

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PRISCILA CHRISTEN NALEVAIKO

**VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE TRANSCRITOS DE VIRULÊNCIA
POR *Campylobacter jejuni* EM LEITE UHT REFRIGERADO**

**UBERLÂNDIA
2015**

PRISCILA CHRISTEN NALEVAIKO

**VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE TRANSCRITOS DE VIRULÊNCIA
POR *Campylobacter jejuni* EM LEITE UHT REFRIGERADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA

2015

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

N169v Nalevaiko, Priscila Christen, 1988
2016 Viabilidade e produção de transcritos de virulência por
Campylobacter jejuni em leite uht refrigerado / Priscila Christen
Nalevaiko. - 2016.
59 p. : il.

Orientadora: 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. Leite - Análise -
Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

**VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE TRANSCRITOS DE VIRULÊNCIA POR
Campylobacter jejuni EM LEITE UHT REFRIGERADO**

Dissertação aprovada para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia (MG) pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 24 de julho de 2015.

Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi, UFU/MG

Prof.^a Dr.^a Belchiolina Beatriz Fonseca, UFU/MG

Prof.^o Dr.^o Gustavo Adolfo Medina Schwerter, UCT/Chile

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Priscila Christen Nalevaiko – Nascida em Guaíra, Paraná em 06 de fevereiro de 1988, filha de Waltraud Christen e David Nalevaiko. Médica Veterinária, graduada em julho de 2012 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista CNPq pelo programa de Iniciação Científica no período de 2010 à 2012. Em agosto de 2013 iniciou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal, na qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de março de 2014 a agosto de 2015.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.*

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por me permitir realizar mais um sonho, e aos animais, pois sem eles não conheceríamos a essência do verdadeiro amor.

AGRADECIMENTOS

Agradecer com certeza é a tarefa mais fácil e confortante, pois é a hora de mostrar que não somos nada sozinhos.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela oportunidade de viver momentos bons, pelos ensinamentos e tarefas árduas que me submeteu, tendo sempre um lado bom, me tornando uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada por colocar em minha vida muitos Anjos disfarçados de amigos, irmãos, mãe, pai e marido.

Pai e mãe, agradeço a vocês pela vida, pelos anos de educação, ensinamentos e principalmente por me ensinar a voar e permitir que meus pés acompanhassem meus sonhos. Minhas irmãs, pelo carinho comigo, atenção e incentivo, obrigada por embarcarem neste barco chamado família. Minha sobrinhas, Mariane, Luiza e Lara vocês são as borboletas do meu jardim, alegram e colorem meus dias, saibam que todo meu esforço é para que eu possa ser exemplo para vocês de dedicação, luta e amor.

A minha orientadora, Daise obrigada por me mostrar como a vida é maravilhosa, por me aconselhar nas horas difíceis, por me conter nos momentos de fúria e acreditar que eu conseguia. Você é muito mais que orientadora, um verdadeiro Anjo, sempre a amiga, a mãe , a irmã que precisei quando precisei, é merecedora de cada fruto que tem recebido e espero que sejamos companheiras de longas conversas por muito tempo.

Como disse tenho que agradecer a alguns Anjos, Guilherme agradeço por você fazer parte da minha vida, dos momentos bons que compartilhamos, por me ensinar tanto com suas atitudes, por ser tão bondoso e caridoso com a minha pessoa. Adilson você também se encaixa nos Anjos que povoam meu céu, obrigada pela confiança e por me mostrar o lado bom de tudo. Terezinha foi o Anjo que mudou os meus ventos, me conduziu por caminhos desconhecidos e acreditou em mim mais do que eu mesma, esta conquista também é sua!

Aos colegas do LABIO, Bruna, Carla, Letícia, Mariana, Edson, Roberta, Eliane, Bia, Marcela, Marcelo, Eduardo, Jocasta, Renata, Silvia, Newton, Phelipe, Clara, Luiza e Tchesca, obrigada pelo companheirismo, pela ajuda durante a

execução do trabalho e pelas conversas e risadas durante os momentos de descontração, vocês fizeram a tarefa árdua ser mais alegre e confortante.

Ao meu companheiro, amigo e marido Jorge por ser mais um Anjo aqui na terra que ilumina meu caminho, obrigada por confiar e acreditar em mim, por me dar força e incentivar a voar mais alto a cada dia e me tornar uma pessoa melhor. Sou uma mulher feliz e realizada ao seu lado, acredito no amanhã melhor, no poder da recompensa, e que neste mundo viemos para fazer o bem. Obrigada pela família linda que me proporcionou, nossas lindas filhas de quatro patas, outros três Anjos na minha vida, Mel, Hana e Pedrita, que alegram nossas vidas, pois são tantos latidos, pedidos de carinho e lambidas que nos mostram o que é o verdadeiro amor.

Agradeço a FAPEMIG pelo recurso financeiro para que este trabalho fosse concluído e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, Juntamente com seus docentes pelo conhecimento adquirido nestes dois anos.

RESUMO

Avaliou-se a viabilidade e a presença transcritos dos genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19* e *sodB* por *C. jejuni* experimentalmente inoculada em leite UHT, após armazenamento refrigerado por 0, 24 e 48 horas. Utilizou-se duas cepas de campo e duas de referência em inóculos de 10^2 e 10^4 UFC.mL⁻¹. *C. jejuni* foi recuperada em todos os períodos analisados, porém a contagem das cepas de referência só foi possível em contaminação de 10^4 UFC.mL⁻¹. O número de células recuperadas nas cepas de campo foi maior que nas de referência e houve diminuição nas contagens durante o armazenamento condicionado ao inoculo inicial. A capacidade de transcrever os genes apresentou diferenças pontuais entre cepas, concentrações de inóculo e períodos analisados. A transcrição dos genes *ciaB* (invasão), e *dnaJ*, *p19* e *sodB* (tolerância ao estresse ambiental) não foi significativa entre as cepas, mas foi maior no inóculo de 10^4 UFC.mL⁻¹. A capacidade de *C. jejuni* se manter viável em leite UHT e a baixa dose infectante desta espécie para a infecção humana indicam que há perigo de adquirir campilobacteriose pelo consumo de leite, caso haja recontaminação posterior à abertura da embalagem. São necessárias boas práticas na manipulação e armazenamento deste alimento.

Palavras chave: Campilobacteriose; Contaminação cruzada; *ciaB*, *p19*, *sodB*, *dnaJ*.

ABSTRACT

Were evaluated the viability and the ability to produce transcripts of *ciaB*, *dnaJ*, *p19* and *sodB* genes by *C. jejuni* experimentally inoculated into UHT milk, after refrigerated storage for 0, 24 and 48 hours. It was used two wild and two reference strains in inoculum of 10^2 and 10^4 UFC.mL $^{-1}$. *C. jejuni* was recovered in all periods analyzed, but the count of reference strains was only possible at contaminations of 10^4 UFC.mL $^{-1}$. The number of recovered cells of the wild strains was higher compared to the reference ones and there was a decrease in the counts during the storage conditioning to the initial inoculum. The ability to transcribe genes showed slight differences between strains, inoculum concentrations and analyzed periods. The transcription of the genes *ciaB* (invasion), and *dnaJ*, *p19* and *sodB* (tolerance to environmental stress) was not significant between the strains, but was higher in the 10^4 inoculum UFC.mL $^{-1}$. The ability of *C. jejuni* to remain viable in UHT milk, and the low infectious dose of this species to human infection, indicates that there is danger of acquiring campylobacteriosis by drinking milk, in case of a subsequent recontamination after opening the package. It takes good practices in the handling and storage of this food.

Keywords: Campylobacteriosis; Cross contamination; *ciaB*, *p19*, *sodB*, *dnaJ*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1.1. <i>Campylobacter</i> spp.....	14
1.2. Epidemiologia e saúde pública.....	14
1.3. <i>Campylobacter</i> spp. em leite e derivados.....	16
1.4. Genes de virulência e adaptação ambiental.....	28
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2 – Leite UHT contaminado por <i>Campylobacter jejuni</i> após abertura da embalagem pode ser fonte de infecção aos humanos.....	30
APÊNDICE A – INSTRUÇÕES AOS AUTORES – Brazilian Journal of Microbiology.....	50

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A qualidade microbiológica dos alimentos oferecidos para a população é primordial para reduzir os riscos de infecção pelo seu consumo e uma das maneiras mais eficazes de se garantir a inocuidade é o seu monitoramento por meio de análises microbiológicas. Casos e surtos de toxinfecções alimentares causam prejuízos, pois colocam em risco a saúde do consumidor (EFSA, 2010).

Campylobacter são bactérias Gram negativas, pertencentes à família *Campylobacteriaceae*, sendo as espécies mais envolvidas em doenças alimentares classificadas como termotolerantes por apresentarem temperatura ótima de crescimento entre 37 a 42°C e não crescer em temperaturas inferiores a 30°C (DAMAS et al., 2010). Porém, podem suportar baixas temperaturas, como por exemplo, a temperatura de geladeira (4 a 7°C), provavelmente, por meio de mecanismos adaptativos (STINTZI e WHITWORTH, 2003).

Campylobacter é o agente etiológico bacteriano mais envolvido na gastroenterite humana na Europa e nos Estados Unidos, excedendo cerca de três a quatro vezes outros patógenos entéricos como *Salmonella* ou *Escherichia coli* (WHO, 2012), sendo a espécie *C. jejuni* a mais prevalente (CDC, 2011; EFSA, 2013).

A campilobacteriose é uma zoonose geralmente assintomática nos animais, mas em humanos, pode provocar diarreia severa com muco e sangue, febre, dor abdominal, náuseas, vômitos, dores de cabeça e musculares. Apesar das complicações serem consideradas raras, *C. jejuni* é capaz de produzir quadros clínicos extraintestinais como bacteremia, peritonite e endocardite (VILLANUEVA, 2005), assim como, desencadear doenças autoimunes como a artrite reativa, síndrome de Guillain-Barré (SGB) e outras neuropatias (ESTEVES et al., 2011).

No Brasil ainda não há uma legislação que torne obrigatória a pesquisa de *Campylobacter* nos alimentos, e dessa forma, os casos são subnotificados. Assim, apesar do aumento no interesse e publicações sobre estes micro-organismos, o enfoque ainda é mais voltado para sua relação com aves e alimentos de origem avícola.

As aves seguidas dos suínos são os principais reservatórios das espécies de *Campylobacter*, no entanto, não são as únicas fontes de infecção para os humanos, uma vez que os bovinos também são reservatórios deste micro-organismo. Estes podem ser uma fonte de contaminação para o leite, bem como seus subprodutos, que quando ingeridos, podem ser potencialmente infectantes aos humanos (ESTEVES et al., 2011).

O consumo de leite contaminado após o processo de pasteurização pode causar campilobacteriose em humanos (BROUGH et al., 2011; MONTEIRO, 2011; KOBAYASHI, 2012). Estudos demonstraram que *C. jejuni* é capaz de se manter viável em leite UHT (*Ultra High Temperature*) e leite pasteurizado (MONTEIRO, 2011), queijo branco frescal ; (MONTEIRO, 2013) e fórmulas lácteas infantis (PACHECO, 2014) experimentalmente contaminados e mantidos sob refrigeração. A sobrevivência de *Campylobacter* durante os processos de manipulação do leite e produtos lácteos pode estar relacionada a mecanismos adaptativos desse agente às condições de estresse ambiental (XIE et al., 2011).

O consumo de leite cru e seus derivados podem representar risco para a infecção de humanos por *Campylobacter*, e mesmo após o beneficiamento como a pasteurização ou esterilização comercial, pode haver recontaminação. Particularmente, durante a manipulação e preparo de alimentos no ambiente doméstico, a contaminação cruzada pode ocorrer facilmente e representar perigo ao consumidor (EFSA, 2013).

São necessários mais estudos para avaliar o potencial do leite UHT e outros lácteos como veículo de *Campylobacter* spp, assim como, elucidar se a manutenção em refrigeração pode influenciar na modulação da transcrição de genes de virulência ou de adaptação ambiental. Deve ser investigado também, se o agente consegue se manter viável nesta matriz, se é uma característica da espécie ou se é cepa dependente, e ainda, se é um perigo ao consumidor.

1.1. *Campylobacter* spp.

A família *Campylobacteraceae* comprehende os gêneros *Campylobacter*, *Arcobacter*, e *Sulfurospirillum*, além da espécie *Bacteroides ureolyticus* (VANDAMME, 2000).

São de natureza zoonótica e morfologicamente correspondem a bacilos Gram negativos curvos, de 0,2 a 0,8 µm de diâmetro e 0,5 a 5µm de comprimento, não esporulados, que em condições de injúria podem adquirir a forma esférica e se tornarem viáveis não cultiváveis (VNC) (HAZELEGER et al., 1994; ROWE et al. 1998). São móveis por apresentar flagelos, o que permite seu movimento característico do tipo “saca rolha”. As colônias de *Campylobacter* geralmente são lisas, translúcidas, acinzentadas, brilhantes, com bordas perfeitas, e em alguns casos, podem também apresentar bordas irregulares e espalhadas com crescimento em aspecto de filme (GODOI; GANDRA e GANDRA, 2010).

Não crescem em aerobiose ou anaerobiose, sendo microaerófilos estritos que necessitam de 5 a 6 % de oxigênio para multiplicar-se. São oxidase positiva e catalase variável. Não utilizam açúcares, obtendo sua energia de aminoácidos (GONZÁLEZ, 2008; ROSSI et al., 2009).

1.2. Epidemiologia e saúde pública

C. jejuni e *C. coli* são reconhecidos como os primeiros agentes relacionados a gastroenterites em países industrializados e o segundo ou terceiro naqueles em desenvolvimento (EFSA, 2013). Além disso, *C. jejuni* é capaz de produzir quadros clínicos extraintestinais como bacteremia, peritonite e endocardite, e em casos mais graves, pode desencadear artrite reativa, síndrome de Guillain-Barré e outras neuropatias (VILLANUEVA, 2005).

Várias espécies do gênero *Campylobacter* são reconhecidas como patógenos intestinais no ser humano, tais como *C. jejuni*, *C. coli* e *C. upsaliensis* (CRUSHELL, 2004).

C. jejuni é um micro-organismo enteropatogênico, que eventualmente pode invadir o sistema circulatório. A infecção se localiza no intestino delgado e grosso,

onde a bactéria se adere ao epitelio e prolifera, expressando seus fatores de virulência. O período de incubação é de um a sete dias, com uma média de três dias. Os sintomas incluem febre, cefaléia, mal estar e dor abdominal (ESTEVES et al., 2011).

Em alguns pacientes a enfermidade se apresenta como uma diarreia exudativa, muco sanguinolenta, com presença de leucócitos fecais, ainda que em outros a manifestação principal se restrinja a uma diarreia aquosa (FERNÁNDEZ, 2008).

A transmissão dessas bactérias ao ser humano se realiza por via fecal ou oral pelo consumo de água ou alimentos contaminados, ou mesmo, por contato com animais reservatórios (SILVA et al, 2010; ESTEVES et al., 2011).

Apesar de principal via de infecção para o homem ser o consumo de alimentos de origem avícola, crus ou insuficientemente cozidos, o consumo de leite não pasteurizado e seus derivados lácteos também são vias de transmissão da bactéria (SNELLING et al., 2005; ESTEVES et al., 2011).

Outro ponto importante na epidemiologia de *C. jejuni* é o ambiente doméstico onde podem acontecer deficiências na manipulação ou oportunidades de contaminação cruzada de alimentos (LINHARES, 2012).

Um dos estudos mais aprofundados realizados na América do Sul em relação a frequência de isolamentos de espécies da família *Campylobacteraceae* se realizou no Chile (FERNÁNDEZ et al, 2007). Os autores analisaram 314 amostras fecais provenientes de cães, bovinos, pardais, galinhas, patos e perus, das quais se isolaram cinco espécies de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*) e uma do gênero *Arcobacter* (*A. butzleri*). As espécies mais frequentemente isoladas foram, *C. jejuni* subsp. *jejuni* (25,3%), *C. coli* (18%) e *A. butzleri* (17,3%), as quais foram encontradas em todas as espécies animais estudadas.

O fato dessas bactérias terem sido isoladas de todas as espécies animais estudadas não apenas confirma seu caráter zoonótico, como também a importância desses animais como reservatórios e eventuais fontes de infecção para o ser humano (FERNÁNDEZ et al, 2007). Por outro lado, o fato de se ter isolado estas bactérias de amostras fecais de aves destinadas ao consumo humano, ressalta também a importância destas aves como potenciais fontes de contaminação de alimentos de origem avícola (carnes, produtos cárneos e miúdos), considerados

importantes veículos destas bactérias (LASTOVICA e SKIRROW, 2000; FERNÁNDEZ et al., 2005).

1.3. *Campylobacter* spp. em leite e derivados

O leite e seus derivados são alimentos de grande valor nutritivo, mas também um excelente meio de cultura para bactérias. A falta de padronização na fabricação de produtos lácteos, principalmente com a utilização de leite cru como matéria-prima, aliada a deficiência no sistema de fiscalização, podem contribuir para a ocorrência de toxinfecções alimentares (DORES, 2013).

Além disso, o leite possui propriedades crioprotetoras que auxiliam na sobrevivência de *Campylobacter* spp. e na criopreservação em laboratórios (MOURA, 2013). Isso ocorre devido à capacidade de alterar a fluidez da membrana da célula (ANNOUS et al., 1999; CARVALHO et al., 2004) e pela contribuição do cálcio na estabilidade das enzimas celulares (BARACH et al., 1976).

O leite não pasteurizado é incriminado como uma das principais fontes de surtos de infecção por *Campylobacter* (WOOD et al., 1992). Na década de 80 nos Estados Unidos, foi verificado que mais de 1000 indivíduos foram infectados após consumirem leite cru, o que correspondeu a uma taxa de 45% de infectados (WOOD et al., 1992). Um surto mais recente de campilobacteriose devido ao consumo de leite cru no estado do Alasca, Estados Unidos, e resultou em 24 infectados no ano de 2013 (CIEVS, 2013).

No Brasil, no estado de Minas Gerais, foi relatado um surto de infecção por *C. jejuni*, após estudantes visitarem uma fazenda produtora de leite e consumirem o produto contaminado. A taxa de infecção foi de 57,6% entre os que consumiram o alimento, e o micro-organismo foi detectado nas fezes dos infectados (SILVA et al., 2003).

Durante o processo de beneficiamento do leite, a pasteurização é eficaz na eliminação dos patógenos, inclusive *C. jejuni*. No entanto, é possível ocorrer recontaminação após o beneficiamento por meio de tubulações, manipulação, transporte ou armazenamento inadequados (SANTOS; NOGUEIRA; CUNHA, 1995).

Além disso, no ambiente doméstico há diferentes oportunidades para a contaminação cruzada (GORMAN et al., 2002). Desta forma, as boas práticas durante e após o processamento são essenciais para garantir um produto livre de patógenos, visando a segurança do consumidor (PICOLI et al., 2006).

Um dos maiores surtos conhecidos envolvendo *Campylobacter jejuni* foi relatado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2010), no estado da Califórnia (Estados Unidos) em 2006. O surto envolveu onze presídios diferentes e aproximadamente 1300 pessoas, dentre internos e funcionários infectados e com sintomas gastrointestinais. Na investigação da origem e causa do surto observou-se que a única ligação entre os onze presídios era a fazenda Deuel Vocational, fornecedora de leite pasteurizado, que tornou este alimento o principal suspeito. A fazenda teve suas atividades suspensas para coleta de amostras de leite pasteurizado e swabs ambientais. As análises realizadas nos tanques de armazenamento detectaram altas contagens bacterianas, no entanto, *C. jejuni* não foi identificada, mas sua presença foi detectada em quantidades elevadas nas fezes dos infectados confirmando ser o agente responsável pelo surto. Mesmo sem a identificação, as autoridades apontaram o leite pasteurizado como a possível causa, uma vez que era a única ligação significativa entre os diferentes pontos onde ocorreram os surtos. Foi constatado que a contaminação do leite ocorreu após o processo de pasteurização, nos containers, tanques de armazenamento ou durante o envasamento.

Estudos utilizando contaminação experimental de *C. jejuni* em leite pasteurizado, leite UHT e fórmulas lácteas infantis demonstraram que este micro-organismo é capaz de se manter viável nestes alimentos por até 48 horas, mesmo em armazenamento refrigerado. O mesmo ocorreu quando foram avaliados queijos Minas frescal produzidos com leite artificialmente contaminado, onde estes micro-organismos foram detectados nos queijos até quatro dias após a fabricação. Estes estudos demonstraram que há perigo no consumo destes alimentos se houver contaminação pós-beneficiamento (MONTEIRO 2011, MONTEIRO 2013, PACHECO, 2014).

1.4. Genes de virulência e adaptação ambiental

A determinação dos efeitos ambientais sobre a virulência e transcrição de genes em patógenos de origem alimentar é objetivo de diversos pesquisadores (BERGHOLZ et al., 2009; OLESEN et al., 2009; RIEU et al., 2010). Porém, pouco se sabe sobre esses parâmetros em *Campylobacter* (MA et al., 2009; LIGOWSKA et al., 2011; XIE et al., 2011).

Os principais mecanismos utilizados para a produção de doenças pelas espécies de *Campylobacter* spp. que causam gastroenterite são: adesão, invasão e produção de toxinas (BABAKRANI & JONES, 1993). Estudos têm revelado que tanto a adesão quanto a invasão de *Campylobacter* na porção intestinal são dependentes de múltiplos fatores (HÄNEL et al., 2004; GILBERT; SLAVIK, 2005; VAN DEUN et al., 2008), que envolvem a motilidade, a quimiotaxia, a colonização, a aquisição de ferro e a produção de toxinas (KETLEY, 1997; WASSENAAR; BLASER, 1999).

A capacidade de *Campylobacter* sobreviver em leite e produtos lácteos, mesmo em condições adversas como o resfriamento, pode estar relacionada a mecanismos adaptativos desse agente às condições de estresse ambiental, pois várias investigações têm relatado que os efeitos ambientais modulam a transcrição de genes em patógenos de origem alimentar (BERGHOLZ et al., 2009; OLESEN e JESPERSEN, 2010; RIEU et al., 2010).

As espécies de *Campylobacter* são capazes de sobreviver a uma grande variedade de ambientes e de temperaturas, como água a (25-30°C), alimentos refrigerados (4-7°C), trato intestinal de frango (42°C) e humano (37°C). Isto ocorre devido à capacidade da bactéria em regular a expressão gênica em resposta às condições adversas a que é submetida (STINTZI e WHITWORTH, 2003).

Os sistemas de respostas ao estresse são codificados por genes reconhecidos como fatores-chave no aumento da resistência a essas condições, caracterizados por possuírem diversas funções como proteção contra danos ao DNA, determinação de modificações morfológicas, virulência, osmoreregulação, proteção contra estresse oxidativo (LOEWEN e HENGGE-ARONIS, 1994; WEBER et al., 2005), termotolerância e resposta ao choque pelo calor e ao frio (VAN VLIET e KETLEY, 2001).

Os genes *ciaB*, *dnaJ*, *sodB* e *p19*, 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.

A transcrição do gene *ciaB* está envolvida na invasão de células epiteliais (POLY e GUERRY, 2008; CHANG et al., 2011). O gene *ciaB* codifica a proteína CiaB de 73-kD que está associada ao mecanismo de exportação da flagelina. Essa proteína destrói microtúbulos, promove a entrada da bactéria e permite a sua mobilidade no interior da célula hospedeira (RIVERA-AMILL et al., 2001).

As proteínas oriundas do gene *dnaJ* apresentam uma importante função na superação de variações bruscas de temperatura, de forma que o micro-organismo se torne capaz de sobreviver e adaptar-se à nova temperatura (STINTZI e WHITWORTH, 2003). A temperatura pode constituir um estímulo importante para *Campylobacter*, que pode usar o aumento da temperatura como sinalizador de invasão ao hospedeiro, no caso de seu reservatório, o frango (temperatura interna de 42 °C) ou do hospedeiro humano (temperatura interna de 37 °C). A expressão diferencial de genes para estas duas temperaturas podem permitir que este micro-organismo colonize seu hospedeiro de forma eficiente, levando ao comensalismo ou patogênese (STINTZI, 2003). Ao superar uma elevação repentina de temperatura, a bactéria deve ser capaz de sobreviver e se adaptar à nova temperatura (STINTZI, 2003).

Melo (2013) 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. Entre os isolados, 57,1% apresentaram a capacidade de produzir 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 e que algumas podem ser mais patogênicas do que outras dependendo da situação que são submetidas, portanto, possuem capacidades diversas para causar doença e lidar com o estresse.

O gene *p19* também está relacionado ao controle do nível de ferro intracelular durante o estresse (BIRK, 2012), pois codifica uma proteína periplasmática ferro-dependente cuja função é o transporte de ferro (PALAYADA et al., 2004).

O ferro é conhecido por catalisar uma ampla gama de reações bioquímicas essenciais para a maioria dos organismos vivos (ANDREWS et al., 2003). Por exemplo, ele desempenha um papel crucial como um cofator na síntese de DNA, bem como em reações de transferência de elétrons.

A biodisponibilidade do ferro em um ambiente de pH neutro e aeróbico no hospedeiro mamífero é limitada a 10^{-18} M e 10^{-24} M, respectivamente. Este nível está muito abaixo do mínimo necessário para o crescimento bacteriano (10^{-7} M) (BRAUN e HANTKE, 2002). Em consequência, os micro-organismos têm desenvolvido sistemas complexos para capturar eficientemente o ferro, regular sua aquisição, e neutralizar seu excesso, para evitar a intoxicação (PALAYDA et al., 2004).

A transcrição do gene *sodB* está relacionada a um mecanismo de proteção contra danos causados por radicais livres de oxigênio (STEINMAN, 1985; HOPKIN et al., 1992). Além disso, este gene ativa-se em resposta ao estresse pelo frio em *Campylobacter* (STINTZI e WHITWORTH, 2003), auxiliando na sobrevivência em alimentos (PURDY et al., 1999) e em processos de congelamento e descongelamento (STEAD e PARK, 2000). Estudo realizado por Stintzi e Whitworth, 2003 avaliou a resposta de *C. jejuni* ao choque frio induzido por 10 minutos partindo da temperatura de 42 °C para 37°, 32°, 10° ou 4°C. Em geral, 218 genes (13% do genoma bacteriano) foram diferencialmente expressos, sendo que um deles foi o *sodB*, comprovando sua relação com o estresse ao frio.

Stintzi e Whitworth (2003) estudaram o perfil de transcrição dos genes *p19* e *sodB* e verificaram um aumento na transcrição do gene *sodB* mediante ao choque ao frio, sugerindo, que o estresse oxidativo é um componente da resposta ao estresse pelo frio em *Campylobacter*. Além disso, os genes *sodB* e *p19*, protegem especificamente os componentes celulares, incluindo várias enzimas citoplasmáticas, DNA, e os fatores de membrana, contra danos causados por radicais livres de oxigénio (STEINMAN, 1985; HOPKIN et al., 1992).

Monteiro (2013) estudou variações na transcrição dos genes *ciaB*, *dnaJ*, *sodB* e *p19* por cepas padrão de *C. jejuni* recuperadas de queijos Minas Frescal

fabricados com leite artificialmente contaminado. O autor observou que a transcrição desses genes diminuiu após o armazenamento refrigerado.

REFERÊNCIAS

- 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**, v.61, n. 6, p. 2723-2726, 1993.
- BARACH, J. T.; ADAMS, D. M.; SPECK, M. L. Stabilization of a psychrotrophic *Peudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 875– 879, 1976.
- BERGHOLZ, T. M.; VANAJA, S. K.; WHITTAM, T. S. Gene expression induced in *Escherichia coli* O157:H7 upon exposure to model apple juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3542–3553, 2009.
- BIRK, T.; WIK, M. T.; LAMETSCH, R.; KNOCHEL, S. Acid stress response and protein induction in *Campylobacter jejuni* isolates with different acid tolerance. **BioMed Central Microbiology**, v. 12, p. 174, 2012.
- BRAUN, V. e K. HANTKE. **Mechanisms of bacterial iron transport.** In: *Microbial transport systems.* G. WINKELMANN ed. Berlim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., p. 289-311, 2002.
- BROUGH, H. A.; SOLOMON, A. W.; WALL, R. A.; ISAZA, F.; PASVOL, G. Brucellosis acquired by eating imported cheese. **Journal of Paediatrics and Child Health**, p. 1-2, 2011.
- 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.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.
2010. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, 2009. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 59, p. 418–422, 2010.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **PulseNet Pathogens - *Campylobacter jejuni***, CDC, 2011. Disponível em:
http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens_pages/campylobacter_jejuni.htm acesso em: 15 fev 2015

CHANG, C.; TASI, W.; LAI C.; LU Y.; HSU Y. Association of CiaB with membrane raft-microdomains increases *Campylobacter jejuni*-induced pathogenesis of cells. **China Medical University Institutional Repository**, 2011.

CIEVS – CENTRO DE INFORMAÇÕES E RESPOSTAS ESTRATÉGICAS DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Informe Epidemiológico** CIEVS Paraná – Eventos Semana Epidemiológica 10, 2013. Disponível em:
<http://www.sesa.pr.gov.br/arquivos/File/ACS/Informe10.pdf> acesso em: 13 fev 2015.

CRUSHELL, E.; HARTY, S.; SHARIF, F.; BOURKE, B. Enteric *Campylobacter*: Purging its Secrets, **Pediatric Research Journal** [online], v. 55, n. 1, p. 3-12, 2004. Disponível em:
http://journals.lww.com/pedresearch/Abstract/2004/01000/Enteric_Campylobacter__Purging_Its_Secrets_.2.aspx. Acesso em: 02 mar 2015.

DAMAS, T. M. T.; MARASSI, A. E. *Campylobacter* sp.: agente etiológico de doença de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, Itapetininga, v. 24, n. 180/181, p. 85-90, 2010.

DORES, M. T.; NOBREGA, J .E; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan canastra cheese. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, 2013.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – 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 European Food Safety Authority Journal**. v. 8, n.3, p.1503, 2010.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. **The European Food Safety Authority Journal.**, v.013, n.11(4). p.3129, 2013.

ESTEVES, W. T. C; FERREIRA, A. P; E SICILIANO,S. Potencial impacto na Saúde Pública por *Campylobacter* spp. Estudo de caso: curso inferior do rio São João, RJ, Brasil. **Caderno Saúde Coletiva**, v.19, n.1, p.74-81, 2011.

FERNÁNDEZ, H. J. **Género *Campylobacter*: un grupo de bacterias zoonóticas de importancia en salud pública.** En: Temas de Zoonosis IV. Cap.21. Pág. 205-213, 2008.

FERNÁNDEZ, H.; GARCÍA, A.; VILLANUEVA, M. P. Serotipos de *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* en carne de aves para consumo humano y en muestras de niños con diarrea. **Archieve of Medicine Veterinary**, v. 37, p. 79-81, 2005.

FERNÁNDEZ, H.; VERA, F.; VILLANUEVA, M. P. Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. **Archieve of Medicine Veterinary** v. 39, n. 2, 2007.

GILBERT, C. D.; SLAVIK, M. F. Evaluation of attachment and penetration abilities of *Campylobacter jejuni* isolates obtained from humans and chicken carcasses during processing and at retail. **Journal of Food Safety**, v.25, n.3, p.209–223, 2005.

GODOI, H. S; GANDRAA, E. A., GANDRA, T. K. V. Técnicas Moleculares Aplicadas à Microbiología de Alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v.30, n.1, p.109-118, 2010.

GONZÁLEZ, M. 2008. *Acanthamoeba castellanii* como posible vehículo de transmisión de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* para aves : evidencia experimental. Tesis de magister, Facultad de Medicina, Instituto de Microbiología Clínica, Escuela de Tecnología Medica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C. C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.143–150, 2002.

HÄNEL, 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**, v.101, n.2, p.75–82, 2004.

HAZELEGER, W.; 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**, v. 24, 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.

KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, v.143, n.1, p.5 – 21, 1997.

KOBAYASHY, P. F. 2012. **Monitoramento dos principais agentes zoonóticos em leite e seus derivados de origem clandestina, provenientes de animais criados às margens do rio Tietê**. 2012. 44f. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. 2012.

LASTOVICA, A; SKIRROW, M. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. En: Nachamkin I, M Blaser (eds.) *Campylobacter* 2nd Edition ASM Press, Washington, DC, USA, Pp 89-120, 2000.

LIGOWSKA, M.; COHN, M. T.; STABLER, R. A.; WREN, B. W.; BRONDSTED, L. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n.1, p.111–115, 2011.

LINHARES, I. W. 2012. **Avaliação das Condições Higiênico - Sanitárias no Preparo de Fórmulas Infantis em Lactário Hospitalar**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

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**, v. 29, n. 1, p. 126–143, 2009.

MELO, R.T; NALEVAIKO, P.C.; MENDONÇA,E. P.; BORGES, L. W; FONSECA, B. B.; BALETTI, 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, n.1, p.227-231, 2013.

MONTEIRO, G. P. **Sobrevivência de Campylobacter jejuni em leite UHT e Leite pasteurizado tipo C**. 2011. 22f. Monografia – Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. 2011.

MONTEIRO, G. P. **Viabilidade e expressão de transcritos de virulência em Campylobacter jejuni experimentalmente inoculados em queijos Minas Frescal**. 2013. 76f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia-MG. 2013.

MOURA, M. S. **Influência de crioprotetores e pré-adaptação na viabilidade e produção de transcritos por cepas de Campylobacter jejuni mantidas a -20 °C**. 2013. 59f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia-MG. 2013

OLESEN, I.; JESPERSEN, L. Relative gene transcription and pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* after long-term adaptation to acid and salt stress. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n.3, p.248–253, 2010.

OLESEN, I.; VOGENSEN, F. K.; JESPERSEN, L. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stresses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.6, p.669–679, 2009.

PACHECO, C. R. **Viabilidade e transcrição gênica de Campylobacter jejuni em fórmulas lácteas**. 2014. 34f. Monografia – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia-MG. 2014.

PALYADA, K.; THREADGILL, D.; STINTZI, A. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.14, p.4714-4729, 2004.

PICOLI, S.U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.65-69, 2006.

POLY, F. & GUERRY P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, pp. 27–31, 2008.

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

RIEU, A.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Sensitivity to acetic acid, ability to colonize abiotic surfaces and virulence potential of *Listeria monocytogenes* EGD-e after incubation on parsley leaves. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n.2, p.560–570, 2010.

RIVERA-AMILL, V.; KIM, B. J.; SESHU, J.; KONKEL, M. E. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, n.11, p.1607–1616, 2001.

ROSSI, M.; DEBRUYNE, L.; GIULIO, Z. R.; MANFREDA, G.; REVEZ, J.; VANDAMME, P. *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. International. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2364–2369, 2009.

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**, v.15, n.5, p.491-498, 1998.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – CE. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.13, n.1, p.31-36, 1995.

SILVA, M. R. **Investigação epidemiológica de um surto de infecção alimentar por *Campylobacter jejuni* associado ao consumo de leite cru.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. [Monografia: Especialização em Nutrição Humana e Saúde].

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, 2010. p.536.

SNELLING, W.J.; McKENNA, J.P.; LECKY, D.M.; DOOLEY, J.S.G. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5560-5571, 2005.

STEAD, D. & PARK, S. F. Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress. **Applied Environmental Microbiology** v. 66, p. 3110–3112, 2000.

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

STINTZI A.; WHITWORTH L. Investigation of the *Campylobacter jejuni* Cold-Shock Response by Global Transcript. **Genome Letters**, v.2, n.1-2, p.18-27, 2003.

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

VAN DEUN, K.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; FLAHOU, B.; VISSENBERG, K.; MARTEL, A.; VAN DEN BROECK, W.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESBROUCK, F. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. **Veterinary Microbiology**, v.130, n.3-4, p.285–297, 2008.

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

VANDAMME, P. 2000. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. En: Nachamkin I, Blaser MJ (eds). *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, DC, USA, Pp 3-26.

VILLANUEVA, M.P. 2005. Sobrevida de *Campylobacter jejuni* y *Arcobacter butzleri* en *Acanthamoeba castellanii*. Tesis de pregrado, Facultad de Medicina, Instituto de Microbiología Clínica, Escuela de Tecnología Médica. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

WASSENAAR, T. M.; BLASER, M. J. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. **Microbes and Infection**, v.1, n.12, p.1023– 1033, 1999.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The global view of campylobacteriosis. Utrecht, netherlands, 9-11, 2012.

WOOD, C.J, FLEMING V., TURNIDGE J., THOMSON N., ATKINS R. C. *Campylobacter* peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis: report of eight cases and a review of the literature. **American Journal of Kidney Diseases**, v.19, p. 257–263, 1992.

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**, v.77, n.7, p.2325–2331, 2011.

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**, v.69, n.4, p.768–774, 2006.

CAPÍTULO II - Leite UHT contaminado por *Campylobacter jejuni* após abertura da embalagem pode ser fonte de infecção aos humanos.

Autores: Priscila Christen Nalevaiko, Guilherme Paz Monteiro, Marcela Franco Timoteo, Roberta Torres Melo, Daise Aparecida Rossi.

Revista: Brazilian Journal of Microbiology

1 Leite UHT contaminado por *Campylobacter jejuni* após abertura da embalagem
2 pode ser fonte de infecção aos humanos

3 NALEVAIKO, Priscila Christen¹, MONTEIRO, Guilherme Paz¹; TIMOTEO, Marcela
4 Franco¹ MELO, Roberta Torres¹, ROSSI, Daise Aparecida¹.

5 ¹Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Rua Ceará S/N, Campus Umuarama,
6 Bloco 2D, Sala 43. CEP: 38402-018, Uberlândia, Minas Gerais. Brasil.

7 E-mail:prinalevaiko@gmail.com

8

9 **ABSTRACT**

10 Were evaluated the viability and the ability to produce transcripts of *ciaB*, *dnaJ*, *p19*
11 and *sodB* genes by *C. jejuni* experimentally inoculated into UHT milk, after
12 refrigerated storage for 0, 24 and 48 hours. It was used two wild and two reference
13 strains in inoculum of 10^2 and 10^4 UFC.mL⁻¹. *C. jejuni* was recovered in all periods
14 analyzed, but the count of reference strains was only possible at contaminations of
15 10^4 UFC.mL⁻¹. The number of recovered cells of the wild strains was higher
16 compared to the reference ones and there was a decrease in the counts during the
17 storage conditioning to the initial inoculum. The ability to transcribe genes showed
18 slight differences between strains, inoculum concentrations and analyzed periods.
19 The transcription of the genes *ciaB* (invasion), and *dnaJ*, *p19* and *sodB* (tolerance to
20 environmental stress) was not significant between the strains, but was higher in the
21 10^4 inoculum UFC.mL⁻¹. The ability of *C. jejuni* to remain viable in UHT milk, and the
22 low infectious dose of this species to human infection, indicates that there is danger
23 of acquiring campylobacteriosis by drinking milk, in case of a subsequent

24 recontamination after opening the package. It takes good practices in the handling
25 and storage of this food.

26 **Keywords:** Campylobacteriosis; Cross contamination; *ciaB*, *p19*, *sodB*, *dnaJ*.

27

28 **RESUMO**

29 Avaliou-se a viabilidade e a capacidade de produzir transcritos dos genes *ciaB*,
30 *dnaJ*, *p19* e *sodB* por *C. jejuni* experimentalmente inoculada em leite UHT, após
31 armazenamento refrigerado por 0, 24 e 48 horas. Utilizou-se duas cepas de campo e
32 duas de referência em inóculos de 10^2 e 10^4 UFC.mL⁻¹. *C. jejuni* foi recuperada em
33 todos os períodos analisados, porém a contagem das cepas de referência só foi
34 possível em contaminação de 10^4 UFC.mL⁻¹. O número de células recuperadas nas
35 cepas de campo foi maior que nas de referência e houve diminuição nas contagens
36 durante o armazenamento condicionado ao inoculo inicial. A capacidade de
37 transcrever os genes apresentou diferenças pontuais entre cepas, concentrações de
38 inóculo e períodos analisados. A transcrição dos genes *ciaB* (invasão), e *dnaJ*, *p19* e
39 *sodB* (tolerância ao estresse ambiental) não foi significativa entre as cepas, mas foi
40 maior no inóculo de 10^4 UFC.mL⁻¹. A capacidade de *C. jejuni* se manter viável em
41 leite UHT e a baixa dose infectante desta espécie para a infecção humana indicam
42 que há perigo de adquirir campilobacteriose pelo consumo de leite, caso haja
43 recontaminação posterior à abertura da embalagem. São necessárias boas práticas
44 na manipulação e armazenamento deste alimento.

45 **Palavras chave:** Campilobacteriose; Contaminação cruzada; *ciaB*, *p19*, *sodB*, *dnaJ*.

46

47 **Introdução**

48 *Campylobacter* spp é considerado um micro-organismo exigente quanto à
49 nutrição e fisiologia, pois não utilizam açúcares, obtendo sua energia de
50 aminoácidos (GONZÁLEZ, 2008; ROSSI et al., 2009), são microaerófilos, exigindo
51 atmosfera de 5 a 6 % para sua multiplicação (HUMPAREY; O'BRIEN; MADSEN,
52 2007), e são também um mal competidores em relação a outras bactérias
53 (MURAOKA et al., 2011).

54 Apesar destas características, é o agente bacteriano mais prevalente na
55 gastroenterite humana via consumo de alimentos (EFSA, 2013), demonstrando que
56 deve possuir estratégias para sobreviver em ambientes hostis.

57 Uma hipótese aceita é a presença de genes específicos e a capacidade de
58 transcrevê-los, que auxiliam na sua sobrevivência em condições de estresse
59 ambiental ou na sua habilidade de causar doença no hospedeiro (STINTZI;
60 WHITWORTH, 2003; PALYADA, 2004; ZHENG et al., 2006). Estas características
61 podem ser intrínsecas, adquiridas ou moduladas pelas condições ambientais, que
62 associadas a outras, justificam a alta prevalência de *Campylobacter* na
63 gastroenterite humana.

64 O leite não pasteurizado é uma fonte de infecção por *Campylobacter* aos
65 humanos, mas pouco se conhece sobre o perigo do consumo deste alimento ou do
66 leite UHT, já beneficiados e recontaminados, para a saúde humana. A
67 recontaminação pode ocorrer em diferentes oportunidades no ambiente doméstico
68 ou em cozinhas industriais após a abertura das embalagens por contaminação
69 cruzada.

70 Objetivou-se verificar em leite UHT experimentalmente contaminado, a
71 viabilidade e a capacidade de produzir transcritos de virulência e resposta ao

72 estresse por cepas de *C. jejuni*, durante o armazenamento refrigerado.

73

74 **Materiais e Métodos**

75 Leite UHT foi experimentalmente contaminado com *C. jejuni* em
76 concentrações de 10^2 e 10^4 UFC.mL⁻¹. Foram testadas quatro cepas, sendo duas
77 provenientes de bancos de cultura: cepa de referência NCTC 11351 (Microbiologics
78 ®) e IAL 2383 (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil), isolada de pacientes
79 humanos durante um surto; e duas cepas de campo isoladas de alimentos: uma
80 oriunda de carcaça de frango congelado (CF47) e outra de pernil suíno congelado
81 (PS11).

82 Imediatamente após a inoculação experimental e após 24 e 48 horas de
83 armazenamento a 4-7°C, alíquotas foram avaliadas quanto à viabilidade de *C. jejuni*
84 e para a presença de transcritos para os genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19* e *sodB*. Como
85 controle negativo foi utilizado leite UHT não inoculado e mantido nas mesmas
86 condições.

87

88 **Processamento das cepas e do leite**

89 A reativação da cepa-padrão NCTC 11351 (Microbiologics ®) e da cepa IAL
90 2383 foi realizada conforme recomendação dos laboratórios fornecedores. As cepas
91 selvagens, que se encontravam criopreservadas em leite integral foram
92 descongeladas em temperatura ambiente e transferidas (200µL) para caldo Bolton
93 (Oxoid), incubado a 37°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia (5% a 15% de
94 oxigênio e 10% de gás carbônico) (Probac do Brasil®) (Probac do Brasil®).

95 As cepas reativadas foram semeadas em placas de ágar
96 *Campylobacter Blood-Free Selective Medium* (m-CCDA) (Oxoid®) e incubadas a 37°C
97 por 48 horas em atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil®).

98 Após incubação, colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo
99 10mL de solução de NaCl 0,85% estéril em quantidade suficiente para atingir
100 turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Estes cultivos foram utilizados para as
101 inoculações experimentais.

102 Os leites UHT de mesma marca obtidos no comércio foram previamente
103 analisados quanto à presença de *C. jejuni* (ISO, 2006) e submetidos à quantificação
104 de bactérias mesófilas (Silva et al., 2007), e após, subdividido assepticamente em
105 três porções de 100mL (dois para grupo teste inoculados com 10^2 e 10^4 UFC.mL⁻¹ e
106 um controle negativo). Este procedimento foi realizado para cada uma das quatro
107 cepas.

108 Após contaminação experimental e homogeneização, as amostras foram
109 mantidas em refrigerador doméstico (4°C a 7°C). Alíquotas foram amostradas
110 imediatamente após inoculação e depois do armazenamento por 24 horas e 48
111 horas para análises. Foram realizadas quatro repetições para cada uma das cepas,
112 sendo em cada uma delas utilizada um lote diferente de leite.

113

114 **Análises**

115 Para verificar a viabilidade de *C. jejuni* nas amostras inoculadas foi realizada
116 a quantificação em placas (ISO, 2006b), mas uma alíquota foi paralelamente
117 submetida ao pré-enriquecimento. Quando não havia recuperação de colônias,
118 dava-se procedimento à técnica de avaliação da presença/ausência (ISO, 2006a).
119 Todas as análises foram realizadas em duplicata.

120 A quantificação de *Campylobacter* spp. foi realizada de acordo com as
121 recomendações da ISO (2006b), com modificações. As amostras eram submetidas a
122 diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (DIFCO), semeadas na
123 superfície de ágar m-CCDA (OXOID®) e incubadas a 41,5 °C por 44 horas±4 horas
124 em jarras de anaerobiose em condições de microaerofilia (Probac do Brasil®). As
125 colônias foram contadas, e no mínimo três de cada placa selecionadas para
126 confirmação do gênero utilizando coloração de Gram modificada (uso da
127 carboxifuccina substituindo a safranina) e teste da catalase. A confirmação da
128 espécie foi realizada por PCR, de acordo com a técnica e primer C1
129 (CAAATAAGTTAGAGGTAGAATGT) e C4 (GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT)
130 descritos por Harmonet al. (1997). Os números de *C. jejuni* por UFC.mL⁻¹ foram
131 calculados multiplicando o número de colônias pela recíproca da diluição utilizada
132 considerando as normas contidas no *Compedium* (Kornacki e Johnson, 2001).

133 Paralelo a quantificação, 10mL das amostras foram pré-enriquecidas em
134 90mL de caldo Bolton (Oxoid®), e incubadas a 37°C por 4 a 6 horas e 41,5°C por 44
135 horas ± 4 horas (ISO, 2006b). Se houvesse crescimento de colônias na
136 quantificação, este material era descartado, e na ausência, era semeado em placas
137 de m-CCDA (Oxoid®). Após incubação e confirmação das colônias nas mesmas
138 condições já descritas, o resultado era reportado como presença/ausência.

139 Para verificar a transcrição dos genes *ciaB* (invasão), *dnaJ* (termotolerância),
140 *p19* (transporte de ferro) e *sodB* (resistência ao estresse oxidativo) utilizou-se a
141 técnica do RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), conforme
142 recomendações de Li et al. (2008). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

143 A extração do DNA foi realizada diretamente de 2mL cada amostra de leite,
144 que após transferência para microtubos, foi centrifugado a 12.000xg por dez minutos

145 a 4°C. Ao *pellet* obtido foi adicionado 1mL de Trizol (Invitrogen®), que foi
146 homogeneizado em *vortex* até ser disperso na solução. Após a adição de 200µL de
147 clorofórmio (Isofar®), homogeneização em *vortex* e centrifugação a 12.000xg por 15
148 minutos a 4°C, a parte aquosa foi transferida para um novo microtubo, adicionada de
149 500µL de isopropanol (Dinâmica®), novamente homogeneizada e centrifugada a
150 12.000xg por 10 minutos a 4°C. Ao *pellet* formado foi adicionado 1mL de etanol 75%
151 (Dinâmica®) e após homogeneização e centrifugação a 7.500xg por 5 minutos a
152 4°C, o sobrenadante foi desprezado.

153 Os *pellets* de RNA foram secos a temperatura ambiente para serem diluídos
154 em 20µL de água DEPC (Invitrogen®). Para a quantificação do RNA utilizou-se o
155 espectrofotômetro Nanodrop (ThermoScientific®), em comprimento de onda de
156 230nm, observando sempre a relação 260/280 para verificar a integridade do RNA
157 (relação entre 1,8-2,0).

158 . Para transcrição reversa utilizou 1µg de RNA total (200ng/uL), 10 U de
159 inibidor de RNase, 40 U de MMLV-RT (AmershamBiosciences), 1X de Tampão da
160 MMLV-RT (AmershamBiosciences), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e
161 dCTP), 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos
162 (Invitrogen®) e 20 µL com água DEPC (Invitrogen®). A solução foi mantida a 37°C
163 por uma hora.

164 Posteriormente 3µL do cDNA foi utilizado para a reação de amplificação de
165 25µL, composta por: 0,625U de Taq DNA polimerase, 5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs
166 e 4 picomoles de cada *primer* (Invitrogen®). O controle positivo, *C. jejuni*NCTC
167 11351 foi utilizado em todas as reações de amplificação e o controle negativo foi
168 composto de água ultrapura estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição
169 ao DNA alvo. A sequência dos *primers* está descrita na Tabela 1.

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

Genes	Seqüência 5' 3'	Peso molecular (pb)	Referência
<i>ciaB</i>	ATATTGCTAGCAGCGAAGAG GATGTCCCACTTGTAAGGTG	157	Li et al. (2008)
<i>dnaJ</i>	AGTGTGAGCTTAATATCCC GGCGATGATCTAACATACA	117	Li et al. (2008)
<i>p19</i>	GATGATGGTCCTCACTATGG CATTTGGCGTGCCTGTGTA	206	Birket al. (2012)
<i>sodB</i>	TATCAAAACTCAAATGGGG TTTCTAAAGATCCAAATTCT	170	Birket al. (2012)

172
 173 A amplificação realizada em termociclador (Eppendorf) obedeceu aos ciclos: 1
 174 ciclo inicial a 94°C por 3 minutos e 45 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C
 175 por 15 segundos, anelamento a 51°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 20
 176 segundos; e um ciclo de extensão final a 72°C por 3 minutos.

177 A separação dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese
 178 em gel de agarose a 1,5% (Affymetrix®), utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x 30
 179 (Invitrogen®) e como padrão de massa molecular o marcador de 50pb (Invitrogen®).

180
 181 **Delineamento experimental e análise dos resultados**

182 Os procedimentos utilizados são os descritos em Triola (1999) e Ayres et al
 183 (2007). Utilizou-se para a análise a ferramenta Action (2015) e o programa R (R
 184 Development Core Team, 2015), adotando-se significância de 5%.

185 O experimento foi delineado de forma inteiramente ao acaso em esquema
 186 fatorial com dois inóculos, quatro cepas, três tempos de avaliação e quatro

187 repetições. Para verificar a normalidade dos resíduos foi utilizado o teste de
188 Anderson-Darling. Após utilizou-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis
189 para a comparação de mais de dois grupos ou o teste de Mann-Whitney para a
190 comparação de dois grupos. O teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar as
191 variáveis quantitativas.

192
193 **Resultados e Discussão**

194 Em todos os lotes de leite UHT utilizados para a inoculação das quatro cepas
195 de *Campylobacter jejuni* não foram detectadas bactérias heterotróficas mesófilas.
196 Esse resultado já era esperado, uma vez que o leite UHT (*ultra hight temperature*)
197 não contém micro-organismos capazes de multiplicar em condições normais de
198 armazenamento, devido ao seu beneficiamento em temperaturas ultra-altas, de 130-
199 150°C (Brasil, 1997).

200 Não houve crescimento de bactérias mesófilas ou *Campylobacter* spp em
201 nenhum período analisado nos controles negativos.

202 As cepas de campo de *C. jejuni* (CF 47 e PS 11) mantiveram-se viáveis e
203 cultiváveis durante os três períodos avaliados (0h, 24h e 48h), independente do
204 número de células utilizadas para a inoculação experimental. O mesmo não ocorreu
205 com as cepas de referência, em que a contagem só foi possível após
206 armazenamento refrigerado quando contaminadas com 10^4 UFC.mL⁻¹, demonstrando
207 que o número de células recuperadas foi dependente da contaminação inicial. Nas
208 cepas de referência (IAL 2383 e NCTC 11351) inoculadas com 10^2 UFC.mL⁻¹, não foi
209 possível estabelecer os números de *C. jejuni* após o armazenamento refrigerado por
210 24 e 48 horas (Tabela 2), porém, a passagem prévia por meio de pré-
211 enriquecimento antes do plaqueamento permitiu a recuperação destas cepas em
212 todos os períodos analisados.

213 A cepa que apresentou maior contagem média em ambas as concentrações
 214 de inóculo e nos diferentes períodos analisados foi a cepa de campo isolada de
 215 suíno, a PS11, seguida da cepa isolada de carcaça de frango, a CF47. A cepa PS11
 216 também foi a única que manteve contagens maiores que 500 UFC após 24 e 48
 217 horas de armazenamento refrigerado, que é considerada a dose infectante de
 218 *Campylobacter* para humanos (Ivanovic, 2012), e somente nas amostras inoculadas
 219 com 10^4 UFC/mL.

220 A análise estatística dos dados demonstrou diminuição nas contagens
 221 durante o armazenamento refrigerado, porém as reduções não foram idênticas entre
 222 as diferentes cepas, e sim pontuais, e condicionadas ao número de células
 223 inoculadas inicialmente, indicando que, esta característica é cepa dependente e
 224 relacionada à contaminação inicial.

225

226 **Tabela 2.** Contagem de *C. jejuni* (UFC mL⁻¹)* em leite UHT contaminado experimentalmente
 227 e mantido sob refrigeração de 4-7 °C por 0, 24 e 48 horas.

Período	Contagem (UFC.mL ⁻¹)							
	Inóculo 10 ^{2(a)}				Inóculo 10 ^{4(b)}			
	PS	CF 47	IAL	NCTC	PS 11	CF 47	IAL	NCTC
	11		2383		11351		2383	
0h	$1,2 \times 10^2$	$6,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$2,2 \times 10^0$	$1,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$
24h	$4,5 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$<1 \times 10^0$	$<1 \times 10^0$	$1,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$
48h	$6,0 \times 10^0$	$4,5 \times 10^0$	$<1 \times 10^0$	$<1 \times 10^0$	$4,6 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$6,0 \times 10^0$	$1,3 \times 10^2$

228 * resultados médios de quatro repetições em duplata. Cepas de campo: PS11 – isolado de pernil
 229 suíno; CF47 – isolado de carne de frango; NCTC 11351 e IAL 2383 – cepas de referência. a e b.
 230 Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p<0,05$).
 231

232 A redução nas contagens ao longo do armazenamento refrigerado foi
 233 acentuada já nas primeiras 24 horas em leite contaminado com 10^2 UFC.mL⁻¹ com
 234 as cepas de referência, mas também foram reduzidas nas cepas de campo. Já no
 235 inóculo de 10^4 UFC.mL⁻¹, as contagens permaneceram semelhantes ao longo do
 236 armazenamento, com exceção da cepa de referência IAL que apresentou redução

237 de 4 ciclos Log em 24 horas e mais um ciclo Log em 48 horas. Estes resultados
238 diferem parcialmente dos obtidos por Monteiro (2011), que também utilizou leite UHT
239 contaminado com a cepa ATCC 33291, e verificou pequena redução nas contagens
240 após armazenamento refrigerado por períodos de 24 e 48 horas, mesmo em inoculo
241 de 10^1 UFC.mL⁻¹.

242 A redução nas contagens de *C. jejuni* ao longo do armazenamento refrigerado
243 em contaminação inicial de 10^2 concorda com estudos anteriores que mostram que o
244 número de células viáveis deste micro-organismo é reduzido em temperatura de 4°C
245 (Haddad et al., 2009; El-shibiny et al., 2009; Eideh et al., 2011). Essa diminuição está
246 relacionada, provavelmente, ao fato de que várias atividades biológicas ficam
247 comprometidas nessas condições, incluindo a síntese de proteínas, o consumo de
248 oxigênio, a atividade de catalase, a geração de ATP e a motilidade (Haddad et al.,
249 2009).

250 A detecção de contagens superiores a 1,0 UFC.mL⁻¹ e da recuperação das
251 cepas em todos os períodos analisados mostra um perigo potencial ao consumo,
252 considerando que a dose infectante de 500 células pode ser atingida facilmente,
253 dependendo do volume ingerido.

254 A contaminação do leite UHT por esse micro-organismo, fato que pode
255 ocorrer nas residências ou restaurantes após a abertura das embalagens, pode
256 tornar este alimento uma fonte de infecção para os humanos, dependendo do
257 número de células e origem das cepas, uma vez que cepas de campo mostraram-se
258 mais resistentes ao armazenamento refrigerado.

259 A manipulação, o contato com outros alimentos de origem animal *in natura* e
260 o armazenamento inadequado podem ser oportunidades de contaminação do leite
261 por *Campylobacter*. A ausência de micro-organismos competidores no leite UHT

262 também pode contribuir para a manutenção do agente. Esta afirmação concorda
263 com os obtidos por Monteiro (2011), que analisou leite UHT e pasteurizado
264 contaminado com concentrações de 10^1 a 10^4 UFC.mL⁻¹ de *C. jejuni* (ATCC 33291) e
265 observou que, devido à característica de má competidora, a viabilidade de *C. jejuni*
266 foi menor em leite pasteurizado.

267 Além disso, outros estudos que utilizaram contaminação experimental com
268 cepas de referência de *C. jejuni* em leite e fórmulas lácteas após o processamento
269 verificaram que o micro-organismo é capaz de se manter viável em números maiores
270 que 10^1 após 48 horas de armazenamento (Monteiro 2011; Pacheco, 2014).

271 A capacidade de *C. jejuni* sobreviver a condições desfavoráveis também foi
272 demonstrada em um estudo que utilizou leite contaminado experimentalmente com
273 10^5 UFC.mL⁻¹ para a fabricação de queijos do tipo frescal. As cepas de referencia
274 NCTC 11351 e IAL 2383 foram recuperadas dos queijos até quatro dias após a
275 fabricação em números superiores a 10^2 UFC.g⁻¹ (Monteiro, 2014).

276 Assim, além da interferência das características intrínsecas das cepas de *C.*
277 *jejuni*, é provável que o tipo de substrato (matriz alimentar) também possa interferir
278 em sua sobrevivência. Há relato de ação crioprotetora do leite para *C. jejuni*,
279 Carvalho et al. (2004) afirma que o efeito crioprotetor do leite é devido à alteração na
280 fluidez da membrana da célula ou pela contribuição do cálcio na estabilidade das
281 enzimas celulares.

282 A presença de transcritos para os genes *ciaB*, *dnaJ*, *sodB* e *p19* pelas
283 diferentes cepas de *C. jejuni* ao longo do armazenamento refrigerado está descrita
284 na Tabela 3.

285

286

287

288 **Tabela 3.** Produção de transcritos (%) por quatro cepas de *C. jejuni* inoculadas em leite UHT
 289 com 10^2 e 10^4 UFC.mL $^{-1}$

Genes	Tempo	Leite UHT							
		PS11		IAL 2383		CF47		NCTC 11351	
		10^2	10^4	10^2	10^4	10^2	10^4	10^2	10^4
<i>ciaB</i>	0h	100%	100%	25%	100%	50%	50%	25%	100%
	24h	25%	50%	25%	-	75%	100%	-	100%
	48h	75%	100%	75%	100%	-	75%	-	100%
<i>dnaJ</i>	0h	50%	50%	50%	50%	25%	75%	50%	75%
	24h	-	-	25%	-	25%	100%	75%	100%
	48h	25%	50%	25%	50%	50%	100%	-	100%
<i>p19</i>	0h	100%	100%	25%	100%	25%	50%	50%	50%
	24h	100%	100%	25%	100%	-	100%	-	100%
	48h	50%	100%	-	100%	25%	50%	-	100%
<i>sodB</i>	0h	-	-	-	-	-	-	25%	75%
	24h	-	-	50%	-	-	50%	-	50%
	48h	-	-	-	-	-	-	-	100%

290 Inóculos de *C. jejuni*: Cepas de campo: PS11= isolado de pernil suíno congelado; CF= isolado de
 291 carcaça de frango congelado; Cepas de referência: IAL 2383(Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil);
 292 NCTC 11351 (Microbiologics). (-) Sem produção de transcritos.

293

294 A capacidade de transcrever os genes apresentou diferenças pontuais
 295 quando se comparou cepas e os períodos analisados. Porém, ao avaliar a
 296 concentração do inóculo constatou-se que amostras com maior número de células
 297 apresentaram maior capacidade de transcrição gênica. O favorecimento da
 298 transcrição em maior contaminação inicial concorda com Gerry (2007) e Lodge
 299 (2007), que afirmam que a codificação de proteínas que auxiliam na manutenção e
 300 expressão de características de virulência de *Campylobacter* é favorecida em maior
 301 quantidade de células.

302 Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na capacidade de transcrição do
303 gene *ciaB* entre as cepas e entre os períodos de avaliação. De forma geral, as
304 porcentagens para este gene foram elevadas em todas as cepas ao longo do tempo,
305 demonstrando que apesar das condições de injúria, as cepas mantiveram seu
306 potencial de virulência por meio da invasão celular.

307 A cepa NCTC 11351 apresentou maior capacidade de transcrição do gene
308 *dnaJ* quando comparada com a PS11. Os transcritos deste gene estão associados à
309 tolerância ao aumento da temperatura no microambiente e injúria (Konkelet al.,
310 1999; Stintzi, 2003), e provavelmente, esse fato pode ter auxiliado na maior
311 viabilidade da cepa NCTC no estudo. As demais cepas apresentaram variações
312 pontuais tanto no aumento (CF47) quanto na diminuição (IAL2383) da capacidade
313 de transcrição para este gene.

314 O gene *p19* codifica uma proteína periplasmática ferro-dependente cuja
315 função é o transporte de ferro (Palyada, 2004) e a regulação desta proteína indica
316 uma forma de controlar o nível de ferro intracelular durante o estresse (Birk, 2012). A
317 cepa PS 11, foi a única que produziu transcritos para este gene em todos os
318 períodos analisados.

319 O conteúdo de ferro nos alimentos é um fator limitante para a multiplicação de
320 várias bactérias, porém o excesso deste nutriente pode resultar em radicais tóxicos.
321 Em contrapartida, para evitar a toxicidade do ferro, micro-organismos devem atingir
322 uma homeostase do ferro eficaz regulando firmemente a expressão de genes que
323 codificam proteínas envolvidas na aquisição e metabolismo em resposta a sua
324 disponibilidade (Ratledge e Dover, 2000). O leite não é nutricionalmente uma boa
325 fonte de ferro aos humanos, porém, o teor de 0,07 µg/mL, é superior aos exigidos
326 pela maioria da bactérias (Dominguez, et al., 2001). Assim, é provável que o sistema

327 de controle seja ativado quando micro-organismos como *Campylobacter* estejam
328 presentes no leite.

329 O gene *sodB* foi o menos transscrito por todas as cepas. A exceção cabe à
330 cepa NCTC 11351 inoculada na concentração de 10^4 UFC no leite, cuja transcrição
331 foi detectada em porcentagens elevadas (100%). Isso indica que a cepa apresentou-
332 se mais adaptada sob o estresse oxidativo ao qual foi submetida em reduzidas
333 temperaturas. Dessa maneira, a viabilidade e, principalmente, a manutenção nas
334 contagens bacterianas observadas ao longo do tempo (tabela 2), coincidindo com a
335 transcrição deste gene, pode estar diretamente relacionada ao seu maior potencial
336 de adaptação.

337 A tradução da proteína *sodB* desencadeia um mecanismo de defesa celular
338 ao estresse oxidativo, decorrente do choque ao frio. Este gene protege
339 especificamente os componentes celulares, incluindo várias enzimas
340 citoplasmáticas, o DNA, e os fatores de membrana, contra danos causados por
341 radicais livres de oxigênio (Stintzi; Whitworth, 2003).

342 Este estudo concorda com a afirmação de que a transcrição de genes por *C.*
343 *jejuni* é variável conforme as condições a que são submetidas (Hendrixson, 2006;
344 Wösten et al., 2006; Garénaux et al. (2008); Wösten et al., 2010; Mourik, 2011),
345 apoiando a ideia de que a regulação dos genes é essencial para a manutenção da
346 sobrevivência de *C. jejuni*.

347

348 **Conclusão**

349 Há perigo de infecção por *C. jejuni* pelo consumo de leite UHT recontaminado
350 após processamento, condicionado a contaminação inicial, cepa contaminante e
351 volume ingerido. Boas práticas na manipulação e armazenamento do leite UHT

352 devem ser observadas após a abertura da embalagem para prevenir a
353 recontaminação.

354

355 **Referências**

356

357 ACTION (2015) Disponível em <http://www.portalaction.com.br>. Acesso em maio
358 2015.

359

360 AYRES M, AYRES JRM, AYRES DL, SANTOS AS (2007) BioEstat 5.0: Aplicações
361 estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil
362 Mamirauá; Brasília: CNPq, 2007, 364 p.

363 BIRK T, WIK MT, LAMETSCH R, KNOCHEL S (2012) Acid stress response and
364 protein induction in *Campylobacter jejuni* isolates with different acid tolerance. BioMed
365 Central Microbiology12: 174.

366 BRASIL (1997) Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria
367 SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, Regulamento Técnico sobre as condições
368 higiênicos – sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos
369 Produtores/Industrializadores de Alimentos. Disponível em:

370 [http://www.mds.gov.br/acesso-a-informacao/legislacao/
371 segurancaalimentar/portarias/1997/Portaria%20Anvisa%20no%20326.97.pdf/view](http://www.mds.gov.br/acesso-a-informacao/legislacao/segurancaalimentar/portarias/1997/Portaria%20Anvisa%20no%20326.97.pdf/view).

372 Acesso em 12 julho 2015.

373 CARVALHO AF (2009) Detecção dos genes da toxina citoletaldistensiva (CDT) em
374 estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas d frangos de corte e hortaliças.
375 (Dissertação de mestrado Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos
376 Agronegocios, São Paulo).

377 DOMÍNGUEZ R, FRAGA JM, COCHO JA, BERMEJO P, BERMEJO A, CERVILLA
378 JR, FERNANDEZ JR (2001) Contenido de hierroenlasleches de formula
379 empleadasenlaalimentación infantil: distribucionenelsuerolacteo y enlagraza.
380 Servicio de Neonatología y Lab. Metabolopatías, Depto. Pediatría, Hospital Clínico
381 Universitario, SERGAS,Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de
382 CompostelaDept. Química Analítica, Fac. de Química, Universidad de Santiago de
383 Compostela.

384 EIDEH AMF, AL-QADIRI HM (2011) Effect of Refrigerated and Frozen Storage
385 ontheSurvival of *Campylobacter jejuni*n CookedChickenMeatBreast. Journal of
386 FoodScience76, nr. 1.

387 EL-SHIBINY A, CONNERTON A, CONNERTON I (2009) Survival at refrigeration
388 and freezingtemperatures of *Campylobacter coli*and *C. jejuni*onchicken skin applied
389 as axenic and mixedinoculums. Int J Food Microbiol131:197–202.

390 GUERRY P (2007) Campylobacter flagella: not just for motility. Review.Trends in
391 Microbiology15:10.

- 392 HADDAD N, BURNS CM, BOLLA JM, PRE'VOST H, FE'DE'RIGHI M, DRIDER D,
393 CAPPELIER JM (2009) Long-Term Survival of *Campylobacter jejuni* at Low
394 Temperatures is Dependent on Polynucleotide Phosphorylase Activity. *Applied and*
395 *environmental microbiology*75:7310–7318.
- 396 HARMON KM, RAMSOM GM, WESLEY IV (1997) Differentiation of *Campylobacter*
397 *jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell.*
398 *Probes*11:195-200.
- 399 IVANOVIC S (2012) *Campylobacter* as a cause of gastroenteritis in humans and
400 animals. *African Journal of Microbiology Research*6:1651-1657.
- 401 ISO – International Standards Organization. ISO 10272-1 (2006a) Microbiology of
402 food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of
403 *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. ISO 10272-1:2006.
- 404 ISO – International Standards Organization. ISO 10272-2 (2006b) Microbiology of
405 food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of
406 *Campylobacter* spp. – Part 2: Colony-count technique. ISO 10272-2:2006.
- 407 KONKEL ME, KIM BJ, RIVERA-AMILL V, GARVIS SG (1999) Bacterial secreted
408 proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured
409 mammalian cells. *Molecular Microbiology*32 :691–701.
- 410 KORNACKI JL, JOHNSON JL (2001) *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia*
411 *coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES FP, ITO K(ed.), *Compendium of*
412 *Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health
413 Association8:69-82.
- 414 LI Y P, INGMER H, MADSEN M, BANG D (2008) Cytokine responses in primary
415 chicken embryo intestinal cells infected with *Campylobacter jejuni* strains of human
416 and chicken origin and the expression of bacterial virulence-associated genes. *BMC*
417 *Microbiology*8:107.
- 418 LODGE KB (2007) A Molecular Investigation of *Campylobacter jejuni* Pathogenesis.
419 2007. 345f. (Tese de Doutorado - School of Applied Sciences Portfolio of Science,
420 Engineering and Technology RMIT University).
- 421 MONTEIRO GP (2011) Sobrevivência de *Campylobacter jejuni* em leite UHT e Leite
422 pasteurizado tipo C. (Monografia – Instituto de Biologia da Universidade Federal de
423 Uberlândia).
- 424 MOURA MS (2013) Influência de crioprotetores e pré-adaptação na viabilidade e
425 produção de transcritos por cepas de *Campylobacter jejuni* mantidas a -20 °C. 2013.
426 59f. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade
427 Federal de Uberlândia-MG).
- 428 PACHECO CR (2014) Viabilidade e transcrição gênica de *Campylobacter jejuni* em fórmulas
429 lácteas. (Monografia – Instituto de Nutrição da Universidade Federal de Uberlândia-MG).
- 430
- 431 PALYADA K, THREADGILL D, STINTZI A (2004) Ironacquisition and regulation in
432 *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*186:4714-4729.

- 433
- 434 SILVA N, JUNQUEIRA VCA, SILVEIRA NFA, TANIWAKI MH, SANTOS RFS, GOMES
435 R A R. (2007). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos, 3^a
436 Edição. São Paulo. Varella.
- 437
- 438 STINTZI A (2003) Expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth
439 temperature variation. J. Bacteriol185:2009-2016.
- 440 STINTZI A, WHITWORTH L (2003) Investigation of the *Campylobacter jejuni* Cold-
441 Shock Response by Global Transcript. Genome Letters2:18-27.
- 442 R DEVELOPMENT CORE TEAM.R (2015) A language and environment for
443 statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em:
444 <http://www.r-project.org>. Acesso em maio 2015.
- 445 RATLEDGE C, DOVER LG (2000) Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria.
446 Annual Review of Microbiology54: 881-941.
- 447 RIVERA-AMILL V, KIM BJ, SESHU J, KONKEL M (2001) E. Secretion of the
448 virulenceassociated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter*
449 *jejuni* requires a stimulatory signal. JournalofInfectiousDiseases183:1607–1616.
- 450 TRIOLA MF (1999) Introdução à Estatística. LTC: Rio de Janeiro, 7. ed., 410 p.
- 451
- 452
- 453
- 454
- 455
- 456
- 457
- 458
- 459
- 460
- 461

**APÊNDICE A – INSTRUÇÕES AOS AUTORES - Brazilian Journal of
Microbiology**

Escopo da revista

A partir do dia 01/01/2015 o Brazilian Journal of Microbiology (BJM) aceitará manuscritos que versem sobre genoma de microrganismo sequenciado recentemente. Eles serão publicados na seção "Genome Announcement". O objetivo desta seção é permitir que autores do sequenciamento informem aos leitores do BJM sobre um genoma que está disponível e qual seria o interesse para a comunidade científica. O publicação não impedirá a futura publicação de um artigo científico completo no BJM ou em outra revista.

Escopo da seção "Genome Announcement" no BJM:

- Os autores da publicação deverão ser os mesmos ou na sua maioria dos contidos no depósito da sequência do genoma;
- A sequência do genoma deve estar disponível para o público no DDBJ / EMBL / NCBI dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), no momento do envio do manuscrito para o BJM. O número de acesso válido no GenBank para o genoma, deve ser claramente indicado no manuscrito;
- As sequências completas de plasmídeos circulares serão aceitas sem lacunas;
- As sequências de nucleotídeos que se refere o "announcement" , deve cobrir pelo menos 95% do tamanho do genoma esperado para o organismo;
- Serão considerados para publicação depósitos completos feitos no GenBank e gapped cromossomos (scattered) do genoma. Para tais depósitos é preferível ter uma anotação funcional.
- O manuscrito enviado para a seção "Genome Announcement" deve conter no máximo 500 palavras no corpo do texto e um resumo de 150 palavras;
- Os autores devem indicar claramente a origem da cepa microbiana, a importância de ter sequenciado o genoma e os benefícios que o campo da microbiologia.
- O texto deve conter a metodologia utilizada no sequenciamento, incluindo o número e tamanho das leituras geradas, métodos de montagem utilizado, as medidas tomadas para gerar os scaffolds e para fechar o genoma, quando aplicável. Além disso, informar quais métodos serão utilizados para anotação e curadoria se for o caso.

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, e trabalhos de revisão que cobrem todos os aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;
- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

Seu manuscrito deve ser escrito em inglês **claro e compreensível**.

Se você tiver dúvidas sobre o nível de inglês do seu texto, você pode optar por ter o seu manuscrito editado profissionalmente por um nativo da língua inglesa ou por um serviço de editoração científica **antes da submissão** do seu manuscrito. Todos os serviços devem ser organizados e pagos pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência para publicação do manuscrito. No caso de o autor ser um nativo da língua inglesa, por favor, substituir o certificado de Inglês por uma carta de justificativa.

É um prazer aceitar o seu trabalho para ser publicado na Revista Brasileira de Microbiologia. No entanto, só será publicada uma vez revisada a versão final do texto em Inglês. Por favor, envie o texto revisado e o certificado emitido pelo "American Journal Experts".

- American Journal Experts:
<http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>

SEÇÕES

Microbiologia Industrial: Fermentação Bacteriana

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por bactérias.
- Aspectos moleculares de biotecnologia bacteriana.

Fermentação Fúngica

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por fungos.
- Aspectos moleculares de biotecnologia fúngica.

Microbiologia de Alimentos: Tecnologia de Alimentos

- Aplicações de microrganismos (bactérias e fungos) na produção de alimentos.

Segurança e Qualidade dos alimentos

- Doenças de origem alimentar.
- Deterioração de alimentos.
- Ecologia microbiana em alimentos.

Microbiologia Médica: Patogênese Bacteriana

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese bacteriana.

Patogenicidade de Fungos

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese fúngica.

Microbiologia Clínica: Bacteriologia

- Estudos sobre bactérias de importância médica.

Micologia

- Estudos sobre fungos de importância médica.

Virulogia

- Estudos sobre vírus de importância médica.

Microbiologia Ambiental: Ecologia Microbiana

- Ecologia de grupos microbianos naturais; diversidade microbiana de ambientes naturais, como água, solo, sedimentos e organismos superiores.
- Interações microbianas.

Biotecnologia

- Aspectos ambientais de saúde pública.
- Biodegradação.
- Biorremediação.
- Considerações ambientais para microrganismos geneticamente modificados.

Fisiologia de Fungos

- Bioquímica de fungos, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Fisiologia de Bactérias

- Bioquímica de bactérias, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Genética e Biologia Molecular de Fungos

- Genética de fungos, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Bactérias

- Genética de bactérias, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Vírus

- Genética de vírus, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Microbiologia Veterinária

- Doenças de animais
- Controle e/ou tratamento de animais
- Diagnóstico de patógenos de animais
- Patógenos veterinários ou zoonóticos

Ensino de Microbiologia

- Estratégias de ensino em microbiologia
- Novas ferramentas de ensino em microbiologia

Submissão de um artigo

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/qppq/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996), e os "Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>) devem ser respeitados.

Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Comission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o BIOSIS. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

a. Artigos de Periódicos

Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol* 37:101-107.

b. Artigos ou Capítulos de Livro

Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.

c. Livros

Montville TJ, Matthews KR (2005) Food Microbiology - an introduction. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patentes

Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Teses e Dissertações

Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)

Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publicações na Web

Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado

anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. _____

Título do Artigo:

"_____"

Nome(s) do(s) Autor(es) _____ Assinatura(s)

Data: ____ / ____ / ____