

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Natália Moraes da Silva

**RESULTADOS PRELIMINARES DA APLICABILIDADE DE PROPÍDIO  
MONOAZIDA E SEQUENCIAMENTO DO DNA PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS VIÁVEIS EM LEITE UHT**

FLORIANÓPOLIS

2019

Natália Moraes da Silva

**RESULTADOS PRELIMINARES DA APLICABILIDADE DE PROPÍDIO  
MONOAZIDA E SEQUENCIAMENTO DO DNA PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS VIÁVEIS EM LEITE UHT**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de  
Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito para a obtenção do Título de  
Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marília Miotto

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da  
Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Natália Moraes da

Resultados preliminares da aplicabilidade de propídio monoazida e sequenciamento do dna para identificação de bactérias viáveis em leite UHT / Natália Moraes da Silva ; orientador, Marília Miotto, 2019.

58 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. Microbiologia de Alimentos. 3. Métodos moleculares . I. Miotto, Marília. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

Natália Moraes da Silva

**RESULTADOS PRELIMINARES DA APLICABILIDADE DE PROPÍDIO  
MONOAZIDA E SEQUENCIAMENTO DO DNA PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS VIÁVEIS EM LEITE UHT**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos” e aprovado em sua forma final.

Local, 25 de novembro de 2019.

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carmen Maria Olivera Müller  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Marília Miotto.  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Isabela Maia Toaldo  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carlise Beddin Fritzen Freire  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais Simone e Jaison, à minha irmã Gabriela, aos meus amigos e ao meu namorado Leonardo.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço imensamente aos meus pais Simone e Jaison por terem me dado acesso ao estudo de qualidade e sempre me incentivarem nas minhas escolhas, e à minha irmã Gabriela por todo apoio, pela sua alegria contagiante e palavras de conforto.

Aos meus familiares por vibrarem com minhas conquistas, em especial minha tia Eloiza.

Ao meu namorado Leonardo pela sua positividade, por acreditar na minha capacidade e apoiar minhas decisões.

À minhas amigas Mariana, Dinah, Thalita, Nataly, Nathalia, Bruna, Andriele, Maria Eliza e Angela, por estarem presentes nesses anos de graduação, me dando apoio, incentivo e encherem meus dias de alegria. Em especial agradeço à Mariana, por estar presente nas minhas melhores e piores fases, por aconselhar, por ouvir e sempre me fazer olhar o lado bom das coisas; à Dinah por desde sempre ser minha parceira de bancada e pesquisa, pelas longas horas de ajuda nos experimentos e por sempre me contagiar com seu riso fácil e alegria; à Thalita por me acolher desde o primeiro dia de aula, pelos inúmeros ensinamentos acadêmicos, por me deixar conhecer sua vida e me inspirar pela sua determinação; à Nataly pelo conforto de suas palavras, por ser uma pessoa incrível e amável.

À minha orientadora Profa. Dra. Marília Miotto, sempre presente e atenciosa, por todo apoio, palavras, ensinamentos e paciência durante a produção deste trabalho, por ser uma pessoa incrível, humana e inspiradora.

Às minhas técnicas preferidas e amigas: Karin pela paciência e ajuda durante os experimentos, e Samira pelos conhecimentos acadêmicos e incentivos. Vocês são demais.

Ao Prof. Dr. Juliano De Déar Lindner e à Profa. Dra. Deise Helena Baggio Ribeiro por terem lecionado lindamente as matérias de microbiologia de alimentos, me instigando a procurar cada vez mais por essa área incrível.

Ao pessoal do Labcal, pessoas incríveis que me ajudaram a crescer como pessoa e profissional: Juci, Josiel, Mi, Malu, Aline, Alana e Gab. Em especial a Mi, Juci e Josiel por todo ensinamento e incentivo.

À Neoprospecta por todo auxílio durante este trabalho e pela oportunidade de visitar o laboratório. Agradeço em especial ao Rafael, Larissa e Luana pela atenção e ensinamentos.

A todos que não foram mencionados, mas que passaram pela minha vida e de alguma forma contribuíram para meu crescimento. Por fim, agradeço a banca pela oportunidade de avaliar e aprimorar este trabalho com suas sugestões.

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”.  
(Steve Jobs)

## RESUMO

Doenças transmitidas por alimentos representam um grave problema de saúde pública. Bactérias patogênicas vinculadas a alimentos como *Salmonella* spp. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são comumente associadas a casos de toxinfecções. Métodos para a identificação e quantificação de microrganismos em alimentos normalmente são baseados em métodos cultivo dependentes, os quais possuem procedimentos trabalhosos e muitas vezes demorados, prejudicando a rápida liberação dos resultados. Além disso, métodos cultivo dependentes não possuem a capacidade de detectar células no estado viável, mas não cultivável (VBNC). Como maneira de contornar esse problema métodos cultivo independentes foram desenvolvidos. Muitas dessas técnicas são baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), bem como métodos de sequenciamento do DNA, que permitem maior acurácia na determinação e identificação dos micro-organismos em diferentes matrizes. Porém, essas técnicas não podem diferenciar entre células viáveis e não viáveis. Após estudos viu-se a possibilidade da utilização de corantes fotorreativos como o Propídio monoazida (PMA), que são capazes de intercalar ao DNA das células mortas fazendo com que ele não possa ser amplificado. Diante disso, o objetivo deste trabalho é a avaliação do uso do Propídio monoazida (PMAxx) associado ao sequenciamento de DNA para identificação de células viáveis de *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* no leite UHT integral. Amostras de leite UHT foram contaminadas com suspensões bacterianas contendo células vivas, células mortas e células 80% mortas e 20% vivas, em concentrações variando de 2 Log UFC/mL a 5 Log UFC/mL, tratadas e não tratadas com PMAxx, para posterior sequenciamento de DNA. Primeiramente, dois tampões de lise foram avaliados para se determinar o mais adequado para este tipo de matriz, sendo que o método que utiliza o Neozol foi aquele com resultados mais adequados. Duas concentrações de PMAxx foram utilizadas e os resultados demonstraram que a concentração de 50 µM de PMAxx foi mais efetiva quando comparada com a concentração de 25 µM no tratamento das amostras contaminadas com suspensões bacterianas de células mortas. Entretanto, foi observado que o uso de 50 µM de PMAxx nas amostras com 2 Log UFC/mL de células vivas de *S. Thyphimurium* e *E. coli*, teve efeito citotóxico, sendo que, para as células vivas de *S. aureus* esse efeito foi mais acentuado nas concentrações celulares de 2 Log UFC/mL a 4 UFC/mL. Nas amostras contaminadas com mistura de células vivas e mortas, *S. aureus* não foi sequenciada em nenhuma das concentrações, *E. coli* apenas na concentração de Log 5 UFC/mL e *S. Thyphimurium* foi sequenciada em todas as concentrações. Contudo, seriam necessárias maiores concentrações de PMAxx nas células mortas de *S. Thyphimurium*, pois as mesmas tiveram seu DNA sequenciado em todas as concentrações celulares. Além disso, o sequenciamento de DNA se mostrou um método completo e eficiente para amostras complexas e de alta diversidade bacteriana como o leite. A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que o tratamento de amostras com PMAxx para identificação de bactérias viáveis em alimentos através do sequenciamento de DNA é um método promissor e que deve continuar a ser avaliado. Sugere-se, desta forma, a avaliação e otimização da concentração de PMAxx, tempo de encubação e de exposição a luz, bem como aplicação a diferentes matrizes alimentares e bactérias patogênicas.

**Palavras-chave:** Bactérias patogênicas. Métodos moleculares. Células viáveis.



## ABSTRACT

Foodborne diseases represent a serious public health problem. Foodborne pathogens such as *Salmonella* spp. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are commonly associated with cases of toxoinfections. Methods for the identification and quantification of microorganisms in foods are usually based on culture dependent methods, which have laborious and often timeconsuming procedures, hindering the rapid release of results. Also, culture dependent methods cannot detect cells in the viable but non-culturable state (VBNC). As an alternative for those problems, culture independent methods have been developed. Many of these techniques are based on Polymerase Chain Reaction (PCR), as well as DNA sequencing methods, which allow greater accuracy in the determination and identification of microorganisms in different matrices. However, these techniques cannot differentiate between viable and nonviable cells. Studies have shown that photo-reactive dyes such as propidium monoazide (PMA) can intercalate with DNA from dead cell bacteria so that it cannot be amplified. Therefore, the objective of this study is to evaluate the use of propidium monoazide (PMAxx) associated with DNA sequencing to identify viable cells of *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in whole UHT milk. UHT milk samples were contaminated with bacterial suspensions containing live cells, dead cells, and mixtures of 80% dead and 20% live cells, in concentrations ranging from 2 Log CFU/mL to 5 Log CFU/mL, treated and untreated with PMAxx and subsequent DNA sequencing. First, two lysis buffers were evaluated to determine the most suitable for this type of matrix, and the method using Neozol was the one with the most adequate results. Two concentrations of PMAxx were used and the results showed that the 50  $\mu$ M concentration of PMAxx was more effective when compared to the 25  $\mu$ M concentration in the treatment of samples contaminated with dead bacterial cell suspensions. Therefore, it was observed that the use of 50  $\mu$ M PMAxx in samples with 2 Log CFU/mL of living cells of *S. Thyphimurium* and *E. coli* had cytotoxic effect, and for living cells of *S. aureus* this effect was most pronounced in cell concentrations from 2 Log CFU/mL to 4 CFU/mL. In the samples contaminated with mixture of live and dead cell, *S. aureus* was not sequenced at any concentration, *E. coli* only at Log 5 CFU/mL concentration and *S. Thyphimurium* was sequenced at all concentrations. However, higher concentrations of PMAxx would be required in dead *S. Thyphimurium* cells, as they had their DNA sequenced at all cell concentrations. Besides, DNA sequencing has proven to be a complete and efficient method for complex and high bacterial diversity samples such as milk. From the results obtained it can be suggested that the treatment of samples with PMAxx for identification of viable bacteria in food through DNA sequencing is a promising method and should be further evaluated. Thus, it is suggested to evaluate and optimize PMAxx concentration, incubation time and light exposure, as well as application to different food matrices and pathogenic bacteria.

**Keywords:** Pathogenic bacteria. Molecular Methods. Viable cells.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Total de surtos de DTA notificados e doentes. Brasil, 2009 a 2018. ....	19
Figura 2 - Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA. Brasil, 2009 a 2018. ....	19
Figura 3 - Células não viáveis de E.coli 0157:H7 tratadas com PMA e EMA respectivamente, observadas por microscopia de fluorescência. ....	26
Figura 4 - Dideoxynucleotídeo e nucleotídeo respectivamente. ....	28
Figura 5 - Eletroferograma apresentando o resultado de sequenciamento de DNA. ....	29
Figura 6 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas, tratadas e não tratadas com 25 µM de PMAxx, que tiveram o DNA extraído utilizando o tampão Neozol.....	37
Figura 7 - Sequenciamento do DNA de amostras, contaminadas com células bacterianas, tratadas e não tratadas com 25 µM de PMAxx, que tiveram o DNA extraído utilizando o tampão NeoSampleZ. ....	37
Figura 8 - Sequenciamento do DNA das amostras, contendo apenas bactérias da microbiota do leite UHT tratadas e não tratadas com 25 µM de PMAxx, que tiveram o DNA extraído utilizando o tampão Neozol.....	38
Figura 9 - Sequenciamento do DNA das amostras, contendo apenas bactérias da microbiota do leite UHT tratadas e não tratadas com 25 µM de PMAxx, que tiveram o DNA extraído utilizando o tampão NeoSamplez. ....	39
Figura 10 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas mortas tratadas e não tratadas com PMAxx em concentrações de 25 µM e 50 µM.....	41
Figura 11 - Sequenciamento do DNA das amostras, contendo apenas bactérias da microbiota do leite UHT tratadas e não tratadas com PMAxx em concentrações de 25 µM e 50 µM.....	41
Figura 12 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas vivas, tratadas e não tratadas com 50 µM de PMAxx.....	43
Figura 13 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas 80% mortas e 20% vivas tratadas e não tratadas com 50 µM de PMAxx. ....	44
Figura 14 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas mortas tratadas e não tratadas com 50 µM de PMAxx.....	45
Figura 15 - Sequenciamento do DNA 16S rRNA das espécies bacterianas da microbiota inviável do leite UHT integral presentes nas amostras.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias identificadas nas amostras sem adição de PMAxX por sequenciamento 16S rRNA no nível de gênero e espécie. ....	46
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DTA - Doenças transmitidas por alimentos

EMA - Etídio monoazida

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PMA - Propídio monoazida

qPCR - PCR quantitativa

UFC – Unidades formadoras de colônia

VBNC - *Viable but non-culturable*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
<b>2.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1	DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS .....	18
3.2	PATÓGENOS ALIMENTARES .....	20
<b>3.2.1</b>	<b><i>Salmonella</i> spp.</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.2</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.3</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>22</b>
3.3	MÉTODOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS.....	23
<b>3.3.1</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase</b> .....	<b>24</b>
3.4	PROPÍDIO MONOAZIDA (PMA).....	26
3.5	SEQUENCIAMENTO DO DNA.....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1	AMOSTRA .....	31
4.2	PREPARO DAS SUSPENSÕES CELULARES BACTERIANAS VIVAS .....	31
4.3	PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES CELULARES BACTERIANAS MORTAS	31
4.4	CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DAS AMOSTRAS .....	32
<b>4.4.1</b>	<b>Preparação das suspensões celulares bacterianas 80% mortas e 20% vivas</b> .....	<b>32</b>
4.5	TRATAMENTOS COM PMA <sub>xx</sub> .....	33
<b>4.5.1</b>	<b>Preparo da solução de trabalho de PMA<sub>xx</sub></b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Tratamento com PMA<sub>xx</sub></b> .....	<b>33</b>
4.6	EXTRAÇÃO DO DNA.....	33
4.7	PROCEDIMENTOS DE PCR E SEQUENCIAMENTO DE DNA .....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>

5.1	AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO .....	36
5.2	EFETIVIDADE DO PROPIDIO MONOAZIDA.....	39
5.2.1	<b>Efetividade do tratamento com PMAxx sobre a microbiota da matriz alimentar .....</b>	<b>45</b>
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Toxinfecções alimentares ocasionadas por bactérias patogênicas têm sido reconhecidas como o problema de saúde pública mais abrangente no mundo atual, e com consequências importantes na saúde da população, além de expressivas perdas econômicas que afetam países, empresas e consumidores (NASCIMENTO, 2000; BUZBY; ROBERTS, 2009).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), alimentos contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas ou produtos químicos são responsáveis por 600 milhões de pessoas doentes e 420 mil mortes, por ano. Sendo que, esses alimentos inseguros custam às economias de baixa e média renda cerca de US\$ 95 bilhões em produtividade perdida a cada ano (FAO, 2019).

Dentre as bactérias patogênicas vinculadas a alimentos que são causadoras de toxinfecções, que podem até mesmo levar a óbito, pode-se citar, entre outras: espécies do gênero *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* patogênicas (XU *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016).

Para a detecção e quantificação de microrganismos em alimentos, como os citados acima, se utilizam métodos cultivo dependentes, os quais possuem procedimentos trabalhos e várias etapas durante a análise, o que acaba prejudicando a rápida liberação dos resultados (RODRIGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2015).

Além do mais, métodos cultivo dependentes podem não detectar células de crescimento lento, ou no estado viável, mas não cultivável (*viable but non-culturable* – VBNC) (KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013). O estado VBNC de bactérias é considerado um risco para saúde humana, devido ao fato das mesmas não serem detectadas pelo método de contagem em meio de cultura (DU *et al.*, 2007).

Devido a esses fatores e a rápida globalização nas últimas décadas do mercado de alimentos, alternativas têm sido desenvolvidas para otimizar os métodos tradicionais de detecção de micro-organismos, identificação e estudo da microbiota em diferentes alimentos (RODRIGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2007). Desta forma, estudou-se a utilização de métodos cultivo independentes, os quais atuam por meio do estudo do DNA ou RNA dos microrganismos em diversas matrizes e diferentes amostras. Muitas dessas técnicas são baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (COCOLIN *et al.*, 2013), bem como métodos de sequenciamento

do DNA, que possibilitam identificar diferentes genomas bacterianos contidos em uma mesma matriz alimentar (ALBERTS *et al.*, 2017; JAGADEESAN *et al.*, 2018).

Porém, a aplicação destas técnicas possui a limitação de não diferenciar entre células viáveis e não viáveis. Como forma de contornar esse problema, estudou-se a possibilidade da utilização de corantes fotorreativos capazes de intercalar ao DNA das células mortas. Propídio monoazida (PMA) e Etídio monoazida (EMA) baseiam-se na integridade das células bacterianas uma vez que somente intercalam com o DNA de células mortas, não viáveis ou danificadas (NOCKER; CAMPER, 2009).

Mais recentemente, tem-se a introdução do sequenciamento do DNA no campo da microbiologia de alimentos. Esta técnica vem sendo introduzida com o intuito de substituir a maioria dos métodos de identificação e caracterização em laboratórios de microbiologia, como sorotipagem, perfil de virulência, determinação de resistência antimicrobiana e métodos anteriores de tipagem molecular (GRANT *et al.*, 2018).

Dentro deste contexto, torna-se necessário o estudo da aplicabilidade de métodos independentes de cultivo associados a técnicas que eliminem a interferência de células não viáveis e que sejam realmente reprodutíveis para identificação de micro-organismos em matrizes alimentares.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso do propídio monoazida (PMAxx) associado ao sequenciamento de DNA para identificação de células viáveis de *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em leite UHT.

#### 2.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar o método de extração de DNA mais adequado para a matriz alimentar leite UHT;
- Avaliar a efetividade do pré-tratamento da amostra com propídio monoazida (PMAxx);
- Avaliar a interferência de diferentes níveis de contaminação da amostra na efetividade do tratamento com PMAxx e posterior sequenciamento de DNA;
- Avaliar a interferência de diferentes proporções de células bacterianas viáveis e não viáveis na amostra observando a efetividade do tratamento com PMAxx e posterior sequenciamento de DNA;
- Avaliar a interferência de três diferentes bactérias presentes em um mesmo tipo de amostra observando a efetividade do tratamento com PMAxx e posterior sequenciamento de DNA.
- Avaliar a aplicabilidade do PMAxx sobre as células bacterianas da microbiota natural da matriz alimentar, mortas pelo tratamento UHT e posterior sequenciamento de DNA.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

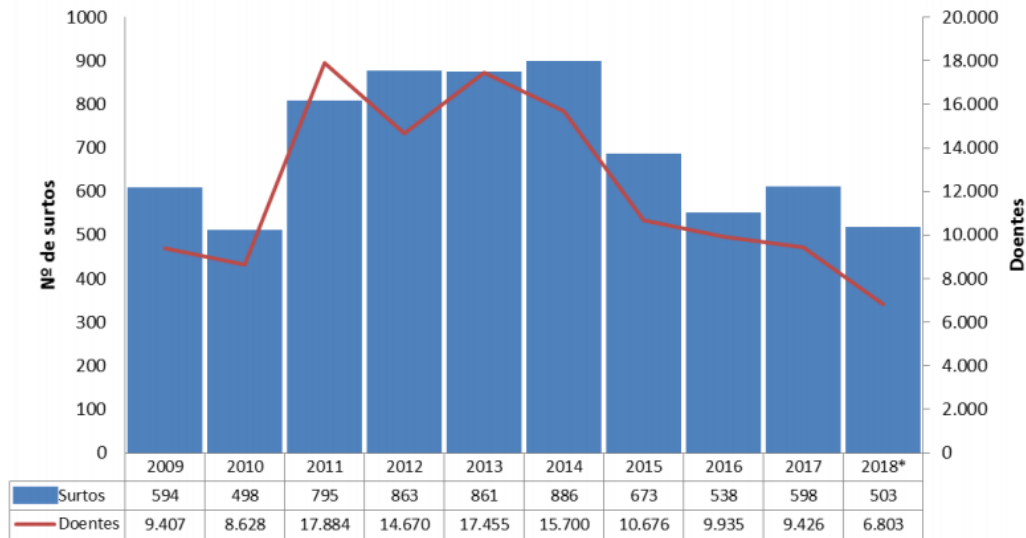
#### 3.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas por agentes etiológicos, dentre eles micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas, por meio da ingestão de alimentos e água contaminados (EMBRAPA, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que as doenças diarreicas estão entre as dez principais causas de mortes em todo o mundo. A taxa de mortalidade nos anos entre 2000 e 2016 diminuiu em quase 1 milhão, porém em 2016 ainda causou 1,4 milhões de mortes (WHO, 2018). Estima-se que até 70% dos episódios de diarreia possam ser causados por contaminações alimentares, das quais podem evoluir para casos mais graves como sequelas crônicas cardiovasculares, renais, articulares, respiratórias ou até mesmo ao sistema imune (KÄFERSTEIN, 2003).

Considera-se um surto de DTA, quando duas ou mais pessoas apresentam sinais e/ou sintomas iguais após ingerir água e/ou alimentos de mesma origem. No Brasil o monitoramento de surtos por contaminação alimentícia se deu início em 1999. A Figura 1 apresenta o total de surtos de DTA notificados e doentes no Brasil, nos anos de 2009 a 2018 (ANVISA, 2019).

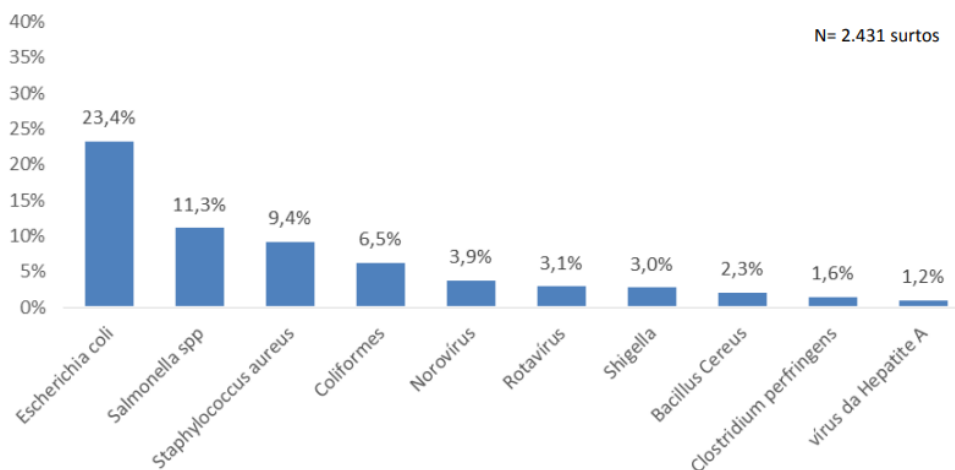
Figura 1 - Total de surtos de DTA notificados e doentes. Brasil, 2009 a 2018.



Fonte: ANVISA (2019).

Grande parte dos surtos de DTAs no Brasil são causados por bactérias. Dentre os dez agentes etiológicos mais identificados em surtos, os cinco mais recorrentes são: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, coliformes e *Bacillus cereus*. A porcentagem dos surtos entre os anos de 2000 a 2017, é observado na figura 2 (ANVISA, 2019).

Figura 2 - Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA. Brasil, 2009 a 2018.



Fonte: ANVISA (2019).

## 3.2 PATÓGENOS ALIMENTARES

Infecções transmitidas por alimentos é um problema que ainda está em fluxo. Patógenos já estabelecidos podem adquirir novas características e se desenvolverem em veículos alimentares diferentes dos já estudados, e ao mesmo tempo novos patógenos estão emergindo, enquanto que problemas antigos permanecem sem solução (TAUXE *et al.*, 2010).

Entre as bactérias patogênicas vinculadas a alimentos, pode-se citar: espécies do gênero *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* patogênicas (XU *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016).

### 3.2.1 *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp., é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae, que inclui espécies Gram-negativas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, em forma de bastonetes curtos, que representa um grande problema de saúde global (JAY, 2005). É um dos agentes patógenos mais conhecidos por transmitir doenças de origem alimentar para humanos e animais, trata-se da salmonelose, infecção com custo médico e econômico relativamente elevado, transmitida através de ovos contaminados, carnes e aves cruas, entre outros diversos grupos alimentares (NOWAK *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2015).

Segundo Dykes (2016), *Salmonella* spp. é encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais e geralmente infectam indivíduos pela via fecal-oral. Surto de salmoneloses são comumente associados com uma vasta gama de alimentos, os sintomas incluem febre, dores de cabeça, dor abdominal, diarreia aquosa, náusea.

Como já comentado, *Salmonella* spp. está presente em diversos alimentos, sendo que, aqueles com maior incidência são os produtos agrícolas que não passam por nenhum processamento, como as frutas e hortaliças, e os alimentos de origem animal, como carnes *in natura* (suína, bovina e pescados) ovos, leite e seus derivados. As contaminações desses alimentos podem ser de origem fecal direta, ocorrendo normalmente em produtos agrícolas, leite e ovos, devido a exposição dos mesmos à água contaminada, ou contaminação por manipulação, como no abate de animais (ANVISA, 2011).

A RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, regulamenta os padrões microbiológicos em alimentos, determinando os grupos alimentícios e os micro-organismos que devem ser pesquisados. A detecção de *Salmonella* spp. é exigida para boa parte dos grupos alimentícios, sendo seu resultado é expresso como ausência ou presença (ANVISA, 2001).

### 3.2.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica em forma de cocos, não formadora de esporos, sem motilidade, apresentando-se na forma de cadeias curtas e aglomeradas. São aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, gram-positivas e catalase positiva. Podem ser encontradas no ambiente, ar, poeira, esgoto, água, superfícies ambientais, em seres humanos e animais (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012).

O gênero *Staphylococcus* possui mais de 30 espécies, e as espécies são divididas em dois grupos: coagulase-negativas e coagulase-positivas. Dentre os de importância alimentar coagulase-positiva produtores de enterotoxina podemos citar seis: *S. aureus* subsp. *anaerobius*; *S. aureus* subsp. *aureus*; *S. intermedius*; *S. hyicus*; *S. delphini*; *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Contudo, o *S. aureus* é considerado o de maior importância, pois ele é frequentemente associado a inúmeras infecções, entre elas, a intoxicação alimentar (JAY, 2005).

*S. aureus* estão presentes na microbiota humana, encontrados nas membranas mucosas, bem como na pele, e principalmente nas mãos, desta forma o principal meio de contaminação é via contato manual ou por meio de secreções respiratórias (KLUYTMANS; WERTHEIM, 2005). A contaminação está associada ao manuseio inadequado de alimentos já processados/cozidos prontos para o consumo, seguindo de armazenamento inadequado, favorecendo o crescimento do *S. aureus* e a produção de enterotoxinas (STEWART *et al.*, 2002).

As intoxicações alimentares estafilocócicas são resultado do consumo de alimentos contaminados, contendo quantidades suficientes de uma ou mais enterotoxina pré formada por espécies de *Staphylococcus* que apresentam resultados positivos no teste de coagulase, embora espécies de coagulase negativas também já foram associadas a produção de toxinas. Essas enterotoxinas são potentes exotoxinas gastrointestinais produzidas pelo micro-organismo em sua fase de crescimento ou na fase de transição da fase exponencial para fase estacionária (ARGUDIN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

Os sintomas de intoxicação por estafilococos coagulase positiva aparecem normalmente dentro de quatro horas após a ingestão de alimentos contaminados (JAY, 2005). Sintomas como náusea, dores abdominais, vômito, diarreia e sudorese fria (HENNEKINNE;

DE BUYSER; DRAGACCI., 2012) geralmente tem duração de 24 a 48 horas, e a taxa de mortalidade é baixa ou muitas vezes nula (JAY, 2005).

As contagens máximas de estafilococos coagulase positiva estabelecidas pela RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, variam de acordo com grupo alimentício, porém o maior valor aceito é de  $5 \times 10^3$  UFC/g. Dentre os alimentos citados temos: hortaliças, legumes e similares minimamente processados; produtos cárneos; pescados; leite e derivados; produtos processados; produtos prontos para o consumo; entre outros (ANVISA, 2001).

### 3.2.3 *Escherichia coli*

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo não esporulado, pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes, incluída na família das enterobactérias, são aeróbicas e anaeróbicas facultativas, capazes de fermentar a lactose, com produção de gás entre 24 a 48 horas a temperatura de 44,5°C a 45,5°C (KORNACKI, JOHNSO, 2001; JAY, 2005). As enterobactérias são amplamente utilizadas como indicadores de higiene para produtos e ambiente, sendo a bactéria *E. coli* considerada o melhor indicador de contaminação fecal em alimentos (JAY, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

*E. coli* tem como ambiente natural o trato intestinal do homem e de animais de sangue quente, além disso, essa bactéria pode contaminar águas de rios e mares através do despejo de esgoto não tratado (ISHII; SADOWSKY, 2008). Contudo, a maioria das cepas que colonizam o trato gastrointestinal não possuem virulência, vivem inofensivamente nos intestinos de indivíduos saudáveis ou desempenham papel na manutenção do funcionamento intestinal (GOMES *et al.*, 2016).

Porém, algumas cepas de *E. coli* são patogênicas podendo causar graves doenças ao homem, sendo classificadas, de acordo com seus mecanismos de virulência, em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC), *E. coli* êntero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregantiva-hemorrágica (EAHEC) (GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2016; GOMES, *et al.*, 2016).

Cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), estão relacionadas com um amplo espectro de doenças, que podem ser desde diarreias leves à colite hemorrágica (CH) e a síndrome hemolítica urêmica (SHU), cujo agravamento da doença pode levar a falência renal.

(BERTÃO; SARIDAKIS, 2007). Os sintomas indicativos desta síndrome são fezes vermelhas sanguinolentas, devido à presença da bactéria no cólon, e em alguns casos febre (JAY, 2005).

Os principais alimentos associados a infecção por STEC são os de origem animal, sendo a carne bovina a de maior incidência (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007).

Cepas patogênicas de *E. coli* são consideradas um risco a saúde humana por provocar doenças diarréicas, como a diarreia aguda, que é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, com prevalência em crianças e jovens, ocorrendo principalmente em países em desenvolvimento (GOMES *et al.*, 2016).

### 3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

Os métodos microbiológicos convencionalmente propostos para detecção e quantificação de bactérias patogênicas veiculadas a doenças alimentares são focados em métodos cultivo dependentes. Os mesmos são considerados padrão por órgãos regulamentários, porém, muitas vezes são demorados e trabalhosos, pois utilizam grandes quantidades de meios de cultivo, possuem procedimentos laboriosos, prolongado tempo para obtenção de resultados, além de possuírem etapas de enriquecimento, confirmações bioquímicas e sorológicas (RODRIGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2015).

Pode-se ter como exemplo o método ISO 6579-1: ano para detecção de *Salmonella* spp., o qual se inicia com um pré-enriquecimento em Buffered Peptone Water (BPW), seguido de um enriquecimento seletivo em Rappaport-Vassiliadis (RVS) e Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (MKTTn), estriamento em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e um segundo ágar seletivo, após incubação as colônias típicas de *Salmonella* spp são isoladas em ágar nutriente, por fim se faz a triagem bioquímica e sorologia. Ou seja, todo esse processo dura em torno de 6 a 7 dias para se ter um resultado de presença ou ausência de *Salmonella* spp., dificultando o rápido resultado e a liberação de laudos técnicos (ISO, 2017).

Além disso, métodos clássicos não possuem a capacidade de detectar as células bacterianas em estado viável, mas não cultivável (VBNC) (RODRIGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2007).

O estado VBNC é considerado um mecanismo de defesa encontrado em microrganismos quando os mesmos se encontram em ambientes de estresse, sendo capazes de

se manter nesses locais como células vegetativas com baixo metabolismo. Bactérias quando encontradas nesse estado não são detectadas por técnicas de cultivo tradicionais. Contudo, quando as condições ambientais voltam a estar favoráveis os microrganismos voltam ao seu estado metabólico ativo (HEIM *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2014).

Segundo Du *et al.* (2007), o mecanismo utilizado pelas bactérias para entrar no estado VBNC representa um risco para saúde humana, pois se algumas células estiverem nesse estado elas não podem ser detectadas pelo método de contagem (UFC) em meio de cultivo, e o resultado total de bactérias viáveis em uma amostra será subestimado. Ou, se todas as bactérias da amostra estiverem nesse estado, o resultado pode ser um falso negativo. Desta forma, a subestimação e/ou a não detecção de células microbianas em amostras de alimentos, água ou clínicas, quando se tratando de bactérias patogênicas, representam um sério problema para saúde pública, uma vez que essas bactérias recuperam sua virulência após ressuscitação em células cultiváveis quando voltam a ter condições favoráveis (DU *et al.*, 2007).

No final da década de 90, surgem os métodos independentes de cultivo na área da microbiologia de alimentos, os quais não necessitam de meios de cultura para detecção de micro-organismos em um ambiente ou uma matriz específica. Métodos que desde então vem sendo vastamente empregados (COCOLIN; ERCOLINI, 2008)

Ao contrário dos métodos cultivo dependentes, os métodos rápidos ou métodos independentes de cultivo, possuem um tempo reduzido para obtenção dos resultados, permitem um processamento de um grande número de amostras em curto tempo, são geralmente fáceis de manuseio, precisos (sensibilidade, especificidade, baixos níveis de detecção) e podem ser economicamente lucrativos, apesar de requererem um considerável investimento inicial. Contudo, deve-se salientar que em muitos casos o uso desses métodos não exclui o estágio inicial de enriquecimento das amostras, e quando os resultados forem positivos devem ser confirmados pelos métodos tradicionais de referência (SORRIBES, 2008).

Estes métodos além de possuírem as vantagens citadas acima permitem o estudo de microrganismos no estado VBNC, pois os mesmos identificam os microrganismos não pela habilidade de se multiplicarem em meios de cultivo específico, mas sim em função do seu DNA, RNA ou proteínas alvo específicas. Muitas técnicas cultivo independentes, bem como métodos moleculares, são baseados na Reação em Cadeia da Polimerase do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (MALORNY *et al.*, 2003; COCOLIN *et al.*, 2013).

### **3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase**



A PCR é um ensaio que possibilita a amplificação *in vitro* de um fragmento específico de ácido nucleico de um complexo conjunto de DNA. A técnica de PCR pode ser executada utilizando diferentes fontes de DNA, como saliva, pele, sangue e microrganismos (MULLINS, 1990).

O processo de PCR reproduz *in vitro* o mecanismo biológico de replicação do DNA celular. A replicação ocorre por meio de iniciadores, e da enzima DNA Polimerase. Nesta reação, utilizam-se iniciadores, que se ligam as extremidades do segmento de interesse a ser amplificado, permitindo que o segmento seja amplificado de forma exponencial e cópias sejam geradas em curto tempo (LIPP *et al.*, 2005).

A PCR inclui três diferentes etapas que ocorrem em ciclos de temperatura repetidos. Primeiramente ocorre a etapa da desnaturação com uso de altas temperaturas ( $\sim 95^{\circ}\text{C}$ ), seguindo de uma redução na temperatura para que ocorra o anelamento e, por último, ocorre a extensão ( $\sim 75^{\circ}\text{C}$ ) impulsionando a enzima DNA Polimerase a síntese de DNA (SHU *et al.*, 2019). A temperatura aplicada na etapa de anelamento depende dos iniciadores escolhidos para a reação e também da força iônica da solução empregada. Após o processo de PCR as amostras são submetidas à eletroforese para que os resultados obtidos sejam analisados (KUBISTA *et al.*, 2006).

Com embasamento na PCR convencional ou qualitativa, foi desenvolvida a PCR em Tempo Real, a qual representou um grande avanço tecnológico e científico, visto que tem como função aumentar e inovar as aplicações para diferentes linhas de pesquisa, devido a sua grande sensibilidade de detecção, a possibilidade de acompanhar em tempo real a formação dos produtos da PCR e ainda possibilita a quantificação das cópias do fragmento estudado (ANDERSEN *et al.*, 2006).

A PCR em Tempo Real fundamenta-se na PCR convencional e é considerada uma das técnicas mais importantes e utilizadas atualmente para quantificação de micro-organismos em alimentos (COCOLIN *et al.*, 2013). Bustine *et al.* (2009) propôs a abreviação “qPCR” para se referir a PCR quantitativa em publicações de trabalhos que fizessem a utilização dessa técnica.

Apesar de ser uma técnica muito utilizada para detecção e quantificação de patógenos, a mesma apresenta limitações, como o fato de não fazer diferenciação entre células bacterianas viáveis e não viáveis, pois o DNA de células mortas de bactérias pode ser detectado por PCR muitos dias após a bactéria ter perdido a viabilidade celular (ALLMANN *et al.*, 1995). Com

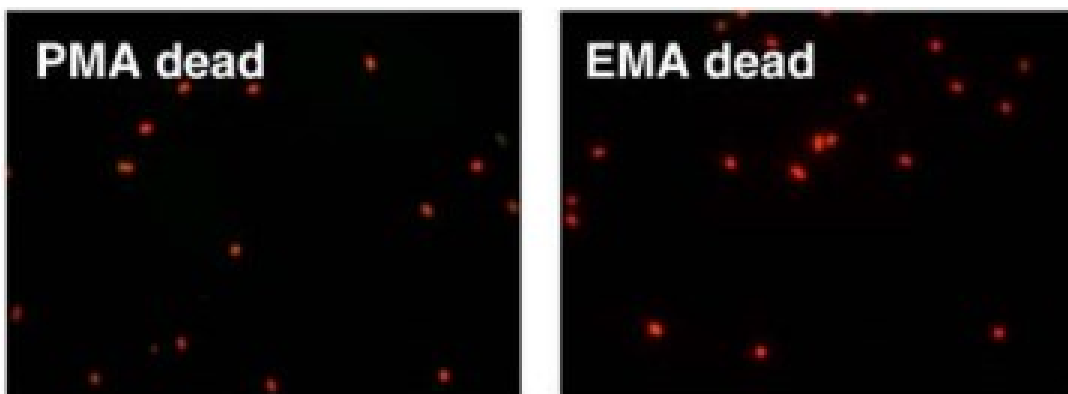
isso a amplificação de células não viáveis pode produzir um falso positivo, resultado da presença de células mortas de micro-organismos na amostra (NOCKER; CAMPER, 2009).

### 3.4 PROPÍDIO MONOAZIDA (PMA)

Como forma de minimizar os problemas de ampliação de células não viáveis, uma estratégia foi desenvolvida baseada na utilização de corantes foto-reativos que são capazes de intercalar o DNA, corantes como o propídio monoazida (PMA) e o etídio monoazida (EMA) são aptos de penetrar seletivamente na membrana celular de células mortas e/ou com a membrana danificada, e se ligarem somente ao DNA de células mortas, não viáveis e/ou danificadas, inibindo a atividade da enzima Polimerase, resultando em um DNA que não pode ser amplificado pela PCR (NOCKER; CAMPER, 2006; RUDI *et al.*, 2005; NOCKER; CAMPER, 2009).

Na figura 3 é possível observar através de uma microscopia de fluorescência células mortas da bactéria patogênica *E.coli* eficientemente coradas de vermelho pelos corantes PMA e EMA respectivamente (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006).

Figura 3 - Células não viáveis de *E.coli* 0157:H7 tratadas com PMA e EMA respectivamente, observadas por microscopia de fluorescência.



Fonte: Adaptado de Nocker, Cheung e Camper (2006).

Apesar do EMA também ser utilizado para inibir a amplificação de células não viáveis, estudos tem demonstrado que sua composição é altamente tóxica para células viáveis de algumas espécies de microrganismos, podendo resultar em uma grande perda de DNA das células integras. Além disso, a performance do corante PMA supera o EMA na não

amplificação de células mortas, pelo fato do PMA ser mais impermeável às células viáveis (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; NOCKER; SOSSA; CAMPER, 2007; PAN; BREIDT, 2007).

Estudos realizados por Taskin, Gozen e Duran, (2011); Yang, Badoni e Gill, (2011); Zhu *et al.*, (2012); Wu, Liang e Kan, (2015); Banihashemi, Van Dyke e Huck, (2015) demonstraram resultados interessantes utilizando o PMA associado a diferentes métodos de cultivo, a fim de evitar falsos positivos na detecção de diferentes espécies de microrganismos em diversas matrizes alimentares.

A utilização do PMA no tratamento de amostras submetidas a qPCR é um método promissor, considerado rápido e eficiente, apresentando boa reprodutibilidade para detecção e quantificação de micro-organismos viáveis em amostras, sendo uma excelente alternativa de substituição para os métodos clássicos de contagem em placas (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; NOCKER; SOSSA; CAMPER, 2007).

### 3.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA

Atualmente o DNA deixou de ser assunto apenas da área acadêmica e passou a ser assunto de interesse para a sociedade, principalmente quando o enfoque são os diagnósticos de doenças, bem como aquelas adquiridas por vírus, bactérias e protozoários (HEPP; DE NONOHAY, 2016). O desenvolvimento de técnicas capazes de determinar de forma simples e rápida o sequenciamento do DNA purificado se deu início na década de 70, sendo que o método mais utilizado é conhecido pelo “Sequenciamento de Sanger” (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977; ALBERTS *et al.*, 2017).

No início dos anos 90, utilizando o método desenvolvido por Frederick Sanger, a revolução do sequenciamento do genoma bacteriano foi instalada, por meio de projetos que proporcionavam o sequenciamento de genomas de bactéria modelo, como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (BLATTNER *et al.*, 1997; KUNST *et al.*, 1997). Contudo, nos dias atuais, métodos mais baratos e rápidos foram desenvolvidos e são comumente utilizados para sequenciar o DNA, possibilitando que uma única pessoa complete a sequência em poucas horas (ALBERTS *et al.*, 2017).

Como já comentado, através de técnicas moleculares é possível fazer o isolamento do DNA dos demais constituintes celulares, promover cortes em regiões da molécula, multiplicar a quantidade de cópias, separar as regiões e determinar sequências específicas de nucleotídeos do DNA de qualquer organismo (HEPP; DE NONOHAY, 2016).

O método desenvolvido por Frederick Sanger e colaboradores, consiste na síntese da fita de DNA utilizando nucleotídeos modificados (dideoxynucleotídeo), os quais são ausentes da hidroxila na posição 3' da desoxirribose (ddNTPs) (Fig 4) e são marcados com corante de cor diferente e específica (ALBERTS *et al.*, 2017; CLARK; DOUGLAS; CHOI, 2019).

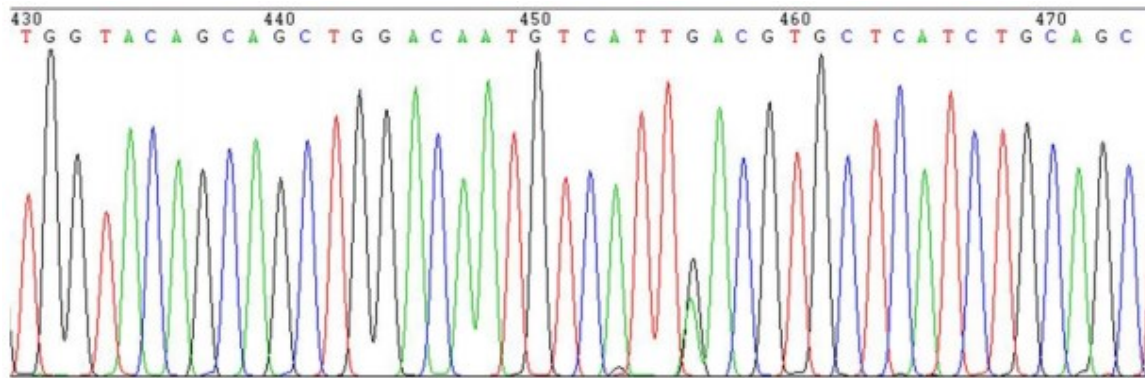
Figura 4 - Dideoxynucleotídeo e nucleotídeo respectivamente.



Fonte: Adaptado de Clark, Douglas e Choi (2019).

O processo de sequenciamento é muito similar ao de replicação de DNA por PCR, sendo que a diferença está na utilização de dideoxynucleotídeo (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP). Na síntese normal do DNA, o grupo 3' hidroxila auxilia a ligação de um novo nucleotídeo na cadeia existente, diferencialmente quando dideoxynucleotídeos são adicionados não há nenhuma hidroxila disponível, sendo assim, nenhum outro nucleotídeo consegue ser adicionado e a cadeia termina com um dideoxynucleotídeo corado em uma cor específica. Ao final de repetidos ciclos de replicação do DNA alvo, cada extremidade dos fragmentos é marcada com corantes que indica o nucleotídeo final. No fim da reação, os fragmentos são lidos em um detector de fluorescência que por meio das cores emitidas pelos dideoxynucleotídeos consegue construir a sequência original do DNA alvo. O resultado do sequenciamento DNA é lido por eletroferogramas (Fig 5), onde cada dideoxynucleotídeo apresenta um pico de cor diferente. Hoje, o sequenciamento é realizado de maneira automatizada em equipamentos que realizam a eletroforese em capilares (HEPP; DE NONOHAY, 2016; CLARK; DOUGLAS; CHOI, 2019).

Figura 5 - Eletroferograma apresentando o resultado de sequenciamento de DNA.



Fonte: Adaptado de Hepp e De Nonohay (2016).

Após 20 anos do sequenciamento do genoma bacteriano, combinado com análises conduzidas por bioinformática, a percepção foi ampliada com relação a como bactérias funcionam, evoluem e interagem umas com as outras, com seus hospedeiros e com o ambiente (LOMAN; PALLEN, 2015).

O sequenciamento do DNA, que permite maior acurácia na determinação e identificação dos micro-organismos em diferentes matrizes, incluindo aqueles não cultiváveis e que permite a identificação simultânea de uma ampla variedade de espécies, vem revolucionado a microbiologia de alimentos (BELL *et al.*, 2013; TANTIKACHORNKIAT *et al.*, 2016).

No setor da indústria de alimentos, o sequenciamento do genoma bacteriano está cada vez ganhando mais espaço, devido a busca pela melhoria na qualidade dos produtos e a segurança de alimentos que essa tecnologia proporciona. Com esse mecanismo é possível prever características de virulência, resistência a antimicrobianos de micro-organismos patogênicos, identificar a capacidade de bactérias deteriorantes de quebrarem as barreiras de preservação de produtos, e, além disso, ajudar a distinguir micro-organismos já presentes no ambiente de produção daqueles que foram introduzidos depois por algum meio de contaminação. Por meio desses conhecimentos, a indústria alimentícia pode rastrear a fonte de contaminação, solucionar e prevenir problemas de contaminação (RANTSIOUA *et al.*, 2018).

Inicialmente, o sequenciamento era utilizado para análises de detecção de fontes de surtos de origem alimentar, atualmente em alguns países como Reino Unido, Dinamarca,

França e Estados Unidos, essa tecnologia foi implementada como forma de vigilância preventiva de patógenos de origem alimentar (JAGADEESAN *et al.*, 2018).

O sequenciamento prevê a presença ou emergência de patógenos e microrganismos deteriorantes com base nas alterações observadas em comunidades microbianas inteiras, bem como no potencial de caracterização de microbiotas desconhecidas. Além do mais, com apenas uma execução de sequenciamento é possível identificar diferentes genomas bacterianos contidos em uma única amostra (JAGADEESAN *et al.*, 2018).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA

A matriz alimentar escolhida para os ensaios foi leite UHT integral. O mesmo foi escolhido por se tratar de uma matriz alimentar em estado líquido, o que facilita a preparação da amostra durante os ensaios. Através do processo UHT garante-se a ausência de células viáveis o que permite ensaios em condições mais controladas. O leite, por ser uma matriz complexa, permite avaliar a interferência da matriz nos resultados.

### 4.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES CELULARES BACTERIANAS VIVAS

*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Thyphimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram inoculadas em caldo de infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 35°C *overnight*. Após verificada turbidez nos tubos, as células bacterianas foram colhidas por centrifugação (12.000 rpm por 5 min) e os sedimentos celulares (*pellets*) foram ressuspensos em solução de NaCl estéril a 0,90% (p/v). Em um tubo estéril as três suspensões bacterianas foram misturadas e homogeneizadas com auxílio de vortex a fim de obter-se um mix de suspensões contendo células das três bactérias citadas anteriormente. A turbidez da suspensão bacteriana preparada foi ajustada ao padrão de 0,5 da escala Mc Farland (absorbância de 0,08 a 0,1 a 625 nm). As contagens de UFC/mL foram confirmadas utilizando ágar seletivos de acordo com as ISO (11290-1:2017; 16649-3:2015; 6579-1:2017; 6888-1:1999) para cada bactéria, sendo eles: xilose lisina desoxicolato (XLD) para *Salmonella* Thyphimurium; glucuronida de bilis triptona (TBX) para *E. coli*; *Baird-Parker* (BP) para *S. aureus*. Também se realizou contagem (ISO 4833-1:2013) em ágar infusão cérebro coração (BHI). Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35° C por 24 h.

### 4.3 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES CELULARES BACTERIANAS MORTAS

Metade do volume da suspensão bacteriana preparada conforme descrito no item 4.2 foi tratado termicamente para a obtenção de células bacterianas mortas/não viáveis. Para isso, foi

submetida a tratamento térmico de 100°C por 10 min em banho maria. Com o objetivo de se confirmar o efeito do calor na morte celular, foi plaqueado 100 µl da suspensão em ágar BHI e também a passagem de 1 mL para caldo BHI. A ausência de formação de colônias em placas e ausência de turbidez no caldo após incubação a 35°C durante 24 horas, confirmou a eficácia do tratamento.

#### 4.4 CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DAS AMOSTRAS

A fim de avaliar a efetividade do PMAxx em se ligar às células não viáveis das bactérias do estudo em amostras de leite UHT para posterior sequenciamento, amostras de leite foram artificialmente contaminadas com as bactérias em diferentes proporções de células vivas e mortas, sendo elas: 100:0, 0:100 20:80 (v/v).

Diluições decimais seriadas foram preparadas com as suspensões bacterianas, tanto vivas quanto mortas, a fim de se obter suspensões do mix de bactérias com contagens variando de 3 Log UFC/mL até 6 Log UFC/mL. Com o objetivo de preparar amostras de leite contaminadas com as bactérias do estudo, amostras de leite UHT integral foram artificialmente contaminadas com as suspensões bacterianas para obter-se contaminações da ordem de 2 Log UFC/mL a 5 Log UFC/mL.

O número das contagens de UFC/mL em cada diluição foi obtido por método padrão de contagem em placa usando meios seletivos específicos para cada espécie de bactéria, conforme descrito no item 4.2.

##### **4.4.1 Preparação das suspensões celulares bacterianas 80% mortas e 20% vivas**

A partir das diluições decimais seriadas de 3 Log UFC/mL a 6 Log UFC/mL das suspensões bacterianas vivas e mortas citadas no item acima, foram feitas suspensões contendo 80% de células mortas e 20% de células vivas. Para isso, foram adicionados em tubos estéreis 2 mL das diluições bacterianas vivas e 8 mL das diluições bacterianas mortas, resultando em um mix contendo suspensões de células bacterianas vivas e mortas. O processo de contaminação das amostras de leite UHT integral foi realizado conforme o item 4.4.



## 4.5 TRATAMENTOS COM PMAxx

### 4.5.1 Preparo da solução de trabalho de PMAxx

No presente trabalho foi utilizado o PMAxx 20 mM em água 100 uL (Biotium®). Este, ficou armazenado protegido da luz a -20°C. Para a condução dos ensaios foram preparadas soluções de trabalho com concentrações de 25 µM e 50 µM, utilizando água para PCR. As soluções de trabalho foram armazenadas protegidas da luz a -20°C até a utilização nos ensaios.

### 4.5.2 Tratamento com PMAxx

Aliquotas de 500 µl de amostra (250 uL de leite UHT integral + 250 uL de tampão fosfato salino (PBS)) foram transferidas para microtubos de 2 mL estéreis. A solução de trabalho de PMAxx foi adicionada às amostras a fim de se obter uma concentração final de 25 µM ou de 50 µM (dependendo do experimento) de PMAxx em cada uma das amostras.

Os microtubos foram incubados no escuro por 5 min sob constante agitação. Após os 5 min, as amostras foram expostas a uma fonte de luz LED (comprimento de onda de 465-475 nm) utilizando o equipamento PMA-Lite™ LED Photolysis Device (Biotium) durante 15 min. A cada minuto os microtubos foram invertidos para completa mistura, processo este que permite que a luz entre em contato com a amostra de forma homogênea. O objetivo da exposição das amostras a luz de LED é permitir que o PMAxx se ligue covalentemente com o DNA das células mortas, bloqueando este para as reações de PCR.

Amostras tratadas e não tratadas com PMAxx foram utilizadas para dar seguimento às análises. Como controle, amostra de leite UHT sem contaminação, com e sem adição do PMAxx, foram incluídas nos ensaios. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

## 4.6 EXTRAÇÃO DO DNA

Inicialmente as amostras de leite com contaminação de 3 e 5 Log UFC/mL, de células mortas e vivas, tratadas e não tratadas com PMAxx, foram submetidas a dois diferentes métodos

de extração, de maneira a definir o método mais adequado para ser utilizado no decorrer das análises. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As amostras com e sem PMAxx já contidas nos microtubos, como descrito no item 4.5.2, foram submetidas a um processo de lavagem. As mesmas foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 min em temperatura ambiente (18 °C), após os 10 min foi retirado o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 500 uL de tampão fosfato salino (PBS), esse processo foi repetido. Depois, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspensão em um tampão de lise celular. Para cada método de extração foi utilizado um tampão de lise específico, as quantidades adicionadas nas amostras foram: 250 uL de Neozol e 1000 uL de NeoSampleZ, respectivamente.

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo desenvolvido pela Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil. Este método baseia-se na extração manual por beads magnéticas, e conta com uma etapa de lise celular baseada em tampões descritos na literatura e processo térmico.

#### 4.7 PROCEDIMENTOS DE PCR E SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para acessar o microbioma da amostra, foi utilizada uma metodologia proprietária (Food Plex 1) da Neopropecta, que através de sequenciamento de alto desempenho, realiza a identificação taxonômica de bactérias com base nas porções conservadas e variáveis de diversos genes específicos para *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus/thuringiensis*, *Escherichia coli*, além do gene 16S rRNA (primers 341F e and 806R) universal (CAPORASO *et al.*, 2012; WANG; QIAN, 2009). Após extração de DNA das amostras, foram realizadas reações de PCR seguindo protocolo previamente descrito (CHRISTOFF *et al.*, 2019). Primeiramente, foi realizada uma primeira PCR contendo sequências baseadas nos adaptadores TruSeq da Illumina, permitindo uma segunda PCR utilizando primers com sequências indexadas. As reações de PCR foram feitas em triplicata usando Taq Platinum (Invitrogen, EUA) com as seguintes condições: PCR1) 95°C por 5 min, 25 ciclos de 95°C por 45 s, 55°C por 30 s e 72°C por 45 s e uma extensão final de 72°C por 2 min; PCR2) 95°C por 5 min, 10 ciclos de 95°C por 45 s, 66°C por 30 s, 72°C por 45 s e uma extensão final de 72°C por 2 min. A reação final foi purificada usando AMPureXP (Beckman Coulter, Brea, CA) e as amostras foram agrupadas em bibliotecas para a quantificação por PCR em tempo real utilizando o kit KAPA Library Quantification (KAPA

Biosystems, Woburn, MA). Os pools de bibliotecas foram sequenciados utilizando o sequenciador de DNA next-generation MiSeq (Illumina Inc., USA) e os kits V2 300 ou V2 de 500 ciclos, em um formato single-end, sem normalização das bibliotecas.

As sequências de DNA resultantes do sequenciamento foram analisadas através de um pipeline proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil), considerando no máximo 1% de erro acumulado no sequenciamento. Para a identificação das espécies de microrganismos presentes nas amostras, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados proprietário contendo diversas sequências de DNA já previamente caracterizadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

A escolha de um método de extração é crucial para garantir a sensibilidade e eficiência durante análises, fornecendo um DNA íntegro, em quantidades suficientes e livre de inibidores (SANTOS *et al.* 2010). Processos de extração de DNA bacteriano continuam sendo um desafio, especialmente quando se trata de matrizes alimentares e amostras com uma microbiota complexa. Dependendo das características da amostra, alguns métodos fornecem um alto rendimento de DNA, enquanto outros podem gerar uma melhor pureza do DNA (VANYSACKER *et al.*, 2010).

No presente trabalho, a escolha do método de extração foi realizada através da observação dos resultados obtidos no sequenciamento do DNA, ou seja, foram comparados os valores da proporção, que se refere ao número de vezes que o microrganismo foi sequenciado por amostra, nos gráficos apresentados no decorrer do estudo essa informação é representada pelo eixo Y com a respectiva denominação: número de sequências (%).

Primeiramente, avaliaram-se os resultados das amostras de leite UHT, tratadas e não tratadas com PMA, sem contaminação artificial com as bactérias do estudo, que serviram como controle nos ensaios. O objetivo foi verificar se nessas amostras, células das bactérias do estudo poderiam estar previamente presentes, sendo então amplificadas pelas PCR's e posteriormente sequenciadas. Através dos resultados, pode-se observar que não apareceu no sequenciamento DNA de *E. coli*, *S. aureus* e *S. Typhimurium* nas amostras controle.

Foram testados dois diferentes protocolos de extração de DNA, sendo um deles utilizando o tampão de lise Neozol e o outro o tampão de lise NeoSampleZ. Apesar de resultados muito semelhantes, o protocolo com tampão de lise celular Neozol sequenciou todas as bactérias utilizadas na contaminação artificial das amostras e apresentou maior número de sequências de DNA (%), quando comparado ao outro protocolo. Utilizando o tampão de lise NeoSampleZ, células de *Staphylococcus aureus* não foram sequenciadas em boa parte das amostras, o que indicou uma má eficiência desse protocolo. Nas figuras 6 e 7 podem ser observados os resultados do sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas com concentração de Log 3 UFC/mL e Log 5 UFC/mL, tratadas e não tratadas com PMAxx, que tiveram o DNA extraídos por dois diferentes protocolos.

Figura 6 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas, tratadas e não tratadas com 25  $\mu$ M de PMAxx, que tiveram o DNA extraído utilizando o tampão Neozol.

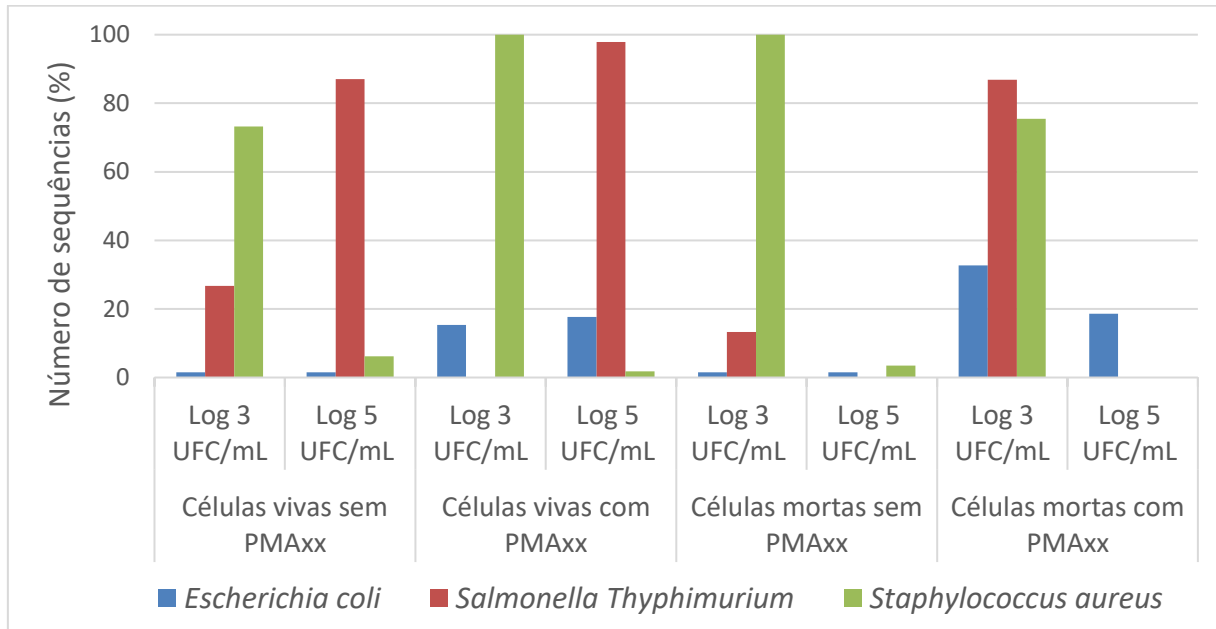
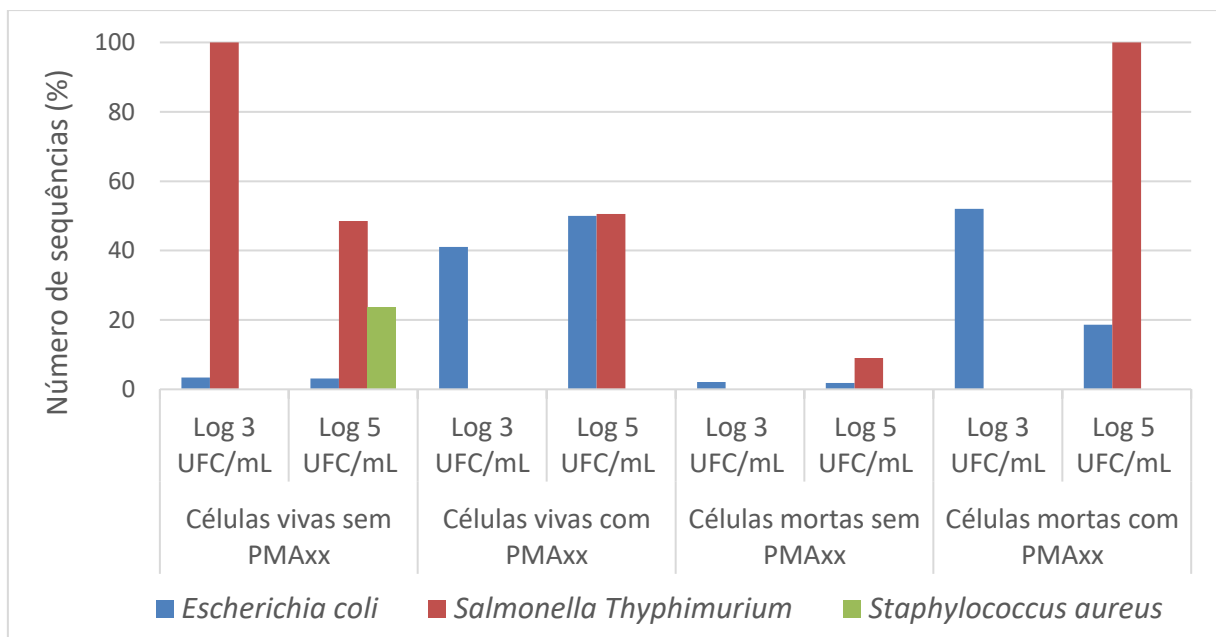


Figura 7 - Sequenciamento do DNA de amostras, contaminadas com células bacterianas, tratadas e não tratadas com 25  $\mu$ M de PMAxx, que tiveram o DNA extraído utilizando o tampão NeoSampleZ.



O efeito dos dois diferentes protocolos de extração de DNA, também foram avaliados para o sequenciamento do DNA das bactérias da microbiota do leite, não viáveis devido ao tratamento UHT. Novamente o tampão Neozol foi o mais efetivo, pois apresentou maior número de sequências de DNA (%), quando comparado ao outro protocolo que utilizou o tampão NeoSampleZ. Estas observações estão representadas nas figuras 8 e 9.

Devido a isto, os experimentos seguintes foram conduzidos utilizando o protocolo de extração com o tampão de lise Neozol.

Figura 8 - Sequenciamento do DNA das amostras, contendo apenas bactérias da microbiota do leite UHT tratadas e não tratadas com 25  $\mu$ M de PMAxx, que tiveram o DNA extraído utilizando o tampão Neozol.

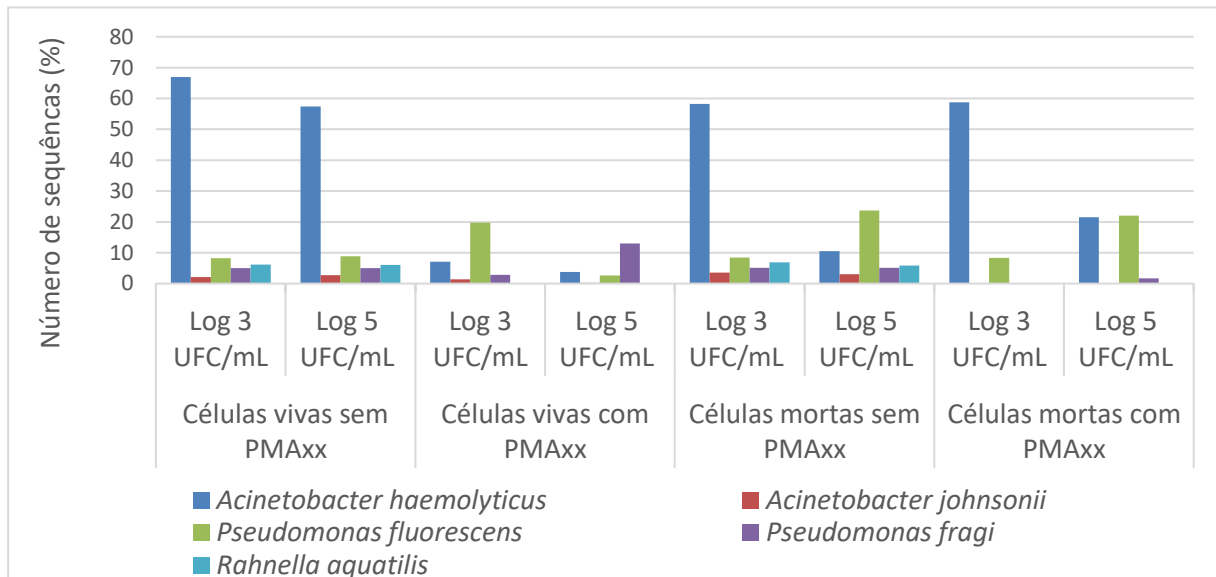
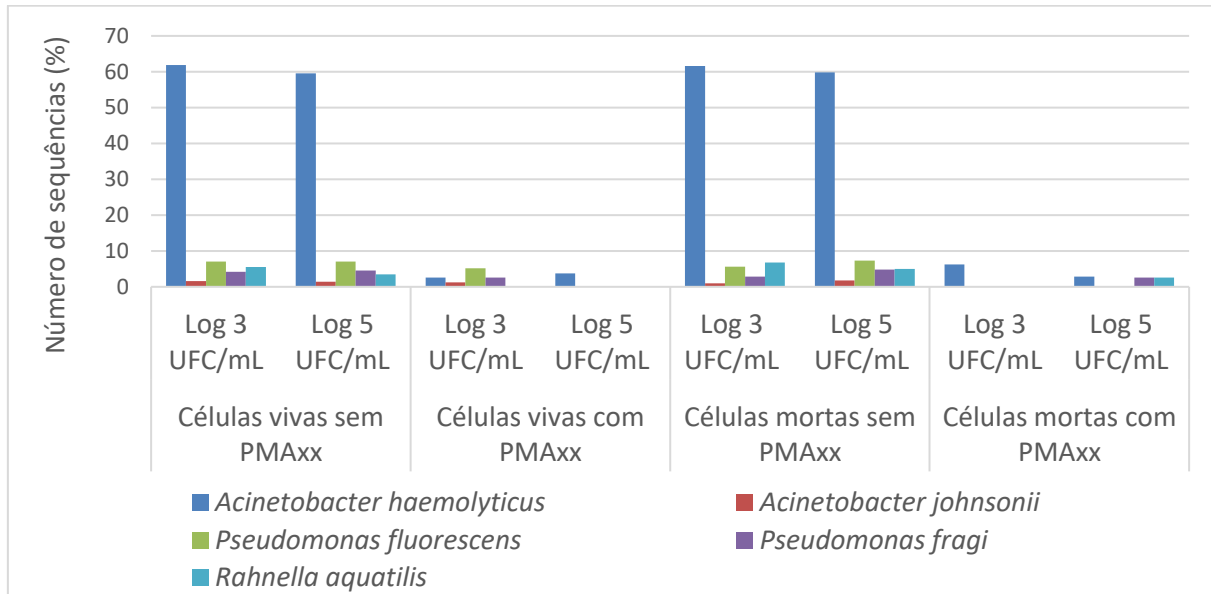


Figura 9 - Sequenciamento do DNA das amostras, contendo apenas bactérias da microbiota do leite UHT tratadas e não tratadas com 25  $\mu$ M de PMAxx, que tiveram o DNA extraído utilizando o tampão NeoSamplez.



Vale ressaltar que o maior número de sequências nas amostras contendo células vivas tratadas com PMAxx (Figuras 6, 7, 8 e 9) não significa que o corante contribuiu para esse dado. Isso pode ser justificado pelo fato de que as amostras sem adição de PMAxx possuíam uma grande variedade celular bacteriana pertencente a microbiota natural do leite, mortas pelo tratamento UHT, fazendo com que o número de sequências dessas bactérias fosse maior quando comparada ao das bactérias da contaminação artificial. Desta forma, o tratamento com PMAxx inibiu a amplificação do DNA da microbiota não viável do leite, devido ao UHT, permitindo um aumento do número de sequências das bactérias viáveis inoculadas no leite, uma vez que os resultados do sequenciamento aparecem como porcentagem em relação a cada amostra contaminada.

## 5.2 EFETIVIDADE DO PROPIDIO MONOAZIDA

Através dos resultados das contagens em placas, foi confirmado que as concentrações das bactérias da contaminação artificial estavam em uma faixa de 2 Log UFC/mL a 5 Log UFC/mL. A efetividade do tratamento térmico para morte celular também foi confirmada

através da inoculação das bactérias em ágar e caldo BHI, nos quais não foram observados crescimento e turvação, respectivamente.

Inicialmente no tratamento das amostras para o primeiro experimento que determinou o método de extração mais adequado, foram utilizados 25  $\mu\text{M}$  de PMAxx combinado com incubação por 5 min no escuro, seguido de exposição a fonte de luz de LED por 15 min, sendo que a cada minuto os tubos eram invertidos para que a atuação do PMAxx fosse de forma homogênea e o mesmo se ligasse covalentemente com o DNA das células mortas.

Porém, após os resultados do sequenciamento do DNA, foi observado que o tratamento com 25  $\mu\text{M}$  de PMAxx não foi tão efetivo, pois foram constadas amostras que continham células bacterianas mortas que, mesmo tratadas com PMAxx, foram sequenciadas no sequenciamento (Figura 10), o que indica que o PMAxx não intercalou eficientemente no DNA das células mortas. Devido a estas observações, fez-se necessário o aumento da concentração do PMAxx, a escolha da nova concentração foi baseada em dados da literatura bem como nas instruções do fabricante.

Martin *et al.* (2012) testaram diferentes concentrações de PMA (35  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) para discriminação entre células vivas e mortas de *Salmonella* em amostras de presunto cozido, sendo que a concentração de 50  $\mu\text{M}$  de PMA foi a melhor observada. Essa mesma concentração de PMA também foi observada por Liang *et al.* (2011) na eliminação de até  $10^8$  UFC/g de células mortas de *Salmonella* em amostras de alface. Dinu e Bach (2013) obtiveram resultados positivos na utilização de 50  $\mu\text{M}$  de PMA para eliminação do DNA de células mortas de *Escherichia coli* em amostras de vegetais. Já Dong *et al.* (2018) testaram diferentes concentrações de PMA, e determinaram que a melhor concentração do corante para diferenciar células vivas e mortas de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite foi de 40  $\mu\text{M}$ , porém 50  $\mu\text{M}$  também teve efeito positivo. Com isso, foi determinado que a concentração de 50  $\mu\text{M}$  de PMAxx, incubação por 5 min no escuro, seguido de exposição a luz de LED por 15 min, seriam os parâmetros utilizados para dar continuidade as análises.

Os resultados demonstraram que a concentração de 50  $\mu\text{M}$  de PMAxx foi mais eficiente nas células mortas, ou seja, o PMAxx intercalou melhor no DNA dessas células e não amplificou as mesmas. Isso pode ser notado na figura 10, onde na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de PMAxx boa parte das bactérias não apresentaram número de sequencias (%). Essa melhor atuação do aumento da concentração de PMAxx também pode ser observada na figura 11, onde a concentração de 25  $\mu\text{M}$  ainda amplificou bactérias inviáveis provenientes da microbiota do leite como *Acinetobacter haemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fragi*, já o



tratamento com 50  $\mu\text{M}$  inibiu o sequenciamento de todas as bactérias não viáveis presentes no leite citadas no gráfico.

Figura 10 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas mortas tratadas e não tratadas com PMAxx em concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ .

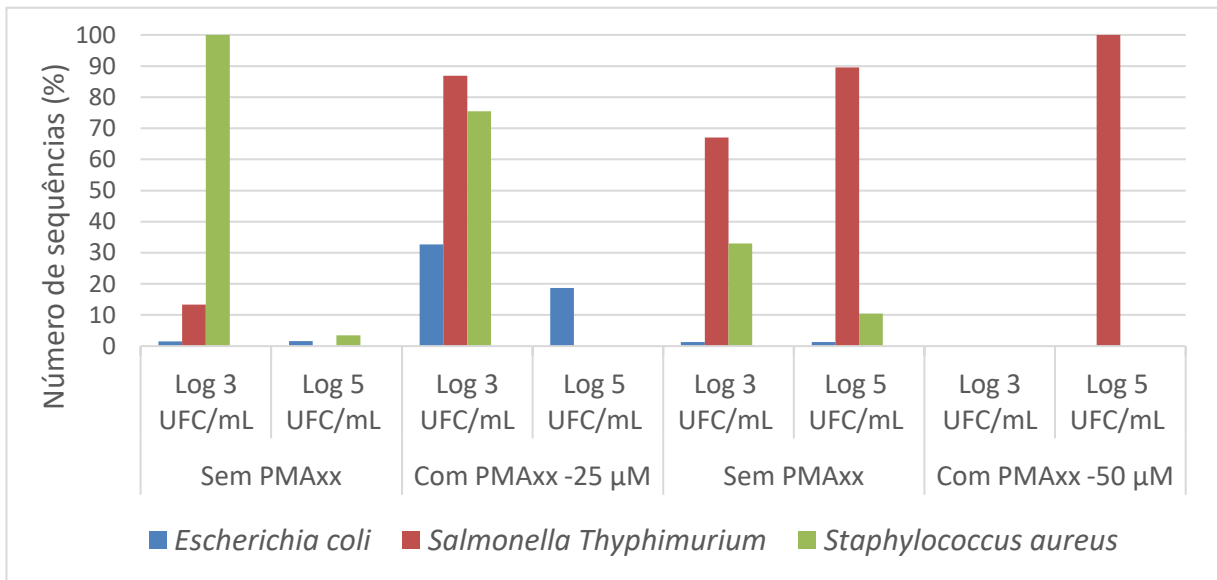
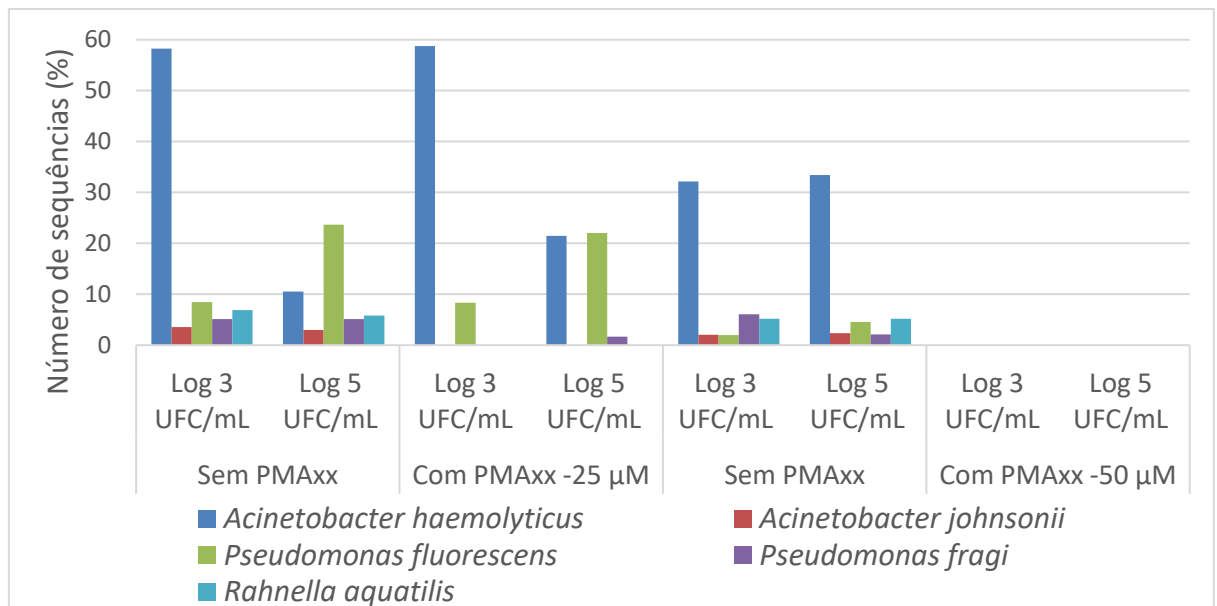


Figura 11 - Sequenciamento do DNA das amostras, contendo apenas bactérias da microbiota do leite UHT tratadas e não tratadas com PMAxx em concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ .



É importante salientar que o tratamento com PMAxx não deve interferir/intercalar com o DNA de células vivas. Por meio dos resultados obtidos pelo sequenciamento do DNA das amostras, foi possível observar que o PMAxx na concentração de 50 µM nas amostras contendo 2 Log UFC/mL de células vivas dos três microrganismos adicionados teve efeito negativo pois os mesmos não foram sequenciados (Figura 12), sugerindo que em menores concentrações celulares o PMAxx pode atuar de maneira tóxica. Contudo nos Log 3 UFC/mL, Log 4 UFC/mL e Log 5 UFC/mL, o PMAxx não teve efeito inibitório nas células vivas de *Salmonella* Thyphimurium e *Escherichia coli*.

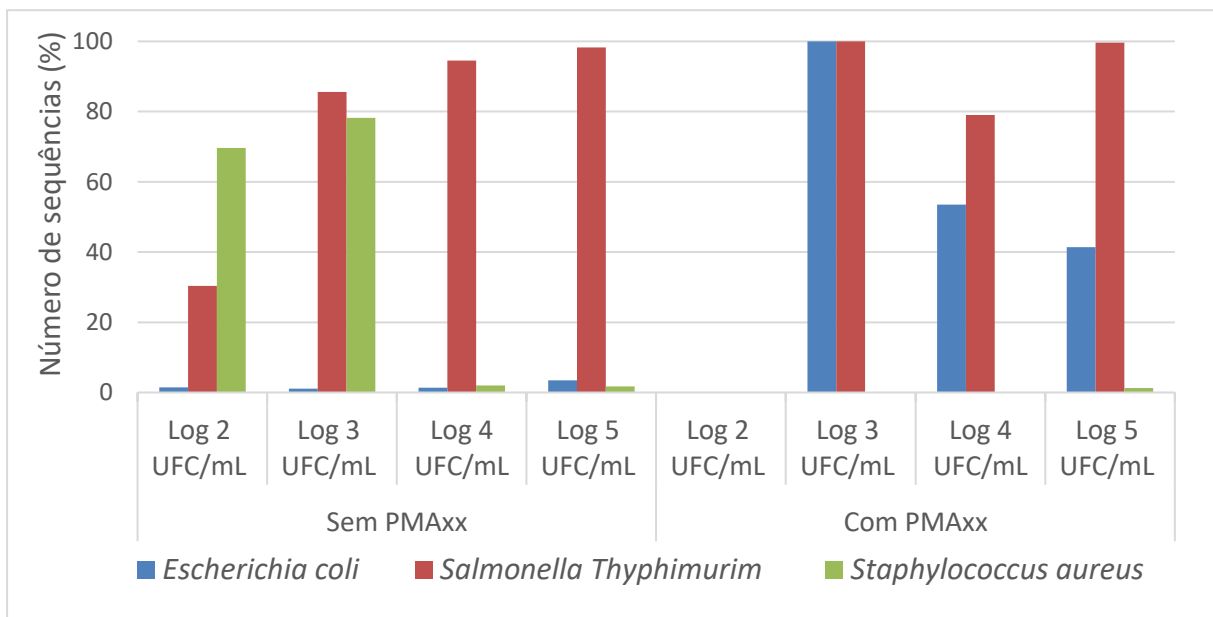
Nas células vivas de *Staphylococcus aureus* o efeito foi acentuado, pois a mesma no sequenciamento de DNA teve uma grande redução no número de sequências após a adição do PMAxx (Figura 12). Isso pode indicar que o PMAxx nesta concentração pode ter tido efeito tóxico nas células de *S. aureus*. Estudos relatam que determinadas concentrações de PMA podem gerar um efeito citotóxico, ou seja, uma toxicidade às células vivas (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012; LIU; MUSTAPHA, 2014). Em um trabalho realizado com células *E. coli* após teste com diferentes concentrações de PMA determinou que a adição de 50 µM do corante mostrou um efeito citotóxico em células viáveis em amostras de água (YUAN *et al.*, 2018).

Como forma de evitar essa toxicidade gerada nas células vivas de *S. aureus* recomenda-se que os próximos experimentos sejam testadas diferentes concentrações de PMAxx, bem como diferentes tempos de incubação no escuro e exposição a luz. Segundo Shekar *et al.* (2017) a concentração de 10 µM de PMA foi capaz de eliminar a amplificação de 10<sup>6</sup> UFC/mL de células mortas de *S. aureus* em produtos alimentícios. Li, Xin e Li (2015) após otimizarem o tratamento com PMA, definiram que a concentração de 30 µM de PMA, combinado com 20 min de incubação no escuro e 10 min de exposição à luz, foi a condição ideal capaz de eliminar o sinal de células mortas de *S. aureus* presente em amostra de água.

Outra informação que pode ser observada nas figuras anteriores (Figuras 6,7 e10) e nas próximas (Figuras 12, 13 e 14) é o fato que em algumas amostras contaminadas em concentrações diversas de células bacterianas sem tratamento com PMAxx não foram sequenciadas ou apresentam um baixo número de sequências. Apesar de métodos cultivo independentes serem mais diretos e precisos, o isolamento total do DNA pode apresentar algumas limitações, os resultados podem ser distorcidos pela má distribuição dos produtos durante as reações de PCR ou ampliações desiguais na clonagem (ACINAS *et al.*, 2005). Por outro lado, matrizes complexas como o leite podem inibir a PCR, ou, o DNA total clonado da

amostra, por apresentar uma alta carga bacteriana, pode sobrecarregar a reação de PCR e posterior sequenciamento de DNA (ŠURANSKÁ *et al.*, 2016). Seriam necessários produzir novos experimentos como maneira de entender o que pode ter acontecido para as bactérias não terem sido sequenciadas em algumas amostras sem adição de PMAxx.

Figura 12 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas vivas, tratadas e não tratadas com 50  $\mu$ M de PMAxx.

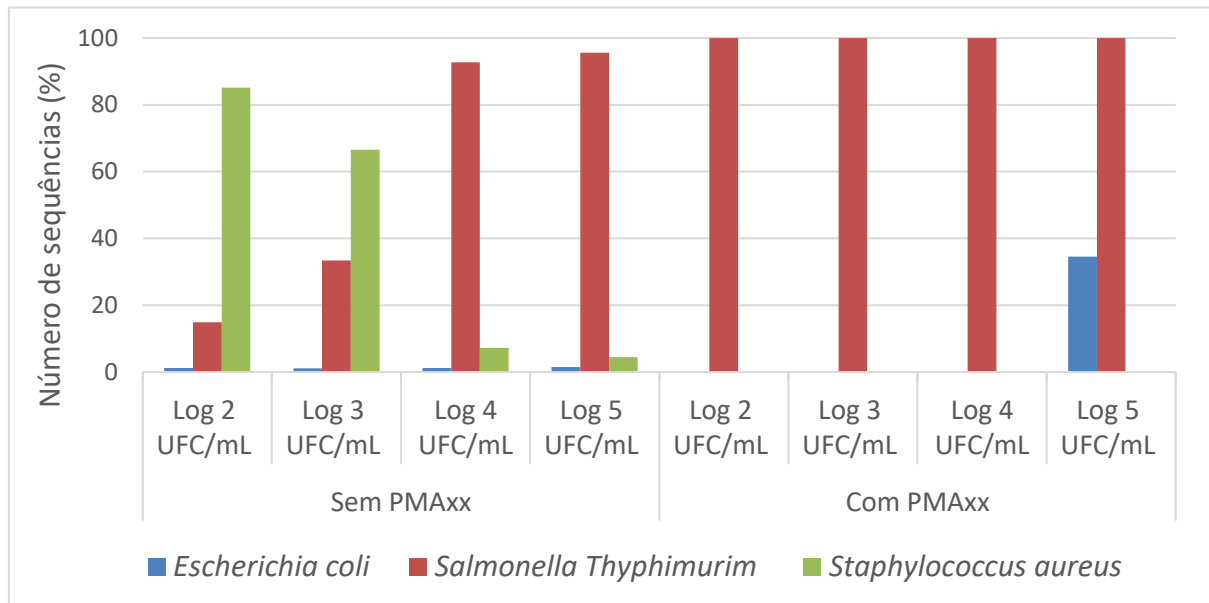


Ao avaliar os resultados do sequenciamento do DNA das amostras contaminadas com células bacterianas 80% mortas e 20% vivas (Figura 13) as únicas bactérias sequenciadas pós tratamento com PMAxx foram *S. Thyphimurium*, e *E. coli*, sendo que *S. Thyphimurium* foi amplificada em todas as concentrações celulares e *E. coli* apenas na concentração de Log 5 UFC/ml. O não sequenciamento do DNA de células vivas de *S. aureus* em nenhuma das concentrações celulares corrobora com o fato da mesma ter sofrido um efeito citotóxico com a adição do PMAxx.

Como a suspensão de células mortas e vivas utilizada na contaminação das amostras possuía maior quantidade de células mortas (80%), as mesmas podem ter interferido no sequenciamento das células viáveis de *E. coli*. Alguns estudos demonstram que misturas celulares de células vivas e mortas contém uma alta densidade celular devido a maior presença

de células mortas que diminuem a eficiência do tratamento com PMA (ELIZAQUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012; LØVDAL *et al.*, 2011).

Figura 13 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas 80% mortas e 20% vivas tratadas e não tratadas com 50  $\mu$ M de PMAxx.

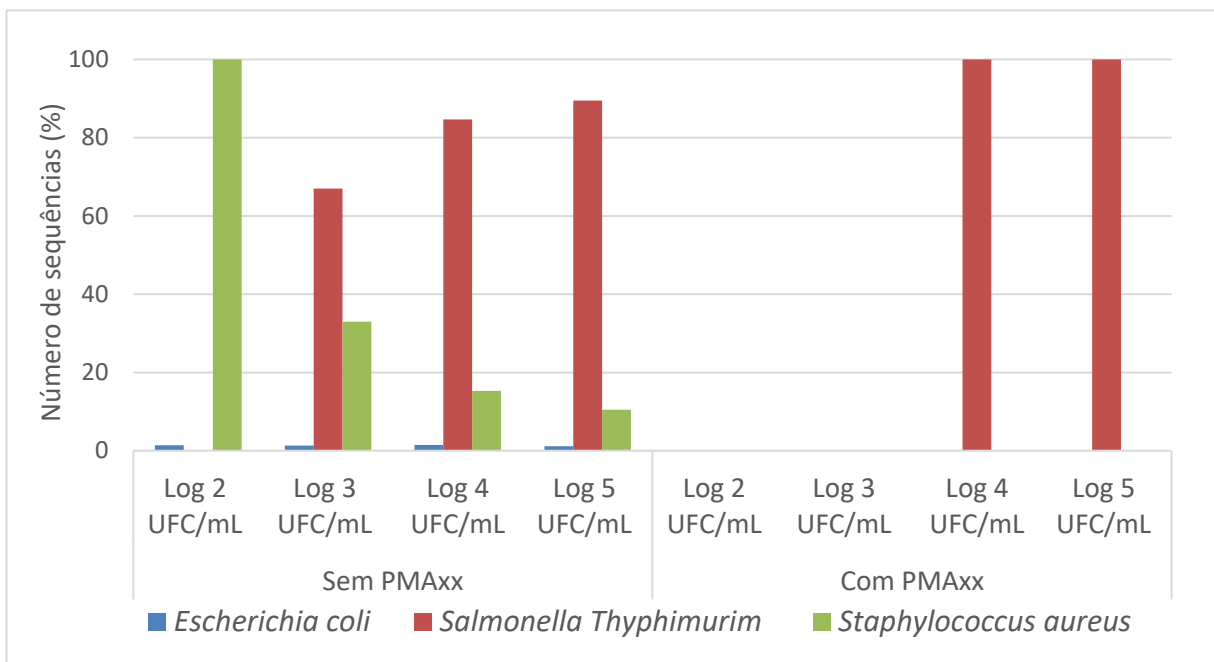


O tratamento com concentração de 50  $\mu$ M de PMAxx para as células mortas (Figura 14) de *E. coli* e *S. aureus* indicam um possível efeito positivo, pois nessas bactérias não ocorreu o sequenciamento das mesmas. Porém essa mesma concentração de PMAxx não foi efetiva para as células mortas de *S. Thyphimurium* nas concentrações celulares de Log 4 UFC/mL e Log 5 UFC/mL. Isso pode ser justificado pelo fato de que 50  $\mu$ M de PMAxx não seja eficiente para eliminar concentrações mais elevadas de células mortas de *S. Thyphimurium*.

Li *et al.* (2017) desenvolveram uma abordagem rápida e eficiente para detecção simultânea de *Salmonella* spp. viável em carne crua, incluindo *Salmonella enterica* serovars Paratyphi B, *S. Typhimurium*, e *S. Enteritidis*, nesse estudo foi determinado que o tratamento das amostras com 100  $\mu$ M de PMA teve a capacidade de eliminar os sinais do DNA de  $10^7$  UFC/mL de células mortas. Outro estudo, realizado por Xiao *et al.* (2015) ao testar diferentes concentrações de PMA (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M e 200  $\mu$ M) determinou que a concentração de 100  $\mu$ M foi considerada efetiva para inibir até  $10^6$  UFC/mL de células mortas de *Salmonella* spp viável em camarão cru. Yang *et al.* (2012) também definiu que o tratamento com 100  $\mu$ M de PMA foi o ideal para eliminar o sinal de  $10^6$  UFC/mL de células mortas de *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Paratyphi B* e *Salmonella Typhi* presentes em alimentos.

O tempo de incubação das amostras no escuro em contato com o PMAxx, também pode ter interferido nos resultados. Nesse estudo utilizou-se 5 min, porém o aumento do tempo de incubação em contato com o corante pode auxiliar na ligação do PMAxx com DNA das células mortas (NKUIPOU-KENFACK *et al.*, 2013).

Figura 14 - Sequenciamento do DNA de amostras contaminadas com células bacterianas mortas tratadas e não tratadas com 50  $\mu$ M de PMAxx.



### 5.2.1 Efetividade do tratamento com PMAxx sobre a microbiota da matriz alimentar

O principal motivo da escolha do leite UHT integral como matriz alimentar foi devido ao seu processo UHT, que garante por meio de um tratamento térmico (145-150°C por 3-4 segundos) a ausência de células viáveis.

Contudo, a microbiota do leite cru de vaca é composta por uma rica variedade de microrganismos, sendo que em sua maioria representada por bactérias, tanto Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* e várias *Enterobacteriaceae*, quanto Gram-positivas, como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Microbacterium*, entre outras (TILOCCA *et al.*, 2019).

Nesse trabalho, o sequenciamento de DNA por gene 16S rRNA identificou mais de 30 gêneros, sendo que os gêneros presentes em todas as amostras foram; *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Streptococcus*, *Thermus*, *Anoxybacillus*. Os gêneros *Acinetobacter* (38,62) e *Thermus* (28,60) foram os gêneros encontrados em maior quantidade. Boa parte dos gêneros sequenciados neste estudo também foram relatados por Zhang *et al.* (2019) através do sequenciamento utilizando 16S rRNA em amostras de leite cru de vaca.

Tabela 1 - Bactérias identificadas nas amostras sem adição de PMAXx por sequenciamento 16S rRNA no nível de gênero e espécie.

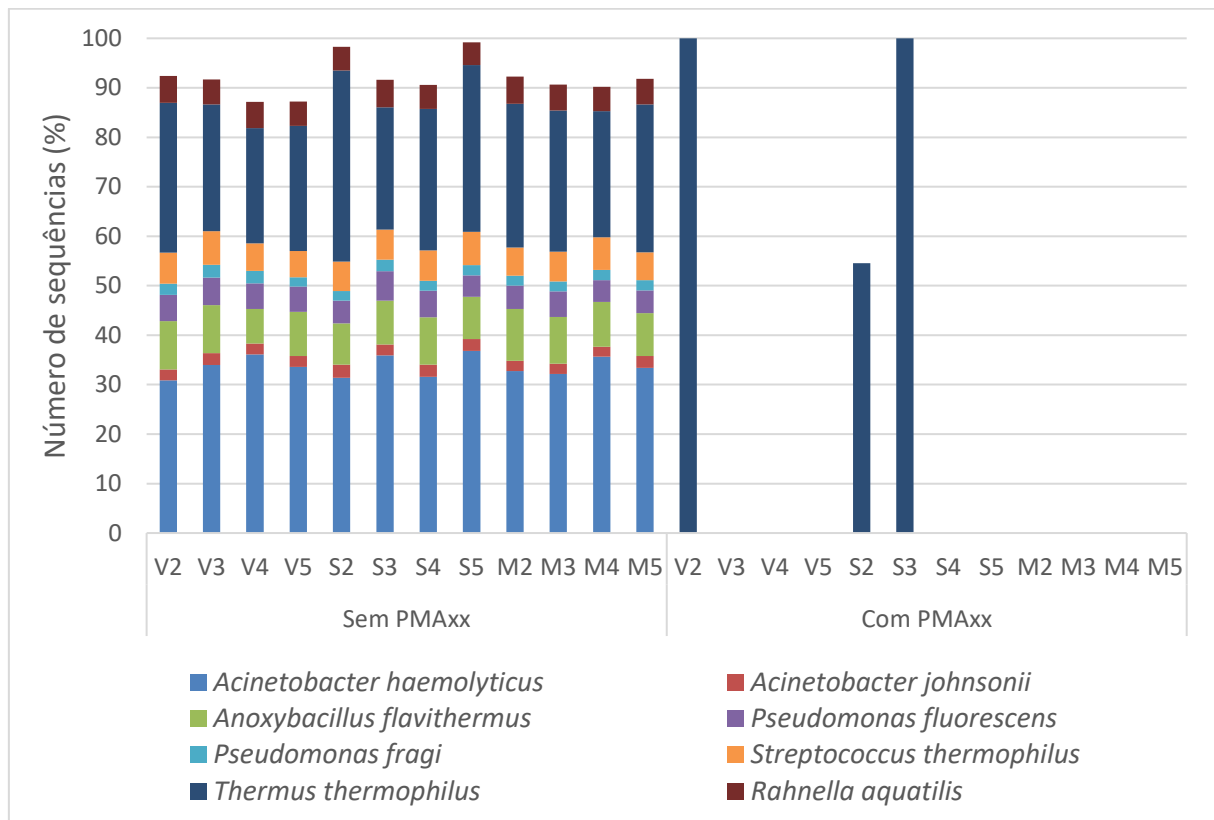
<b>Gênero</b>	<b>Proporção (%)</b>	<b>Espécie</b>	<b>Proporção (%)</b>
<i>Acinetobacter</i>	38,62	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	33,70
		<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,26
<i>Anoxybacillus</i>	9,55	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	9,02
<i>Pseudomonas</i>	8,35	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,03
		<i>Pseudomonas fragi</i>	2,15
<i>Streptococcus</i>	6,52	<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,07
<i>Rahnella</i>	5,10	<i>Rahnella aquatilis</i>	5,10
<i>Thermus</i>	28,60	<i>Thermus thermophilus</i>	28,60

Contudo, essa diversidade microbiana é observada nas amostras sem adição de PMAXx, o que contribui com o fato de células não viáveis podem estar presentes em alimentos com a membrana celular danificada, porém permanecendo com o DNA íntegro, podendo indicar falsos positivos em reações de PCR e posteriormente sequenciadas.

Nas amostras adicionadas de PMAXx com concentração de 50 µM não ocorreu à amplificação da maior parte das bactérias observadas nas amostras sem o corante (Figura 15). Somente a bactéria *Thermus thermophilus* se manteve presente em algumas amostras pós adição de PMAXx. A mesma é um microrganismo aeróbico, Gram-negativo, e extremamente termofílico, podendo crescer em temperaturas que variam de 50 ° C a 82 ° C (OHTANI; TOMITA; ITAYA, 2010). A não efetividade do PMAXx nessa bactéria pode ser devido a sua estrutura de parede celular que dificulta a permeabilidade do mesmo, a concentração do corante ter sido baixa para essa espécie ou até mesmo que tratamento UHT não foi eficiente para eliminá-la. Nos próximos experimentos sugere-se a utilização de métodos de cultivo dependentes como a contagem em placas em condições específicas para bactérias termofílicas com o intuito da certeza da ausência das mesmas presentes nas amostras de leite UHT. Outra

forma de solucionar o problema seria a adição de maior concentração de PMAxx. Em um estudo utilizando PMA para investigar patógenos bacterianos Gram-negativos presentes em amostras de partículas transportadas pelo ar, foi possível observar que a concentração de 100  $\mu\text{M}$  do PMA reduziu 100% o sinal emitido pelas células mortas pelo calor quando comparadas a células mortas sem o tratamento (KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013).

Figura 15 - Sequenciamento do DNA 16S rRNA das espécies bacterianas da microbiota inviável do leite UHT integral presentes nas amostras.



V2: células vivas Log 2 UFC/mL; V3: células vivas Log 3 UFC/mL; V4: células vivas Log 4 UFC/mL; V5: células vivas Log 5 UFC/mL; S2: células vivas e mortas Log 2 UFC/mL; S3: células vivas e mortas Log 3 UFC/mL; S4: células vivas e mortas Log 4 UFC/mL; S5: células vivas e mortas Log 5 UFC/mL; M2: células mortas Log 2 UFC/mL; M3: células mortas Log 3 UFC/mL; M4: células mortas Log 4 UFC/mL; M5: células mortas Log 5 UFC/mL;

Diferentes tipos de sequenciamento de DNA, como o PacBio SMART já foram utilizados para avaliar a segurança do leite cru, leite UHT e de fórmulas infantis (HOU *et al.*, 2015). Porém, esse tipo de sequenciamento apesar de permitir uma abrangente análise e de alto rendimento da microbiota, essa tecnologia é incapaz de refletir a real presença de

microrganismos viáveis. Contudo essa limitação pode ser solucionada ao utilizar corantes como o PMA (MO *et al.* 2019). Segundo Mo *et al.* (2019) a utilização do sequenciamento de DNA conjunto com o uso do corante PMA, permitiu o monitoramento da microbiota bacteriana de leite durante o processo de fermentação na produção de fermentados lácteos.

Alguns estudos demonstram que o sequenciamento de DNA utilizando gene 16S rRNA é uma ferramenta conveniente e eficiente para as indústrias de alimentos. Witte *et al.* (2018) utilizou o sequenciamento DNA 16S rRNA para detecção de comunidades bacterianas presentes em duas diferentes plantas industriais de processamento de laticínios como forma de investigar fontes de contaminação com *Listeria monocytogenes*. Rodríguez-López *et al.* (2019) utilizou também o sequenciamento 16S rRNA, para identificar e caracterizar comunidades bacterianas portadoras de *L. monocytogenes* presente em plantas alimentícias de pescados, laticínios e carnes.

Vieira *et al.* (2019) investigou a microbiota de ovos líquidos produzidos por diferentes fornecedores e o produto final (ovos inteiros pasteurizados líquidos resfriados e gema de ovo líquida pasteurizada resfriada), utilizando sequenciamento baseado em gene 16S rRNA com finalidade de analisar se o processamento, transporte e armazenamento podem atuar na modulação da microbiota das matérias-primas e conseqüentemente os produtos finais. Brightwell *et al.* (2006) analisou uma comunidade bacteriana presente em um sistema de correia transportadora de uma sala de desossa de carneiros por meio do sequenciamento 16S, com o intuito de identificar possíveis bactérias no ambiente de processamento capazes de atuar na deterioração da carne.

Além de ser usado como uma ferramenta de detecção de microrganismos o sequenciamento de DNA pode ser utilizado para melhorar processos tecnológicos na indústria de alimentos. Alessandria *et al.* (2016) explorou a microbiota de queijos tipo Grana durante a fabricação e maturação para compreender diferentes fatores que podem afetar a composição da microbiota final dos queijos. Wang *et al.* (2018) utilizou o sequenciamento de alto rendimento para estudar a sucessão microbiana e as alterações metabólicas durante a fermentação de licor chinês em dois ambientes distintos para compreender que influência o ambiente de processamento possui na produção da bebida

Estudos como esses demonstram que a utilização do sequenciamento de DNA em indústrias de alimentos pode fornecer informações valiosas, como identificar bactérias causadoras de contaminação, determinar o local/foco da contaminação, otimizar estratégias de limpeza/processamento, além da melhoria de processos tecnológicos industriais que utilizam



bactérias na produção de alimentos, como alimentos fermentados. Conjunto a isso, o tratamento dessas amostras com PMAxx, permite a realização de todos estes estudos, entretanto, levando em consideração somente as bactérias vivas que, por exemplo, no caso de prevenção bem como rastreabilidade de surtos de infecção alimentar, é uma ferramenta valiosa, uma vez que nestes casos as células vivas que são importantes. Ainda, pode permitir a emissão de resultados mais precisos, com alta especificidade, sem a liberação de falsos positivos e sem longos prazos de espera. No caso de amostras de leite UHT, como as utilizadas no experimento, é possível monitorar a efetividade do processamento UHT, fornecendo maior segurança aos consumidores.

## 6 CONCLUSÃO

O método utilizado para a contaminação artificial das amostras por *Salmonella* Thyphimurium, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* se mostrou replicável, bem como o processo de morte celular das mesmas por tratamento térmico.

O protocolo de extração de DNA utilizando tampão de lise Neozol apresentou maior número de sequências (%) e amplificação de todas as bactérias testadas, sendo assim, o mesmo pode ser utilizado para dar continuidade a outros experimentos. A concentração de 50 µM de PMAxx foi mais efetiva quando comparada com a concentração de 25 µM. Porém, a adição de 50 µM nas amostras com concentração de 2 Log UFC/mL de células vivas de *S. Thyphimurium* e *E. coli* teve efeito citotóxico, sugerindo que em baixas concentrações celulares o PMAxx pode ser tóxico. Nas células vivas de *S. aureus*, o PMAxx teve efeito citotóxico nas concentrações celulares de 2 Log UFC/mL a 4 UFC/mL. Já nas amostras contaminadas com células vivas e mortas, *S. aureus* não foi sequenciada em nenhuma das concentrações, *E. coli*, apenas na concentração de Log 5 UFC/ml, e *S. Thyphimurium* foi sequenciada em todas as concentrações. Contudo, seriam necessárias maiores concentrações de PMAxx nas células mortas de *S. Thyphimurium*, pois as mesmas tiveram seu DNA sequenciado em todas as concentrações celulares.

O sequenciamento de DNA se mostrou um método completo e eficiente para amostras complexas e de alta diversidade bacteriana como o leite. Utilizando o gene 16S rRNA foi possível identificar mais de 30 gêneros de bactérias, que após adição do PMAxx em sua maioria não foram sequenciadas, confirmando a efetividade do tratamento UHT que produz a morte celular das bactérias presentes no leite cru.

Os resultados descritos neste estudo são promissores para a utilização do PMAxx no tratamento de amostras submetidas ao sequenciamento de DNA para detecção de células viáveis bacterianas em alimentos. Para confirmar a eficiência desse método sugere-se testes com outras diferentes matrizes para compreender a atuação do PMAxx nas mesmas, o emprego de outros microrganismos patogênicos para a contaminação artificial das amostras, além disso, testes com outros tempos de incubação das amostras no escuro em contato com o PMAxx e diferentes tempos de exposição a fonte de luz LED também devem ser levados em consideração.

## REFERÊNCIAS

- ACINAS, S. G. *et al.* PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8966-8969, 2005.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1467p.
- ALESSANDRIA, V. *et al.* Microbiota of an Italian grana-like cheese during manufacture and ripening, unraveled by 16S rRNA-based approaches. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3988-3995, 2016.
- ALLMANN, M. *et al.* Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. **Research in Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 85-97, 1995.
- ANDERSEN, C. B. *et al.* Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil União**, v. 139, n. 7-E, 2001. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b). Acesso em: 14 de agosto de 2019.
- ANVISA. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Doenças Transmissíveis. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, Informe 2018**. Brasília, D.F., 2019. 16 p. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: 08 de agosto de 2019.
- ANVISA. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Apoio à Gestão de Vigilância em Saúde. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp.** Brasília, D.F., 2011. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>. Acesso em: 14 de agosto de 2019.
- ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
- BANIHASHEMI, A. VAN DYKE, M. L.; HUCK, P. M. Detection of viable bacterial pathogens in a drinking water source using propidium monoazide-quantitative PCR. **Journal of Water Supply: Research and Technology—AQUA**, v. 64, n. 2, p. 139-148, 2015.

- BELL, T. H. *et al.* Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. **The ISME Journal**, v. 7, n. 6, p. 1200-1210, 2013.
- BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 28, n. 2, p. 81-92, 2007.
- BLATTNER, F. R. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453-1462, 1997.
- BRIGHTWELL, G. *et al.* Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. **International journal of food microbiology**, v. 109, n. 1-2, p. 47-53, 2006.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- BUZBY, J. C.; ROBERTS, T. The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1851-1862, 2009.
- CAPORASO, J. G. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.
- CHRISTOFF, A. P. *et al.* Uncovering the hidden microbiota in hospital and built environments: New approaches and solutions. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 6, p. 534-542, 2019.
- CLARK, M. A.; DOUGLAS M.; CHOI, J. **Biology 2e**. 1 ed. Texas: OpenStax, 2019. 2722p.
- COCOLIN, L. *et al.* Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 29–43, 2013.
- COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. **Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods**. New York: Springer Science & Business Media, 2008. 280p.
- DINU, L.D.; BACH, S. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157: H7 from vegetable samples using quantitative PCR with propidium monoazide and immunological assays. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 268-273, 2013.
- DONG, L. Quantitative PCR coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4936-4943, 2018.
- DU, M. *et al.* Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1349-1354, 2007.
- DYKES, G. A. *Salmonella*: Detection. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 689-694, 2016.

ELIZACQUIVEL, P.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. **Food Control**, v. 25, p. 704–708, 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Patógenos emergentes em alimentos**. Fortaleza, CE., 2013. 20 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/90041/1/DOC13002.pdf>. Acesso em: 10 de maio 2019.

FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação). **Empenho internacional para melhorar a segurança alimentar**, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1180378/>. Acesso em: 20 setembro de 2019.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of microbiological methods**, v. 91, n. 2, p. 276-289, 2012.

GOMES, T. A. T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 3-30, 2016.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A. *et al.* Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic, *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. **Food Microbiology**, v. 59, p. 97-103, 2016.

GRANT, K. *et al.* Implementing Pathogen Genomics: a Case Study. p. 1- 32, 2018.

HEIM, S. *et al.* The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6739- 6745, 2002.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

HEPP, D.; DE NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. **Scientia Tec: revista de educação, ciência e tecnologia do IFRS - Campus Porto Alegre**, v. 3, n. 2, p. 114-124, 2016.

HOU, Q. *et al.* Evaluation of bacterial contamination in raw milk, ultra-high temperature milk and infant formula using single molecule, real-time sequencing technology. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 12, p. 8464-8472, 2015.

ISHII, S.; SADOWSKY, M.J. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 2, p. 101-108, 2008.

ISO 11290-1:2017. International Organization for Standardization. **Microbiology of the food chain -- horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- part 1: detection method.** p. 36, 2017.

ISO 16649-3:2015. International Organization for Standardization. **Microbiology of the food chain -- horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- part 3: detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ss-d-glucuronide.** p. 10, 2015.

ISO 4833-1:2013. International Organization for Standardization. **Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.** p. 9, 2013.

ISO 6579-1:2017. International Organization for Standardization. **Microbiology of the food chain -- horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - part 1: detection of *Salmonella* spp.** p. 50, 2017.

ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018. International Organization for Standardization. **Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.** p. 20, 2018.

JAGADEESAN, B. *et al.* The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. **Food microbiology**, v. 79, p. 96-115, 2018.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KÄFERSTEIN, F. Food safety as a public health issue for developing countries. **Food Safety in Food Security and Food Trade**, p. 1-38, 2003.

KAUSHIK, R.; BALASUBRAMANIAN, R. Discrimination of viable from non-viable Gram-negative bacterial pathogens in airborne particles using propidium monoazide-assisted qPCR. **Science of the Total Environment**, n. 449, p. 237–243, 2013.

KLUYTMANS, J. A. J.; WERTHEIM, H. F. L. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v. 33, n. 1, p. 3-8, 2005.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. p. 69-82, 2001.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

KUNST, F. *et al.* The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v. 390, n. 6657, p. 249-256, 1997.

LEE, K. M. *et al.* Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. **Food control**, v. 47, p. 264-276, 2015.

- LI, F. *et al.* Sextuplex PCR combined with immunomagnetic separation and PMA treatment for rapid detection and specific identification of viable *Salmonella* spp., *Salmonella* enterica serovars Paratyphi B, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Enteritidis in raw meat. **Food control**, v. 73, p. 587-594, 2017.
- LI, H.; XIN, H.; LI, S. F. Y. Multiplex PMA–qPCR Assay with internal amplification control for simultaneous detection of viable *Legionella* pneumophila, *Salmonella* typhimurium, and *Staphylococcus aureus* in environmental waters. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 24, p. 14249-14256, 2015.
- LI, L. *et al.* The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 258, 2014.
- LIANG, N. *et al.* Detection of viable *Salmonella* in lettuce by propidium monoazide real-time PCR. **Journal of food science**, v. 76, n. 4, p. 234-237, 2011.
- LIPP, M. *et al.* Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 1, p. 136-155, 2005.
- LIU, Y.; MUSTAPHA, A. Detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. **International journal of food microbiology**, v. 170, p. 48-54, 2014.
- LIU, ZHONG-MEI. *et al.* Target-Enriched Multiplex PCR (Tem-PCR) Assay for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli* O157:H7 in Food. **Journal of Food Safety**, v. 36, n. 2, p. 18-185, 2016.
- LOMAN, N. J.; PALLEN, M. J. Twenty years of bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 787, 2015.
- LØVDAL, T. *et al.* Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. **Journal of microbiological methods**, v. 85, p. 164–169, 2011.
- MALORNY, B. *et al.* Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International journal of food microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39–48, 2003.
- MARTIN, B. *et al.* Effect of amplicon length in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cells of *Salmonella* in cooked ham. **Food analytical methods**, v. 6, n. 2, p. 683-690, 2012.
- MO, L. *et al.* Investigating the bacterial microbiota of traditional fermented dairy products using propidium monoazide with single-molecule real-time sequencing. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 5, p. 3912-3923, 2019.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.

- NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em pauta**, v. 40, p. 22-26, 2000.
- NASCIMENTO, M. S. *et al.* *Enterobacteriaceae* contamination in chocolate processing. **Food Control**, v. 47, p. 291-297, 2015.
- NKUIPOU-KENFACK, E. *et al.* Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. **Journal of microbiological methods**, v. 93, n. 1, p. 20-24, 2013.
- NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. **FEMS microbiology letters**, v. 291, n. 2, p. 137-142, 2009.
- NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1997-2004, 2006.
- NOCKER, A.; CHEUNG, C.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of microbiological methods**, v. 67, n. 2, p. 310-320, 2006.
- NOCKER, A.; SOSSA, K. E.; CAMPER, A. K. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 70, n.2, p. 252-260, 2007.
- NOWAK, B. *et al.* *Salmonella* contamination in pigs at slaughter and on the farm: A field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. **International journal of food microbiology**, v. 115, n. 3, p. 259-267, 2007.
- OHTANI, N.; TOMITA, M.; ITAYA, M. An extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, is a polyploid bacterium. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 20, p. 5499-5505, 2010.
- PAN, Y.; BREIDT, F. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 24 , p. 8028–8031, 2007.
- RANTSIOU, K. *et al.* Next generation microbiological risk assessment: opportunities of whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance, source tracking and risk assessment. **International journal of food microbiology**, v. 287, p. 3-9, 2018.
- RODRIGUEZ-LÁZARO, D. *et al.* Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in food science & technol.** v. 18, p. 306–319, 2007.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. *et al.* Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes*-harbouring communities present in food-related industrial environments. **Food control**, v. 95, p. 6-17, 2019.
- RUDI, K., *et al.* Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1018-1024, 2005.



- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS, A. *et al.* Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. **Apmis**, v. 118, n. 1, p. 60-65, 2010.
- SHEKAR, A. *et al.* Selective and concurrent detection of viable *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157: H7, and *Shigella* spp., in low moisture food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control. **LWT**, v. 86, p. 586-593, 2017.
- SHU, J. *et al.* Performance of convective polymerase chain reaction by doubling time. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 133, p. 1230-1239, 2019.
- SORRIBES, C. H. Metodos rapidos y automatizacion em microbiologia alimentaria. **Alimentaria: Revista de Investigacion, Tecnologia y Seguridad**, v. 392, p. 109-113, 2008.
- STEWART, C. M. *et al.* *Staphylococcus aureus* growth boundaries: moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1864-1871, 2002.
- ŠURANSKÁ, H. *et al.* Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. **Folia microbiologica**, v. 61, n. 6, p. 455-463, 2016.
- TANTIKACHORNKIAT, M. *et al.* The use of propidium monoazide in conjunction with qPCR and Illumina sequencing to identify and quantify live yeasts and bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 234, p. 53-59, 2016.
- TASKIN, B.; GOZEN, A. G.; DURAN, M. Selective quantification of viable *Escherichia coli* bacteria in biosolids by quantitative pcr with propidium monoazide modification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4329-4335, 2011.
- TAUXE, R. V. *et al.* Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International journal of food microbiology**, v. 139, p. 516-428, 2010.
- TILOCCA, B. *et al.* Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, p. 103534, 2019.
- VANYSACKER, L. *et al.* Bacterial community analysis of activated sludge: an evaluation of four commonly used DNA extraction methods. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 299-307, 2010.
- VIEIRA, D. A. P. *et al.* Microbiota of eggs revealed by 16S rRNA-based sequencing: From raw materials produced by different suppliers to chilled pasteurized liquid products. **Food control**, v. 96, p. 194-204, 2019.

WANG, X. *et al.* Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 1-13, 2018.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

WHO (World Health Organization). **The top 10 causes of death**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 10 maio 2019.

WITTE, A. K. *et al.* Influence of sampling and DNA extraction on 16S rRNA gene amplicon sequencing-Comparison of the bacterial community between two food processing plants. **LWT**, v. 90, p. 186-192, 2018.

WU, B.; LIANG, W.; KAN, B. Enumeration of viable non-culturable *Vibrio cholerae* using propidium monoazide combined with quantitative PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 115, p. 147-152, 2015.

XIAO, L. *et al.* Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment. **Food Control**, v. 57, p. 185-189, 2015.

XU, Y. *et al.* A multiplex polymerase chain reaction coupled with high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 778-783, 2012.

YANG, X. BADONI, M. GILL, C. O. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild pasteurizing heat treatments, **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1478-1482, 2011.

YANG, Y. *et al.* Development of a multiplexed PCR assay combined with propidium monoazide treatment for rapid and accurate detection and identification of three viable *Salmonella enterica* serovars. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 456-462, 2012.

YUAN, Y. *et al.* Detection of viable *Escherichia coli* in environmental water using combined propidium monoazide staining and quantitative PCR. **Water research**, v. 145, n. 15, p. 398-407, 2018.

ZHANG, D. *et al.* 16S rDNA high-throughput sequencing and MALDI-TOF MS are complementary when studying psychrotrophic bacterial diversity of raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 86-91, 2019.

ZHU, R. G. *et al.* Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 90, n. 3, p. 262-266, 2012.