabes de TGI de Tambaqui	162	13	8,02 %
Suabes de brânquia de Matrinxã	2	1	50%
Suabes de TGI de Matrinxã	102	-	-
Suabes de branquia de Piau	2	-	-
Suabes de TGI de Pintado	116	6	6%
Suabes de branquia de Pintado	6	-	-
Suabes de TGI de Tilápia	2	-	-
Suabes de TGI de Piau	35	9	25,71 %
Suabes de TGI de Caranha	14	6	42,85 %
Intestino de Tambaqui	9	-	-
Água de tanques	43	2	4,65 %
Sedimentos	2	-	-
Água de caminhões	5	-	-
Fezes de animais encontrados próximos aos tanques	9	2	22,2 %
Farinha de carcaça	2	-	-
Farinha de vísceras	3	-	-
Farinha de Sangue	2	-	-
Farinha de carne e ossos	2	-	-
Farinha de frango	2	-	-
Total de amostras	569	39	6,85

ANEXO IV

TABELA 24

Resultados Gerais da Sorotipificação.

ID	Fazenda da coleta	Material coletado	Material coletado	Sorotipificação
sal 05	Fazenda B	Matrinxã	SUABES DE BRANQUIA	S. Panama
sal 08	Fazenda A	Pintado	SUABES DE TGI	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i>
sal 09	Fazenda A	Tambaqui	SUABES DE TGI	S. Saintpaul
sal 10	Fazenda A	Agua	AGUA DOS TANQUES	S. Panama
sal 11	Fazenda A	Tambaqui	SUABES DE TGI	S. Heidelberg
sal 12	Fazenda B	Agua	AGUA DOS TANQUES	S. Brandenburg
sal 13	Fazenda B	Tambaqui	SUABES DE TGI	S. Heidelberg
sal 14	Fazenda B	Pintado	SUABES DE TGI	S. Heidelberg
sal 15	Fazenda B	Piau	SUABES DE TGI	S. Heidelberg
sal 16	Fazenda B	Piau	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 17	Fazenda B	Piau	SUABES DE TGI	S. Heidelberg
sal 18	Fazenda B	Pintado amazônico	SUABES DE TGI	S. Heidelberg
sal 19	Fazenda B	Pintado amazônico	SUABES DE TGI	S. Brandenburg
sal 20	Fazenda B	Piau	SUABES DE TGI	S. Brandenburg
sal 21	Fazenda B	Piau	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 22	Fazenda B	Piau	SUABES DE TGI	S. Brandenburg
sal 23	Fazenda B	Pintado	SUABES DE TGI	S. Saintpaul
sal 24	Fazenda B	Piau	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 25	Fazenda B	Pintado	SUABES DE TGI	S. Saintpaul
sal 26	Fazenda B	Tambaqui	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 27	Fazenda B	Tambaqui	SUABES DE TGI	S. Panama
sal 28	Fazenda B	Tambaqui	SUABES DE TGI	S. Arizonae
Sal 29	Fazenda B	Juvenil Piau	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 30	Fazenda C	Tambaqui adulto/ reprodutores	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 31	Fazenda C	Tambaqui adulto/ reprodutores	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 32	Fazenda C	Tambaqui adulto/ reprodutores	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 33	Fazenda C	Tambaqui adulto/ reprodutores	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 34	Fazenda C	Tambaqui adulto/ reprodutores	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 35	Fazenda C	Tambaqui adulto/ reprodutores	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 36	Fazenda C	Caranha adulto	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 37	Fazenda C	Caranha adulto	SUABES DE TGI	S. Hadar
sal 38	Fazenda C	Caranha adulto	SUABES DE TGI	S. Hadar

sal 39	Fazenda C	Caranha adulto	SUABES DE TGI	S.Hadar
ID	Fazenda C	Material coletado	Material coletado	Sorotipificação
sal 40	Fazenda C	Caranha adulto	SUABES DE TGI	S.Hadar
sal 41	Fazenda C	Caranha adulto	SUABES DE TGI	S.Hadar
sal 45	Fazenda B	Fezes Tamarindo 1	FEZES DE ANIMAIS	S.Hadar
sal 46	Fazenda B	Fezes Tamarindo 2	FEZES DE ANIMAIS	S.Hadar
sal 47	Fazenda B	Piau	SUABES DE TGI	S. Heidelberg
sal 48	Fazenda B	Tambaqui	SUABES DE TGI	S. Hadar

ANEXO V

TABELA 25

Resultados do perfil de alelos das amostras de *Salmonella*.

Identificação da amostra	Identificação da Fazenda	Material coletado	ST	CC	NST	AROC	DNAN	HEMD	HISD	PURE	SUCA	THRA	Sorotipagem convencional
sal 05	B	Matrinxã	não	não	NST 01	13	12	117	16	13	16	4	<i>Salmonella</i> Panama
sal 08	A	Pintado	não	não	NST 02	46	122	3	130	6	19	1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. Enterica
sal 09	A	Tambaqui	não	não	NST 03	1	18	18	130	8	7	115	<i>Salmonella</i> Saintpaul
sal 10	A	Água	24	17	STC	13	12	17	16	13	16	4	<i>Salmonella</i> Panama
sal 11	A	Tambaqui	não	não	NST 04	46	430	18	130	8	42	115	<i>Salmonella</i> Heidelberg
sal 12	B	Água	não	não	NST 05	5	21	2	9	505	358	17	<i>Salmonella</i> Brandenburg
sal 13	B	Tambaqui	não	não	NST 06	46	430	18	130	8	324	115	<i>Salmonella</i> Heidelberg
sal 14	B	Pintado	não	não	NST 07	46	122	18	18	8	42	115	<i>Salmonella</i> Heidelberg
sal 15	B	Piau	não	não	NST 08	13	12	18	16	13	343	4	<i>Salmonella</i> Heidelberg
sal 16	B	Piau	não	não	NST 09	10	7	21	14	185	300	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 17	B	Piau	não	não	NST 10	15	430	18	130	6	7	115	<i>Salmonella</i> Heidelberg
sal 18	B	Pintado amazônico	não	não	NST 11	5	21	18	9	6	7	17	<i>Salmonella</i> Heidelberg
sal 19	B	Pintado amazônico	não	não	NST 12	5	21	18	9	8	12	17	<i>Salmonella</i> Brandenburg
sal 20	B	Piau	50	14	STC	5	21	18	9	6	12	17	<i>Salmonella</i> Brandenburg
sal 21	B	Piau	não	não	NST 13	2	5	6	7	5	7	5	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 22	B	Piau	não	não	NST14	11	10	25	13	10	355	5	<i>Salmonella</i> Brandenburg

sal 23	B	Pintado	não	não	NST15	5	5	18	9	6	12	17	<i>Salmonella</i> Saintpaul
sal 24	B	Piau	não	não	NST16	15	148	18	9	8	7	102	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 25	B	Pintado	não	não	NST17	5	21	18	44	8	160	5	<i>Salmonella</i> Saintpaul
sal 26	B	Tambaqui	112	8	STC	41	42	43	58	9	12	2	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 27	B	Tambaqui	24	17	STC	13	12	17	16	13	16	4	<i>Salmonella</i> Panama
sal 28	B	Tambaqui	não	não	NST18	33	21	30	144	283	87	134	<i>Salmonella</i> enterica subsp. Arizonae
Sal 29	B	Juvenil Piau	não	não	NST19	1	5	6	7	8	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 30	C	Tambaqui adulto/ reprodutores	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 31	C	Tambaqui adulto/ reprodutores	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 32	C	Tambaqui adulto/ reprodutores	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 33	C	Tambaqui adulto/ reprodutores	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 34	C	Tambaqui adulto/ reprodutores	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 35	C	Tambaqui adulto/ reprodutores	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 36	C	Caranha adulto	não	não	NST 20	2	5	2	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 37	C	Caranha adulto	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 38	C	Caranha adulto	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 39	C	Caranha adulto	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 40	C	Caranha adulto	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 41	C	Caranha adulto	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 45	B	Fezes Tamarindo 1	614	3	STC	10	7	21	14	185	12	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 46	B	Fezes Tamarindo 2	614	3	STC	10	7	21	14	185	12	12	<i>Salmonella</i> Hadar
sal 47	B	Piau	não	não	NST 21	46	430	6	130	8	7	12	<i>Salmonella</i> Heidelberg
sal 48	B	Tambaqui	33	22	STC	2	5	6	7	5	7	12	<i>Salmonella</i> Hadar

Legenda: NST- novo ST e STC – ST conhecido

ANEXO VII

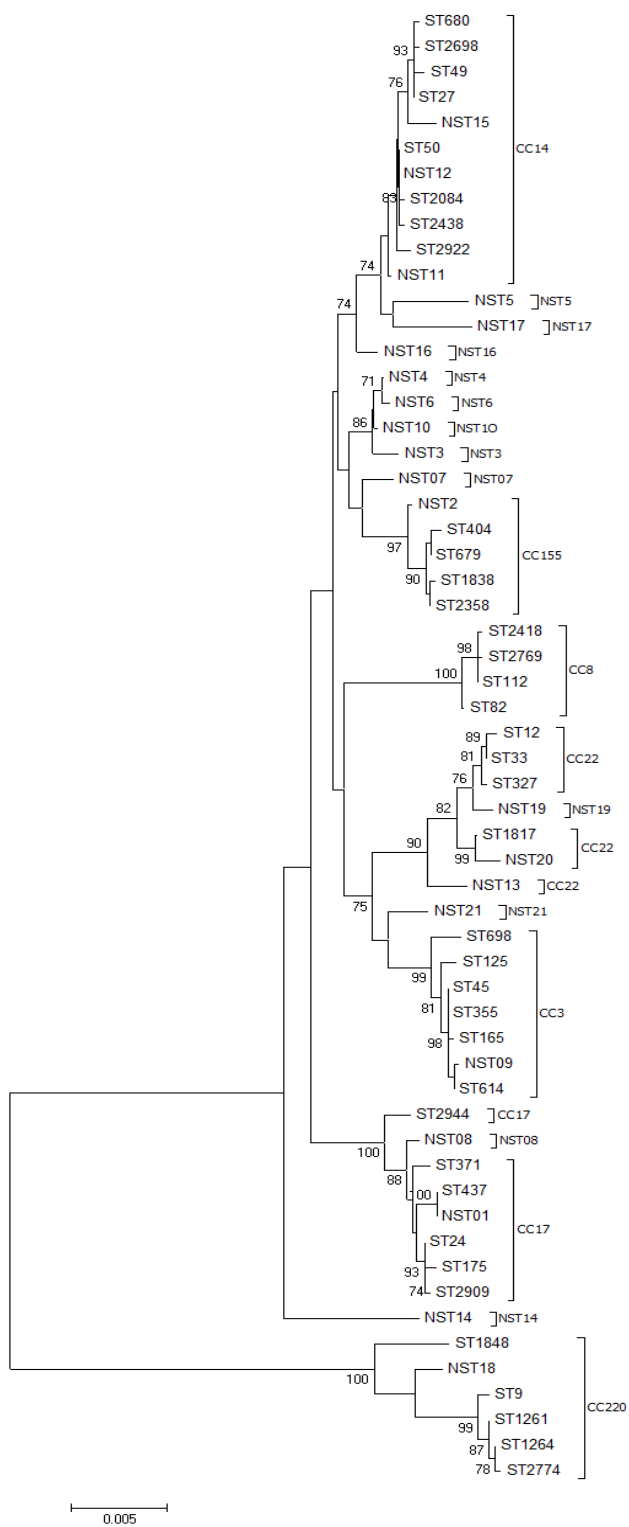


FIGURA 2. Dendograma ilustrando a relação filogenética dos isolados

ANEXO VIII

TABELA 26

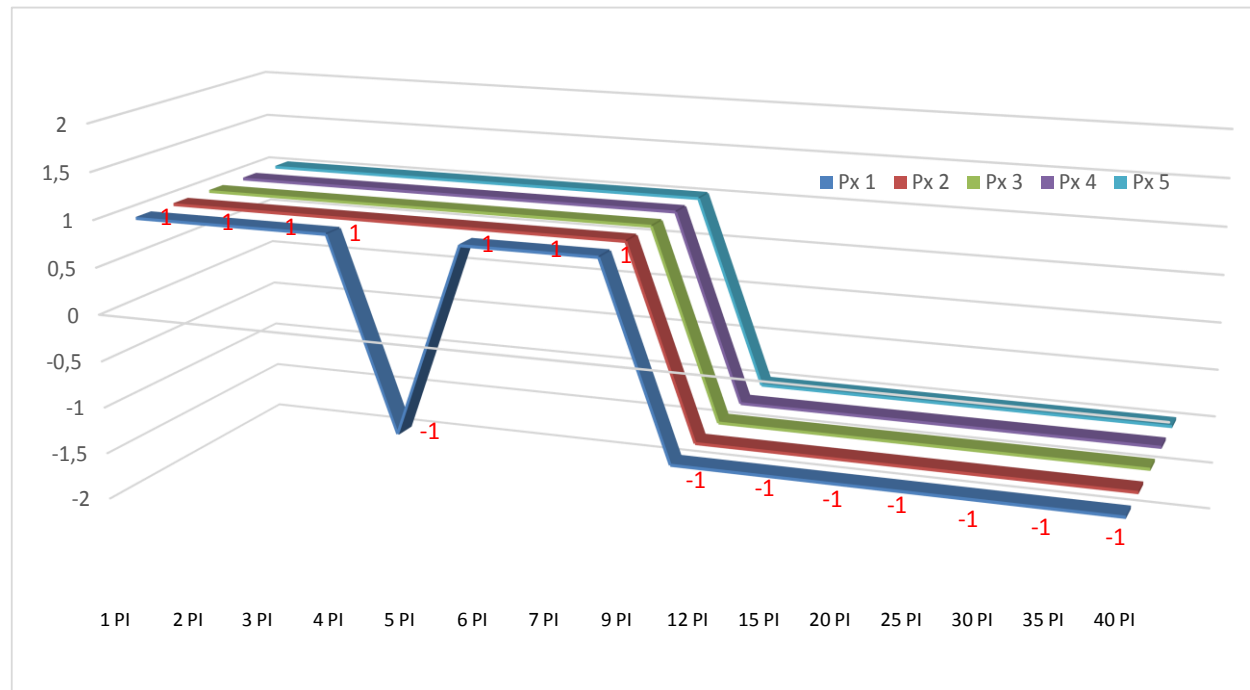
Resultado das análises de PCR das coletas de fezes e águas do Experimento I

DIAS PÓS-COLETA	1 PI	2PI	3PI	4PI	5PI	7PI	9PI	12PI	15PI	20PI	26 PI	31 PI	35 PI
Grupo controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo 1	5 *	5	6	4	6	6	6	2	2	0	1	1	0
Grupo 2	6	3	1	0	4	5	2	0	1	1	0	1	0
Grupo 3	3	3	0	1	4	4	4	0	0	0	0	0	0

*Número de animais positivos em cada coleta.

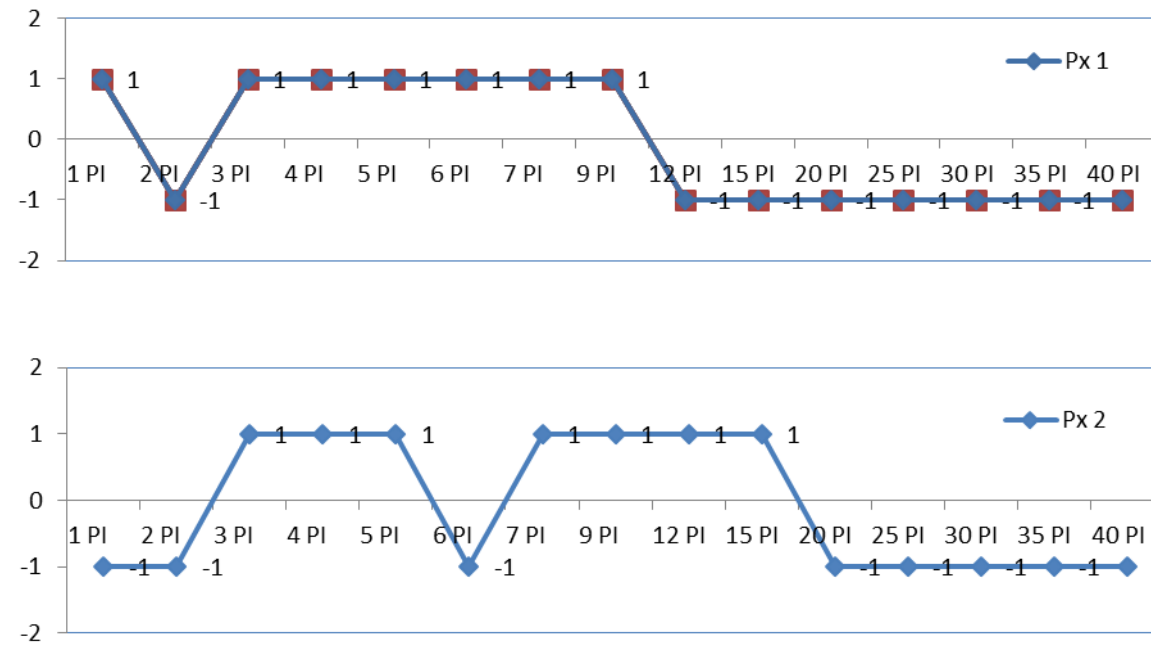
ANEXO IX

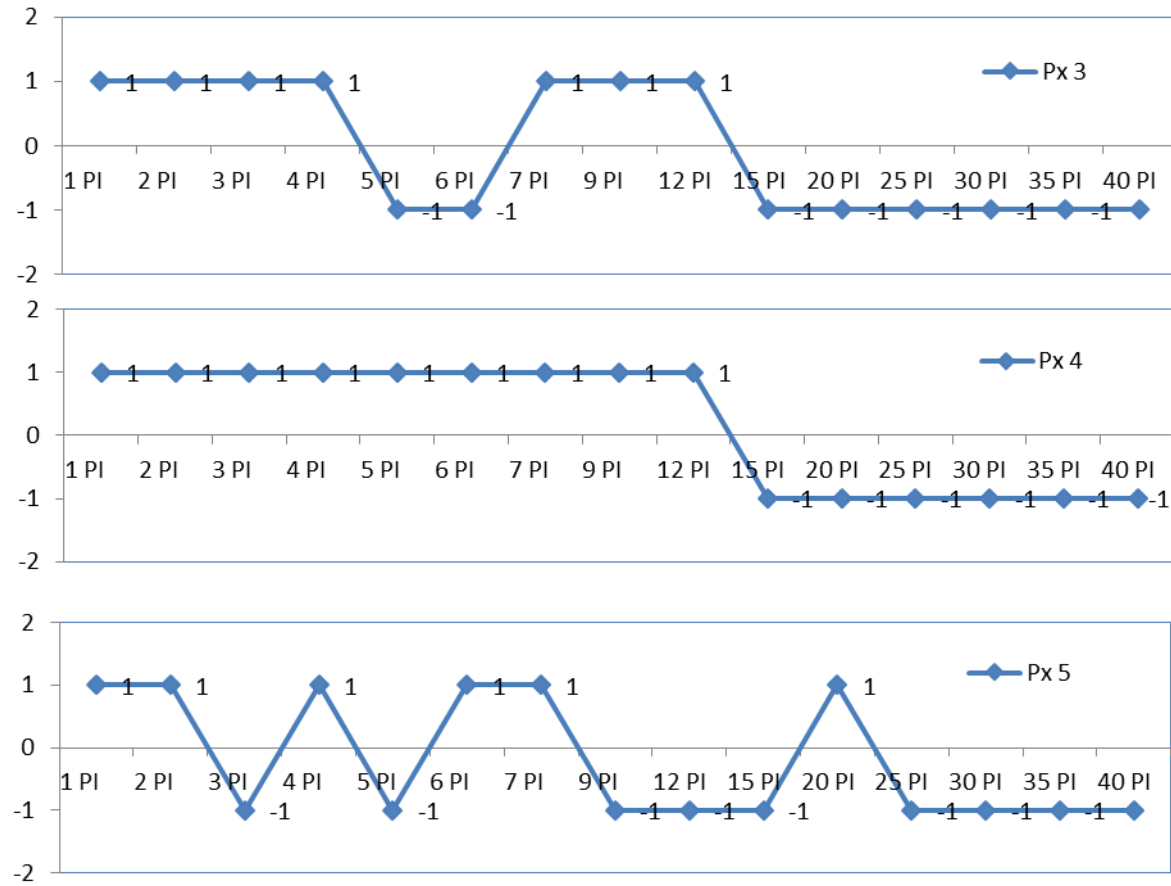
GRÁFICO 4. Avaliação de animais positivos ao longo de 40 dias de infecção experimental nos grupo 1 do ensaio experimental II.



Legenda: Onde no gráfico o número 1 indica animais positivos na coleta e -1 indica animais negativos.

ANEXO X

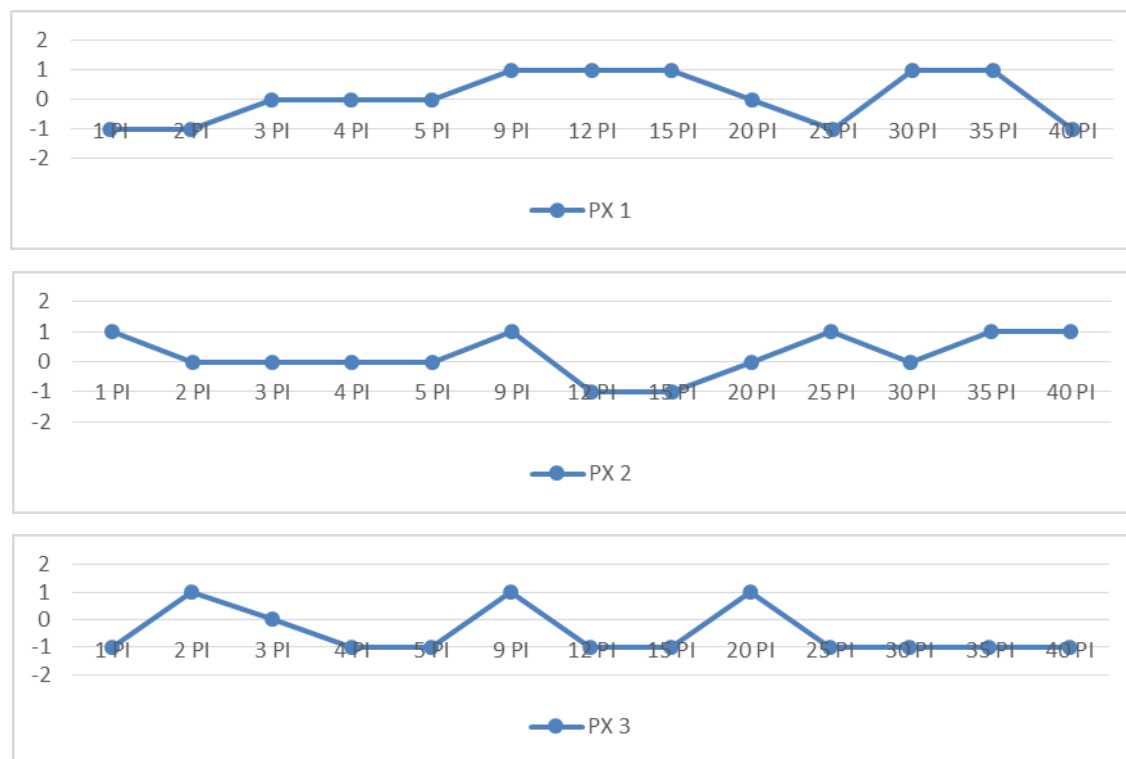
GRÁFICO 5 - Gráficos ilustrativos demonstrando a avaliação de animais positivos ao longo de 40 dias de infecção experimental nos Grupo 2 do ensaio experimental II.

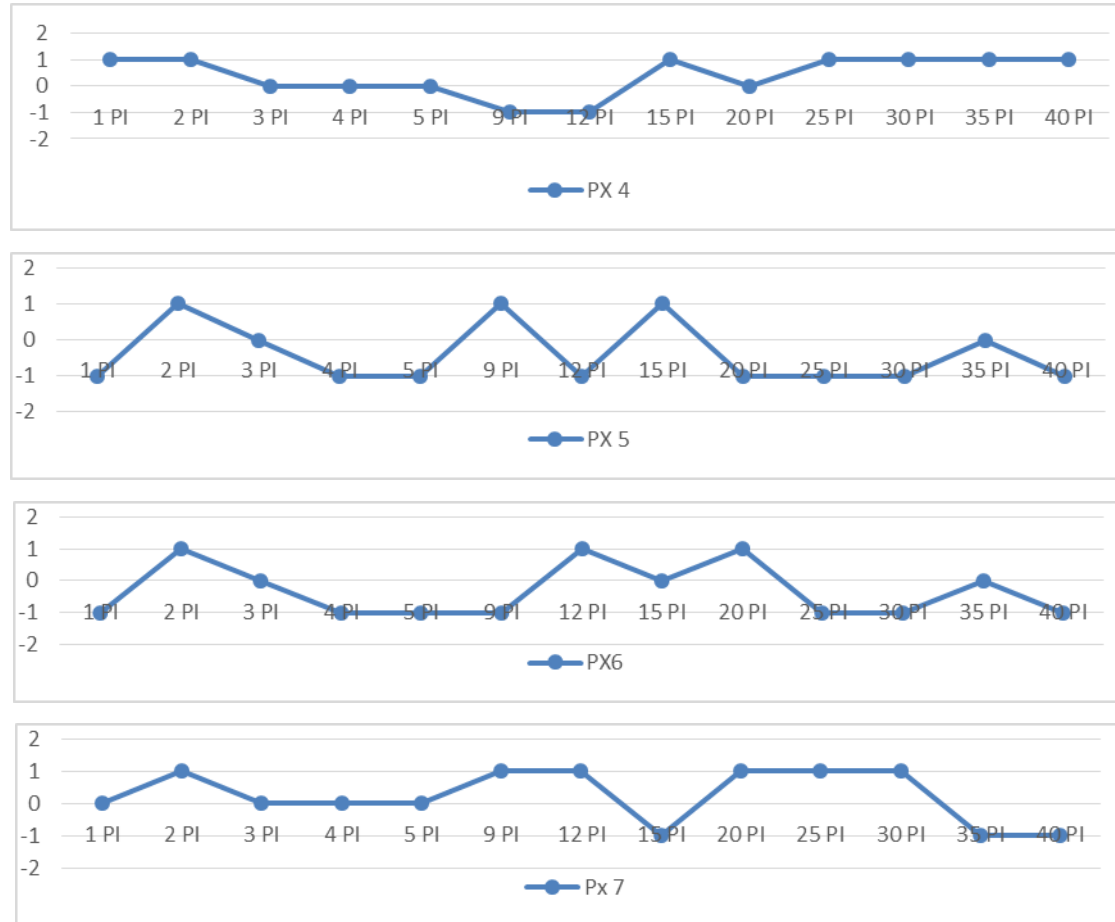


Legenda: Onde 1 no gráfico são animais que na coleta apresentaram-se positivos e - 1 animais negativos.

ANEXO XI

GRÁFICO 6 - Gráficos ilustrativos demonstrando a avaliação de animais positivos ao longo de 40 dias de infecção experimental nos Grupo 1 do ensaio experimental III.





Legenda: Onde: 0 no gráfico representa que não houveram fezes a serem coletadas, 1 animais positivos no momento da coleta e - 1 são animais que a coleta apresentaram-se negativos.