

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES E PRÉ-
ADAPTAÇÃO NA VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE
TRANSCRITOS POR CEPAS *Campylobacter jejuni*
MANTIDAS A -20 °C**

Mariela Silva Moura
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES E PRÉ-
ADAPTAÇÃO NA VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE
TRANSCRITOS POR CEPAS *Campylobacter jejuni*
MANTIDAS A -20 °C**

Mariela Silva Moura

Orientadora: Dra. Daise Aparecida Rossi

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias (Produção Animal)

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- M929i 2013 Moura, Mariela Silva, 1986-
Influência de crioprotetores e pré- adaptação na viabilidade e produção de transcritos por cepas de *Campylobacter jejuni* mantidas a - 20°C/ Mariela Silva Moura.-- 2013.
74f. : il.
- Orientador: Daise Aparecida Rossi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. *Campylobacter*- Teses. 3. Produção animal - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU:619

DADOS CURRICULARES DA AUTORA:

MARIELA SILVA MOURA – Nascida em Uberlândia, Minas Gerais, em 14 de Junho de 1986, filha de Daniel de Sousa Moura e Solange Maria da Silva Sousa. Médica Veterinária, graduada em Janeiro de 2011 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por um período de um ano (2006-2007) e Presidente da Comissão de Formatura. Em 2011 iniciou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Produção Animal, na qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por dois anos (2011-2013) e no mesmo período, foi representante discente no Conselho de Pós-Graduação. Atualmente é professora na Fundação Presidente Antônio Carlos (UNIPAC) nos cursos de Medicina Veterinária e Tecnologia em Agronegócio com as disciplinas de Tecnologia e Inspeção de Carnes e Tópicos especiais em Produção Animal, respectivamente.

*"Tudo o que serve para corrigir, elevar, educar e construir,
nasce primeiramente no esforço da vontade
unida à decisão de cada um."*
Emmanuel

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais,
Dani, Guto, Arthur, vó Nenê e Rafael por não medirem
esforços para a minha formação profissional,
por confiarem e acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Aproxima-se o final desta batalha da qual, muitos vibraram e se dedicaram para que eu pudesse atingir mais um objetivo em minha vida. Gratidão, apenas, é pouco para expressar meus sentimentos em relação àqueles que estiveram comigo durante todo este percurso.

A Deus e aos amigos espirituais, por estarem sempre comigo, trilhando meus passos pelo caminho da verdade e, permitindo a concretização deste sonho.

A Universidade Federal de Uberlândia em particular à Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária, onde encontrei condições para o aprendizado, estímulo e oportunidade de crescimento.

À minha mãe, Solange, mulher batalhadora que me inspira a nunca desanimar frente aos obstáculos e a caminhar com “minhas próprias pernas”, mostrando os melhores caminhos à busca pela excelência. Obrigada pelo apoio, por me guiar e confiar nos meus passos.

Ao meu pai, Daniel, pela dedicação em educar-me para o crescimento não só para minha vida profissional, tendo sempre algum conselho para minhas aflições. Obrigada pelas palavras sábias.

À Vó Nenê, pela sua atenção e carinho ao longo de toda minha vida. Serei eternamente grata por acreditar e confiar nas minhas decisões para a minha formação profissional.

À Dani, minha irmã que mesmo distante está sempre presente. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos para que eu possa me tornar uma pessoa cada vez melhor. Você sabe o quanto me espelho em seus passos e atitudes.

Ao meu irmão baiano Gustavo, pelas palavras, risadas e principalmente por estar disposto a ajudar e aconselhar sempre quando preciso.

E agora, ao meu sobrinho Arthur, que mesmo ainda não tendo capacidade para entender a importância que ele possui em nossa família, já faz com que a alegria dos pequenos momentos se torne eterna para nós.

Ao Rafael, pelo companheirismo, pelas palavras que, carinhosamente, sempre me conforta e pelo suporte que tem me dado tanto profissionalmente como pessoalmente. Agradeço pelo amor e pela paciência.

À Professora Dra. Daise Aparecida Rossi, minha orientadora, a quem sou grata pela confiança depositada, por me acolher como orientada e permitir que eu pudesse concretizar o sonho de fazer esta pós-graduação. Nossa proximidade foi maior na reta final do Mestrado, mas já foi muito importante para nos conhecermos melhor, e para a transmissão de conselhos em relação à docência. Obrigada pela oportunidade de tantos ensinamentos, por transmitir parte de sua experiência e pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, (Guilherme, Eliane, Priscila, Letícia, Marcelo, Eduardo, Francesca, Filipe, Carla, Leandro, Mariana) que fizeram com que os obstáculos dos trabalhos fossem amenizados pelos momentos de descontração. Obrigada pela amizade e confiança. Em destaque à Raquel e Driene que com tão pouco tempo de convivência percebemos o quanto temos em comum. E em especial, à Roberta, pela sua atenção, dedicação, amizade, ensinamentos e, que apesar de destacar-se pela vasta experiência e seus conhecimentos, os transmite com tanta humildade e satisfação. Sem dúvidas o seu papel de amiga e co-orientadora será lembrado por toda minha vida.

A Professora Dra. Belchiolina Beatriz, pelo incentivo, ideias e lógico, pela disponibilidade de seu tempo, mesmo com seus afazeres em plena licença maternidade.

A Professora Dra. Anna Lima, que com papel mais de amiga do que professora me incentivou a continuar sempre, independente das dificuldades. E também pelas dicas profissionais que me auxiliarão tanto nesse começo da prática da docência.

A Professora Dra. Cinthia, por desprender parte do seu tempo e vir até Uberlândia para participar da banca e trazer parte de seus conhecimentos e considerações.

A todos aqueles que entraram e estão presentes em minha vida e que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Objetivos.....	21
1.1.1. Objetivo Geral.....	21
1.1.2. Objetivos Específicos.....	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1. Caracterização do gênero <i>Campylobacter</i> spp.....	22
2.2. <i>Campylobacter</i> e riscos para a saúde pública.....	24
2.3. <i>Campylobacter</i> e métodos de criopreservação.....	26
2.4. Presença de Transcritos e RT-PCR.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Desenho do estudo.....	33
3.2. Processamento das cepas.....	34
3.3. Substâncias Crioprotetoras.....	35
3.4. Preparo do Inóculo.....	35
3.5. Tratamentos – Estresse térmico.....	35
3.6. Viabilidade e quantificação das cepas.....	36
3.7. Presença de Transcritos.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Quantificação de <i>C. jejuni</i> após descongelamento.....	39
4.2. Viabilidade de <i>C. jejuni</i> após descongelamento.....	42

4.3. Produção de Transcritos.....	44
4.4. Produção de transcritos por <i>C. jejuni</i> ATCC 33291.....	47
4.5. Produção de transcritos por <i>C. jejuni</i> NCTC 11351.....	49
4.6. Produção de transcritos por <i>C. jejuni</i> IAL 2383.....	52
5. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection

cDNA – Ácido desoxirribonucleico (complementar)

CP1 – ATCC

CP2 – NCTC

CP3 – IAL

dATP – Desoxiadenosina trifosfato

dCTP – Desoxicitosina trifosfato

DEPC – Dietilpirocarbonato

dGTP – Desoxiguanina trifosfato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos tri-fosfatados

dTTP – Desoxitimina trifosfato

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ISO – International Organization for Standardization

m-CCDA – Agar Campylobacter Blood-Free Selective Medium

MMLV-RT – Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

NCTC – National Collection of Types Cultures

pb – Pares de bases

PCR – Reação da polimerase em cadeia

RNA – Ácido ribonucleico

RT-PCR – Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

SODs – Superóxido dismutase

TBE – Tris/Borate/EDTA

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UHT –Ultra highttemperature

UV – Ultra Violeta

VNC – Viáveis e não cultiváveis

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema representativo dos procedimentos realizados no estudo.....	34
Figura 2. 2a - <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 em agar m-CCDA (leite UHT integral, pré-tratamento a 10°C/30min, 30 dias a -20°C). 2b - <i>C. jejuni</i> IAL 2383 em agar m-CCDA (leite UHT integral, sem tratamento, 30 dias a -20°C).....	41
Figura 3. Gel de agarose demonstrando a presença de transcritos do gene <i>ciaB</i> por <i>C. jejuni</i> ATCC 33291. M (marcador de peso molecular de 50pb); C- (Controle negativo); C+ (Controle positivo, <i>C. jejuni</i> NCTC 11351); LC, L4, L10, GC, G4, G10 (presença dos transcritos em todos os tratamentos).....	46
Figura 4. Gel de agarose demonstrando a presença de transcritos do gene <i>sodB</i> por <i>C. jejuni</i> ATCC 33291. M (marcador de peso molecular de 50pb); C- (Controle negativo); C+ (Controle positivo, <i>C. jejuni</i> NCTC 11351). ; LC, L4, L10, GC, G4, G10 (presença de transcritos em todos os tratamentos).....	46
Figura 5. Gel de agarose demonstrando a presença de transcritos do gene <i>p19</i> por <i>C. jejuni</i> NCTC 11351. M (marcador de peso molecular de 50pb); C- (Controle negativo); C+ (Controle positivo, <i>C. jejuni</i> NCTC 11351). ; LC, L4, L10 (presença de transcritos em todos os tratamentos, exceto controle).....	46

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para verificar a produção de transcritos dos genes <i>ciaB</i> , <i>dnaJ</i> , <i>p19</i> e <i>sodB</i> em <i>C. jejuni</i>	37
Tabela 2. Contagens de <i>C. jejuni</i> (UFC.mL ⁻¹) criopreservadas em leite UHT integral e neopeptona+glicerol 12%, submetidas a três tratamentos e congeladas em nitrogênio líquido.....	40
Tabela 3. Viabilidade de <i>C. jejuni</i> submetidas a tratamentos pré-congelamento após inoculação em dois crioprotetores e armazenadas a -20°C por 0, 30, 60 e 90 dias.....	43
Tabela 4. Número de amostras viáveis após descongelamento, analisadas quanto à capacidade de produzir transcritos pela técnica de RT-PCR.....	45
Tabela 5. Produção de transcritos para os genes <i>sodB</i> e <i>p19</i> por cepas de <i>C.jejuni</i> ATCC 33291 criopreservadas em leite UHT, com e sem submissão a pré-tratamentos a 4°C e 10°C por 30 minutos antes do armazenamento a -20°C.....	47
Tabela 6. Produção de transcritos para os genes <i>sodB</i> e <i>p19</i> , <i>ciaB</i> e <i>dnaJ</i> por cepas de <i>C.jejuni</i> ATCC 33291 criopreservadas em neopeptona + glicerol 12%, com e sem submissão a pré-tratamentos a 4°C e 10°C por 30 minutos antes do armazenamento a -20°C (dia 0).....	48
Tabela 7. Produção de transcritos por cinco cepas de <i>C.jejuni</i> NCTC 11351 criopreservadas em neopeptona + glicerol 12%, discriminado por tratamentos e tempo de armazenamento a -20°C.....	50
Tabela 8. Produção de transcritos para os genes <i>sodB</i> e <i>p19</i> por seis cepas de <i>C.jejuni</i> NCTC 11351 criopreservadas em leite UHT integral, discriminado por tratamentos e tempo de armazenamento a -20°C.....	50

Tabela 9.	Presença de transcritos dos genes <i>sodB</i> e <i>p19</i> por 20 cepas de <i>C. jejuni</i> IAL 2383 recuperadas na forma viável após manutenção em dois crioprotetores a -20° C.....	52
Tabela 10.	Presença de transcritos dos genes <i>ciaB</i> e <i>dnaJ</i> por 20 cepas de <i>C. jejuni</i> IAL 2383 recuperadas na forma viável após manutenção em dois crioprotetores a -20° C.....	54
Tabela 11.	Quantidade de cepas analisadas por crioprotetor quanto à Viabilidade e à Produção de transcritos e os respectivos resultados.....	55

**INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES E PRÉ- ADAPTAÇÃO NA
VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE TRANSCRITOS POR CEPAS DE
Campylobacter jejuni MANTIDAS A -20°C**

RESUMO – *Campylobacter* é considerado um microrganismo frágil e sensível às condições ambientais, mas que demonstram possuir estratégias para sobreviver em condições ambientais desfavoráveis. Este estudo avaliou a viabilidade e produção de transcritos dos genes *sodB*, *p19*, *ciaB* e *dnaJ* em cepas ATCC 33291, NCTC 11351 e IAL 2383 armazenadas em leite UHT integral e neopeptona + glicerol 12%, submetidas ou não a pré-tratamentos à temperatura de 4°C ou 10°C por 30 minutos. As análises foram realizadas imediatamente após o congelamento em nitrogênio líquido (dia 0) e após manutenção por 30, 60 e 90 dias a -20°C. A viabilidade foi avaliada pelo método tradicional de cultivo e a produção de transcritos pela técnica do RT-PCR. A quantificação só foi possível no primeiro dia de análise (dia 0) e apresentaram média de $3,0 \times 10^7$ UFC, sendo que nos demais períodos de armazenamento as cepas apresentaram crescimento confluyente não permitindo sua enumeração. O conjunto de resultados permitiu verificar que o leite UHT integral foi mais adequado para a criopreservação que o uso da neopeptona + glicerol 12%. O pré-tratamento a 4°C por 30 minutos favoreceu a produção de transcritos para os genes *ciaB* e *dnaJ*. Para as cepas ATCC 33291 e NCTC 11351 foi verificada uma possível interligação dos genes *sodB* e *p19*, entretanto, esta ligação não foi observada para a cepa IAL 2383, que também mostrou comportamento diferente das outras cepas quanto à viabilidade nos dois crioprotetores e produção de transcritos. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que quando a manutenção da viabilidade das cepas é essencial, faz-se necessário o uso das diferentes combinações crioprotetor/tratamentos para aumentar as chances de recuperação e, quando o objetivo principal é a produção de transcritos, a opção para manter a fidedignidade dos resultados é a extração imediata do DNA das estirpes isoladas.

Palavras-chave: *Campylobacter*, criopreservação, pré-tratamento, RT-PCR

**INFLUENCE OF CRYOPROTECTANTS AND PRETREATMENT ON
VIABILITY AND PRODUCTION OF TRANSCRIPTS IN STRAINS
Campylobacter jejuni KEPT AT -20 °C**

ABSTRACT – *Campylobacter* is considered a fragile microorganism and sensitive to environmental conditions, but demonstrate strategies to survive in unfavorable environmental conditions. This study evaluated the viability and production of transcripts of the genes *sodB*, *p19* *ciaB* and *dnaJ* in strains ATCC 33291, NCTC 11351 and IAL 2383 stored in UHT milk and neopeptona + 12% glycerol, whether or not subject to the pre-treatment temperature of 4 °C or 10 °C for 30 minutes. Analyses were performed immediately after freezing in liquid nitrogen (day 0) and after maintenance for 30, 60 and 90 days at -20 °C. The viability was evaluated by traditional method of cultivation and production of transcripts by RT-PCR technique. The quantification was only possible on the first day of analysis (day 0) and had a mean of 3.0×10^7 UFC and in the remaining periods of storage strains showed confluent growth not allowing their enumeration. The set of results has shown that the UHT milk was the most appropriate for cryopreservation than the use of neopeptona +12% glycerol. The pretreatment at 4 °C for 30 minutes favored the production of transcripts for *ciaB* and *dnaJ* genes. For the strains ATCC 33291 and NCTC 11351 was verified a possible interconnection of *sodB* genes and *p19*, however, this link was not observed for the strain IAL 2383, which also showed different behavior from other strains for viability in both cryoprotectants and production of transcripts. The results of this study show that when the maintenance of viability of the strains is essential, it is necessary to use different combinations of cryoprotectants / treatments to increase the chances of recovery and, when the primary purpose is the production of transcripts, the option to maintain the reliability of the results is the immediate extraction of DNA of isolated strains.

Key-words: *Campylobacter*, cryopreservation, pretreatments, RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

Espécies termofílicas de *Campylobacter* são reconhecidas como os agentes etiológicos mais frequentes da diarreia bacteriana de origem alimentar em humanos em países desenvolvidos, como os do continente Europeu e Estados Unidos da América (EFSA, 2010; CDC, 2010). Os humanos infectam-se por contato direto com animais portadores ou pela ingestão de carne crua ou mal processada de aves, suínos e bovinos, leite não pasteurizado e água contaminados (FDA, 2012).

A campilobacteriose normalmente é uma doença com manifestações gastrointestinais, que, em cerca de sete dias, tende a manifestar uma melhora espontânea do quadro clínico (COCKER et al., 2002). A infecção é usualmente auto limitante em adultos saudáveis, mas em crianças, idosos ou indivíduos imunossuprimidos pode se tornar uma doença severa requerendo terapia antibiótica (COX, 2002). Além disso, em alguns casos, podem ocorrer graves sequelas da infecção, como o desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré, a síndrome de Fisher e a Síndrome de Reiter (DORREL; WREN, 2007).

Campylobacter é considerado um microrganismo frágil e sensível às condições ambientais (PARK, 2002). Isso é facilmente observado em seu cultivo no laboratório, necessidade de atmosfera especial para incubação e dificuldade na manutenção das cepas para estudos posteriores. Estes estudos podem contribuir para melhorar o entendimento da epidemiologia do microrganismo. Adicionalmente, podem auxiliar no entendimento das condições que garantem a manutenção desta bactéria em condições desfavoráveis e basear controles que objetivem diminuir a sua persistência no ambiente.

É conhecido que *Campylobacter* apresenta uma resposta ao estresse para se adaptar (GARÉNAUX et al., 2008), o que pode permitir a sua sobrevivência em condições mais adversas, como variações de temperatura e de ambientes (SHAHEEN; MILLER; OYARZABAL, 2006), além disso, a *Campylobacter* pode modular a expressão da virulência de acordo com a mudança de condições (CHUNG, BANG; DRAKE, 2006).

À comparação com outros agentes patogênicos de origem alimentar, como a *Salmonella* sp., *C. Jejuni* se mostra mais sensível ao estresse (BIRK; KNOCHEL, 2009; MURPHY, CARROLL; JORDAN, 2003) e incapazes de

multiplicar abaixo dos 30 °C (STANLEY; JONES, 2003). Apesar disso, *C. Jejuni* ainda possui potencial de sobrevivência notável sob condições não permissivas para seu crescimento (CHAN et al., 2001), já que é capaz de persistir na cadeia alimentar, sobreviver e ser o mais prevalente agente bacteriano causador de doenças transmitidas por alimentos (HUMPHREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007). A alta prevalência comprova que *C. jejuni* sobrevive às condições desfavoráveis como exposição ao oxigênio do ambiente, grandes mudanças de temperatura e variações no pH, condições comuns no percurso percorrido pelo microrganismo até a infecção do hospedeiro humano ou animal.

As diferentes condições de armazenamento afetam a sobrevivência celular diminuindo a viabilidade bacteriana, que é definida como a capacidade do microrganismo crescer e se multiplicar após o descongelamento, quando inoculado em um meio de cultura apropriado (WELLS; RUSSEL, 1996). Rojas (2007) ressaltou que no processo de criopreservação o desafio é determinar como as células podem sobreviver a baixas temperaturas e retornar subsequentemente às condições fisiológicas.

A sensibilidade das células ao estresse pelo frio é dependente de vários fatores, incluindo a mudança de temperatura, velocidade de congelamento, meio de cultura, estirpe microbiana e duração do armazenamento (BEALES, 2004).

A aplicação de tratamentos de estresse, prévios ao congelamento às células, como o choque frio, resultam em alterações na composição da membrana citoplasmática e na indução de algumas proteínas de estresse. Essas alterações na célula estão associadas ao aumento da tolerância ao congelamento (ZHANG et al., 2012).

A capacidade de expressar genes de tolerância ao estresse e a utilização de tratamentos térmicos para adaptar previamente, a bactéria antes do congelamento, assim como a interferência dos crioprotetores tem sido estudados em *C. jejuni*, *Oenococcus oeni*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella entericae* *Escherichia coli* (ZHANG et al., 2012; CODY et al., 2008; STINTZI; WHITWORTH, 2003). Os resultados obtidos mostram que estas variáveis resultam em alterações na viabilidade celular no decorrer do período de estocagem.

Entender e conhecer os diferentes fatores que interferem na manutenção de cepas de *Campylobacter jejuni* armazenadas sob congelamento permitirá estudos posteriores sobre sua epidemiologia e patogenia. Além disso, podem auxiliar na compreensão das condições que contribuem para sua persistência no ambiente, e conseqüentemente, em ações visando o seu controle.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar a viabilidade e produção de transcritos de genes de virulência que são relacionados à termotolerância em três cepas de *Campylobacter jejuni* sem e com pré-tratamentos a 4°C e 10°C, armazenadas em dois crioprotetores e mantidas congeladas a -20°C por 30, 60 e 90 dias.

1.1.2. Objetivos específicos

Determinar a viabilidade de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, NCTC 11351 e IAL 2383 armazenados a -20°C por 0, 30, 60 e 90 dias em caldo neopeptona + glicerol 12% e em leite integral UHT (ultra high temperature):

- Os efeitos crioprotetores do caldo neopeptona + glicerol 12% e do leite UHT integral na manutenção da viabilidade das cepas.
- A influência da submissão das cepas a estresse térmico por manutenção a temperaturas de 4°C e 10°C por 30 minutos pré-congelamento na viabilidade das cepas inoculadas nos dois crioprotetores.
- A influência do tempo de manutenção sob congelamento na viabilidade de *Campylobacter jejuni*.
- A produção de transcritos associados à invasividade, tolerância ao frio e choque térmico antes e após o congelamento das cepas nos diferentes tratamentos e períodos utilizados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Caracterização do gênero *Campylobacter* spp.

Campylobacter foi descrito pela primeira vez em 1886 por Escherich, mas somente na década de 70 adquiriu importância em saúde pública devido à patogenicidade de algumas espécies causadoras de diarreia nos seres humanos (TRABULSI et al., 1999).

As espécies de *Campylobacter* foram incluídas no atual gênero em 1963 (ADAMS; MOSS, 1997). Previamente, eram classificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, sendo reorganizadas após inúmeras pesquisas que empregaram técnicas moleculares para identificação das espécies (WINN; KONEMAN, 2008).

A família Campylobacteriaceae é composta pelos gêneros *Campylobacter* e *Arcobacter* (ON, 2001). As diferenças fundamentais entre os dois gêneros são que *Campylobacter* não pode crescer a 15°C, mas cresce bem entre 37°C e 42°C e *Arcobacter* cresce em baixas temperaturas (17°C) e pouco a 37°C-42°C (MALBRÁN, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

As características morfológicas celulares da família incluem pequenos bacilos Gram negativos curvos ou espiralados, em forma de “S” ou asa de gaivota. São essencialmente microaerófilos, com crescimento máximo em atmosfera contendo aproximadamente 10% de CO₂, 5% de O₂ e 85% de N₂ (HUMPHREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007). Não são fermentativas, são oxidase positivas e tem reação variável para a catalase (QUINN et al., 1994).

As colônias de *Campylobacter* nos diversos meios de cultura são semelhantes, podendo apresentar-se lisas, convexas e brilhantes, com bordas perfeitas, ou planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas (GODOI; GANDRA; GANDRA, 2010). Geralmente são incolores, levemente creme ou acinzentadas, podendo apresentar brilho d'água ao refletir a luz ambiental (QUINN et al., 2005).

As culturas que passam por processo de injúria podem ser substituídas por formas cocóides, quando observadas ao microscópio (SHANE; HARRINGTON, 1998). Pode também perder a capacidade de multiplicação em meios de cultura, o que torna difícil seu cultivo em laboratório (HUNT; ABEYTA;

TRANT, 2001). Reezal; Mcneil e Anderson (1998) ressaltaram a dificuldade da recuperação dessas células cocóides, mesmo viáveis, quando são utilizadas técnicas de cultura convencionais.

Segundo Hazeleger et al. (1994), quando as bactérias perdem sua capacidade de multiplicação em meios de cultivos inertes são consideradas formas viáveis e não cultiváveis (VNC). A transição de uma forma viável para VNC é acompanhada de uma redução na dimensão celular e uma mudança na morfologia de bastonetes para cocos. Não há evidências de que o decréscimo do tamanho seja devido à fissão binária e, sim, a uma estratégia para minimizar as exigências para manutenção celular. Dessa forma, a redução em massa da parede pode ser resultado de atividade catabólica (ROWE et al., 1998).

Rowe et al. (1998) citaram que formas VNC de *Campylobacter* spp. são induzidas pelo estresse térmico, pela escassez de nutrientes no meio, temperaturas baixas, dentre outros fatores, e representa uma estratégia de sobrevivência do organismo no ambiente natural como o ambiente aquático.

As espécies responsáveis por doenças gastroentéricas são termotolerantes, com crescimento ótimo em temperaturas entre 37°C e 42°C e o meio ideal para seu crescimento deve ser composto por altos níveis de proteína (HAZELEGER et al., 1994). Germano & Germano (2001) afirmaram que *Campylobacter* spp. pode sobreviver durante quatro semanas ou mais em água a 4°C. Não suporta durante muito tempo situações de ressecamento e congelamento, característica que limita sua transmissão. A desinfecção com cloro e a pasteurização destroem o microrganismo. De acordo com Food Safety and Inspection Service (FSIS, 1997) e Altekruze et al. (1999) a bactéria não se multiplica em água, mas permanece viável e infectiva para homens e animais.

Dentre as espécies de *Campylobacter*, aquelas associadas às doenças transmitidas por alimentos constituem um grupo distinto, chamadas de termofílicas (SILVA et al., 2007). O grupo de espécies termofílicas é responsável por uma série de patologias de origem alimentar, estando relacionados a esses microrganismos outros quadros clínicos mais graves em humanos, além de casos de enterite. Entre as complicações destacam-se a Síndrome de Guillain-Barré, que é uma desordem dos nervos periféricos caracterizada por paralisia e a artrite reativa, que é uma inflamação asséptica

das membranas sinoviais (BIASI, 2010), a Síndrome de Fisher e a Síndrome de Reiter, responsável pela ocorrência de artrite reativa (DORREL; WREN, 2007).

No grupo *Campylobacter* termotolerantes estão incluídas as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*. Estas se diferenciam das demais espécies por apresentarem temperaturas ótimas de multiplicação na faixa de 42 a 43°C e não se multiplicarem a 30°C (SILVA et al., 2007).

Em baixa temperatura, a maioria dos microrganismos apresentam modificações fisiológicas que permitem sua sobrevivência a esta condição (RUSSEL et al., 1993). Quando submetidos ao congelamento, resfriamento ou pH reduzido, sua viabilidade diminui consideravelmente (ADAMS; MOSS, 1997). *Campylobacter* spp. são inativadas em temperatura de congelamento de -15°C em 3 dias quando as células são mantidas em cultura (STERN; KOTULA, 1982), contudo, o congelamento não elimina o patógeno de alimentos contaminados (LEE; SMITH; COLOE, 1998).

Estudos indicam que o congelamento reduz o número de células viáveis de *Campylobacter* presentes nas carnes cruas, dada sua característica de sensibilidade a baixas temperaturas (SILVA; AMSTALDEN, 1997), mas o microrganismo pode ser recuperado de carcaças de frango congeladas (MELO, 2012). Outros estudos demonstram que não há diferença significativa na incidência de *C. jejuni* nas amostras frescas e naquelas submetidas a baixas temperaturas, comprovando que este microrganismo é capaz de sobreviver nas condições de resfriamento e congelamento (MAZIERO, 2007). Hazeleger et al. (1994) afirmaram que células de *Campylobacter* spp. sobrevivem por um longo período a 4°C. O microrganismo é capaz de crescer em pH de 4,9 a 9,0, sendo ótimo valores entre 6,5 a 7,5.

2.2. *Campylobacter* e riscos para a saúde pública

As bactérias do gênero *Campylobacter* vêm recebendo grande destaque como causadoras de problemas de saúde pública nos últimos 30 anos. Estudos comprovam que atualmente estas bactérias são uma das principais causas mundiais de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, sendo a principal causa enterite no mundo, como exemplo, os Estados Unidos,

que possuem cerca de 1% da sua população atingida com esta enfermidade (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012). Entretanto, em muitas situações sua incidência é subestimada devido à natureza auto limitante das manifestações clínicas e a falta de notificação de infecções alimentares (ALVES, 2006).

O gênero *Campylobacter* é composto por várias espécies de natureza zoonótica, amplamente distribuídos em animais de sangue quente, domésticos e silvestres como frangos, suínos, ovinos, bovinos, cães e gatos (SILVA et al., 2007). Ao contrário do gênero *Salmonella* que sobrevive bem fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente, este gênero é menos adaptado à vida extra-intestinal (OLIVO, 2006).

Aproximadamente 95% das infecções humanas atribuídas ao gênero *Campylobacter* são causadas pelas espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Embora qualquer pessoa possa ser infectada por *C. jejuni*, crianças de até cinco anos de idade, adultos jovens (15 a 29 anos) e idosos são mais frequentemente afetados que grupos de outras faixas etárias (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012). O mecanismo de transmissão mais frequente é a ingestão de água e alimentos contaminados, principalmente os de origem animal, como leite cru e carne de aves (CANAL; PÁEZ, 2007). A dose infectante é baixa, estimando-se que a ingestão de 400-500 células possa provocar a doença (ANONYMOUS, 1993). Em humanos a gastroenterite provocada por *Campylobacter* é chamada campilobacteriose e possui período de incubação de dois a cinco dias, com duração de sete a 10 dias (ANONYMOUS, 1993).

A expressiva participação do Brasil no concorrido mercado externo de produtos cárneos, associada aos poucos estudos desenvolvidos no país relacionados à incidência de *Campylobacter* nesses produtos, leva ao questionamento na segurança dos alimentos e no gerenciamento do risco que representa esse microrganismo. Isso implica na necessidade de debates junto às indústrias e órgãos oficiais sobre o tema, a fim de antever o problema e garantir a qualidade do produto ofertado (EMBRAPA, 2008).

2.3. *Campylobacter* e métodos de criopreservação

Devido à similaridade morfológica entre as diferentes espécies que compõem o gênero *Campylobacter* e a dificuldade de isolamento e caracterização somente em 1993 foram realizados os estudos que resultaram na manutenção *in vitro* desta bactéria por um grupo de pesquisadores escoceses (GUEDES, 2003).

O reconhecimento das espécies de *Campylobacter* como um patógeno entérico importante nos últimos anos gerou interesse entre os cientistas na realização de diferentes pesquisas relacionadas ao microrganismo, incluindo técnicas diagnósticas. Como resultado, as técnicas para o isolamento e identificação do organismo a partir de espécimes clínicos foram consideravelmente simplificadas (BUTZLER; SKIRROW, 1979). No entanto, a manutenção e preservação de culturas de *C.jejuni* em laboratório continuam como problemas a resolver, já que para os mesmos autores a espécie é conhecida por perder rapidamente a sua viabilidade, geralmente após 72 horas do isolamento primário.

A preservação de isolados bacterianos por longo período sem laboratório é necessária para uso como cepas controle, uso no controle de qualidade, no ensino, na pesquisa, para estudos epidemiológicos e análises quantitativas e qualitativas (WHITE; SANDS, 1985; ROGOL et al., 1990). Cody (2008) afirmou que o congelamento de culturas de bactérias é o método mais comum para preservação de cepas em laboratório.

A conservação prolongada de cultivos de *Campylobacter* é dificultada pela sua sensibilidade ao oxigênio (LEE; SMIBERT; KRIEG, 1988) e a formação de formas viáveis, mas não cultiváveis (JONES; SUTCLIFFE; CURRY, 1991). Para a preservação por longos prazos, pesquisas descrevem o uso da liofilização e do uso do nitrogênio líquido (MILLS; GHERNA, 1988), porém, esses métodos requerem equipamentos que não estão disponíveis em todos os laboratórios.

As dificuldades para o uso do frio na manutenção de células bacterianas iniciam-se com a possibilidade de alterações na membrana celular. No caso de alterações na permeabilidade pode ocorrer extravasamento do conteúdo celular, e ainda, quando as células são submetidas ao congelamento, micro

cristais de gelo podem promover o seu rompimento (EVERIS, 2001; BOZIARIS; ADAMS, 2001).

Em 1913 já era conhecido que o uso de aditivos, tal como leite, açúcar ou o glicerol protegem as bactérias de morte celular após repetidos ciclos de congelamento e descongelamento (CODY, 2008). O mecanismo de ação dos crioprotetores baseia-se nas ligações de hidrogênio que eles promovem com as moléculas de água. Essas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células (ZHAO; ZHANG, 2005).

O glicerol é hoje um dos agentes mais comumente utilizados como crioprotectores (CODY et al., 2008). Os métodos convencionais para o congelamento inclui a suspensão de culturas bacterianas em glicerol a 15% (BAKER, 1998). Fonseca, Béal e Corrieu (2001) avaliando a preservação da atividade celular de bactérias como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*, confirmaram o efeito benéfico do agente crioprotetor glicerol durante o congelamento e o armazenamento desses microrganismos a -70°C. Gorman e Adley (2004) utilizaram diferentes técnicas para o armazenamento da bactéria *C. jejuni*, sendo que, a bactéria permaneceu viável durante sete meses, quando armazenada a -20°C com 10% de glicerol e durante 12 meses quando armazenada a -85°C com 15% de glicerol. Porém, Saha e Sanyal (1991) verificaram que *C. jejuni* estocadas a -10°C em glicerol a 15% perderam a viabilidade após 45 dias.

Alternativamente, o leite desnatado, comumente usado na liofilização, pode ser utilizado como uma solução para o congelamento (BARBAREE; SANCHEZ, 1982; ESSIAIN; FLOURNOY, 1986). O leite desnatado em concentrações de um a 10% tem sido frequentemente utilizado para criopreservação e liofilização de vários microrganismos (DAHMEN; STAUB; SCHWINN, 1983; GIBSON; KHOURY, 1986). *Mycobacterium tuberculosis* em suspensão no leite, manteve-se 100% viável após um ano de armazenamento a -70°C (KIM; KUBICA, 1973).

Cody et al. (2008) comparou o armazenamento de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi*, *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e afirmaram que para essas bactérias, uma solução de leite desnatado a 10% é melhor

crioprotetor do que uma solução de glicerol a 15%. Além disso, os autores recomendam o uso de leite desnatado a 10% para melhorar a viabilidade da bactéria em longos prazos de armazenamento. O efeito protetor do leite desnatado pode ser devido a alteração na fluidez da membranda da célula (ANNOUS; KOZEMPEL; KURANTZ, 1999; CARVALHO et al., 2004) ou o cálcio pode contribuir com a estabilidade das enzimas celulares (BARACH; ADAMS; SPECK, 1976). Além disso, o meio ideal para seu crescimento deve ser composto por altos níveis de proteína (HAZELEGER et al., 1994). Carvalho e colaboradores (2004) afirmam que o meio utilizado para liofilização quando suplementado com glucose, frutose, lactose, manose ou sorbitol conduziu em muitos casos a melhoria da proteção durante o armazenamento de cepas de *Lactobacillus delbrueckii*.

Estudos revelam que a resistência de *Salmonella* aos tratamentos térmicos é maior quando as mesmas estão na presença de gordura (DOYLE; MAZZOTTA, 2000; BOZIARIS; ADAMS, 2001; TAYLOR-ROBINSON et al., 2003). Por isso, a utilização do leite integral pode complementar a estabilidade celular fornecendo todos os componentes para a manutenção dos microrganismos contidos no leite desnatado, aliado à resistência conferida pela presença de lipídeos.

A tolerância a baixas temperaturas também pode ser observada por culturas bacterianas previamente submetidas à pré-tratamentos de estresse em temperaturas sub-letais, o que resulta numa maior sobrevivência (BEALES, 2004). Por exemplo, um pré-tratamento a -20°C com quatro ciclos de congelamento-descongelamento em cultivos de *Streptococcus thermophilus*, resultou em um aumento de 1000 vezes na sobrevivência em comparação com as células que não foram pré-tratadas (WOUTERS et al., 1999).

Além do meio utilizado como crioprotetor, existem estudos que verificam a interferência de uma pré-adaptação às baixas temperaturas, antes do congelamento e estocagem da cepa. Lee (2004) comparou em *Lactococcus lactis* o efeito do congelamento imediato a -20°C e o congelamento após a manutenção do cultivo a 10°C por 4 horas (condição de estresse térmico), resultando num aumento da viabilidade quando as cepas foram submetidas a este último tratamento.

2.4. Presença de transcritos e RT-PCR

Levando em consideração que as espécies de *Campylobacter* habitam uma grande variedade de ambientes com uma vasta gama de temperaturas, como água a 25°C - 30°C, o alimento refrigerado a 4°C, o intestino do frango a 42°C e o intestino humano a 37°C, pode-se concluir que a bactéria deve regular a expressão gênica em resposta ao choque pelo frio e pelo calor, para adaptar-se, sobreviver, e, eventualmente, replicar nestas temperaturas diversas (STINTZI; WHITWORTH, 2003).

Enquanto a resposta ao choque térmico pelo calor tem sido extensivamente estudada em muitas bactérias, muito pouco se sabe acerca do mecanismo de resposta e de adaptação ao choque pelo frio. No entanto, as bactérias devem ser capazes de se adaptar a temperatura fria durante um período prolongado de tempo (como em alimentos refrigerados) e ser capaz desobreviver a um declínio súbito da temperatura, como quando excretado no meio ambiente, juntamente com as fezes dos animais. A chamada resposta ao choque pelo frio deve permitir que as bactérias se adaptem rapidamente ao seu novo ambiente. Muitas bactérias produzem proteínas de choque pelo frio, após um declínio da temperatura ótima para a temperatura mínima de crescimento ou a temperaturas mais baixas (PHADTARE; YAMANAKA; INOUE, 2000).

Os sistemas de respostas ao estresse, como a limitação de nutrientes ou mudanças de condições ambientais são codificados por genes que induzem a bactéria a entrar na fase estacionária. Esses genes são reconhecidos como fatores-chave no aumento da resistência ao estresse, caracterizados por possuírem diversas funções, como a proteção contra danos ao DNA, determinação de modificações morfológicas, virulência, osmoproteção, proteção contra estresse oxidativo (LOEWEN; HENGGE-ARONIS, 1994), termotolerância e resposta ao choque pelo calor e ao frio (VAN VLIET; KETLEY, 2001).

Recentemente em um estudo sobre *C. jejuni*, Reid e colaboradores (2008) encontraram alterações na expressão de genes após centenas de choques com ácido que simulavam o ambiente gástrico. Muitos dos genes regulados pelo estresse ácido no estudo foram previamente caracterizados como genes participativos ao choque pela temperatura e genes de estresse

oxidativo. No entanto, nem todos os genes precisam necessariamente ser traduzidos em proteínas vitais específicas para garantir a sobrevivência da bactéria (BIRRELL et al., 2002; CALHOUN et al., 2010).

O estresse oxidativo tem sido implicado como um mecanismo que contribui na injúria de *Campylobacter* após o processo de congelamento e descongelamento, uma vez que oxidação ocorre após o descongelamento. A produção de enzimas como as superóxido dismutase (SODs) demonstraram ser importantes fatores de virulência de vários agentes patogênicos bacterianos incluindo *Campylobacter coli* e *C. jejuni* (PESCI; COTTLE; PICKETT, 1994; PURDY et al., 1999). Três tipos de enzimas SODs foram descritas: os cofatores que contêm ferro (*sodB* ou FeSOD), manganês (*sodA* ou MnSOD), e cobre e zinco (*sodC* ou CuZnSOD). Estas enzimas catalisam a quebra das moléculas de superóxido em peróxido de hidrogênio e de dióxigênio e constituem, assim, um dos principais mecanismos de defesa da célula contra o estresse oxidativo (HASSAN, 1988). Stintzi e Whitworth (2003) observaram um aumento na transcrição do gene *sodB* mediante choque ao frio, sugerindo, que o estresse oxidativo é um componente da resposta ao estresse pelo frio em *Campylobacter*. Além disso, estes genes protegem especificamente os componentes celulares, incluindo várias enzimas citoplasmáticas, DNA, e os fatores de membrana, contra danos causados por radicais livres de oxigênio (STEINMAN, 1985; HOPKIN; PAPAIZIAN; STEINMAN, 1992).

A biodisponibilidade do ferro no interior do hospedeiro mamífero é extremamente limitada, em contraste com o ambiente externo (LITWIN; CALDERWOCK, 1993). Isto parece ser um sinal chave para os agentes patogênicos, tais como a *Campylobacter*, para “sentir” que invadiram um hospedeiro e começar a expressar determinantes de virulência (OTTO; VERWEIJ-VAN VUGHT; MACLAREN, 1992; LITWIN; CALDERWOCK, 1993; VASIL; OCHSNER, 1999). Vale ressaltar que a *Campylobacter* apresenta habilidade de adquirir ferro, fator necessário para o desenvolvimento e virulência para o hospedeiro (KONKEL, et al., 2001). O gene *p19* codifica uma proteína periplasmática ferro-dependente cuja função é o transporte de ferro (PALYADA, 2004) e a regulação desta proteína indica uma maneira de controlar o nível de ferro intracelular durante o estresse (BIRK et al., 2012).

Os três principais mecanismos de produção de doenças das espécies de *Campylobacter* spp. que causam gastroenterite são: adesão, invasão e produção de toxinas (BABAKHANI; JOENS, 1993). Vários fatores de virulência relacionados com a capacidade de invadir células epiteliais do trato gastrointestinal têm sido identificados em estudos anteriores (RIVERA-AMILL et al., 2001; HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006). O gene *ciaB* codifica uma proteína envolvida na invasão celular (RIVERA-AMILL et al., 2001). A presença dos transcritos do gene *ciaB* é importante já que a secreção da proteína *ciaB* é de grande relevância para invasão tanto em células epiteliais como na mucosa intestinal (KONKEL et al., 1999; ZIPPRIN et al., 2001).

MA; HANNING; SLAVIK, (2009) submeteram *C. jejuni* a estresse nutricional e verificaram que a expressão do gene *ciaB* foi bastante reduzida entre 24 e 48 horas. Já Xie et al. (2011) expôs *C. jejuni* a estresse nutricional acrescentando um aditivo alimentar, o óxido de zinco (ZnO) e verificaram que a transcrição do gene *ciaB* não foi afetada.

A presença de transcritos do gene *dnaJ* indica que *Campylobacter* codifica uma proteína do choque térmico, que permite à bactéria crescimento em temperatura superiores a 40°C e seja termotolerante (KONKEL et al., 1998). As proteínas oriundas do gene *dnaJ* apresentam uma importante função na superação a variações bruscas de temperatura, de forma que o microrganismo se torne capaz de sobreviver e adaptar-se à nova temperatura (STINTZI, 2003). A resposta ao choque térmico está associada ao desempenho na colonização do trato intestinal e à sobrevivência bacteriana a altas temperaturas (KONKEL et al., 1998). Konkelet al. (1998) e Reid et al. (2008) ao analisarem proteínas de choque térmico, tais como ClpP e DnaJ, constataram que sua síntese varia com um aumento súbito da temperatura. Já durante o estresse submetido pelo choque frio, os genes responsáveis pela resposta ao choque térmico reprimem sua expressão (BEALES, 2004).

Melo (2012) avaliou a presença de transcritos de virulência dos genes *ciaB* e *dnaJ* em cepas de *C. jejuni*, *C. coli* e *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frango resfriadas e congeladas e verificou que 57,1% das cepas apresentaram os transcritos de virulência. A autora argumentou que o fato de algumas cepas não expressarem transcritos para os genes *ciaB* e/ou *dnaJ* pode estar relacionado à particularidades das cepas, que podem assumir

diversas propriedades para modular sua virulência. Além disso, afirmou que a capacidade de produzir transcritos de virulência pode estar relacionada às condições a que as cepas são submetidas, já que podem possuir estratégias diferentes para lidar como o estresse.

Os genes *sodB*, *p19*, *ciaB* e *dnaJ* estão relacionados aos mecanismos de patogenicidade e de adaptação da *C.jejuni* (STINTZI; WHITWORTH, 2003; PALYADA, 2004; ZHENG et al., 2006). Esses genes codificam proteínas envolvidas na capacidade invasiva e de adaptação ambiental de *Campylobacter jejuni* e são, portanto, considerados como possíveis fatores de virulência desta espécie.

PCR é o método mais conveniente para a determinação de prevalência de genes de virulência, mas a variação evolutiva dos genes, as mutações no local de ligação dos *primers*, bem como a utilização de iniciadores de PCR diferentes, podem contribuir para gerar resultados diferentes a partir de diversos estudos (RIPABELLI et al., 2010). Além disso, o fenótipo de uma estirpe não pode ser inferido apenas pela presença ou ausência de um gene, já que os níveis de expressão podem variar muito de estirpe para estirpe e o meio em que se encontram (PICKETT et al., 1996; GILBERT; SLAVIK, 2004; VAN DEUN et al., 2007).

Afirmar que determinada cepa é capaz de transcrever genes associados à virulência assegura de forma mais contundente o poder patogênico da estirpe estudada. A presença dos transcritos mostra que o microrganismo está transcrevendo um determinado gene, e provavelmente, expressando o seu potencial genético.

A técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) baseia-se na amplificação de DNA obtido por meio da transcrição reversa de RNA. Por meio da enzima transcriptase reversa (RT), o RNA é convertido em DNA complementar (DNAc), que posteriormente é amplificado por PCR (TANG; PERSING, 1999). As principais vantagens dessa técnica são: a rapidez na obtenção dos resultados, ao material analisado não ser mais infeccioso, e quando devidamente padronizada, às altas taxas de sensibilidade e especificidade (GEBARA et al., 2004; PILZ; ALFIERI; ALFIERI, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Foram utilizadas três cepas de referência de *Campylobacter jejuni* adquiridas de bancos de cultura: (*American Type Culture Collection*) ATCC 33291, (*National Collection of Type Cultures*) NCTC 11351 e (*Instituto Adolfo Lutz*) IAL 2383.

Inóculos padronizados de cada uma das cepas foram adicionados em paralelo a duas substâncias crioprotetoras: neopeptona-glicerol 12% e leite integral UHT e distribuídos em ependorfes. Após foram submetidas a três tratamentos:

- 1) Imediato congelamento por imersão em nitrogênio líquido (Controle)
- 2) Estresse térmico (4°C/30 minutos) e congelamento em nitrogênio líquido
- 3) Estresse térmico (10°C/30 minutos) e congelamento em nitrogênio líquido

Depois da imersão no nitrogênio líquido por 10 segundos, os ependorfes foram mantidos a -20°C por períodos de 30, 60 e 90 dias e uma amostra de cada tratamento foi imediatamente analisada, denominadas dia 0 (Figura 1).

Em cada período foi verificado a viabilidade das cepas pelo método de cultura tradicional com pré-enriquecimento, quantificação após diluição seriada e a capacidade de produzir transcritos de invasividade e tolerância ao frio pela técnica de RT-PCR. Todas as análises microbiológicas e moleculares foram realizadas em triplicata.

Um esquema representando a condução do experimento pode ser visualizada na Figura 1.

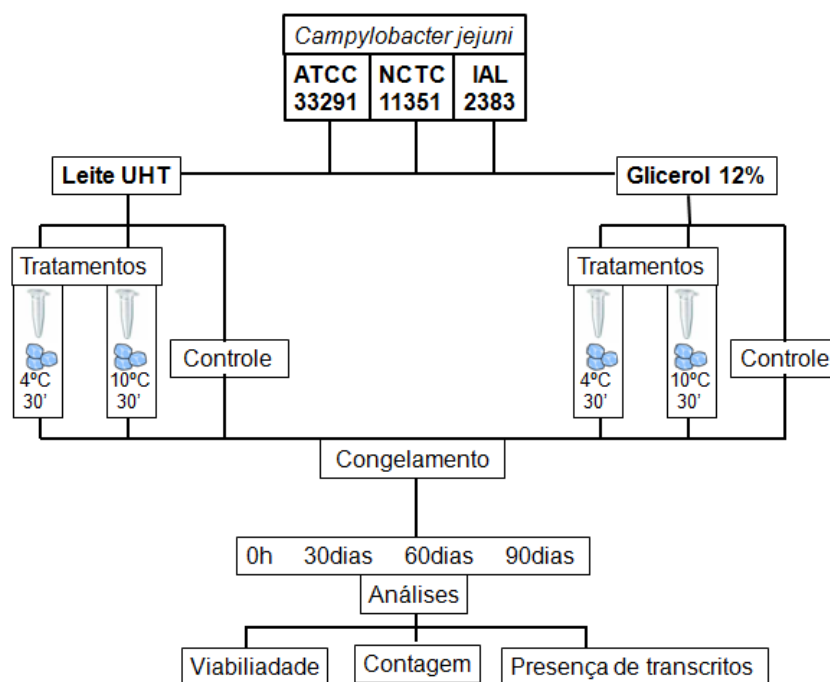


Figura 1: Esquema representativo dos procedimentos realizados no estudo.

3.2. Processamento das Cepas

O estudo foi realizado com as cepas de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, NCTC 11351 e IAL 2383.

A reativação das cepas-padrão (Microbiologics®) foi realizada conforme descrito pelo fornecedor para as cepas ATCC e NCTC, com a adição do caldo hidratante à ampola contendo a cultura liofilizada. Após homogeneização, as cepas foram semeadas em ágar *Campylobacter Blood-Free Selective Medium (m-CCDA)* (Oxoid®) com auxílio de suabe estéril e as placas incubadas invertidas a 37° C por 44 horas ± 4 horas em atmosfera microaerofilia.

Para a cepa IAL 2383 a reativação foi feita por meio do pré-enriquecimento da cultura liofilizada em caldo Bolton (Oxoid®) suplementado com 5% de sangue equino hemolisado. Após incubação em atmosfera de microaerofilia (5% a 15% de oxigênio e 10% de gás carbônico) (Probac do Brasil®) a 37°C por 44 horas ± 4 horas, a cepa foi semeada na superfície do ágar m-CCDA (Oxoid®) e incubada a 37° C por 44 horas ± 4 horas em atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil).

3.3. Substâncias crioprotetoras

Como crioprotetores foram utilizados a solução de neopeptona-glicerol 12% e leite UHT integral (Ninho- Nestlé®).

A solução de neopeptona-glicerol 12% foi preparada com o uso de 88mL de água destilada, 1,0g de Neo-peptona (Difco®), 0,5g de Cloreto de Sódio (Synth®) e 12mL de Glicerol PA (Synth®). Após o preparo, a solução foi esterilizada em autoclave.

O leite integral UHT (*ultra high temperature*) Ninho, Nestlé® foi adquirido no comércio e previamente avaliado quanto à presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos e tetraciclina, com o uso do método imunoenzimático SNAP duo Beta-Tetra ST Test Kit – Simplicit (Idexx®), conforme as instruções do fabricante (Idexx, 2006).

3.4. Preparo do Inóculo

O concentrado de células obtido da cultura em cinco placas de m-CCDA (Oxoid®) de cada uma das cepas foi inoculado em paralelo a 100mL de solução de neopeptona + glicerol 12% e leite integral UHT.

Após homogeneização, 500 μ L da suspensão de bactérias em cada um dos crioprotetores (leite integral UHT e neopeptona + glicerol 12%) foi distribuída em 24 endorfses, e então, submetida aos tratamentos de estresse térmico.

3.5. Tratamentos – estresse térmico

Os endorfses contendo cada uma das cepas nos dois crioprotetores foram divididos em três grupos e submetidos aos seguintes tratamentos:

- 1)manutenção a 4°C por 30 minutos,
- 2)manutenção 10°C por 30 minutos e;
- 3)Controle negativo – nenhum tratamento/nitrogênio líquido imediato.

Imediatamente após os tratamentos, os ependorfes foram congelados por submersão em nitrogênio líquido por 10 segundos. Os ependorfes designados para análise em 0 hora foram analisados imediatamente e as demais amostras armazenadas em freezer doméstico (-20°C). Após períodos de 30, 60 e 90 dias de armazenamento, amostras de cada um dos tratamentos foram analisadas quanto à viabilidade e quantificadas. Nas cepas recuperadas foi verificada a presença de transcritos de invasão, resistência ao frio, termotolerância e aquisição de ferro.

3.6. Viabilidade e quantificação das cepas

Após os períodos pré-determinados de 0, 30, 60 e 90 dias, as cepas foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas vigorosamente em *vortex* (Phoenix®).

Para determinar a viabilidade, uma alíquota de 200µL de cada microtubo foi inoculada em tubos contendo 10mL de caldo Bolton. Após incubação em atmosfera de microaerofilia (5% a 15% de oxigênio e 10% de gás carbônico) (Probac do Brasil®) a 37°C por 44 horas \pm 4 horas, as amostras foram semeadas na superfície de ágar m-CCDA (Oxoid®) e incubadas a 37°C por 44 horas \pm 4 horas em atmosfera microaerofilia.

Colônias com morfologia suspeita de pertencerem ao gênero *Campylobacter* foram confirmadas por coloração de Gram modificada (uso da carboxifuccina substituindo a safranina).

Para a quantificação de *Campylobacter* foram realizadas diluições seriadas em água peptonada tamponada (Oxoid) e as mesmas inoculadas na superfície de placas de m-CCDA (Oxoid®). A distribuição foi realizada com auxílio da alça de Drigalski e as placas incubadas em microaerofilia a 37°C por 4 a 6 horas, e depois a 41,5°C por 44 horas \pm 4 horas. As placas foram contadas em contador de colônias (Phoenix®) e cinco colônias confirmadas quanto ao gênero por coloração de Gram modificada. Esta técnica está de acordo com a ISO 10272-1:2006.

3.7. Presença de transcritos

Imediatamente após a reativação das cepas, as mesmas foram analisadas quanto a produção de transcritos de virulência e tolerância térmica. As mesmas análises foram realizadas nas cepas viáveis recuperadas nas placas após os tratamentos e armazenamento. Os genes avaliados foram *ciaB*, importante no processo de invasividade, *dnaJ*, relacionado a tolerância ao aumento de temperatura, *p19*, que regula o transporte de ferro e *sodB*, associado a mecanismos de defesa ao estresse oxidativo. Para esta análise, foram utilizados os pares de iniciadores descritos na Tabela 1 e o protocolo de acordo com Li et al. (2008).

Para a obtenção do RNA, cada um dos isolados foi semeado em quatro placas de CCDA (Oxoid®) pelo método de preenchimento. Após o crescimento em atmosfera de microaerofilia por 48 horas a 37°C, todas as colônias formadas nas placas foram transferidas para microtubos contendo 2mL de solução NaCl 0,85% (Synth®) e realizados os procedimentos para a extração do RNA. A mistura foi centrifugada (Cientec®) a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O *pellet* resultante foi acrescido de 1mL de Trizol (Invitrogen®) e homogeneizada em *vortex* (Phoenix®) até que o *pellet* fosse dispersado na solução. Posteriormente, adicionou-se 200µL de clorofórmio (Isofar®) e foi repetido o mesmo procedimento de homogeneização em *vortex* (Phoenix®).

Tabela 1: *Primers* utilizados para verificar a produção de transcritos dos genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19* e *sodB* por *C. jejuni*.

Genes	Sequência 5' → 3'	Peso molecular (pb)	Referência
<i>ciaB</i>	ATATTTGCTAGCAGCGAAGAG GATGTCCCACTTGTAAGGTG	157	Li et al. (2008)
<i>dnaJ</i>	AGTGTGCGAGCTTAATATCCC GGCGATGATCTTAACATACA	117	Li et al. (2008)
<i>p19</i>	GATGATGGTCCTCACTATGG CATTTTGGCGTGCCTGTGTA	206	Birket al. (2012)
<i>sodB</i>	TATCAAACTTCAAATGGGG TTTTCTAAAGATCCAAATTCT	170	Birket al. (2012)

Em seguida, a solução foi centrifugada (Cientec®) a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa de cada microtubo foi transferida para novo

microtubo, adicionada de 500µL de isopropanol (Dinâmica®) e homogeneizada em *vortex*(Phoenix®). Os microtubos foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4°C e removidos os sobrenadantes.

Foi adicionado 1mL de etanol 75% (Dinâmica®) ao *pellet* formado, seguido de homogeneização em *vortex*(Phoenix®) e centrifugação (Cientec®) a 7.500g por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* de RNA secos por 5 minutos a temperatura ambiente, após foram diluídos em 20µL de água DEPC (Invitrogen®).

A quantificação do RNA foi realizada no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) em comprimento de onda de 230nm, observando sempre a relação 260/280 a fim de verificar a integridade do RNA (relação entre 1,8-2,0).

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 1µg de RNA total (200ng/µL), 10U de inibidor de RNase, 40U de MMLV-RT (*Amersham Biosciences*), 1x de tampão da MMLV-RT (*Amersham Biosciences*), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos (Invitrogen®). O volume final de cada reação foi completado para 20 µL com água tratada com DEPC (Invitrogen®). A solução foi colocada em termociclador (Eppendorf®) a 37°C por uma hora. Reações controle foram realizadas verificar possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20°C para posterior amplificação.

Após a transcrição do RNA, 3µL do cDNA foi utilizado em um volume final para a reação de amplificação de 25µL, composto por: 0,625U de Taq DNA polimerase, 5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs e 4 picomoles de cada *primer* (Invitrogen®). Cada gene foi estudado separadamente nas reações.

O controle positivo da cepa pura de *C. jejuni* (NCTC 11351) foi usado em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo, composto por água ultrapura estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA alvo.

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf®), obedecendo aos ciclos: 1 ciclo inicial a 94°C por 3 minutos; 45 ciclos de amplificação em 3 etapas: desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 51°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 3 minutos.

A separação dos produtos amplificados (8µL) foi realizada por

eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Affymetrix®), utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular o marcador de 50pb (Invitrogen®). Os géis de agarose (Affymetrix®) foram corados pela solução de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e visualizados sob luz UV, no transiluminador (Loccus Biotecnologia) após 90 minutos de corrida do gel à 100W de potência, 100V de voltagem e 100A de corrente elétrica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. Quantificação de *C. jejuni* após descongelamento

A contagem de *C. jejuni* armazenadas em dois crioprotetores só foi possível nas amostras imediatamente analisadas após o congelamento em nitrogênio líquido por 10 segundos, antes do armazenamento em freezer a -20°C (Tabela 2). Após o armazenamento por 30, 60 e 90 dias, as colônias cresceram espalhadas, formando um “filme” sobre a superfície do ágar impossibilitando a contagem (Figura 2).

Tabela 2: Contagens de *C. jejuni* (UFC.mL⁻¹) criopreservadas em leite UHT integral e neopeptona+glicerol 12%, submetidas a três tratamentos e congeladas em nitrogênio líquido.

<i>Campylobacter jejuni</i>			
Cepas		Tratamentos	Contagem
ATCC 33291	Leite UHT integral	Controle	3,0 x10 ⁷
		4°C	2,3 x10 ⁷
		10°C	2,3 x10 ⁷
	Neopeptona + Glicerol 12%	Controle	4,0 x10 ⁷
		4°C	2,0 x10 ⁷
		10°C	4,0 x10 ⁶
NCTC 11351	Leite UHT integral	Controle	3,7 x10 ⁷
		4°C	8,7 x10 ⁷
		10°C	9,7 x10 ⁷
	Neopeptona + Glicerol 12%	Controle	1,0 x10 ⁸
		4°C	1,3 x10 ⁷
		10°C	6,0 x10 ⁶
IAL	Leite UHT	Controle	7,0 x10 ⁶

2383	integral	4°C	$9,9 \times 10^6$
		10°C	$1,6 \times 10^7$
	Neopeptona + Glicerol 12%	Controle	$6,0 \times 10^6$
		4°C	$7,0 \times 10^6$
		10°C	$7,0 \times 10^6$

Tratamentos pré-congelamento a 4°C e 10°C realizados por 30 minutos.

Controle= nenhum tratamento pré-congelamento.

O número de células nas amostras imediatamente após o congelamento em nitrogênio líquido variou de $6,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^8$ UFC, com média de $3,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹.



Figura 2: 2a - *C. jejuni* NCTC 11351 em agar m-CCDA (leite UHT integral, pré-tratamento a 10°C/30min, 30 dias a -20°C). 2b - *C. jejuni* IAL 2383 em agar m-CCDA (leite UHT integral, sem tratamento, 30 dias a -20°C).

Após 30 dias de congelamento, as colônias em m-CCDA formadas por amostras controle e submetidas aos diferentes tratamentos apresentaram aspecto “de filme” e não foi possível a sua contagem. Porém, aparentemente o número de células era elevado, pois este aspecto foi observado em diluições até 10^{-7} . As colônias de *Campylobacter* spp. normalmente são planas, com coloração acinzentada ou translúcidas e formato irregular, arredondadas ou convexas. Possuem tanto aspecto de secas como de úmidas. Podem apresentar brilho d’água ao refletir a luz ambiental. Existe uma tendência das colônias apresentarem crescimento confluyente ao longo da linha de semeadura nos meio sólidos (QUINN et al., 2005).

Quando a “massa de colônias” de aparência atípica para o gênero *Campylobacter* foi submetida à microscopia observou-se que apresentavam morfologia de cocos, sugerindo injúria (SHANE; HARRINGTON, 1998) e não apresentaram crescimento quando foram novamente repicadas em placas de m-CCDA. Segundo Hunt; Abeyta e Trant (2001) estas células cocóides injuriadas podem perder a capacidade de multiplicação em meios de cultura inertes, tornando difícil seu cultivo em laboratório e são consideradas VNC - viáveis e não cultiváveis (HAZELEGER et al., 1994; DEBRUYNE; GEVERS; VANDAMME, 2008).

Rowe e colaboradores (1998) citaram entre as causas de indução de formas VNC em *Campylobacter*, o estresse térmico e a manutenção em baixas temperaturas. Consideram esta forma como uma estratégia de sobrevivência do organismo em ambientes naturais ou situações desfavoráveis.

Células VNC de *C. jejuni* são frequentemente citadas na literatura e representam dificuldade em seu cultivo e manutenção (HAZELEGER et al., 1994; ROWE et al., 1998; DEBRUYNE; GEVERS; VANDAMME, 2008). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a dificuldade de enumeração de *Campylobacter* em alimentos submetidos a beneficiamento como pasteurização, congelamento ou resfriamento e demonstram a importância do pré-enriquecimento para atestar a presença/ausência destes microrganismos em alimentos.

4.2. Viabilidade de *C. jejuni* após descongelamento

Apesar de não ter sido possível o crescimento de colônias após repique direto em meio sólido, pode-se afirmar que algumas amostras continham células viáveis, pois apresentaram crescimento após serem pré-enriquecidas em caldo Bolton (Oxoid). Este procedimento foi realizado paralelamente a diluição seriada e inoculação direta em placas de m-CCDA. Foram consideradas como células viáveis, amostras que apresentaram crescimento de colônias, que quando observadas ao microscópio apresentavam morfologia típica de pequenos bacilos Gram negativos e curvos.

Na Tabela 3 estão presentes as amostras que apresentaram formação de colônias após pré-enriquecimento em caldo Bolton (Oxoid), discriminadas por meio de criopreservação, tratamento e tempo de armazenamento a -20° C.

Os resultados demonstram a adequação do leite para a manutenção da viabilidade das cepas estudadas. Entre as 36 amostras armazenadas no leite e reativadas com o uso de pré-enriquecimento, 91,7% (33/36) apresentaram células viáveis. Já com o uso da neopeptona + glicerol 12% como crioprotetor, somente 52,8% (19/36) amostras apresentou viabilidade pós-congelamento, incluindo nesta porcentagem as nove amostras analisadas imediatamente após o congelamento. O uso da neopeptona + glicerol 12% como crioprotetor não foi eficiente para a manutenção das cepas ATCC 33291 e NCTC 11351, com exceção da cepa NCTC 11351 tratada a 4°C por 30 minutos antes do congelamento, que se manteve viável após 30 dias de congelamento.

Tabela 3: Viabilidade de *C. jejuni* submetidas a tratamentos pré-congelamento após inoculação em dois crioprotetores e armazenadas a -20°C por 0, 30, 60 e 90 dias.

		<i>Campylobacter jejuni</i>								
Crioprotetor		ATCC 33291			NCTC 11351			IAL 2383		
		Tratamentos pré-congelamento por 30 minutos								
	Dia	Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C
Leite UHT Integral	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	90	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Neopeptona + glicerol 12%	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	-	-	-	-	+	-	+	+	+
	60	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	90	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Esse resultado está de acordo com Cody e colaboradores (2008) que afirmaram que a viabilidade da *C. jejuni* foi maior em leite desnatado a 10% quando comparado com o uso de glicerol a 15%. Os autores demonstraram que utilização do leite no armazenamento é o mais adequado para garantir a viabilidade a longo prazo das células e proteger contra a morte celular durante períodos prolongados. Além disso, o uso do leite como crioprotetor já é frequentemente usado para criopreservação de vários microrganismos (KIM; KUBICA, 1973; GIBSON; KHOURY, 1986).

O efeito protetor do leite pode estar relacionado à sua ação na estabilização na fluidez da membrana da célula (CARVALHO et al., 2004) e à contribuição do cálcio na estabilidade enzimática celular (BARACH; ADAMS; SPECK, 1976). Além disso, a gordura do leite pode exercer proteção às células de *C. jejuni* durante o congelamento, como acontece em cepas de *Salmonella*, onde este componente exerce ação benéfica auxiliando na estabilidade celular (TAYLOR-ROBINSON et al., 2003).

Acepa IAL 2383 foi recuperada na forma viável até o último período de análise (dia 90) quando armazenada no Glicerol + Neopeptona 12%. Entretanto, quando mantida em Leite UHT a viabilidade foi possível apenas até o dia 60. Em um estudo de caracterização da cepa IAL 2383 realizado por Fonseca (2011), concluiu-se que esta estirpe pode ser utilizada como modelo útil em estudos pelo seu potencial de virulência. A manutenção da viabilidade desta cepa, independente do crioprotetor ou tratamento utilizado indica boa adaptação ambiental ou maior resistência a situações adversas em relação às demais.

Há influência do meio em que *Campylobacter* é armazenada na sua viabilidade. Porém, a recuperação de células viáveis de *C. jejuni* IAL 2383, indica que além do meio utilizado para criopreservação, fatores intrínsecos das cepas e suas condições antes do isolamento também interferirem no sucesso da sua manutenção em laboratório.

Apesar de Wouters et al. (1999) e Lee (2004) afirmarem que o pré-tratamento pela manutenção em temperatura diferente da ótima para seu desenvolvimento aumenta a sobrevivência por longos períodos de cepas congeladas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*, este fato não foi comprovado neste estudo. A viabilidade ou não das cepas de *C. jejuni* recuperadas após o congelamento não foi influenciada pelo uso dos pré-tratamentos.

O conhecimento das condições que favorecem a manutenção de culturas de *Campylobacter* em laboratórios, que são também meios comuns de conservação de alimentos, como o congelamento ou resfriamento, pode auxiliar no entendimento do comportamento deste microrganismo da cadeia de produção de produtos de origem animal.

4.3. Produção de Transcritos

A técnica molecular que utiliza a enzima transcriptase reversa (RT-PCR) é uma ferramenta adequada para verificar se cepas de *C. jejuni* estão transcrevendo genes de virulência (POLI et al., 2012). A comprovação da transcrição destes genes pode auxiliar na estimativa da maior ou menor gravidade da infecção causada por determinada cepa e o risco de doença. Podem ser úteis também, para determinar se situações de injúria e estresse é capaz de estimular ou reprimir sua transcrição. Porém, estudos que associam a transcrição desses genes com a maior ou menor adaptação de *C. jejuni* às diferentes condições de estresse a que são submetidas no ambiente ainda são escassos. Também não está estabelecido se cepas de *C. jejuni* em condições desfavoráveis continuam a produzir transcritos de genes relacionados a virulência.

Para a determinação da produção de transcritos de genes virulência ou termotolerância por *C. jejuni* pela técnica do RT-PCR é necessária a obtenção de RNA de números elevados de células. Este número é obtido pelo crescimento confluyente do microrganismo na superfície de pelo menos quatro placas de Petri (MELO et al., 2013).

No presente estudo, não foi possível a obtenção de crescimento confluyente e suficiente para a análise de transcritos, de todos os microrganismos recuperados em sua forma viável. Como o objetivo do estudo foi avaliar a capacidade dos microrganismos produzir estes transcritos após a manutenção em condição de injúria (manutenção a -20°C, com e sem pré-tratamentos), não foram utilizadas técnicas laboratoriais como vários repiques ou passagem em meios semi-sólidos para a recuperação das cepas. Desta forma, somente as amostras viáveis que foram capazes de produzir número de células suficiente para a análise no primeiro repique foram analisadas.

Vale ressaltar que previamente, foi detectado a presença de transcritos para os genes analisados logo após a primeira reativação das três cepas utilizadas, antes de qualquer tratamento. As amostras analisadas quanto à produção de transcritos, discriminadas por meio utilizado para a

criopreservação, uso de pré-tratamentos e tempo de armazenamento estão discriminadas na Tabela 4.

Tabela 4: Número de amostras viáveis após descongelamento, analisadas quanto à capacidade de produzir transcritos pela técnica de RT-PCR.

Tratamentos		Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Total
Leite UHT Integral	Controle	3	2	3	1	9
	4 °C	3	2	2	2	9
	10 °C	3	1	3	1	8
Neopeptona + Glicerol 12%	Controle	3	1	2	1	7
	4 °C	3	1	1	1	6
	10 °C	3	2	1	1	7
TOTAL		18	9	12	7	46

As figuras 3, 4 e 5 permitem visualizar a produção dos transcritos dos genes *sodB*, *p19* e *ciaB* em gel de agarose nas diferentes cepas utilizadas neste estudo.

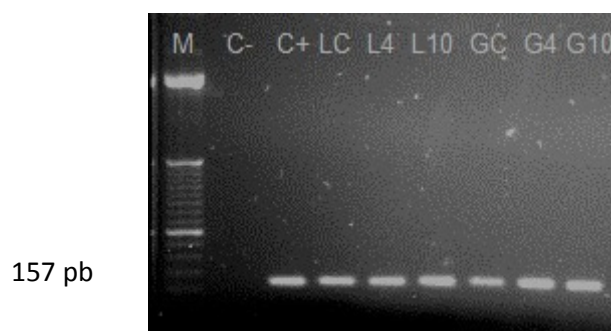


Figura 3: Gel de PCR demonstrando a presença de transcritos do gene *ciaB* por *C. jejuni* ATCC 33291. M (marcador de peso molecular de 50pb); C- (Controle negativo); C+ (Controle positivo, *C. jejuni* NCTC 11351); LC, L4, L10, GC, G4, G10 (presença dos transcritos em todos os tratamentos).

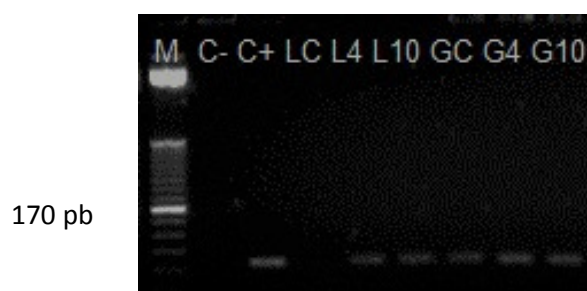


Figura 4: Gel de agarose demonstrando a presença de transcritos do gene *sodB* por *C. jejuni* ATCC 33291. M (marcador de peso molecular de 50pb); C- (Controle negativo); C+ (Controle positivo, *C. jejuni* NCTC 11351). ; LC, L4, L10, GC, G4, G10 (presença de transcritos em todos os tratamentos).

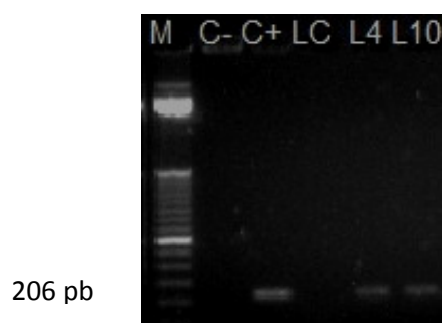


Figura 5: Gel de agarose demonstrando a presença de transcritos do gene *p19* por *C. jejuni* NCTC 11351. M (marcador de peso molecular de 50pb); C- (Controle negativo); C+ (Controle positivo, *C. jejuni* NCTC 11351). ; LC, L4, L10 (presença de transcritos em todos os tratamentos, exceto controle).

4. 4. Produção de transcritos por *C. jejuni* ATCC 33291

Todas as 12 amostras de *C. jejuni* ATCC 33291 mantidas no leite e recuperadas após submissão aos diferentes tratamentos foram capazes de produzir transcritos para os genes *ciaB* e *dnaJ*, independente do uso de pré-tratamentos.

Dentre as estirpes recuperadas, somente uma, submetidas ao tratamento a 4°C por 30 minutos pré-congelamento, imediatamente analisadas (dia 0) e outra armazenada a -20°C por 30 dias não foram capazes de produzir transcritos para os genes *sodB* e *p19*. Aos 60 dias de armazenamento foi verificada a produção destes genes por estas amostras (Tabela 5).

Tabela 5: Produção de transcritos para os genes *sodB* e *p19* por cepas de *C.jejuni* ATCC 33291 criopreservadas em leite UHT, com e sem submissão a pré-tratamentos a 4°C e 10°C por 30 minutos antes do armazenamento a -20°C.

Dias a -20° C	Produção de transcritos*					
	Gene <i>sodB</i>			Gene <i>p19</i>		
	Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C
0	+	-	+	+	-	+
30	+	-	+	+	-	+
60	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+

* análise realizada em triplicata.

Foi observada equivalência na transcrição dos genes de adaptação ao frio (*sodB* e *p19*) por *C. jejuni* ATCC 33291 criopreservada em leite, demonstrando uma possível interligação desses genes para essa cepa. A transcrição do gene *sodB* e *p19* foi constante em todos os períodos de armazenamento quando a cepa foi conservada no leite integral UHT nas amostras controle e submetidas ao pré-tratamento de 10°C por 30 minutos antes do congelamento. Quando o tratamento pré-congelamento foi 4°C, a transcrição destes genes só ocorreu aos 60 e 90 dias de armazenamento.

A correlação na transcrição dos genes *sodB* e *p19* pela cepa ATCC verificado neste trabalho está de acordo com observações de vários autores. O gene *sodB* participa na resposta ao estresse oxidativo (PESCI; COTTLE; PICKETT, 1994; PURDY et al., 1999) e há uma clara ligação entre esta condição e o ferro (PALYADA, 2004), já que o aumento da concentração de ferro reprime a expressão de genes em defesa à este tipo de estresse (BAILLON et al., 1999).

Não foi encontrada na literatura explicação para que as cepas submetidas a 4°C por 30 minutos pré-congelamento só transcrevessem estes genes após 60 dias a -20°C. É provável que mecanismos intrínsecos do microrganismo tenham regulado a transcrição somente dos genes após um período maior em condições ambientais desfavoráveis.

Os resultados obtidos mostram que para a cepa ATCC 33291, quando em leite UHT integral, com congelamento imediato e a submissão a pré-tratamento a 10°C são mais adequados para a manutenção da capacidade transcrição de genes de virulência e de adaptação ambiental avaliados neste estudo do que o pré-tratamento a 4°C.

A produção de transcritos por *C. jejuni* ATCC 33291 criopreservadas em neopeptona + glicerol 12% só foi possível em três cepas, todas imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (dia 0).

Todas as três amostras foram capazes de transcrever os genes *ciaB* e *dnaJ*. Porém, na avaliação dos genes *sodB* e *p19*, relacionados a adaptação ao frio e aquisição de ferro, respectivamente, as amostras que não foram submetidas a tratamentos pré-congelamento (controles), os transcritos não foram identificados (Tabela 6).

Tabela 6: Produção de transcritos para os genes *sodB* e *p19*, *ciaB* e *dnaJ* por cepas de *C.jejuni* ATCC 33291 criopreservadas em neopeptona + glicerol 12%, com e sem submissão a pré-tratamentos a 4°C e 10°C por 30 minutos antes do armazenamento a -20°C (dia 0).

Genes	Tratamentos pré-congelamento		
	Controle	4 °C	10 °C
<i>sodB</i>	-	+	+
<i>p19</i>	-	+	+
<i>ciaB</i>	+	+	+
<i>dnaJ</i>	+	+	+

RIVERA-AMILL et al. (2001) afirmaram que a expressão dos genes que codificam as proteínas *Cia* está sujeita à regulação ambiental e está envolvida na invasão de células epiteliais (POLY; GUERRY, 2008). Poli et al. (2012) submeteram cepas de *C. jejuni* a uma variação de temperatura de 4°C para 37°C durante 24 horas e constataram, por meio da identificação de transcritos do o gene *ciaB*, que a capacidade de invasão não foi afetada pela mudança na temperatura.

As proteínas oriundas do gene *dnaJ* apresentam uma importante função na superação de variações bruscas de temperatura, de forma que o microrganismo se torne capaz de sobreviver e adaptar-se às novas condições térmicas (STINTZI, 2003). Apesar de a transcrição desse gene ter sido constante para esta cepa imediatamente após o congelamento (dia 0), não influenciou na manutenção da integridade celular quando as cepas foram criopreservadas em neopeptona + glicerol 12%. Nenhuma das amostras mantidas neste crioprotetor foi recuperada na sua forma viável após a manutenção a -20°C.

4. 5. Produção de transcritos por *C. jejuni* NCTC 11351

Um total de onze amostras *C. jejuni* NCTC 11351 foi avaliado quanto a produção de transcritos. Destas, seis amostras foram criopreservadas em leite e cinco em neopeptona + glicerol 12%.

Apesar de o número de cepas recuperadas na forma viável ter sido semelhante nos dois meios utilizados para a criopreservação, a produção de transcritos das cepas mantidas em neopeptona + glicerol 12% foi menor que as

mantidas em leite UHT integral. Ao analisar as cepas mantidas em neopeptona + glicerol 12%, a produção de transcritos para todos os genes foi detectada nas cepas imediatamente após o congelamento em nitrogênio líquido (dia 0), mas após a manutenção a -20° C, só foi observada em uma amostra congelada por 60 dias, que não sofreu tratamento pré-congelamento (controle), e somente para os genes *ciaB* e *dnaJ* (Tabela 7).

Tabela 7: Produção de transcritos por cinco cepas de *C.jejuni* NCTC 11351 criopreservadas em neopeptona + glicerol 12%, discriminado por tratamentos e tempo de armazenamento a -20°C.

Transcritos												
Gene <i>sodB</i>			Gene <i>p19</i>			Gene <i>ciaB</i>			Gene <i>dnaJ</i>			
Dia	Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30			+			+			-			-
60	-			-			+			+		
90												

Entre as amostras criopreservadas no leite UHT integral somente duas amostras analisadas no dia 0 não produziram os genes *sodB* e *p19*. Estas amostras não sofreram pré-tratamento ao congelamento a -20°C (Tabela 8). Este resultado indica que o pré-tratamento de estresse para essa cepa criopreservada em leite estimula a produção de transcritos de genes relacionados à adaptação ambiental. Este pode ser um comportamento utilizado por outras cepas de *C. jejuni* para adaptar-se e se manter viável em ambientes desfavoráveis, mas ricos em proteínas e gorduras.

Tabela 8: Produção de transcritos para os genes *sodB* e *p19* por seis cepas de *C.jejuni* NCTC 11351 criopreservadas em leite UHT integral, discriminado por tratamentos e tempo de armazenamento a -20°C.

Gene <i>sodB</i>				Gene <i>p19</i>		
Dia	Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C
0	-	+	+	-	+	+
30						
60	-		+	-		+
90		+			+	

O uso do leite UHT integral como crioprotetor associado a pré-tratamentos antes do congelamento se mostrou superior a neoptona + glicerol 12% para garantir a expressão genética durante o armazenamento desta cepa.

A baixa transcrição dos genes estudados por *C. jejuni* NCTC 11351 criopreservados em neopeptona-glicerol 12% deve servir de alerta aos pesquisadores. Esta cepa é recomendada para utilização como controle positivo em avaliações de vários genes de virulência (MELO et al., 2013) e, portanto, para seu uso como controle das reações deve-se utilizar o primeiro repique, já que foi comprovado neste estudo, que há inibição da produção de transcritos de vários genes após a manutenção das mesmas a -20°C.

A baixa transcrição de genes por esta cepa leva também a outras preocupações. É provável que outras cepas isoladas de animais, humanos ou alimentos se comportem de maneira similar quando mantidas a -20°C em neopeptona + glicerol 12%. Assim, caso sejam estocadas para análises posteriores e haja necessidade de se avaliar genes de virulência, o DNA das mesmas deve ser extraído antes do armazenamento, evitando resultados falso-negativos. Uma estratégia nestas situações seria criopreservar as cepas em leite UHT integral e submetê-las a pré-tratamentos, já que mesmo neste crioprotetor, três amostras congeladas sem tratamento prévio não foram capazes de produzir os genes *sodB* e *p19*.

A interligação na capacidade de produzir transcritos para os genes *sodB* e *p19* também foi verificada na cepa de *C. jejuni* NCTC 11351. Esta condição é mais evidente nas amostras criopreservadas em leite UHT integral, onde um maior número de amostras estava viável após descongelamento. Isto concorda com Palyada (2004) que descreve a ligação entre o ferro e o estresse oxidativo, com o gene *sodB* participando desta condição. A transcrição destes genes não foi observada nas cepas conservadas em neopeptona + glicerol 12% após a manutenção a -20°C.

As dificuldades na recuperação de células viáveis e a baixa transcrição de genes em *C. jejuni* NCTC 11351 criopreservada em neopeptona+ glicerol 12% é provavelmente consequência da injúria. Nesta situação é uma estratégia adaptativa do gênero apresentar-se como VNC (viável não cultivável). ROWE et al. (1998) afirmam que *C. jejuni* adquirem essa forma quando são induzidas pelo estresse térmico, pela escassez de nutrientes no meio e temperaturas

baixas. Vale salientar que apesar de o congelamento reduzir os números de *Campylobacter spp.* quando presente em alimentos, não os elimina completamente, podendo a bactéria assumir formas viáveis, mas não cultiváveis em condições ambientais adversas (DIMITRAKI; VELONAKIS, 2007; HUMPHREY; O'BRIEN; MADSEN, 2007).

A produção de transcritos para os genes *sodB* (adaptação ao frio) e *p19* (aquisição de ferro) foi observada nas amostras submetidas aos pré-tratamentos a 4°C e 10°C, mas não nas amostras controles (sem pré-tratamento). Este resultado indica que o estresse térmico pré-congelamento estimulou a produção de transcritos para estes genes, e esta condição, pode acontecer também *in vivo*, ou seja, em alimentos contaminados por estes microrganismos e mantidos nestas condições antes do congelamento. Apesar disso, a produção destes transcritos não foi suficiente para manter os microrganismos viáveis durante o armazenamento a -20°C por 30 a 90 dias.

4.6. Produção de transcritos por *C. jejuni* IAL 2383

Vinte amostras de *C. jejuni* IAL 2383 foram avaliadas quanto à produção de transcritos, destas, oito estavam armazenadas no leite e 12 em neopeptona + glicerol 12%.

A interligação para a produção de transcritos dos genes *sodB* e *p19* (Tabela 9), comum às outras cepas estudadas não foi verificada nas amostras de *C. jejuni* IAL 2383. Esta cepa também demonstrou comportamento diferente das outras estudadas quanto à eficiência do meio usado para criopreservação.

Tabela 9: Presença de transcritos dos genes *sodB* e *p19* por 20 cepas de *C. jejuni* IAL 2383 recuperadas na forma viável após manutenção em dois crioprotetores a -20° C.

Crioprotetor	Dia	Gene <i>sodB</i>			Gene <i>p19</i>		
		Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C
Leite UHT Integral	0	-	+	+	-	-	+
	30	-	+		-	-	
	60	-	+	+	-	+	+
Neopeptona + Glicerol 12%	0	-	+	-	-	+	-
	30	-	+	+	+	+	+
	60	-	+	+	+	+	+

90 - + + + + +

O uso de pré-tratamentos antes do congelamento, particularmente a 4°C por 30 minutos mostrou-se eficiente e necessário para a produção de transcritos do gene *sodB* em ambos os crioprotetores. Para o gene *p19*, a necessidade deste pré-tratamento foi mais evidente nas cepas armazenadas no leite UHT integral.

A ausência de transcritos do gene nas amostras não submetidas a tratamentos pré-congelamento indica que a pré-adaptação a 4°C e 10°C favorece a expressão dessa característica. Esse fato pode ser visto como uma estratégia desse agente na permanência no alimento submetido em condições de choque ao frio. O beneficiamento e armazenamento do leite e carne de frangos podem representar exemplos de situações similares, já que no processo produtivo ocorre uma etapa de resfriamento, que pode estimular a transcrição desse gene e/ou favorecer sua viabilidade.

Estudo realizado por Wouters et al.(1999) e Beales (2004) mostraram resultados satisfatórios em cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* quando submetidas a pré-tratamento antes do congelamento. Lee (2004) também observou que a manutenção a 10°C por quatro horas em *Lactococcus lactis* antes do congelamento, resultou em um aumento da viabilidade das cepas. Estes estudos foram relacionados à manutenção da viabilidade e não à produção de transcrito, não podendo, portanto, ser diretamente relacionado aos resultados obtidos neste estudo.

As diferenças encontradas para essa estirpe pode estar relacionada ao fato de não se tratar de uma cepa-padrão, como a NCTC e a ATCC, mas sim de uma bactéria isolada de paciente clínico, que pode assumir caráter distinto de tolerância a condições de adversas.

Outra característica observada nesta cepa foi a capacidade de adaptação quando criopreservada em neopeptona + glicerol 12%. Com exceção do grupo controle na análise do gene *sodB*, que não apresentou transcritos, e do tratamento a 4°C, que apresentou os melhores resultados, todos os demais passaram a expressar todos os genes após 30 dias de armazenamento (Tabela 9 e 10). De acordo com Mourik (2011) *C. jejuni* desenvolveu um repertório de mecanismos específicos que permitem uma

rápida adaptação metabólica, além das alterações no crescimento e no comportamento de acordo com os diversos ambientes.

Tabela 10: Presença de transcritos dos genes *ciaB* e *dnaJ* por 20 cepas de *C. jejuni* IAL 2383 recuperadas na forma viável após manutenção em dois crioprotetores a -20° C.

Crioprotetor	Dia	Gene <i>ciaB</i>			Gene <i>dnaJ</i>		
		Controle	4°C	10°C	Controle	4°C	10°C
Leite UHT Integral (L)	0	-	-	+	-	+	+
	30	-	+		+	+	
	60	+	+	+	+	+	+
Neopeptona + Glicerol 12%	0	-	+	-	-	+	-
	30	+	+	+	+	+	+
	60	+	+	+	+	+	+
	90	+	+	+	+	+	+

A produção de transcritos do gene *dnaJ* aconteceu em todas as amostras submetidas a pré-tratamentos. Pode-se observar que houve incompatibilidade na transcrição do gene de choque ao calor (*dnaJ*) em detrimento ao de tolerância ao frio (*p19*) nas cepas armazenadas em leite UHT. Esta condição pode ser vista como um empecilho na viabilidade dessa cepa em condições de resfriamento de alimentos de origem animal ricos em proteínas e gorduras e explicar o fato de o leite não ter sido superior à neopeptona na manutenção dessa estirpe como observado para as outras cepas estudadas.

Vários estudos demonstram que a capacidade de expressão de características de virulência como adesão, invasão e produção de toxinas em *C. jejuni* é cepa-dependente (VAN VLIET; KETLEY, 2001; FERNANDEZ; GARCÍA; VILLANUEVA, 2005). Provavelmente, características de resistência às condições do meio, como a tolerância ao calor e ao frio, também devem ser afetadas nas diferentes cepas.

A transcrição do gene *ciaB* não apresentou diferenças marcantes quando se compara ambos os crioprotetores e seus respectivos tratamentos. Isso indica que a maneira de conservação dessa cepa, avaliada neste estudo, não influencia no seu potencial invasivo.

A transcrição de todos os genes estudados foi observada no último dia de análise, com exceção do grupo controle para o gene *sodB* e *p19*, quando se utilizou o leite como crioprotetor. Quando o crioprotetor foi o Glicerol 12% +

Neopeptona, essa exceção foi verificada apenas para o gene *sodB*. Esse fato evidencia mais uma vez o potencial adaptativo da cepa. De acordo com STINZI e WHITWORTH (2003), em geral, a expressão de cerca de 13% do genoma bacteriano é significativamente alterado no choque frio. Estes mesmos autores afirmam que, apesar disso, *Campylobacter* apresenta mecanismos de tolerância e adaptação a baixas temperaturas que incluem a aquisição ou biossíntese de moléculas protetoras, levando a alterações da composição lipídica da membrana de forma a expressar características que mantenham sua viabilidade.

É provável que a pré-adaptação a 4 °C ou 10 °C contribui na manutenção de características de virulência (*ciaB*), de desenvolvimento de mecanismos de resistência ao frio (*sodB* e *p19*) e de resistência a choques térmicos por altas temperaturas (*dnaJ*) em *C. jejuni* IAL 2383.

No geral, observa-se que o leite UHT integral foi mais eficiente na manutenção das cepas analisadas. Quando armazenadas neste crioprotetor, a viabilidade representou 91,7% do total de 36 cepas analisadas (Tabela 11). A análise de produção de transcritos nas amostras foi feita para 26 amostras mantidas em leite UHT integral, sendo que 19 (73,1%) transcreveram. Já para as cepas armazenadas em Neopeptona + Glicerol 12% foram testadas a viabilidade de 36 amostras, das quais 19 (52,8%) permaneceram viáveis. Quanto à produção de transcritos das cepas mantidas em Neopeptona + Glicerol 12%, 20 foram analisadas e 13 (65,0%) cepas apresentaram transcritos.

Tabela 11: Quantidade de cepas analisadas por crioprotetor quanto à Viabilidade e à Produção de transcritos e os respectivos resultados.

<i>Campylobacter jejuni</i>				
Crioprotetor	Viabilidade		Produção de transcritos	
	Analizadas		Analizadas	
Leite UHT Integral		36		26
	Viáveis	33 (91,7%)	Transcritos	19 (73,1%)
Neopeptona + Glicerol 12%	Analizadas	36	Analizadas	20
	Viáveis	19 (52,8%)	Transcritos	13 (65,0%)

Recentemente, tem aumentado o número de estudos objetivando a detecção e expressão de genes de virulência, utilizando RT-PCR, em estirpes de *Campylobacter* spp, mantidas sob uma variedade de condições de crescimento. Os resultados destes estudos indicam que as mudanças nas condições ambientais podem gerar uma variação considerável na capacidade de expressão dos genes (STINZI, 2003; PALYADA, 2004; STINZI, WHITWORTH, 2003; MOURIK, 2011).

A regulação dos diferentes genes é essencial para a manutenção da sobrevivência de *Campylobacter*. O comportamento destes microrganismos frente a diferentes condições de cultivo pode demonstrar a capacidade desta espécie modular o seu potencial de virulência de acordo com o ambiente (MELO et al., 2013) e o conhecimento deste processo é de grande importância para estudos mais detalhados sobre epidemiologia e patogenia da campilobacteriose (MARTINEZ et al., 2006). Além disso, esse conhecimento permite entender os diferentes comportamentos nas transcrições gênicas, de forma a determinar e explicar as diferenças observadas na patologia pelas diversas estirpes (MOURIK, 2011).

5. CONCLUSÃO

Sabe-se que a *Campylobacter* é frágil e sensível às condições ambientais, o que é facilmente observado pela dificuldade de seu acondicionamento e manutenção em laboratórios.

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a viabilidade e capacidade de produzir de transcritos para os genes *sodB*, *p19*, *ciaB* e *dnaJ* relacionados à adaptação ao frio, aquisição de ferro, invasão e termotolerância respectivamente, parecem ser cepa-dependentes. Porém, para sua manutenção em laboratório sob congelamento a -20°C, para estudos posteriores ou uso como cepas-controle, a escolha do tipo de crioprotetor e uso de tratamentos pré-congelamento podem auxiliar na manutenção da viabilidade e na capacidade de produzir transcritos.

Em geral, o leite UHT integral foi mais eficiente na manutenção das diferentes cepas, considerando todos os tratamentos efetuados antes do congelamento para as diferentes cepas. Quando armazenadas neste crioprotetor a maioria das cepas apresentou maior viabilidade (91,7%) e/ou produção de transcritos (73,1%) quando comparada ao uso da neopeptona + glicerol 12% (52,8% para viabilidade e 65,0% para produção de transcritos).

Quanto à utilização de pré-tratamentos antes do congelamento, a manutenção das cepas ATCC 33291, NCTC 11351 e IAL 2383 demonstraram que seu uso pode favorecer na manutenção da viabilidade das cepas de *Campylobacter* e na produção de transcrito após manutenção a -20°C em comparação ao controle (sem pré-tratamentos).

A utilização de um dos crioprotetores ou um dos tratamentos pré-congelamento analisados neste estudo, isoladamente, não são capazes de garantir a viabilidade ou a manutenção da capacidade de produzir transcritos pelas cepas de *C. jejuni* avaliadas. Quando a manutenção da viabilidade das mesmas é essencial, faz-se necessário o uso das diferentes combinações crioprotetor/tratamentos para aumentar as chances de recuperação. Quando o objetivo principal é a produção de transcritos, a opção para manter a fidedignidade dos resultados é a extração imediata do DNA das estirpes isoladas, que deve ser ainda, associada ao uso de um controle positivo em primeiro repique.

A análise da viabilidade e produção de transcritos sob as condições estudadas no presente trabalho em cepas de *Campylobacter* selvagens será tema de estudos posteriores para confirmar se as variações observadas podem ser vistas como cepa-dependentes.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiologia de los alimentos**. 1. ed. Zaragoza: Acríbia, p. 464, 1997.

ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I.; SWERDLOW, D.L. *Campylobacter jejuni* - an emerging food borne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p.28-35, 1999.

ALVES, E. *Campylobacter*. **Informativo Cefar de Microbiologia**, São Paulo, Ano III, Ed. 16, Julho/Agosto 2006. Disponível em: <http://www.cefar.com.br/download/jornal%2016ed_web.pdf>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2013.

ANONYMOUS. Interim report on *Campylobacter*. **Advisory Committee on Microbiological Safety of Food**. London, 1993.

ANNOUS, B. A.; KOZEMPEL, M. F.; KURANTZ, M. J. Changes in membrane fatty acid composition of *Pediococcus* sp. strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2857–2862, 1999.

BABAKHANI, F. K.; JOENS, L. A. Primary swine intestinal cells as a model for Studying *Campylobacter jejuni* invasiveness. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2723-2726, 1993.

BAILLON, M. A.; VAN VLIET, A. H. M.; KETLEY, J. M.; CONSTANTINIDOU, C.; PENN, C. W. An iron-regulated alkyl hydroperoxidase reductase (*ahpC*) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 4798-4804, 1999.

BAKER, K. **At the Bench: A Laboratory Navigator**. Cold Springs Habor Laboratory Press, Cold Springs Habor, Nova Iorque, EUA, 1998.

BARACH, J. T.; ADAMS, D. M.; SPECK, M. L. Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 875–879, 1976.

BARBAREE, J.; SANCHEZ, A. Cross-contamination during lyophilization. **Cryobiology**, v. 19, p. 443-447, 1982.

BEALES, N. Adaptation of microorganism to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1–20, 2004.

BIASI, R. S. **Frequência e caracterização de *Campylobacter* sp. termofílico na linha de abate de suínos em abatedouro no sul do Brasil**. Dissertação de Mestrado, Pontífica Universidade Católica do Paraná, Campus São José dos Pinhais, 2010.

BIRK, T.; KNOCH, S. Fate of food-associated bacteria in pork as affected by marinade, temperature, and ultra sound. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 3, p. 549–555, 2009.

BIRK, T.; WIK, M. T.; LAMETSCH, R.; KNOCH, S. Acid stress response and protein induction in *Campylobacter jejuni* isolates with different acid tolerance. **BioMed Central Microbiology**, v. 12, p. 174, 2012.

BIRRELL, G. W.; BROWN, J. A.; WU, H. I.; GIAEVER, G.; CHU, A. M.; DAVIS, R. W.; BROWN, J. M. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 99, n. 13, p. 8778–8783, 2002.

BOZIARIS, I.S.; ADAMS, M.R. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 715-724, 2001.

BUTZLER, J. P.; SKIRROW, M. B. *Campylobacter enteritis*. **Clinics in Gastroenterology**, v. 8, n. 3, p. 737-765, 1979.

CALHOUN, L. N.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O. JR.; KWON, Y. M. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis following propionate adaptation. **BioMed Central Microbiology**, v. 10, p. 249, 2010.

CANAL, V.A.; PÁEZ F.S. **Estudio para la implementacion del analisis de *Campylobacter ssp* según la metodologia USDA/FSIS MLG** Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Rancagua, Chile, p. 62, 2007.

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F. X.; GIBBS, P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus. **Biotechnology Progress** v. 20, p. 248–254, 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. ***Campylobacter***. Nacional Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. EUA, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter>>. Acesso dia 10.02.2013.

CHAN, K.F.; LE TRAN, H.; KANENAKA, R.Y.; KATHARIOU, S. Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4°C). **Applied and Environmental Microbiology**, 67, p. 4186-4191, 2001.

CHUNG, H.J.; BANG, W.; DRAKE, M.A Stress response of *Escherichia coli*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 52-64, 2006.

COCKER, A. O.; ISOKPEHI, R. D.; THOMAS, B. .; AMISU, K. O.; OBI, C. L. Human campylobacteriosis in developing countries **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 3, p. 237-242, 2002.

CODY, W.L.; WILSON, J.W.; HENDRIXSON, D.R.; MCLVER, K.S.; HAGMAN, K.E.; OTT, C.M.; NICKERSON, C.A.; SCHURR, M.J. Skim Milk Enhances the Preservation of Thawed -80°C Bacterial Stocks. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 1, p. 135 – 138, 2008.

COX, L. A. Re-examining the causes of campylobacteriosis. **International Journal of Infections Diseases**, Denver, v. 6, n. 3, p. 26-36, 2002.

DAHMEN, H.; STAUB, T.; SCHWINN, F. J. Technique for long term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen, **Phytopathology**, v. 73, p. 241-246, 1983.

DEBRUYNE, L.; GEVERS, D.; VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: Campylobacter Ed. NACHAMKIN, I.; SKYMANSKI, C. M.; BLASER, M. J. Washington, DC. **American Society for Microbiology**, p. 3-26, 2008.

DIMITRAKI, P.; VELONAKIS, E. The survival of pathogens in frozen food as a healthrisk. **Archives of Hellenic Medicine**, Atenas, v.24, n.5, p. 432-439, 2007.

DORREL, N. e WREN, B. W. The second century of *Campylobacter* research: recent advances, new opportunities and old problems. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 20, n.5, p. 514-518, 2007.

DOYLE, M.E.; MAZZOTA, A.S. Review of studies on the thermal resistance of Salmonellae. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 6, p. 779-795, 2000.

ESSIAIN, R.; FLOURNOY, D.J. Viability of *Staplylococci* in various diluents. **Infection Control**, v. 7, p. 370 – 372, 1986.

EMBRAPA - *Campylobacter* na segurança dos alimentos e na avicultura. 2008.

ESCHERICH, T. Beitragezur Kenntniss der Darm bacterien. III. Ueber das Vorkom men von Vibrio nenim Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. (The knowledge of intestinal bacteria.III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies.) **Münchener Med Wochen schrift**. v. 33 p. 815–817, 1886.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, **The EFSA Journal**. Italy, v. 8, n. 3, p. 1503, 2010. Disponível em <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120308.htm>>. Acesso em 10.03.2013.

EVERIS, L. Injured bacteria in foods. **Nutrition & Food Science**, v. 31, n. 2, p. 84-87, 2001.

FERNANDEZ, H.; GARCÍA, A.; VILLANUEVA, M. P. Serotipos de *Campylobacter jejuni ssp. Jejuni* isolado de ave para consumo humano y enmuestras de heces de niños com diarrea. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 37, n. 1, p. 79-81, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**.1 ed. São Paulo: Atheneu, p. 182, 1996.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE U.S.D Department of Agriculture [Fsis/Cdc/Fda].**Sentinel site study**: The establishment and implementation of a active surveillance system for bacterial foodborne diseases in United States. Report to congress. Washington, DC, 1997.

FONSECA, B.B. **Resposta celular à infecção por *Campylobacter jejuni* em embriões e explants de íleo de aves e participação do citoesqueleto e lisossomos no processo de invasão em células CACO-2.** Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas - Programa de Pós Graduação em Parasitologia e Imunologia Aplicadas Universidade Federal de Uberlândia, p. 124, 2011.

FONSECA, F.; BÉAL, C.; CORRIEU, G. Operating Conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. **Cryobiology**, v. 43, p. 189-198, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - Center for Food Safety and Applied Nutrition, USA. ***Campylobacter jejuni* bad bug book.** 2012. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap4.html>>. Acesso em: 20 de Novembro de 2012.

GARÉNAUX, A.; JUGIAU, F.; RAMA, F.; DE JONGE, R.; DENIS, M.; FEDERIGUI, M.; RITZ, M. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. **Current Microbiology**, v. 56, p. 293–297, 2008.

GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; OLIVEIRA, D. B.; BELONI, S. N. E.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p. 480-487, 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. 629 p. 2001.

GILBERT, C.; SLAVIK, M. Determination of toxicity of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and from poultry carcasses acquired at various stages of production. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 347–353, 2004.

GIBSON, L. F.; KHOURY, J. T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze, **Letters in Applied Microbiology**.v. 3, p. 127 – 129, 1986.

GODOI, H. S; GANDRA, T. K. V; GANDRA, E. A. *Campylobacter spp* em alimentos. Uma revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, Umuarama, v. 13, n. 1, p. 37-41, 2010.

GORMAN, J.; ADLEY, C. C. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 306-310, 2004.

GUEDES, R.M.C. Enteropatia proliferativa suína (ileíte). **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.42, p. 102, 2003.

HANEL, I.; MULLER, J.; MULLER, W.; SCHULZE, E. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 75–82, 2004.

HASSAN, H. M. Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. **Free Radical Biology & Medicine**,v. 5, p. 377-385, 1988.

HAZELEGER, W. C.; ARKESTEIJN, C.; TOOROPBOUMA, A.; BEUMER, R. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 273-281, 1994.

HOPKIN, K. A.;PAPAZIAN, M. A.; STEINMAN, H. M. Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12.**The Journal of Biological Chemistry**. v. 267, p. 24253- 24258, 1992.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacter* as a zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**. v.117, p. 237-257, 2007.

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRANT, T. *Campylobacter*. In: U S Food and Drug Administration (FDA). **Bacteriological Analytical Manual Online**. Revisado em março de 2001. Disponível em: < <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html> >. Acesso em: 20 de Novembro de 2012.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. ISO 10272-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. ISO 10272-1:2006. 2006.

JONES, D.M.; SUTCLIFFE, E.M.; CURRY, A. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. **Journal of General Microbiology**. v. 137, p. 2477–2482, 1991.

KIM, T.H., KUBICA, G.P. Preservation of mycobacteria: 100% viability of suspensions stored at 70° C. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 956–961, 1973.

KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; KLENA, J. D., YOUNG, C. R.; ZIPRIN, R. Characterization of the Thermal Stress Response of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3666–3672, 1998.

KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; RIVERA-AMILL, V.; GARVIS, S. G. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 32, n. 4, p. 691–701, 1999.

KONKEL, M. E.; MONTEVILLE, M. R.; RIVERA-AMILL, V.; JOENS, L. A. The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni* - Mediated Enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, p. 55-71, 2001.

LEE, A.;SMITH, S. C., COLOE, P. J. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 1609–1614, 1998.

LEE, K. Cold shock response in *Lactococcus lactis* sp. *diacetylactis*: a comparison of the protection generated by brief pre-treatment at less severe temperatures. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 2233–2239, 2004.

LEE, M-H.T.;SMIBERT, R.M.; KRIEG, N. R. Effect of incubation temperature, ageing, and bisulfite content of un supplemented brucella agar on aerotolerance of *Campylobacter jejuni*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p.1069–1074, 1988.

LITWIN, C. M.; CALDERWOOD, S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, p.137-49, 1993.

LOEWEN, P. C.; HENGGE-ARONIS, R. The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 53–80, 1994.

MA, Y.; HANNING, I.; SLAVIK, M. Stress-induced adaptive tolerance response and virulence gene expression in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 29, n. 1, p. 126–143, 2009.

MALBRÁN, C.A. **Manual de procedimientos *Campylobacter*** Ministerio de Salud, Buenos Aires, Argentina, p. 29, 2001.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.;FERNANDEZASTORGA, A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 296, n. 1, p. 45-48, 2006.

MAZIERO, M. T. **Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após resfriamento e congelamento.** Londrina, 2007. 136 f. dissertação de mestrado – Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 2007.

MELO, R. T. **Fatores de patogenicidade e potencial risco à saúde em *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de frangos.** Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Uberlândia, p. 133, 2012.

MELO, R. T.; NALEVAIKO, P. C.; MENDONÇA, E. P.; BORGES, L. W.; FONSECA, B. B.; BELETTI, M. E.; ROSSI, D. A. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbor several virulence factors and represent a potential risk to humans. **Food Control**, v. 33, p. 227-231, 2013.

MILLS, C.K.; GHERNA, R.L. Cryopreservation studies of *Campylobacter*. **Cryobiology**, v. 25, p. 148–152, 1988.

MOURIK, A. V. **Host adaptation mechanisms and transcriptional regulation in *Campylobacter jejuni*.** 2011. 152f. Tese de Doutorado - Infection and Immunity Center Utrecht, Universiteit Utrecht. 2011.

MURPHY, C.; CARROLL, C.; JORDAN, K. N. Induction of an adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 1, p. 89-93, 2003.

OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango.** 1. Ed. Criciúma: do autor, p. 680, 2006.

ON, S. L. W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Heliobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **Journal Applied Microbiology**, Copenhagen, v. 90, p. 1-15, 2001.

OTTO, B. R.; VERWEIJ-VAN VUGHT, A. M.; MACLAREN, D. M. Transferrin and heme compounds as iron sources for pathogenic bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 18, n. 3, p.217- 233, 1992.

PALYADA, K. **Response of *Campylobacter jejuni* to iron and hydrogen peroxide** -Tese de doutorado - The Oklahoma State University – p. 299, Dezembro, 2004.

PARK, P. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 74, p. 177-188, 2002.

PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; PICKETT, C. L. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**,v. 62, p.2687–2694, 1994.

PHADTARE, S.; YAMANAKA, K.; INOUE, M.The cold shock response.2000. p. 33-45. In: STORZ, G.; HENGEE-ARONIS, H. **Bacterial Stress Responses**, 1ed. Editors American Society for Microbiology. Washington, 2000.

PICKETT, C. L.; PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; RUSSELL, G.; ERDEM, A. N.; ZEYTIN, H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. cdtB gene. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, n. 6, p. 2070–2078, 1996.

PILZ, D.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarreia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sanguíneo, artificialmente contaminados. **Semina Ciências Agrárias**. Londrina, v.26, n.2, p.211-220, 2005.

POLI, V. F. S.; THORSEN, L.; OLESEN, I.; WIK, M. T.; JESPERSEN, L. Differentiation of the virulence potential of *Campylobacter jejuni* strains by use of gene transcription analysis and a Caco-2 assay. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 1-2, p. 60–68, 2012.

POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**, New York, v. 24, n. 1, p. 27–31, 2008.

PURDY, D., S. CAWTHRAW, J. H. DICKINSON, D. G. NEWELL, AND S. F. PARK. Generation of a superoxide dismutase (SOD)-deficient mutant of *Campylobacter coli*: evidence for the significance of SOD in *Campylobacter* survival and colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2540–2546, 1999.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary Microbiology**, Spain, Elsevier Limited, section 2, p. 268, 1994.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**, Porto Alegre, editora Artmed, cap.29, p.173, 2005.

REEZAL, A.; MCNEIL, B.; ANDERSON, J. G. Effect of low-osmolarity nutrient media on growth and Culturability of *Campylobacter* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4643–4649, 1998.

REID, A. N.; PANDEY, R.; PALYADA, K.; NAIKARE, H.; STINTZI, A. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1583–1597, 2008.

RIPABELLI, G.; TAMBURRO, M.; MINELLI, F.; LEONE, A.; SAMMARCO, M. L. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 355-364, 2010.

RIVERA-AMILL, V.; KIM, B. J.; SESHU, J.; KONKEL, M. E. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter*

jejuni requires astimulatory signal. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 183, n. 11, p. 1607–1616, 2001.

ROGOL, M.; SCHNAIDMAN, B.; KATZENELSON, E.; SECHTER, I. Improved medium for storage and transportation of thermophilic campylobacters. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.9, p. 760–762, 1990.

ROJAS, E. U. **Avaliação da viabilidade e da variabilidade da microbiota salivar armazenadas em diferentes temperaturas**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 60, 2007.

ROWE, M. T.; DUNSTALL, G.; KIRK, R.; LOUGHNEY, C. F.; COOKE, J. L.; BROWN, S. R. H. Development of an image system for the study of viable but non-culturable forms of *Campylobacter jejuni* and its use to determine their resistance to disinfectants. **Food Microbiology**, London, v. 15, n. 5, p. 491–498, 1998.

RUSSEL, R. G.; O'KONNOGHUE, M.; BLAKE, D.C.; ZULTY, J.; DeTOLLA, L. J. Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant *Macaca Mulatta*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 168, n. 1, p.210-215, 1993.

SAHA, S.K.; SANYAL, S.C. Better preservation of *Campylobacter jejuni*/*Campylobacter coli* in a defined medium. **Indian Journal of Medical Research**, v. 93, p. 26–28, 1991.

SHAHEEN, B.W., MILLER, M.E.; OYARZABAL, O.A. *In vitro* survival at low pH and acid adaptation response of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Food Safety**, v. 27, p. 326–343, 2006.

SHANE, S. M.; HARRINGTON, K. S. Campylobacteriosis. In: SWAYNE, D.E. *et al.* **A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian**

Pathogens. 4th ed. Kennet Square: American Association of Avian Pathologists. Cap7, p.35-39, 1998.

SILVA, N.; AMSTALDEN, V. C. **Detecção de *Campylobacter*. Manual de métodos de análise microbiológica**. São Paulo. Livraria Varela, 1997. 326 p. cap. 18, p. 142- 148.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. Ed. São Paulo: Livraria Varela, p. 536, 2007.

STANLEY, K.; JONES, K. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 104S–113S, 2003.

STEINMAN, H. M. Bacteriocuprein superoxide dismutases in pseudomonads. **Journal of Bacteriology**, v. 162, p. 1255-1260, 1985.

STERN, N. J., KOTULA, A. W. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 5, p. 1150, 1982.

STINTZI, A. Expression Profile of *Campylobacter jejuni* in Response to Growth Temperature Variation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 6, p. 2009–2016, 2003.

STINTZI, A.; WHITWORTH, L. Investigation of the *Campylobacter jejuni* Cold-Shock response by global transcript profiling. **Genome Letters**, v. 3, p. 18-27, 2003.

TANG, Y.; PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: **Manual of clinical microbiology**. Washington, D.C.: ASM, cap. 13, p. 215-244, 1999.

TAYLOR-ROBINSON, J.D.; CHILD, M.; PICKUP, R.; STRIKE, P.; EDWARDS, C. Cell-cell interactions influence resistance and survival of *Salmonella* serotype Typhimurium to environmental stress. **Journal Applied Microbiology**, v. 94, p. 95-102, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 720, 1999.

VAN DEUN, K.; HAESBROUCK, F.; HEYNDRIKX, M.; FAVOREEL, H.; DEWULF, J.; CELEN, L.; DUMEZ, L.; MESSENS, W.; LELEU, S.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R. PASMANS, F. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 10, p. 1284–1289, 2007.

VAN VLIET, A. H.; KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **Symposium Series (Society for Applied Microbiology)**, v. 30, p. 45-56, 2001.

VASIL, M. L.; OCHSNER, U. A. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 399-413, 1999.

WELLS, J.E.; RUSSELL, J.B. Why do many ruminal bacteria die in vitro so quickly? **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1487-1495, 1996.

WINN, W.C.; KONEMAN, E.W. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 1565, 2008.

WHITE, D.J.; SANDS, R.L. Storage of bacteria at 76°C. **Medical Laboratory Sciences**, v. 42, p. 289–290, 1985.

WOUTERS, J. A.; ROMBOUTS, F. M.; DEVOS, W. M.; KUIPERS, O. P.; ABEE, T. Cold shock proteins and low temperature response of *Streptococcus*

thermophilus CNRZ302. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4436–4442, 1999.

XIE, Y. P.; HE, Y. P.; IRWIN, P. L.; JIN, T.; SHI, X. M. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 7, p. 2325–2331, 2011.

ZHAO, G.; ZHANG, G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 333–338, 2005.

ZHANG, G.; FAN, M.; QIAN, L.V; LI, Y.; LIU, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, H. The effect of cold, acid and ethanol shocks on synthesis of membrane fatty acid, freeze-drying survival and malolactic activity of *Oenococcus oeni*. **Annals of Microbiology**, Fev, 2012.

ZHENG, J.; MENG, J. H.; ZHAO, S. H.; SINGH, R.; SONG, W. X. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 4, p. 768–774, 2006.

ZIPPRIN, R. L.; YOUNG, C. R.; BYRD, J. A.; STANKER, L. H.; HUME, M. E.; GRAY, S.A.; KIM, B. J.; KONKEL, M. E. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 45, n. 3, p. 549–557, 2001.