

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**VIABILIDADE E EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE
VIRULÊNCIA EM *Campylobacter jejuni*
EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS EM QUEIJOS
MINAS FRESCAL**

Guilherme Paz Monteiro
Biólogo

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Agosto de 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**VIABILIDADE E EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE
VIRULÊNCIA EM *Campylobacter jejuni*
EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS EM QUEIJOS
MINAS FRESCAL**

Guilherme Paz Monteiro

Orientadora: Dra. Daise Aparecida Rossi

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

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Agosto de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M775v Monteiro, Guilherme Paz, 1976 -
2013 Viabilidade e expressão de transcritos de virulência em *Campylobacter jejuni* experimentalmente inoculados em queijos minas frescal / Guilherme Paz Monteiro. – 2013.
77 f. : il.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Queijo-de-minas - Teses. 2. Bacterioses – Teses. 3. Bactérias patogênicas – Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME PAZ MONTEIRO – Nascido em Catalão, Estado de Goiás, em 01 de dezembro de 1988, filho de Ronaldo Antônio Monteiro e Aparecida Maria da Paz Monteiro. Biólogo, graduado em agosto de 2010 pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista da PROGRAD entre os anos 2009-2011. Em 2011 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 2011 a fevereiro de 2013.

*“Se sonha, cuida!
Cuida que seu sonho
Seja expedição venturosa,
Mesmo que seja surreal
como todo sonho é.*

*Quando sonha, cuida!
Cuida para que seu sonho
Seja o passo primeiro
No princípio da jornada
Que não se perde no tempo.*

*Porque sonha, cuida!
Preserve para o adiante
O que começa no hoje.
Assim é a vida de estradeiro:
Construir caminhos
Para perseguir sonhos!”
(Paulo Pazz)*

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional de sempre e pelo apoio prestado nessa jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradecer...finalmente a parte mais doce de toda essa jornada. Provavelmente aqui me faltarão palavras para expressar meu afeto por cada uma das pessoas especiais que fizeram/fazem parte da minha história, mas ainda assim, quero lembrar de cada um de vocês.

Primeiramente a Deus, o mais importante, que me deu de presente a vida, e me colocou nessa jornada junto com pessoas maravilhosas, agradeço ao Senhor em oração por me amparar e me dar forças sempre que precisei.

As pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, meus exemplos, meu porto seguro. Por vocês eu tenho o maior e melhor sentimento do mundo, tão grandioso que não pode ser dito ou explicado...Obrigado é pouco, mas é o melhor que posso dizer. Eu sei que a luta de vocês não foi fácil, mas vocês superaram tudo em nome dos seus três filhos, obrigado pelo carinho, pelas broncas, pelo riso, pelo choro, obrigado simplesmente por existirem na minha vida. Amo vocês.

Meus irmãos, Rodrigo e Hugo, agradeço pelo companheirismo de sempre, por mais que sejamos diferentes e as vezes até brigamos, eu precisarei de vocês do meu lado, e vou estar aqui pra vocês sempre que precisarem, porque estamos nessa juntos até o fim. Amo vocês.

Aos meus avós, tias, tios, primos e primas, de parte de mãe e pai. Família...vocês são tudo pra mim, agradeço a cada um pela convivência. Ter a oportunidade de ter uma família como a nossa, tão unida, é para poucos. Agradeço a Deus sempre por ter me dado vocês. Aqui em especial quero agradecer à minha Vovó Orlanda e ao Tio Júnior, que sempre estiveram nos bastidores ajudando quando eu mais precisei.

A minha orientadora, mãe, amiga, Professora Dra. Daise Rossi, minha admiração por você é enorme, esses longos anos de convivência ao seu lado me renderam bons frutos. Vejo você como exemplo de profissional e de pessoa, obrigado pelos ensinamentos, pelas risadas, pelos puxões de orelha, pela confiança.

A família LABIO, pois é assim que vejo vocês, mais do que colegas de trabalho...os filhotes da Daisinha, meus irmãozinhos. Em especial, Robertinha, Eliane, Pri, Bia e Let, vocês que sempre estiveram comigo, obrigado de coração pelo carinho e ajuda de sempre. Tchesquinha talvez a pessoa que mais riu e mais brigou comigo nesses anos todos, obrigado por tudo, gosto muito de você. Carlinha, Gus, Dudu, Carol, Mariela, Marcelo, Filipe, Mari, Raquel e Leandro, os que conviveram, ou que ainda estão convivendo comigo diariamente no laboratório, obrigado pela companhia de sempre, gosto muito de todos vocês.

A Professora Dra. Yara Maia, obrigado por sempre se dispor a me ajudar, com satisfação e sorriso no rosto, sou grato pela grande ajuda que você me deu nas análises estatísticas, e mais do que isso, por sempre ser tão positiva e legal comigo.

Obrigado também aos meus colegas da 65 Bio, em especial Gu e Isa, meus grandes amigos-irmãos...não importa quanto tempo passe, nem a distância que possa nos separar, levo vocês no meu coração sempre.

A minha segunda família, que convivi/convivo diariamente, aos que me amparam, me suportam, e estão comigo pra tudo, Wini e minha “zoiudinha” Baby Jane, em especial, e Paulinha, Renatinha, Pedro e Gus, sem vocês meus dias não teriam a mesma graça.

Enfim...a verdade é que com o tempo, a vida nos leva a caminhos diferentes, então fica aqui a oportunidade de agradecer a cada um de vocês, para que saibam o quão importantes vocês são para mim. Se algum dia isso tudo se tornar lembranças, elas vão ser maravilhosas e cativantes, lembranças essas que me ajudaram a me tornar em quem eu sou hoje...e no que eu vier a ser algum dia. Com vocês, eu me sinto infinito! Obrigado por tudo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Objetivos.....	3
1.1.1.Geral.....	3
1.1.2. Específicos.....	3
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
2.1. <i>Campylobacter</i> spp.....	4
2.2. Manifestações Clínicas e Saúde Pública.....	6
2.3. <i>Campylobacter</i> spp. em Leite e Derivados	8
2.4. Virulência.....	11
3. METODOLOGIA.....	16
3.1. Desenho do Estudo.....	16
3.2. Processamento das cepas e preparo do inóculo.....	16
3.3. Delineamento Experimental.....	17
3.4. Fabricação dos Queijos.....	18
3.5. Análises Físico-químicas.....	19
3.6. Análises Microbiológicas.....	19
3.7. Identificação de <i>Campylobacter jejuni</i>	20
3.8. Presença de transcritos de virulência.....	21
3.9. Análises Estatísticas.....	23
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. Análises microbiológicas e físico-químicas do leite.....	24
4.2. Análises microbiológicas e viabilidade de <i>C. jejuni</i> em queijos Minas Frescal.....	26
4.3. Análises físico-químicas dos queijos e viabilidade de <i>C. jejuni</i> em queijos Minas Frescal	31
4.4. Produção de Transcritos.....	37
5.0 CONCLUSÕES.....	46
6.0 REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACMSF - Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food
CCDA – Agar Campylobacter Blood-Free Selective Medium
CDC – Centers for Disease Control
cDNA – Ácido desoxirribonucléico (complementar)
CIEVS – Centro de Informação e Respostas Estratégicas de Vigilância em Saúde.
DEPC – Dietilpirocarbonato
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos tri-fosfatados
EFSA – European Food Safety Authority
FAO – Food and Agriculture Organization
FDA – Food and Drug Administration
IAL – Instituto Adolfo Lutz
ISO – International Organization for Standardization
LPS – Lipopolissacarídeos
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCTC – National Collection of Types Cultures
NMP – Número Mais Provável
OMS – Organização Mundial da Saúde
pb – Pares de bases
PCA – Plate Count Agar
PCR – Reação da polimerase em cadeia
pH – Potencial de hidrogênio
RNA – Ácido ribonucléico
RT-PCR - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SGB – Síndrome de Guillain-Barré
SOD – Superóxido dismutase
TGI – Trato gastrointestinal
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
UHT – Ultra High Temperature
VNC – Viáveis não cultiváveis
WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma representativo dos procedimentos experimentais e análises realizadas.....	18
Figura 2. Coliformes totais e termotolerantes em queijos Minas Frescal experimentalmente inoculados com duas cepas de <i>C. jejuni</i> e analisado por até 10 dias.....	31
Figura 3. Representação gráfica da correlação entre umidade e sobrevivência de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 e IAL 2383 em queijos Minas Frescal ($P<0,05$).....	33
Figura 4. Representação gráfica da correlação entre pH e sobrevivência de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 e IAL 2383 em queijos Minas Frescal ($P<0,05$).....	34
Figura 5. Representação gráfica dos resultados de acidez; a) correlação entre acidez e sobrevivência de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 e IAL 2383 em queijos Minas Frescal ($P<0,05$); b) valores de acidez por cepa em três produções e quatro períodos de armazenamento.....	35
Figura 6. Valores de cloreto de sódio em queijo Minas Frescal em três produções e quatro períodos de armazenamento, discriminado por cepa de <i>C. jejuni</i> inoculada.....	36
Figura 7. a) o gel de PCR demonstra M (marcador de peso molecular de 50pb); C- (Controle Negativo, composto por água ultrapura em substituição ao DNA alvo); C+ (Controle Positivo: <i>C. jejuni</i> NCTC 11351); 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 amostras de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 isoladas dos queijos Minas Frescal que transcreveram o gene <i>dnaJ</i> e 2 e 3 isoladas que não transcreveram. b) 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 23 são <i>C. jejuni</i> IAL 2383 isoladas positivas para transcrição de <i>dnaJ</i> e 13 e 22 negativas.....	40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Análises microbiológicas e físico-química realizadas nos leites pasteurizados utilizados para as fabricações dos queijos Minas Frescal antes da inoculação experimental com <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 e IAL 2383.....	24
Tabela 2. <i>Campylobacter jejuni</i> (UFC.g ⁻¹) recuperados de queijos Minas Frescal fabricados com leite experimentalmente contaminado após armazenamento a 4°C por 10 dias.....	26
Tabela 3. Contagens médias de coliformes em queijos Minas Frescal fabricados com leite experimentalmente contaminado com <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 e IAL 2383 e armazenados por até 10 dias a 4°C.....	30
Tabela 4. Análises físico-químicas de queijos Minas Frescal fabricados com leite experimentalmente contaminado com <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 e IAL 2383, armazenados por até 10 dias a 4°C.....	32
Tabela 5. Produção de transcritos para o gene <i>ciaB</i> por <i>Campylobacter</i> isolados de queijos Minas Frescal, por período de armazenamento e produção.....	38
Tabela 6. Produção de transcritos para o gene <i>dnaJ</i> por <i>Campylobacter</i> isolados de queijos Minas Frescal, por período de armazenamento e produção.....	29
Tabela 7. Produção de transcritos para o gene <i>p19</i> por <i>Campylobacter</i> isolados de queijos Minas Frescal, por período de armazenamento e produção.....	41
Tabela 8. Produção de transcritos para o gene <i>sodB</i> por <i>Campylobacter</i> isolados de queijos Minas Frescal, por período de armazenamento e produção.....	42
Tabela 9. Frequência da produção de transcritos para quatro genes por 23 estirpes de <i>Campylobacter</i> recuperadas de queijos Minas	

Frescal após armazenamento refrigerado..... 43

Tabela 10. Perfil de transcrição para os genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19* e *sodB* por *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383, discriminado por isolados recuperados de queijos Minas Frescal após armazenamento refrigerado..... 44

**VIABILIDADE E EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE VIRULÊNCIA EM
Campylobacter jejuni EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS EM QUEIJOS
MINAS FRESCAL**

RESUMO - Este estudo avaliou a viabilidade e a capacidade de transcrição dos genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19*, *sodB* por duas cepas de *Campylobacter jejuni* (NCTC 11351 e IAL 2383) recuperadas de queijos Minas Frescal, fabricados com leite pasteurizado inoculado experimentalmente com o micro-organismo. Os queijos foram armazenados a 4°C por 10 dias e avaliados periodicamente quanto a presença/quantificação do grupo coliforme, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Campylobacter jejuni*, além da acidez, pH, umidade e cloreto de sódio. Os isolados de *Campylobacter* recuperados dos queijos foram avaliados pela técnica do RT-PCR para verificar se houve mudança em seus transcriptomas. O armazenamento a 4° C reduziu as contagens de *C. jejuni* do primeiro para o quarto dia e levou a nível não detectável a partir do sétimo dia. O decréscimo da umidade e pH e aumento da acidez nos queijos Minas Frescal apresentaram correlação com a diminuição da viabilidade de *C. jejuni*. Houve redução na produção de transcritos dos quatro genes testados, mais acentuada no quarto dia de armazenamento, quando os transcritos de *p19* e *sodB* já não foram mais encontrados. O consumo de queijo Minas Frescal contaminado com *Campylobacter* oferece risco de infecção aos humanos quando consumido até quatro dias após sua fabricação.

Palavras-chave: Campilobacteriose, inóculo experimental, viabilidade, segurança alimentar, virulência.

VIABILITY AND EXPRESSION OF VIRULENCE TRANSCRIPTS OF *Campylobacter jejuni* EXPERIMENTALLY INOCULATED IN MINAS FRESCAL CHEESES

ABSTRACT - This study evaluated the viability and capability of transcription of genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19*, *sodB* by two strains of *Campylobacter jejuni* (NCTC 11351 and IAL 2383) retrieved from Minas Frescal cheeses, made with pasteurized milk experimentally inoculated with the micro-organism. The cheeses were stored at 4 °C for 10 days and periodically evaluated for the presence/quantify of coliform group, *Staphylococcus* coagulase positive, *Campylobacter jejuni*, besides acidity, pH, umidity and sodium chloride. The *Campylobacter* isolates recovered from cheeses were evaluated by RT-PCR technique to check if there was a change in their transcriptomes. Storage at 4° C reduced the counts of *C. jejuni* from the first to the fourth day and led to undetectable levels after the seventh day. The decrease of umidity and pH and the increasing of acidity in Minas Frescal was correlated with the decrease in viability of *C. jejuni*. There was a reduction in the production of transcripts of the four genes tested, more pronounced on the fourth day of storage, when *p19* and *sodB* transcripts have not been found anymore. The consumption of Minas Frescal cheese contaminated with *Campylobacter* can be threatening to infect humans when consumed up to four days after its manufacture.

Keywords: Campylobacteriosis, experimental inoculum, viability, food protection, virulence.

1. INTRODUÇÃO

Um dos pilares para se garantir a segurança dos alimentos oferecidos à população é o monitoramento de sua qualidade microbiológica. Dentro dos conceitos de segurança alimentar é também importante entender o risco do consumo de cada um dos alimentos, quando contaminados por determinado micro-organismo. Sabe-se que surtos causados por toxi-infecções alimentares causam prejuízos diretos e indiretos, pois coloca em risco a saúde do consumidor e também gera impacto econômico (EFSA, 2010).

Campylobacter são bactérias Gram negativas, pertencentes à família *Campylobacteriaceae* (DAMAS et al. 2010). São classificadas como termotolerantes por apresentar temperatura ótima de crescimento entre 42°C a 43°C e não crescem em temperaturas inferiores a 30°C (DAMAS et al. 2010), porém suportam baixas temperaturas, por meio de mecanismos adaptativos. É atualmente o agente etiológico bacteriano mais envolvido nos casos de enterite humana na Europa e nos EUA (Estados Unidos), sendo a espécie *C. jejuni* a mais prevalente (EFSA, 2011; CDC, 2011; WHO, 2011). No Brasil ainda não há uma legislação vigente que inclui o gênero *Campylobacter*, conseqüentemente os estudos ainda são escassos.

Não há obrigatoriedade para a análise de *Campylobacter* em alimentos por parte do Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, mas a análise deste micro-organismo é exigida por alguns importadores (ACMSF, 2005).

A campilobacteriose é uma zoonose, que é geralmente assintomática nos animais, mas em humanos infectados pode provocar diarreia, febre, dor abdominal, náusea, vômito, dor de cabeça e dores musculares. As complicações são consideradas raras, mas pode ocorrer meningite, colite recorrente, colicistite aguda, SGB (Síndrome de Guillain-Barré) e outras neuropatias (ESTEVES et al., 2011).

Além de aves e suínos, um importante reservatório das espécies de *Campylobacter* é o bovino. Dessa forma, o leite, bem como seus subprodutos podem se contaminar, e quando ingeridos, infectar os humanos (ESTEVES et al. 2011). Diversos autores citam o consumo de leite não pasteurizado contaminado como causa de campilobacteriose em humanos (CEBBALLOS-BARÓNA et al., 2007; GERMANO e GERMANO, 2008; RAMOS et al., 2008; BROUGH et al., 2011; KOBAYASHI, 2012). Sabe-se que o leite e seus subprodutos podem se contaminar

após o beneficiamento, no entanto, pouco se conhece ou é discutido sobre o papel deste grupo de alimentos como veiculadores deste micro-organismos.

Dentre os subprodutos lácteos, um dos que apresenta grande consumo pela população é o queijo Minas Frescal. Esta variedade possui elevado teor de umidade e é um produto altamente perecível, além disso, dependendo da tecnologia empregada, passa por considerável manipulação, apresentando condições propícias para contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, incluindo espécies patogênicas aos seres humanos (CÂMARA *et al.*, 2002). Dentre os possíveis contaminantes, está *C. jejuni*, porém não há estudos sobre *C. jejuni* e não se conhece se o microambiente desta matriz alimentar é favorável para permitir, quando presente, a viabilidade destes micro-organismos.

Existem dados que comprovam que *C. jejuni* é capaz de sobreviver, em número suficiente para causar infecção (400-500 células), em leite UHT e pasteurizado experimentalmente contaminados e mantidos sob refrigeração por 48 horas (MONTEIRO, 2011). A capacidade de 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).

Considerando que o consumo de leite cru e seus derivados representam risco para a infecção de humanos por *Campylobacter* (FDA, 2008), e que poucos estudos discutem a sobrevivência de *C. jejuni* no leite e nos seus subprodutos lácteos, há dificuldade na compreensão dos riscos que estes alimentos, se contaminados, podem representar. Também não está estabelecido se condições de estresse ao frio a que estes micro-organismos são submetidos durante o armazenamento, como as usadas na conservação de produtos lácteos influenciam na transcrição de seus genes de virulência.

Dessa forma, é importante avaliar a viabilidade e a capacidade deste micro-organismo expressar seus genes de virulência frente a condições de injúria como: manutenção a baixas temperaturas, na presença de competidores e outras situações de estresse. Este conhecimento pode subsidiar estudos de avaliação de risco, implementação de medidas de controle e campanhas educativas que visem garantir a segurança do alimento consumido pela população.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. GERAL

Determinar a viabilidade e a capacidade de expressar transcritos de virulência de *Campylobacter jejuni* recuperadas de queijo Minas Frescal após armazenamento refrigerado.

1.1.2. ESPECÍFICOS

Determinar em queijos Minas Frescal fabricados com leites experimentalmente contaminados com *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383.

2. O número de células viáveis de *Campylobacter jejuni* nos queijos mantidos sob refrigeração após 1, 4, 7 e 10 dias de fabricação.
3. Se há correlação entre o número e tipo de micro-organismos bioindicadores presentes no leite, com a viabilidade de *C. jejuni*.
4. Se as mudanças na composição físico-químicas dos queijos durante o armazenamento (umidade, pH, acidez e o teor de sal) podem ser correlacionadas à viabilidade de *Campylobacter jejuni*.
5. Utilizar a técnica de RT-PCR para verificar se há mudanças na produção de transcritos dos genes *dnaJ*, *ciaB*, *sodB* e *p19* pelos micro-organismos recuperados dos queijos após o processamento e armazenamento refrigerado.
6. Utilizar os resultados obtidos para estimar o perigo de infecção por *C. jejuni* pelo consumo de queijo Minas Frescal contaminado.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae*, sendo que as principais espécies implicadas em doenças gastroentéricas no homem são: *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Este micro-organismo é um bacilo gram-negativo, microaerófilo e termofílico que possui morfologia vibrióide ou em asa de gaivota (CRUSHELL et al., 2004). Sua estrutura é delgada com 0,2-0,5µm de largura e 0,5-5,0µm de comprimento, e se movimenta por meio de flagelos que podem estar localizados na região polar ou em ambas as extremidades (NACHAMKIN, 1998).

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

Em cultivos acima de três dias, as células de *Campylobacter* passam a se degenerar em formas esféricas ou ovóides com perda de sua capacidade de multiplicação em meios de cultura, o que torna difícil seu cultivo em laboratório (DEBRUYNE et al., 2008). Segundo HAZELEGER et al. (1994), quando perdem sua capacidade de multiplicação em meios de cultivos inertes são consideradas formas viáveis e não cultiváveis (VNC). ROWE et al. (1998) citam que formas VNC de *Campylobacter* spp. são induzidas pelo estresse causado pela escassez de nutrientes no meio, dentre outros fatores que levam à injúria, o que representa uma estratégia de sobrevivência desse agente.

Germano & Germano (2001) afirmam que *Campylobacter* spp. pode sobreviver durante quatro semanas ou mais em água a 4°C. De acordo com STINTZI & WHITWORTH (2003), em geral, a expressão de cerca de 13% do genoma bacteriano é significativamente alterado no choque frio. Estes mesmos autores afirmam que, apesar disso, *Campylobacter* apresenta mecanismos de tolerância e adaptação às baixas temperaturas que incluem a aquisição ou a biossíntese de moléculas crioprotetoras, levando a alterações da composição

lipídica da membrana de forma a mantê-la viável nessas condições.

C. jejuni é capaz de se adaptar e sobreviver a uma vasta gama de condições ambientais, de forma ubíqua e persistente, apesar de ter um genoma relativamente pequeno, uma temperatura ótima elevada para seu crescimento, sensibilidade para os níveis altos de oxigênio atmosférico e necessidade de meios enriquecidos e seletivos para seu crescimento (PARK, 2000). Portanto, é essencial para *C. jejuni* possuir a capacidade para responder rapidamente às mudanças nas condições ambientais por meio de uma série de sistemas especializados. Estes sistemas funcionam promovendo um ajuste de seu transcriptoma de forma a modificar e facilitar uma resposta à condição submetida que se traduz em mudança física (LODGE, 2007).

A resposta de *C. jejuni* às mudanças de temperatura é talvez o tema mais investigado quanto ao seu sistema regulatório. *Campylobacter* pode ser encontrada em uma vasta gama de temperaturas ambientais desde alimentos congelados/refrigerados (-20°C/4°C) até o trato gastrointestinal das aves (42°C). Por conseguinte, é evidente supor que *C. jejuni* possui ambos os mecanismos de defesa ao frio e a altas temperaturas. Várias proteínas de tolerância às variações de temperatura foram identificadas em *C. jejuni*, porém não há homologia com as mesmas encontradas em outras enterobactérias, como *E. coli* (RATH & JAWALI, 2006).

Além do frio, o pH também pode ser um fator limitante para a viabilidade de *Campylobacter* spp., já que o micro-organismo não se multiplica em pH abaixo de 4,9, com crescimento na faixa de pH entre 4,9 a 9,0, com valores ótimos 6,5 a 7,5 (HAZELEGER et al., 1994).

Há alguns anos pensava-se que *Campylobacter* não era capaz de se multiplicar em alimentos durante o processamento ou armazenamento devido principalmente a crença de que a bactéria era muito sensível à dessecação e concentrações de cloreto de sódio iguais ou maiores que 2% (PARK, 2002).

Acreditava-se também que o micro-organismo não era capaz de sobreviver em superfícies secas, mas isso vem mudando com estudos relacionados à capacidade de formação de biofilmes por *Campylobacter* spp. Estudos de Bruswell (1998), Zimmer (2003) e seus colaboradores demonstraram a formação de biofilmes nas fontes de água, sistemas de canalização, em criadouros animais e plantas de

abate. Biofilme pode ser uma fonte contínua de infecção para animais domésticos e contaminação de alimentos nas plantas beneficiadoras, podendo assim, favorecer a infecção de humanos.

2.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

Campylobacter spp. é o agente etiológico mais prevalente em gastroenterites de causa alimentar na Europa e Estados Unidos e *C. jejuni* é reconhecido como o primeiro agente de diarreia nos países industrializados, já tendo superado a *Salmonella* como responsável por casos de diarreia (EFSA, 2011; CDC, 2011; WHO, 2011). Os Estados Unidos, por exemplo, possuem cerca de 1% da sua população atingida pela campilobacteriose (MOORE et al., 2005; FDA, 2008; EFSA, 2010).

A segurança alimentar é uma questão de saúde pública que tem merecido atenção especial tanto por parte de governos como das indústrias produtoras de alimentos. Desta forma, governos de muitos países têm intensificado esforços para garantir a segurança dos alimentos oferecidos à população. Nos últimos anos, países europeus, África do Sul e Japão vêm apresentando grande preocupação com as doenças alimentares, incluindo as associadas à presença de *Campylobacter*.

Os esforços ocorrem em resposta aos riscos da ingestão de alimentos contaminados e às exigências crescentes dos consumidores internos e importadores. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2009), o monitoramento e a vigilância demonstram que a principal causa de enfermidades transmitidas por alimentos é devido a patógenos zoonóticos. Consideram essencial sua prevenção, que deve incluir o monitoramento, análise de risco, o controle de enfermidades dos animais e as condições de preparo dos alimentos.

C. jejuni é a espécie mais prevalente em doenças gastroentéricas, chegando a representar aproximadamente 95% dos casos atribuídos ao gênero *Campylobacter*. Embora qualquer pessoa possa ser infectada por *C. jejuni*, crianças de até cinco anos de idade, idosos e imunodeprimidos, são mais frequentemente afetados (FDA, 2008). Embora seja autolimitante em adultos saudáveis, nos grupos de risco, pode se tornar uma doença severa requerendo terapia antibiótica. Porém, na maioria dos casos ocorrem infecções individuais esporádicas (COX, 2002).

Em países desenvolvidos, as campilobacterioses transmitidas por fontes alimentares infectam com maior frequência os adultos que não tiveram contato prévio com o micro-organismo. Já em países em desenvolvimento é mais comum a ocorrência de infecções alimentares por *C. jejuni* em pessoas com idade inferior a cinco anos (FDA, 2008).

Campylobacter tem sido isolado como patógeno entérico em praticamente todos os países latino-americanos, com frequências variáveis (México 5,3%, Argentina 6,1%, Venezuela 9,2%, Chile 5,7-14,1%, Brasil 7,3-18,5%, Panamá 11,7%, Peru 15-23% e Equador 23%). Possivelmente, as variações observadas são devido a condições ecológicas próprias de cada lugar, que intervêm no ciclo epidemiológico do *C. jejuni* (FERNÁNDEZ et al., 2005).

Espécies de *Campylobacter* são encontradas principalmente no trato gastrointestinal - TGI - de animais, como os bovinos e as aves, sendo também detectadas em alimentos provenientes destes animais. Portanto, os humanos infectam-se por contato direto com animais portadores ou pela ingestão de carne crua ou mal processada de aves, suínos e bovinos ou, ainda, pela ingestão de leite não pasteurizado, seus subprodutos e água não tratada e contaminada (FDA, 2008; SILVA et al., 2010; ESTEVES et al., 2011).

A principal característica da campilobacteriose é a diarreia líquida, com muco contendo sangue (geralmente oculto) e leucócitos fecais. Outros sinais e sintomas são: febre, dor abdominal, náusea, dor de cabeça e dores musculares. A maior parte das infecções são autolimitantes e não necessita de tratamento com antibiótico (WHO, 2000).

Entre as complicações causadas pela campilobacteriose, destacam-se a Síndrome de Guillain-Barré, que é uma desordem dos nervos periféricos caracterizada por paralisia e a artrite reativa, que é uma inflamação asséptica das membranas sinoviais (BIASI, 2010), a Síndrome de Fisher e a Síndrome de Reiter, responsável pela ocorrência de artrite reativa (DORREL; WREN, 2008). Estima-se que cerca de uma em cada 1000 infecções por *Campylobacter* leve a SGB (POPE et al., 2007; RABINSTEIN, 2007).

É provável que um fator determinante para a grande frequência dos surtos de campilobacteriose seja o fato de a dose infectante ser considerada baixa. A ingestão de apenas 500 micro-organismos, facilmente presentes em uma gota de água de

degelo é o suficiente para gerar um quadro de infecção (ACMSF, 2005).

A caracterização genética de *Campylobacter* aliada a genotipagem molecular tem fornecido importantes informações a respeito das fontes de contaminação dos alimentos, fato este que contribui na aplicação de medidas de controle (COLLES et al., 2008; HUNTER et al., 2009). Além disso, essas informações genéticas são importantes na determinação das habilidades de genótipos específicos para colonizar, causar a doença e sobreviver em condições adversas (HUNTER et al., 2009).

2.3. *Campylobacter* spp. EM LEITE E DERIVADOS

Os principais alimentos implicados nos surtos humanos de campilobacteriose são: leite cru, fígado e carne de bovinos, mariscos crus, vegetais, água, carne de frango insuficientemente cozida, leite pasteurizado contaminado e hambúrguer cru (BRYAN, 1982; DOYLE et al., 1992; ALTEKRUSE et al., 1994;).

Sabe-se que o leite utilizado na produção de queijo Minas Frescal nas indústrias passa por processo de pasteurização, que é suficiente para eliminar *C. jejuni*. No entanto, pode ocorrer contaminação posterior ao beneficiamento, devido à manipulação e armazenamento inadequados ou contaminação cruzada. No ambiente doméstico, a cozinha oferece diferentes oportunidades para a contaminação cruzada dos alimentos e pode contribuir para o aumento de doenças transmitidas por alimentos (GORMAN et al., 2002).

O leite apresenta propriedades que auxiliam na sobrevivência de *C. jejuni*, sendo utilizado até como crioprotetor, já que mantém ou auxilia na viabilidade do micro-organismo (MOURA, 2013). O efeito protetor do leite pode ser devido a alteração na fluidez da membrana da célula (ANNOUS et al., 1999; CARVALHO et al., 2004) ou pela contribuição do cálcio na estabilidade das enzimas celulares (BARACH et al., 1976).

Estudos revelam que a resistência de *Salmonella* aos tratamentos térmicos é maior quando as mesmas estão na presença de gordura (DOYLE; MAZZOTTA, 2000; BOZIARIS; ADAMS, 2001; TAYLOR-ROBINSON et al., 2003). O mesmo pode ocorrer para representantes do gênero *Campylobacter* em leite padronizado ou integral, onde a gordura pode complementar a estabilidade celular.

Além disso, o meio ideal para o crescimento de *Campylobacter* deve ser composto por altos níveis de proteína e açúcares como glicose, frutose, lactose, manose ou sorbitol, encontrados no leite (HAZELEGER et al., 1994; CARVALHO et al., 2004).

O leite não pasteurizado é um dos principais alimentos implicados como fonte de surtos de infecção por *Campylobacter* (WOOD et al., 1992). Em uma revisão de surtos ocorridos na década de 1980 nos Estados Unidos, foi verificado que 1.013 indivíduos foram infectados após consumirem leite não pasteurizado, o que correspondeu a uma taxa de 45% de infectados (WOOD et al., 1992). O leite não pasteurizado, comercializado ou obtido diretamente de uma das propriedades foi responsável por 61% dos surtos de campilobacteriose ocorridos nos EUA entre os anos de 1980 a 1982, o que correspondeu a 621 pessoas infectadas pelo micro-organismo. É importante ressaltar que em quatro destes surtos, 107 crianças foram infectadas por estes patógenos ao realizarem visitas escolares em fazendas (SILVA et al., 2007).

No Brasil também houve um surto de infecção alimentar por *C. jejuni* que foi associado ao consumo de leite não pasteurizado e infectou estudantes que visitaram uma fazenda produtora de leite no estado de Minas Gerais, resultando em 57,6% de infectados entre os que consumiram o alimento. Nas fezes de alguns estudantes foram isoladas amostras de *C. jejuni* invasivas em cultivo de células Hep-2 (SILVA et al., 1998; SILVA et al., 2003).

Outro caso recente envolvendo *C. jejuni* ocorreu no estado do Alaska, nos Estados Unidos, em março de 2013, no qual foram notificados 24 casos de campilobacteriose. Os casos foram associados ao consumo de leite cru produzido por uma fazenda situada na Península de Kenai que faz parte de uma cooperativa. O setor de epidemiologia do Alasca está realizando busca ativa de novos casos e a investigação epidemiológica ainda está em curso (CIEVS, 2013).

O envolvimento do gênero *Campylobacter* em mastites é reconhecido como uma das causas de contaminação do leite. LOPES et al. (1994) e LANGONI (1997) relataram o envolvimento de *Campylobacter* spp., inclusive *C. jejuni*, em mastites bovinas no Brasil, o que reforça o risco do consumo de leite não pasteurizado pela população.

Estudo recente comprovou que o consumo de leite e seus derivados

contaminados após a fabricação, podem ser potenciais veiculadores de *Campylobacter*. Um trabalho experimental determinou que *C. jejuni* é capaz de se manter viável em leite e fórmulas lácteas após 48 horas sob refrigeração, representando importantes fontes de infecção para humanos. O risco é maior, quando a microbiota natural é destruída ou diminuída anteriormente à contaminação por *Campylobacter* (PACHECO, 2013).

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 queijos artesanais, a utilização de leite cru e a deficiência no sistema de fiscalização, são fatores que contribuem para o queijo causar toxinfecções alimentares (FEITOSA et al., 2003; DORES, 2013)

O queijo Minas Frescal é um produto de massa crua, com alto teor de umidade (46 a 55%), o que pode proporcionar melhores condições para sobrevivência de micro-organismos como *Campylobacter* sp., já que no processo de beneficiamento não há emprego de altas temperaturas. Os queijos de massa mole, com pH alto e umidade elevada permitem o desenvolvimento de muitos micro-organismos (VARNAN; SUTHERLAND, 1999).

Além disso, para fabricação do queijo Minas Frescal, a indústria brasileira tem utilizado para o processo de acidificação, o ácido lático em substituição ao fermento láctico. Esse ingrediente gera maiores vantagens técnicas e econômicas devido a facilidade de emprego e à maior vida de prateleira, mas proporciona ao produto final, menor acidez, maior pH e umidade (FURTADO, 1980; ROSSI, 1997).

As condições encontradas no queijo Minas Frescal podem ser favoráveis a viabilidade e multiplicação de *Campylobacter* spp. Essa matriz alimentar apresenta alta umidade e faixa de pH que permite a sobrevivência e crescimento da *Campylobacter* spp. (6,5-7,5), assim como, o teor de cloreto de sódio suportado pela bactéria (até 2%) (HOFEMANN, 2001).

Durante o processo de fabricação, há risco de contaminação do queijo Minas Frescal por *Campylobacter* spp. além de outros micro-organismos. São várias as oportunidades, como: matéria-prima previamente contaminada, recontaminação do leite pós-pasteurização, temperaturas inadequadas de fabricação e de armazenamento e contaminação por manipulação (SANTOS; NOGUEIRA; CUNHA, 1995). Assim, as boas práticas de fabricação e as medidas de higienização durante

o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade e livre de patógenos (PICOLI et al., 2006).

Diante dos poucos estudos relacionados à viabilidade de *C. jejuni* em produtos lácteos e das condições favoráveis encontradas no processamento do queijo Minas Frescal, faz-se necessário compreender se há risco de sobrevivência desse agente após o beneficiamento, e quando contaminados, se representam ambiente adequado para a sobrevivência do agente, representando assim risco ao consumidor.

2.4. VIRULÊNCIA

Estudos que objetivam conhecer as características genotípicas das bactérias são muito importantes para inferir as habilidades de colonização, seu potencial para causar doenças e sua sobrevivência em condições adversas (HUNTER et al., 2009). Os três principais mecanismos de produção de doenças das espécies de *Campylobacter* spp. que causam gastroenterite são: adesão, invasão e produção de toxinas (BABAKRANI & JONES, 1993).

O interesse crescente na determinação dos efeitos ambientais sobre a virulência e transcrição de genes em patógenos de origem alimentar tem sido o objetivo de diversos pesquisadores (BERGHOLZ et al., 2009; OLESEN et al., 2009; OLESEN & JESPERSEN, 2010; RIEU et al., 2010). Porém, muito pouco se sabe sobre esses parâmetros em *Campylobacter* (PHONGSISAY et al., 2007; MA et al., 2009; LIGOWSKA et al., 2011; XIE et al., 2011).

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

Segundo JAWETS et al. (1998), as espécies de *Campylobacter* possuem lipopolissacarídeos (LPS) e flagelos que atuam como estruturas de aderência e invasão sendo capazes de produzir citotoxinas e enterotoxinas. Os micro-

organismos multiplicam-se no intestino delgado, invadem o epitélio e provocam inflamação. Eventualmente, a corrente sanguínea é invadida e se observa desenvolvimento de febre entérica.

Havendo sucesso da fixação e internalização, *Campylobacter* spp. coloniza as células epiteliais por alguns mecanismos que incluem: invasão (RUSSEL et al., 1993), produção de toxinas (WHITEHOUSE et al., 1998) e apoptose (RUSSEL et al., 1993). *Campylobacter* spp. pode evitar o ataque pelos fagócitos e entrar no sistema circulatório, principalmente em pacientes imunodeprimidos (WALLIS, 1994). O ataque pelos fagócitos pode envolver fagocitose, liberação de reações intermediárias e liberação de citotoxinas (JONES et al., 1999).

Campylobacter spp. não possui fímbrias, porém, foi demonstrado que o flagelo e o lipopolissacarídeo (LPS) atuam como adesinas, que permitem a adesão da bactéria à célula epitelial e ao muco intestinal. A forma curva-espiralada e o movimento típico em “saca-rolha” de *Campylobacter jejuni*, assim como, a atração quimiotática que o muco intestinal exerce sobre a bactéria, facilitam o contato desta com o epitélio do intestino. A adesão pode ser inibida experimentalmente por anticorpos específicos antíflagelos (FERNANDEZ, 2005).

Vários estudos têm revelado que tanto a adesão quanto a invasão de *Campylobacter* na porção intestinal são dependentes de múltiplos fatores (HÄNEL et al., 2004; FRIIS et al., 2005; GILBERT; SLAVIK, 2005; VAN DEUN et al., 2008), que envolvem a motilidade, a quimiotaxia, a colonização, a aquisição de ferro e a formação de toxinas (KETLEY, 1997; WASSENAAR; BLASER, 1999).

Dados de sequenciamento genômico de várias cepas revelaram que *Campylobacter* não possui mecanismos homólogos aos clássicos encontrados em bactérias entéricas, como: os de enterotoxinas, adesinas, invasinas e sistemas de secreção de proteínas do tipo III (HU & KOPECKO, 2008). No entanto, vários fatores de virulência foram identificados, como genes associados à aderência e à invasão (HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006; HU & KOPECKO, 2008), além de diferenças na capacidade de aderência e de invasão nas diferentes fases de crescimento (GANAN et al., 2010).

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 presença dos transcritos do gene *dnaJ* indica que a cepa codifica uma proteína do choque térmico, que permite à bactéria crescimento em temperatura superiores a 40°C e seja termotolerante (KONKEL et al., 1998). As proteínas oriundas do gene *dnaJ* apresentam uma importante função na superação de variações bruscas de temperatura, de forma que o micro-organismo se torne capaz de sobreviver e adaptar-se à nova temperatura (STINTZI, WHITWORTH, 2003). A resposta ao choque térmico está associada ao desempenho na colonização do trato intestinal e à sobrevivência bacteriana a altas temperaturas (KONKEL et al., 1998).

A presença dos transcritos do gene *ciaB* é importante já que a secreção da proteína *ciaB* é relevante para a invasão tanto em células epiteliais como na mucosa intestinal (KONKEL et al., 1999; ZIPPRIN et al., 2001). O gene *ciaB* codifica a proteína CiaB de 73-kD que está associada ao mecanismo de exportação da flagelina. Essa proteína está ligada à destruição de microtúbulos promovendo a entrada e permitindo a mobilidade da bactéria no interior da célula hospedeira. O mecanismo de invasão produzido por *ciaB* induz a desestruturação de microtúbulos motores e microfilamentos celulares, além da fosforilação de proteínas tirosina citoplasmáticas, que são sinalizadoras de reações em cascata, promovendo distúrbios celulares de forma a potencializar a motilidade intracitoplasmática sem restrições (RIVERA-AMILL et al., 2001).

Melo e colaboradores (2013) avaliaram 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 57,1% das cepas apresentaram a capacidade de produzir transcritos de virulência. Os autores argumentaram que o fato de algumas cepas não expressarem transcritos para os genes *ciaB* e/ou *dnaJ* pode estar relacionado à particularidades da cepas que podem assumir diversas propriedades para modular sua virulência. Além disso, afirmam que algumas cepas 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.

Os genes *sodB*, *p19* também 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 de adaptação ambiental relacionada a baixas temperaturas por *Campylobacter jejuni* e são, portanto, considerados como possíveis fatores de virulência desta espécie.

O estresse oxidativo tem sido implicado como um mecanismo que contribui na injúria de *Campylobacter* após o processo de congelamento e descongelamento, uma vez que oxidação ocorre após o descongelamento. A produção de enzimas como as superóxido dismutase (SODs) demonstrou ser importante fator de virulência em vários agentes patogênicos bacterianos incluindo *Campylobacter coli* e *C. jejuni* (PESCI, et al., 1994; PURDY, et al., 1999). Três tipos de SODs foram descritos: os cofatores que contêm ferro (*sodB* ou FeSOD), manganês (*sodA* ou MnSOD), e cobre e zinco (*sodC* ou CuZnSOD). Estas enzimas catalisam a quebra das moléculas de superóxido em peróxido de hidrogênio e de dióxigênio, e constituem, assim, um dos principais mecanismos de defesa da célula contra o estresse oxidativo (HASSAN, 1988).

Stintzi e Whitworth (2003) observaram um aumento na transcrição do gene *sodB* mediante um 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 oxigênio (STEINMAN, 1985; HOPKIN et al., 1992).

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

A capacidade de um micro-organismo causar doença é denominada patogenicidade. A diferença entre micro-organismos patogênicos e não patogênicos é que os primeiros expressam genes que codificam fatores de virulência

responsáveis por colonizar e desencadear eventos que alteram a fisiologia do hospedeiro aparecendo assim, a doença (BONITA et al., 2010). Estudos tem relatado a presença desses genes em cepas de *Campylobacter jejuni* isoladas de humanos independentemente da origem e da capacidade de adesão e invasão (ZHENG et al., 2006; GANAN et al., 2010).

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Foram realizadas no leite pasteurizado padronizado análises microbiológicas (quantificação de bactérias mesófilas, coliformes totais, termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva) e presença/ausência de *Campylobacter* spp., e físico-químicas (peroxidase, fosfatase e resíduos de antibióticos). Em seguida, o leite foi contaminado experimentalmente com duas cepas de *C. jejuni* (NCTC 11351 e IAL 2833) e utilizado na fabricação dos queijos Minas Frescal, que foram mantidos armazenadas sob refrigeração por até dez dias.

Após períodos pré-determinados (1, 4, 7 e 10 dias), as amostras foram avaliadas quanto aos aspectos microbiológicos (bioindicadores, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Campylobacter* spp.) e físico-químicos (pH, acidez, umidade e cloreto de sódio) a fim de correlacionar os resultados com a viabilidade de *C. jejuni* e a alterações em seu transcriptoma em relação aos genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19* e *sodB*. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.2. Processamento das cepas e preparo do inóculo

Para a inoculação experimental foi utilizada a cepa de *C. jejuni* NCTC 11351 (Microbiologics®), que é uma estirpe de referência e a cepa IAL 2383 (Instituto Adolfo Lutz – SP – Brasil). A cepa IAL 2383 é um isolado de amostra de paciente humano durante um surto, catalogada e depositada no IAL, Brasil.

No experimento foram utilizadas cepas em primeiro repique após a aquisição. A reativação da cepa-padrão NCTC 11351 (Microbiologics®) foi realizada conforme descrito pelo fornecedor, com a adição do caldo hidratante à ampola contendo a cultura liofilizada. Após homogeneização, a cepa foi semeada em ágar *Campylobacter Blood-Free Selective Medium (m-CCDA)* (Oxoid®) com auxílio de swab estéril e as placas incubadas a 37°C por 44 horas $\pm$ 4 horas em atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil®).

Para a cepa IAL 2383 (Instituto Adolfo Lutz) a reativação foi feita por meio de

pré-enriquecimento da cultura em caldo Bolton (Oxoid®) suplementado com 5% de sangue eqüino hemolisado. Após incubação em atmosfera de microaerofilia (5% a 15% de oxigênio e 10% de gás carbônico) (Probac do Brasil®) a 37°C por 44 horas $\pm$ 4 horas, a cepa foi semeada na superfície de ágar m-CCDA (Oxoid®) e incubada a 37° C por 44 horas $\pm$ 4 horas em atmosfera microaerofilia.

As colônias isoladas e puras crescidas em agar m-CCDA foram transferidas para tubos contendo 10mL de solução de NaCl 0,85% estéril e submetidas a diluições seriadas para determinar o número de 10^5 UFC.mL⁻¹. Estes cultivos foram utilizados para as inoculações experimentais.

3.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial. A avaliação transcricional das cepas em todas as amostras de queijo Minas Frescal foi realizada antes da inoculação e após a recuperação dos queijos. Todas as análises foram determinadas em triplicata.

Para cada uma das duas cepas utilizadas foram realizadas três repetições (lotes) de queijo minas frescal em dias diferentes. Em cada lote foram produzidos três queijos, utilizando uma concentração de inóculo (10^5 UFC.mL⁻¹) e quatro períodos de armazenamento (1, 4, 7 e 10 dias), totalizando 72 parcelas, sendo 36 para cada cepa. Um esquema da condução do experimento pode ser observado na Figura 1.

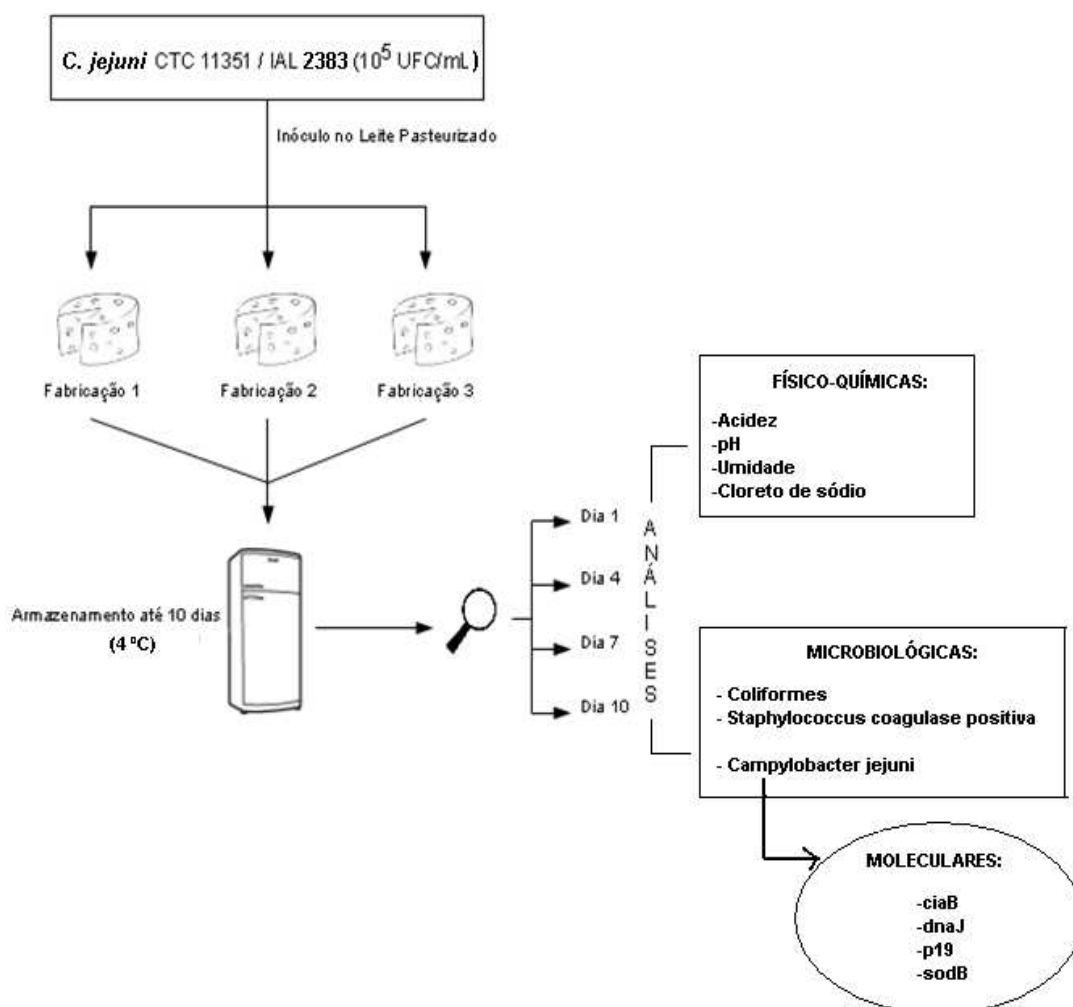


Figura 1. Fluxograma representativo dos procedimentos experimentais e análises realizadas.

3.4. Fabricação dos queijos

Foi utilizado em cada lote, 20L de leite pasteurizado padronizado com teor de gordura em 3%, obtido em estabelecimento sob Inspeção Federal.

As condições da fabricação foram as descritas por ROSSI (1997), usando ácido láctico em substituição ao fermento láctico e salga no leite, porém com adição de 1% de cloreto de sódio (Cisne). Em cada lote, após a adição do inóculo ao leite na temperatura de 40°C e homogeneização foram utilizados 4,7mL de ácido láctico 85% (Flex ®), 10mL de cloreto de cálcio 50% (Labsynth ®) e 16mL de coalho líquido (Ha-La). Em cada uma das repetições foram produzidas três unidades de queijo de aproximadamente 0,5 Kg.

Após a fabricação, os queijos foram embalados em sacos plásticos estéreis, armazenados em refrigerador (4°C a 7°C) e analisados após 1, 4, 7 e 10 dias.

3.5. Análises físico-químicas

A determinação das enzimas fosfatase e peroxidase, assim como, de resíduos de antibióticos betalactâmicos e de tetraciclina no leite usado para a fabricação dos queijos foram realizados por meio de kits de análises comerciais. Para as enzimas foram usados kits imunoenzimáticos da Laborclin® e para resíduos de antibióticos kits SNAP (Idexx Laboratories®). Ambos realizados conforme recomendação do fabricante.

As medidas de pH foram determinadas com o auxílio de pH-metro da marca Tecnal e modelo Tec-3MP, previamente calibrado, com imersão direta do potenciômetro na amostra diluída em água.

Para determinação da umidade foi utilizado o método gravimétrico e a concentração de cloreto de sódio nos queijos foi realizada por meio da titulação com nitrato de prata seguindo a recomendações da IN nº68 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006).

3.6. Análises microbiológicas

Para as análises microbiológicas, 25g dos queijos foram previamente diluídos em solução de citrato de sódio 2% (Synth®). Em seguida, foram submetidas a diluições decimais seriadas em 9mL de água peptonada 0,1% (Difco™).

A quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas foi realizada pelo método *pour plate*, com o uso de PCA - agar padrão para mesófilas (Difco™). Para a quantificação de coliformes totais e termotolerantes foi utilizada a técnica do número mais provável (NMP) com pré-enriquecimento em caldo Lauril sulfato de sódio (Difco™) e confirmação em caldo verde bile brilhante lactose e caldo E.C. (Difco™). Os procedimentos foram realizados conforme recomendações de SILVA et al. (2007).

A presença/ausência de *Campylobacter* spp. foi realizada com o pré-enriquecimento realizado em caldo Bolton (Oxoid®) a 37°C por 4 a 6 horas e 41,5°C por 44 horas $\pm$ 4 horas, seguido do cultivo tradicional em placas de *Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base* (m-CCDA) (Oxoid®) a 41,5°C por 44 horas $\pm$ 4

horas, ambos incubados em atmosfera de microaerofilia (5% a 15% de oxigênio e 10% de gás carbônico) (Probac do Brasil®) (ISO, 2006). A contagem de *Campylobacter* spp. foi realizada em paralelo a técnica da presença/ausência com o uso da técnica recomendada pela ISO 10272-18 (ISO, 2006), utilizando o agar seletivo CCDA *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base – m-CCDA (OXOID®), suplementado com antibióticos (OXOID®), incubado a 41,5 °C por 44 horas±4 horas em jarras de anaerobiose em condições de microaerofilia (Probac do Brasil®).

3.7. Identificação de *Campylobacter jejuni*.

As colônias foram confirmadas pela coloração de Gram modificada (uso da carboxifuccina substituindo a safranina) e teste da catalase.

A identificação genotípica de *C. jejuni* foi realizada por PCR multiplex, utilizando a técnica descrita por Harmon et al. (1997). Para a extração do DNA e a realização do PCR foi utilizado o kit DuPont™ PCR Reagent, que contém reagentes para extração do DNA (tampão fosfato e protease) e para a amplificação da sequência alvo do DNA (microtubos contendo tabletes com o MgCl₂, dNTPs e Taq-DNA polimerase). Os procedimentos foram realizados de acordo as orientações do fabricante.

Após o isolamento das cepas retirou-se dez colônias típicas de cada amostra e estas foram colocadas em tubos contendo 2mL de solução de NaCl 0,85% (Synth®). Após homogeneização em vortex (Phoenix®) por dois minutos, uma alíquota de 5µL da amostra foi transferida para microtubos (Bioexpress, USA), adicionado de 200µL de solução de protease em tampão fosfato (DuPont™ PCR Reagent) e a mistura foi aquecida a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, a mistura foi aquecida a 95°C por 10 minutos em termociclador (Eppendorff®) transferida para bloco de resfriamento (2°C a 8°C) durante 5 minutos, para obtenção do DNA.

O preparo da reação PCR constou de 19µL do tampão fosfato (DuPont™ PCR Reagent); 20 picomoles do *primer* C1 e C4 (Invitrogen®) e 40 picomoles de pg3 e pg50 (Invitrogen®) e 25µL do DNA, que foram transferidos para os tubos de PCR contendo dNTPs, a Taq-DNA polimerase e demais reagentes necessários para a PCR (DuPont™ PCR Reagent).

Os tubos foram transferidos para o termociclador (*Eppendorf®*) para amplificação, obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos; 25 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 47°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos (HARMON et al., 1997).

Os produtos amplificados (8µL) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Invitrogen®). Os géis de agarose (Afllymetrix®) foram corados pela solução de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e visualizados sob luz UV, no transluminador (Loccus Biotecnologia) após 90 minutos de corrida do gel à 100W de potência, 100V de voltagem e 100A de corrente elétrica.

Em paralelo à prova genotípica, foi realizada a confirmação fenotípica de *Campylobacter jejuni* por meio da prova da hidrólise do hipurato de sódio (SILVA et al., 2007). Uma alçada com inóculo pesado da cultura foi adicionada a 0,4 mL de solução de hipurato de sódio (Inlab®) e a mistura incubada a 37°C por 4 horas em estufa e depois adicionada de 0,2 mL de solução de ninidrina (Nuclear®). Após reincubação por 10 minutos foi realizada a leitura. *C. jejuni* é capaz de hidrolisar o hipurato.

3.8. Presença de transcritos de virulência

Para estas análises foi utilizada a técnica do RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*). A extração do RNA foi realizada conforme LI et al. (2008) em colônias isoladas e puras crescidas em agar CCDA e transferidas para microtubos contendo 2mL de solução NaCl 0,85% (Synth®). A mistura foi centrifugada a 12.000g por dez minutos a 4°C.

Ao *pellet* obtido foi adicionado 1mL de trizol (Invitrogen®) e homogeneizado em *vortex* até ocorrer sua dispersão na solução. Em seguida, foi adicionado 200µL de clorofórmio (Isofar®), e feita a homogeneização em *vortex* e centrifugação (Cientec®) a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A parte aquosa formada foi transferida para um novo microtubo, que foi adicionado de 500µL de isopropanol (Dinâmica®),

novamente homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Ao *pellet* formado foi adicionado 1mL de etanol 75% (Dinâmica®) e após homogeneização e centrifugação a 7.500g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado.

Os *pellets* de RNA foram secados a temperatura ambiente para serem diluídos em 20µL de água DEPC (Invitrogen®). Para a quantificação do RNA foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific®), em comprimento de onda de 230nm, observando sempre a relação 260/280 verificando a integridade do RNA (relação entre 1,8-2,0).

Para a transcrição reversa realizada para cada amostra, utilizou-se 1µg de RNA total (200ng/uL), 10 U de inibidor de RNase, 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP), 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos (Invitrogen®) e 20 µL com água DEPC (Invitrogen®).

A solução foi colocada em *ependorf* a 37°C por uma hora. Posteriormente 3 µL do cDNA foi utilizado para a reação de amplificação de 25µL, composto por: 0,625U de Taq DNA polimerase, 5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs e 4 picomoles de cada *primer* (Invitrogen®). O controle positivo, *C. jejuni* NCTC 11351 foi utilizado em todas as reações de amplificação e o controle negativo foi composto de água ultrapura estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA alvo.

Os genes avaliados neste estudo foram *ciaB*, que está relacionado ao poder de invasão da bactéria, *dnaJ*, que está ligado a capacidade de termotolerância, *p19*, que regula o transporte de ferro e *sodB*, que está associado a mecanismos de defesa ao estresse oxidativo. Para avaliação do transcriptoma destes genes foi utilizado o protocolo de LI et. al (2008)

A sequência dos primers (5' – 3') para determinar a transcrição de genes de virulência foi:

Primer ciaB (ATATTTGCTAGCAGCGAAGAG / ATGTCCCACTTGTAAGGTG) – 157pb

Primer dnaJ (AGTGTCGAGCTTAATATCCC / GGCGATGATCTTAACATACA) – 117pb

Primer p19 (GATGATGGTCCTCACTATGG / CATTTTGGCGTGCCTGTGTA) – 206pb

Primer sodB (TATCAAACTTCAAATGGGG / TTTTCTAAAGATCCAAATTCT) – 170pb

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

72°C por 3 minutos. A separação dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Affymetrix®), utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x 30 (Invitrogen®) e como padrão de massa molecular o marcador de 50pb (Invitrogen®). A visualização das bandas formadas foi possível através de transiluminador (Loccus Biotecnologia®).

3.9. Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Minitab®.

Inicialmente foi verificada a distribuição dos dados para determinar a normalidade dos mesmos. Após, os resultados das análises microbiológicas, físico-químicas e moleculares foram realizados por meio da estatística descritiva e pela comparação entre os resultados obtidos nas três repetições e duas cepas inoculadas para verificar diferenças significativas entre eles. O teste t pareado (por produção e dia) e não pareado foi utilizado para verificar diferenças entre as médias das análises físico-químicas entre as cepas considerando 95% de probabilidade.

O teste de Pearson foi utilizado para verificar correlação entre os diferentes parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados e a sobrevivência de *Campylobacter* nos queijos. A associação entre a cepa e a capacidade de produzir transcritos foi avaliada pelo teste do chi-quadrado (χ^2).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises microbiológicas e físico-químicas do leite

Os resultados das análises microbiológicas e físico-químicas (Tabela 1) mostraram que o leite utilizado para a fabricação dos queijos em todas as etapas atenderam os limites preconizados pela Instrução Normativa nº 62 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011). O padrão máximo permitido para coliformes totais e termotolerantes no leite é de 4,0 e 2,0 NMP.mL⁻¹, respectivamente, e o de bactérias heterotróficas mesófilas é de 8,0 x 10⁴ UFC.mL⁻¹.

Tabela 1. Análises microbiológicas e físico-química¹ realizadas nos leites pasteurizados utilizados para as fabricações dos queijos Minas Frescal antes da inoculação experimental com *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383.

Parâmetro avaliado	Cepa de <i>C. jejuni</i> inoculada					
	NCTC 11351			IAL 2383		
	Produção 1	Produção 2	Produção 3	Produção 1	Produção 2	Produção 3
Coliformes 35°C (NMP.mL ⁻¹)	0,36	1,1	1,5	0,92	2,0	1,5
Coliformes 45°C (NMP.mL ⁻¹)	0,36	0,74	1,1	0,74	1,5	0,74
Mesófilas (UFC.mL ⁻¹)	3,4 x 10 ³	2,6 x 10 ³	5,6 x 10 ³	4,7 x 10 ³	1,2 x 10 ⁴	4,1 x 10 ³
<i>Staphylococcus</i> (UFC.mL ⁻¹)	ausência	Ausência	ausência	ausência	ausência	ausência
<i>Campylobacter</i> spp. em 25mL	ausência	Ausência	ausência	ausência	ausência	ausência
Resíduos de betalactâmicos	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Resíduos de tetraciclina	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Enzima peroxidase	positiva	Positiva	positiva	positiva	positiva	positiva
Enzima fosfatase	negativa	Negativa	negativa	negativa	negativa	negativa

¹determinações em triplicata

Não foi observada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Campylobacter* spp. em nenhuma das amostras, indicando que o leite utilizado nas fabricações foi adequadamente beneficiado, manipulado e armazenado. A análise destes últimos micro-organismos não está prevista na legislação vigente, porém o fato de *Staphylococcus* coagulase positiva ser indicador de manipulação inadequada torna importante sua pesquisa. No caso de *Campylobacter jejuni* foi necessário comprovar sua ausência no leite, para garantir que as *C. jejuni* isoladas nos queijos foram provenientes exclusivamente do inóculo experimental e não vinculada à

contaminação prévia da matéria-prima.

Gorman e colaboradores (2002) afirmam que o processo de pasteurização deve garantir a inocuidade do leite utilizado na produção de queijo Minas Frescal nas indústrias. Este tratamento é suficiente para eliminar micro-organismos patogênicos, tais como *C. jejuni*, além de diminuir o número de bactérias saprófitas a níveis aceitáveis pela legislação.

Porém, na literatura há relatos de contaminação por *Campylobacter* posterior ao beneficiamento do leite, devido à manipulação e armazenamento inadequados ou por meio de contaminação cruzada (CDC, 2012). Tanto o ambiente doméstico quanto o industrial, oferecem diferentes oportunidades para a contaminação cruzada dos alimentos e podem contribuir para o aumento de doenças transmitidas por alimentos (MADALOZZO et. al, 2007).

As enzimas fosfatase e peroxidase são usualmente utilizadas para a comprovação da aplicação correta do processo de pasteurização e seus resultados devem ser respectivamente, negativa e positiva (BRASIL, 2011). Os resultados obtidos neste estudo foram compatíveis com o esperado em todas as fabricações. Estes resultados aliados aos obtidos nas análises microbiológicas permitem afirmar que o processo de pasteurização foi adequado.

O leite utilizado em todas as fabricações apresentava-se livre de resíduos de antibióticos betalactâmicos e do grupo das tetraciclinas, garantindo que os micro-organismos experimentalmente inoculados não sofreram injúria ou inibição devido à presença de resíduos de antibióticos.

A contagem média de *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383 no leite após a inoculação experimental foi de $3,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, não havendo diferença significativa entre as contagens nas diferentes fabricações. Os micro-organismos inoculados também foram detectados no soro obtido durante a fabricação dos queijos. As contagens no soro variaram de 10^3 UFC.mL⁻¹ a 10^4 UFC.mL⁻¹, demonstrando que o micro-organismo permaneceu viável durante o processamento.

A presença de *C. jejuni* no soro demonstra que caso o queijo seja produzido com leite contaminado, este pode se tornar uma fonte de contaminação das instalações. A contagem dos micro-organismos no soro, em comparação com o número inicialmente detectado no leite, mostra que a redução neste subproduto foi de somente 1 ou 2 ciclos log, dependendo da fabricação (dados não mostrados). O

soro pode também contaminar de forma cruzada outros produtos lácteos dentro da planta, dependendo do fluxograma de produção e da distribuição dos locais de produção dos diferentes subprodutos dentro do laticínio.

4.2. Análises microbiológicas e viabilidade de *C. jejuni* em queijos Minas Frescal

Houve um decréscimo significativo ($P < 0,001$) no número de *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383 ao longo do armazenamento refrigerado por 10 dias em todas as amostras analisadas (Tabela 2). A partir de sete dias de armazenamento, o micro-organismo não foi mais recuperado dos queijos em sua forma viável e cultivável.

Tabela 2. *Campylobacter jejuni* (UFC.g⁻¹) recuperados de queijos Minas Frescal fabricados com leite experimentalmente contaminado¹ após armazenamento a 4°C por 10 dias

Cepa de <i>C. jejuni</i> inoculada ¹						
Produção	1		2		3	
Armazenamento (Dias)	NCTC 11351	IAL 2383	NCTC 11351	IAL 2383	NCTC 11351	IAL 2383
1	>2,1 × 10 ⁵	>2,1 × 10 ⁵	>3,0 × 10 ⁵	>2,1 × 10 ⁵	>2,1 × 10 ⁵	>3,0 × 10 ⁵
4	>1,2 × 10 ³	>1,2 × 10 ³	>3,0 × 10 ²	>1,2 × 10 ³	>3,0 × 10 ²	>1,2 × 10 ³
7	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}
10	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}	<1,0 × 10 ^{1*}

¹ 10⁵ UFC.mL⁻¹ de *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383 no leite. Média de três amostras em triplicata.

* Limite de detecção do teste.

A comparação entre o número de células recuperadas dos queijos de cada uma das cepas estudadas não apresentou diferença. Isto indica que as condições de injúria que determinaram a diminuição de células viáveis no armazenamento não foi cepa dependente.

Do total de queijos analisados nos quatro períodos de armazenamento refrigerado, três repetições (fabricações) e três amostras distintas por cada período e duas cepas, 36/72 (50,0%) das amostras apresentou crescimento de *C. jejuni*. O número de amostras em que o micro-organismo foi recuperado foi idêntico para

ambas as cepas.

SILVA (2008) coletou no comércio de Bocaiúva (MG), dezoito queijos Minas Frescal fabricados artesanalmente (leite cru) no comércio local e os avaliou quanto à presença de *Campylobacter* spp., e obteve positividade em 80% das amostras analisadas, resultado mais elevado ao encontrado neste estudo. O maior índice deve-se possivelmente ao fato destes queijos terem sido fabricados com leite cru. No presente estudo, apesar de ter sido utilizado leite pasteurizado, o mesmo foi contaminado experimentalmente com *C. jejuni*, e ainda assim, o número de isolados foi menor.

Fazendo um paralelo entre esta pesquisa e a de Silva (2008), era esperado que o índice de positividade desta fosse semelhante ou superior aos 80% encontrados pela autora. O leite pasteurizado tem sua carga microbiana natural diminuída em relação ao leite cru, e isso representaria menor exclusão por competitividade com a *C. jejuni* inoculada. Porém, não foi este o resultado observado. Deve-se ressaltar, entretanto, que Silva (2008) não especificou o tempo decorrido entre a fabricação e a análise, o que pode explicar o maior percentual de isolamento naquele estudo.

SALOTTI (2006) também realizou estudo da qualidade microbiológica de 60 queijos Minas Frescal na cidade de Jaboticabal (SP), sendo 30 de produção artesanal (leite cru) e 30 industriais (leite pasteurizado). Apesar de o autor ter obtidos resultados acima dos permitidos para coliformes em ambos os tipos de fabricação, 80% e 60%, para queijos artesanais e industriais, respectivamente, não houve isolamento de *Campylobacter* spp. em nenhuma das amostras.

O número de colônias de *C. jejuni* nos dois tratamentos (cepas inoculadas) e recuperados das amostras de queijo em todos os períodos de armazenamento refrigerado, incluindo o primeiro dia, foi estimado em todas as amostras. A estimativa do número de células viáveis foi realizada pelo crescimento de colônias na maior diluição usada.

A determinação exata do número de UFC.g⁻¹ não foi possível, pois não foram visualizadas colônias individualizadas, sendo o crescimento caracterizado por uma massa confluenta na placa contendo o meio de cultura seletivo. A dificuldade de quantificação de *Campylobacter* em condições de injúria também foi relatada por Moura (2013). A autora testou métodos alternativos para manutenção de cepas de

Campylobacter congeladas em laboratório em diferentes crioprotetores e também observou após o armazenamento que as cepas recuperadas nos meios de cultura tinham uma aparência de filme, não sendo observadas colônias isoladas.

Neste estudo, além da não visualização de colônias individualizadas, quando foi realizada a confirmação do gênero, foi observado nas amostras recuperadas desde o primeiro dia de armazenamento, dois tipos de morfológicos distintos nas lâminas: bacilos curvos, característicos do gênero e cocos, característica observada em espécimes do gênero em situação de injúria. O número de cocos nas lâminas foi se acentuando de acordo com o tempo de armazenamento.

O polimorfismo e a degeneração para formas viáveis, mas não cultiváveis é descrita eventualmente para várias espécies bacterianas patogênicas que contaminam alimentos, como salmonelas, como exemplo (BAFFONE et al., 2003). Porém, é considerada como relativamente comum para espécies de *Campylobacter*, e considerada para estes micro-organismos, como uma forma de adaptação e sobrevivência em condições adversas (ROWE et. al, 1998; BHAVSAR & KAPADNIS, 2007; DEYBRUYNE et. al, 2008).

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

Debruyne e colaboradores (2008) relataram que as bactérias do gênero *Campylobacter* são capazes de mudar sua conformação celular, alterando sua forma típica espiralada para cocos. Essa mudança na morfologia das bactérias, de acordo com Rowe e colaboradores (1998) é induzida pelo estresse causado pela escassez de nutrientes no meio, dentre outros fatores que levam a injúria, o que representa uma estratégia de sobrevivência desse agente.

A presença das formas degenerativas em cocos foi mais freqüente na cepa *C. jejuni* NCTC 11351 em relação à cepa IAL 2383, sugerindo uma possível maior susceptibilidade da estirpe NCTC. Também houve uma maior presença destas formas cocóides a partir do quarto dia pós-fabricação dos queijos em relação ao primeiro dia de análise para ambas as cepas.

O tempo de armazenamento influenciou tanto no número de células viáveis

recuperadas dos queijos quanto no aumento da presença das formas degenerativas. É provável que as condições que causam estresse e injúria se acumulem ao longo do tempo de armazenamento, incluindo as alterações no pH, metabólitos de outros micro-organismos, compostos resultantes da ação microbiana nas proteínas e outros nutrientes presentes, assim como, a permanência prolongada em temperatura não adequada ao crescimento e manutenção do micro-organismo.

Aos sete e dez dias de armazenamento o micro-organismo não foi mais detectado na sua forma viável e cultivável nos queijos. Possivelmente, devido ao aumento nas condições adversas neste microambiente como a acidificação e a exclusão competitiva com bioindicadores, aliados à baixa temperatura.

Staphylococcus coagulase positiva não foi determinada nos queijos, mas coliformes totais e termotolerantes foram determinados em todos os períodos analisados (Tabela 3). A ausência de crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva nos queijos indica que não houve contaminação durante a fabricação por uso de equipamentos e instrumentos contaminados ou via manipulador.

Apesar da presença de coliformes, as contagens observadas estavam dentro dos limites preconizados na Portaria número 146 de 1996 (BRASIL, 1996). Contagens de coliformes totais e termotolerantes eram esperadas nos queijos, pois estes grupos de micro-organismos foram detectados nos leites utilizados em todas as produções, apesar de em números dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2011).

As maiores contagens de coliformes totais foram observadas nos queijos da segunda fabricação e as de coliformes termotolerantes na primeira fabricação. Também foi observada uma tendência de aumento nos número de coliformes durante o período de armazenamento refrigerado.

Tabela 3. Contagens médias¹ de coliformes em queijos Minas Frescal fabricados com leite experimentalmente contaminado com *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383 e armazenados por até 10 dias a 4°C

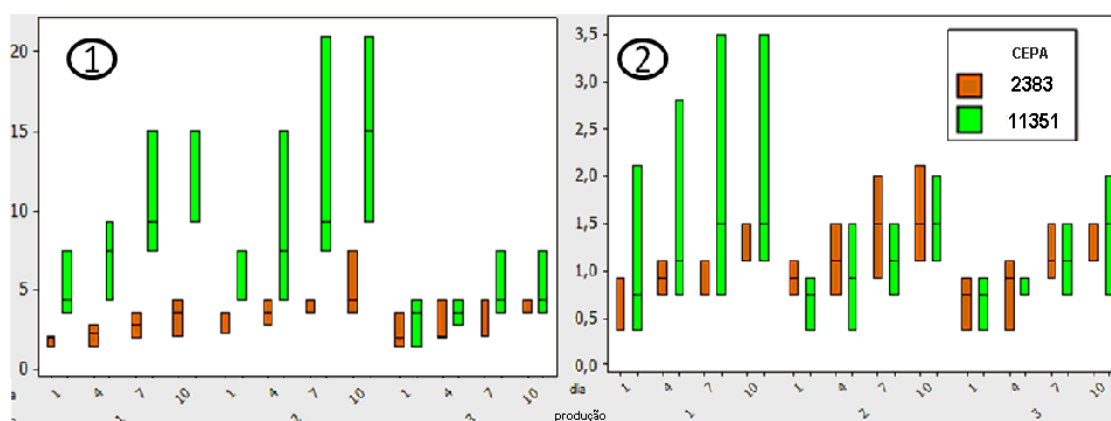
		NMP.g ⁻¹					
Produção		1		2		3	
Armazenamento (dias) / Micro- organismo		NCTC 11351	IAL 2383	NCTC 11351	IAL 2383	NCTC 11351	IAL 2383
1	Coliformes totais	5,1 (±) 2,12	1,9(±) 0,32	5,4 (±) 1,85	3,1 (±) 0,70	3,1 (±) 1,44	2,3 (±) 1,04
	Coliformes termotolerantes	1,1 (±) 0,92	0,7 (±) 0,32	0,7 (±) 0,29	0,9 (±) 0,20	0,7 (±) 0,30	0,7 (±) 0,30
4	Coliformes totais	7,0 (±) 2,53	2,2 (±) 0,70	8,9 (±) 5,50	3,5 (±) 0,75	3,5 (±) 0,75	2,8 (±) 1,30
	Coliformes termotolerantes	1,5 (±) 1,10	0,9 (±) 0,20	0,9 (±) 0,60	1,1 (±) 0,40	0,9 (±) 0,10	0,8 (±) 0,40
7	Coliformes totais	10,6 (±) 3,92	2,8 (±) 0,75	12,6 (±) 7,33	4,0 (±) 0,50	5,1 (±) 2,12	2,8 (±) 1,30
	Coliformes termotolerantes	1,9 (±) 1,43	1,0 (±) 0,21	1,1 (±) 0,40	1,5 (±) 0,54	1,1 (±) 0,40	1,2 (±) 0,30
10	Coliformes totais	11,2 (±) 3,30	3,3 (±) 1,11	15,1 (±) 5,85	5,1 (±) 2,12	5,1 (±) 2,12	3,8 (±) 0,50
	Coliformes termotolerantes	2,0 (±) 1,29	1,4 (±) 0,23	1,5 (±) 0,45	1,6 (±) 0,50	1,4 (±) 0,63	1,4 (±) 0,23

¹ média e desvio padrão das análises de três queijos em triplicata.

A representação gráfica da análise estatística descritiva para os números de coliformes totais e termotolerantes nos queijos em relação ao tempo de armazenamento e diferentes fabricações pode ser visualizada na Figura 2.

Segundo Franco e Landgraf (1996), *C. jejuni* pode estar presente nos alimentos em número reduzido após terem sido submetidos a condições adversas. A presença de coliformes nos queijos pode ser uma das condições de estresse ao qual *Campylobacter* foi submetida, e pode ter contribuído para a diminuição da sua viabilidade. Coliformes são bactérias altamente adaptadas à matriz láctea e entre os produtos resultantes da sua ação fermentativa destaca-se a produção de ácido láctico (AXELSSON, 2009). O ácido láctico é capaz de inibir a multiplicação de um grande número de patógenos.

Outro fator que pode ter influenciado na menor sobrevivência de *Campylobacter* são os mecanismos de exclusão competitiva, já que coliformes são reconhecidamente bons competidores quando presentes em alimentos. *Campylobacter* é considerado frágil e um mal competidor (MURAOKA & ZHANG, 2011).



1-Coliformes totais (NMP.g⁻¹); 2- Coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹); 1,2,3 – Produções: 1,4,7,10 – dias de armazenamento refrigerado.

Figura 2. Coliformes totais e termotolerantes em queijos Minas Frescal experimentalmente inoculados com duas cepas de *C. jejuni* e analisado por até 10 dias.

O fato de *Campylobacter* ser considerado um mal competidor, concorda com SALOTTI (2006) que não encontrou o micro-organismo em 60 amostras de queijo Minas que apresentavam em sua maioria contagens de coliformes maiores que as permitidas.

Apesar destas especulações, outros fatores parecem ser determinantes na viabilidade de *Campylobacter* em queijo Minas Frescal, já que SILVA (2008) verificou a presença de *Campylobacter* em 80% das amostras desse queijo produzidas com leite cru. Porém, a autora não analisou em sua pesquisa a presença de bioindicadores, dificultando estabelecer uma correlação mais precisa entre os estudos.

4.3. Análises físico-químicas dos queijos e viabilidade de *C. jejuni* em queijos Minas Frescal

Outros fatores que podem significar situação de injúria e influenciar na sobrevivência de *Campylobacter* em queijo Minas Frescal são as alterações físico-químicas que a matriz do queijo sofre durante o período de armazenamento.

Os resultados das análises físico-químicas realizadas estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Análises físico-químicas¹ de queijos Minas Frescal fabricados com leite experimentalmente contaminado com *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383, armazenados por até 10 dias a 4°C.

Produção		1		2		3	
Armazenamento (Dias) / Micro-organismo analisado		NCTC 11351	IAL 2383	NCTC 11351	IAL 2383	NCTC 11351	IAL 2383
1	pH	6,73(±)0,07	6,77(±)0,06	6,52(±)0,05	6,71(±)0,03	6,67(±)0,10	6,70(±)0,03
	Acidez	0,27(±)0,00	0,30(±)0,05	0,30(±)0,05	0,30(±)0,05	0,33(±)0,05	0,36(±)0,00
	Umidade	66,86(±)1,7	65,20(±)0,8	65,40(±)1,15	66,92(±)0,09	66,70(±)0,62	65,66(±)0,4
	Cloreto	0,68(±)0,01	0,74(±)0,04	0,67(±)0,04	0,78(±)0,01	0,69(±)0,03	0,76(±)0,02
4	pH	6,61(±)0,07	6,60(±)0,08	6,39(±)0,04	6,62(±)0,05	6,53 (±)0,08	6,59(±)0,04
	Acidez	0,42(±)0,05	0,48(±)0,05	0,42(±)0,05	0,42 (±)0,05	0,45(±)0,09	0,51(±)0,05
	Umidade	66,10(±)1,7	63,84(±)0,5	63,80(±)0,9	65,19(±)0,06	64,87(±)0,28	64,00(±)0,21
	Cloreto	0,66(±)0,01	0,78(±)0,05	0,70(±)0,04	0,78(±)0,02	0,70(±)0,04	0,76(±)0,03
7	pH	6,49(±)0,07	6,46(±)0,08	6,25(±)0,04	6,43(±)0,04	6,37(±)0,08	6,45(±)0,04
	Acidez	0,57(±)0,05	0,57(±)0,05	0,57(±)0,05	0,60(±)0,05	0,60(±)0,05	0,63(±)0,09
	Umidade	65,24(±)2,0	62,50(±)0,5	61,81(±)0,7	63,87(±)0,14	62,17(±)0,25	62,59(±)0,50
	Cloreto	0,64(±)0,02	0,74(±)0,04	0,70(±)0,01	0,78(±)0,01	0,70(±)0,02	0,78(±)0,0
10	pH	6,30(±)0,02	6,32(±)0,09	6,17(±)0,03	6,28(±)0,07	6,24(±)0,07	6,33(±)0,02
	Acidez	0,66(±)0,05	0,66(±)0,05	0,69(±)0,05	0,69(±)0,05	0,69(±)0,05	0,75(±)0,05
	Umidade	63,82(±)2,2	61,55(±)0,5	60,89(±)0,21	63,98(±)2,8	61,06 (±)0,6	61,12(±)0,12
	Cloreto	0,66(±)0,03	0,74(±)0,01	0,70(±)0,01	0,78(±)0,04	0,70(±)0,01	0,73(±)0,02

¹ média da análise de três queijos em triplicata.

A umidade foi a única das análises realizadas que é exigida pela legislação e apresentou resultados conformes em todas as amostras, que é de no mínimo 55% (BRASIL, 1996).

Os queijos fabricados com leite inoculado com *C. jejuni* NCTC 11351 apresentaram umidade média de $64,06 \pm 2,32$ e os inoculados com a cepa IAL 2383, $63,87 \pm 1,83$. Apesar de não haver diferença entre os teores de umidade quando se compara os queijos fabricados com as duas cepas pode-se observar uma redução gradual nos teores de umidade dos mesmos e isso resultou em uma correlação moderada e estatisticamente relevante entre a umidade e a sobrevivência de ambas

as cepas (Figura 3).

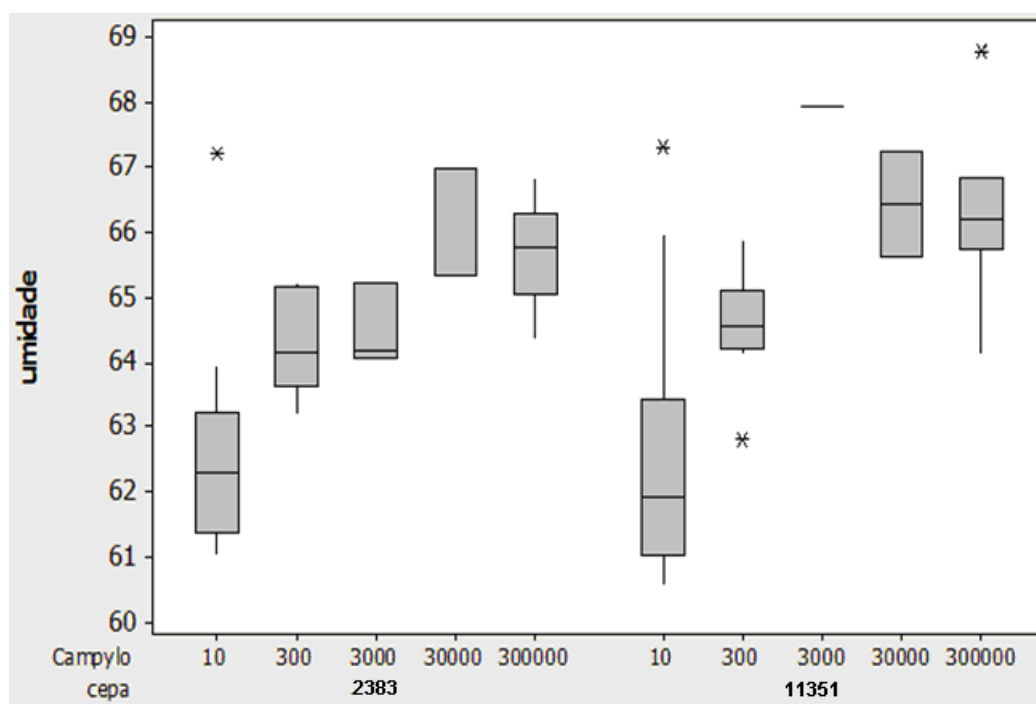


Figura 3. Representação gráfica da correlação entre umidade e sobrevivência de *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383 em queijos Minas Frescal ($P < 0,05$).

Queijos de muito alta umidade como o Minas Frescal tendem a perder umidade na forma de soro durante o armazenamento (ALVES, 2004). Isso pode ter contribuído para a concentração de substâncias tóxicas para *Campylobacter*, assim como, diminuído a atividade de água nos queijos.

Os valores médios de pH dos queijos considerando as três fabricações, nos queijos inoculados com as cepas de *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383 foram de $6,44 \pm 0,18$ e $6,52 \pm 0,17$, respectivamente. Os valores de pH dos queijos inoculados com a cepa NCTC 11351 foi menor que os queijos fabricados com a cepa IAL 2383 ($P = 0,049$).

A análise estatística dos dados demonstrou que há uma correlação moderada e estatisticamente relevante ($P < 0,05$) entre o pH e a sobrevivência de ambas as cepas inoculadas. A representação gráfica desta afirmativa pode ser visualizada na Figura 4.

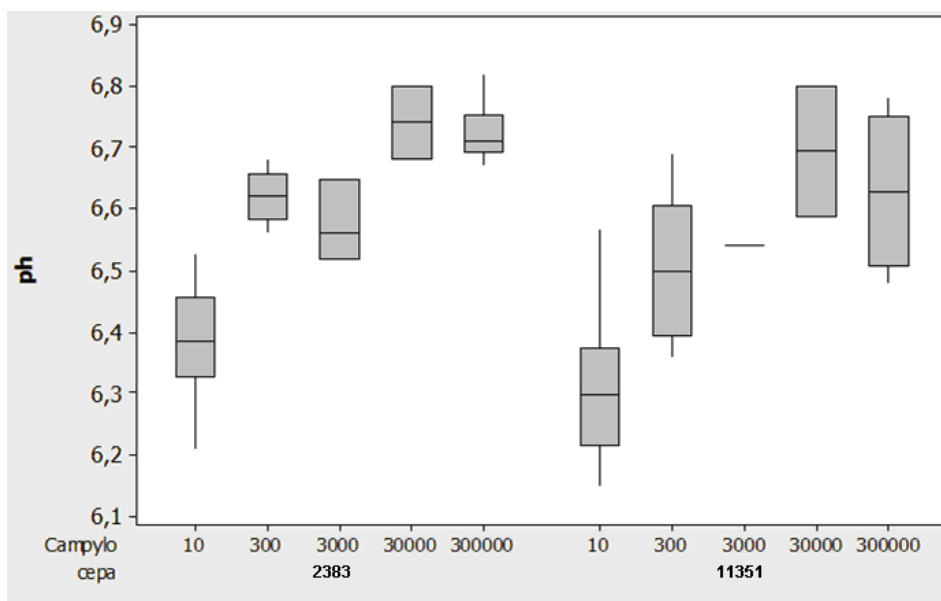


Figura 4. Representação gráfica da correlação entre pH e sobrevivência de *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383 em queijos Minas Frescal ($P < 0,05$).

Segundo Hazeleger (1994) e Hofemann (2001), a faixa de pH para o crescimento de *Campylobacter jejuni* se encontra entre 4,9 e 9,0, com ótimo entre 6,5 e 7,5. Apesar de todos os resultados obtidos nesta pesquisa estarem dentro deste intervalo, as variações observadas interferiram no crescimento, provavelmente, por se somarem a outros fatores estressantes como metabólitos bacterianos e baixa temperatura.

A determinação média para a acidez expressa em ácido láctico nos queijos foi de $0,50 \pm 0,15$ e $0,52 \pm 0,16$, respectivamente, para os queijos inoculados com *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383. Não houve diferença significativa entre os resultados quando se comparou os índices dos queijos inoculados com as duas cepas, mas pode-se verificar que os teores de ácido láctico aumentaram com o período de armazenamento (Tabela 4).

As características de aumento da acidez e diminuição do pH durante o armazenamento foram, provavelmente, devido à fermentação da lactose por bactérias lácticas e também pelos coliformes.

Houve correlação moderada e estatisticamente relevante entre os índices de acidez dos queijos e a viabilidade das cepas ($P < 0,05$). A representação gráfica da correlação entre esta variável e a viabilidade das cepas está demonstrada na Figura 5a e os teores de sódio nas diferentes produções e períodos analisados podem ser visualizados na Figura 5b.

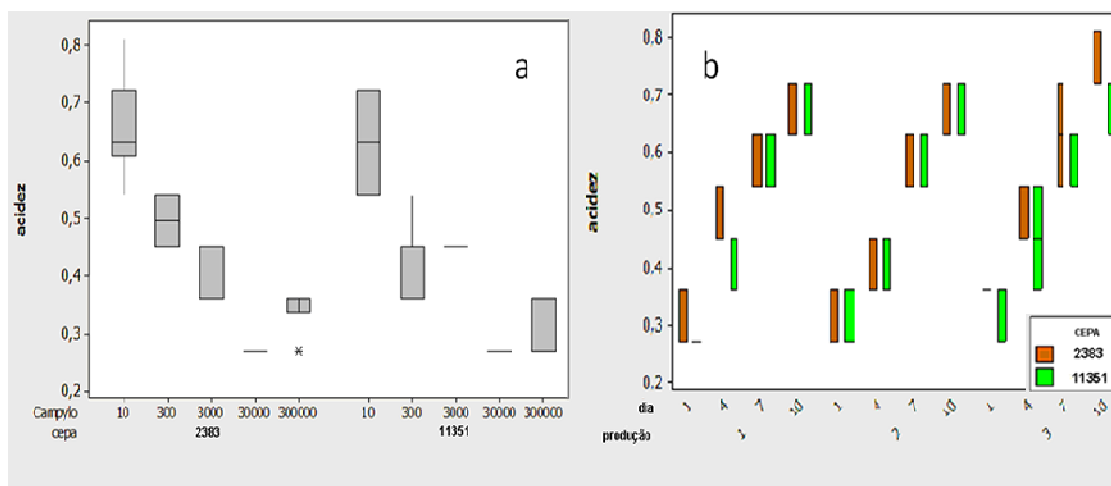


Figura 5. Representação gráfica dos resultados de acidez; a) correlação entre acidez e sobrevivência de *C. jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383 em queijos Minas Frescal ($P < 0,05$); b) valores de acidez por cepa em três produções e quatro períodos de armazenamento.

O teor médio de cloretos foi menor nos queijos contaminados com a cepa de *C. jejuni* NCTC 11351 em relação aos queijos contaminados com a cepa IAL 2383. O teor médio foi de $0,68 \pm 0,29$ nos queijos com *C. jejuni* NCTC 11351 e $0,76 \pm 0,032$ nos queijos contaminados com a cepa IAL 2383. Porém, não houve correlação estatisticamente relevante ($P > 0,05$) entre este índice e a viabilidade das cepas.

A evolução dos índices de cloreto, por produção, cepa e período de armazenamento pode ser observada na Tabela 4 e Figura 6.

Não houve correlação ($P > 0,05$) entre os teores de cloreto de sódio nos queijos e a viabilidade de *Campylobacter*. Este resultado era esperado, já que em todos os queijos analisados, os índices de cloreto foram menores que os considerados inibitórios para o gênero *Campylobacter*, que é de até 2% (PARK, 2002).

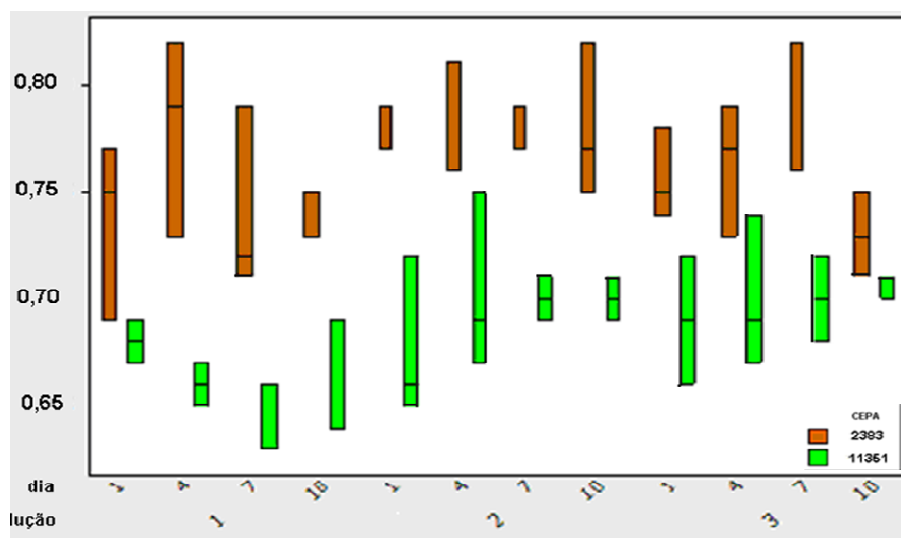


Figura 6. Valores de cloreto de sódio em queijo Minas Frescal em três produções e quatro períodos de armazenamento, discriminado por cepa de *C. jejuni* inoculada.

O queijo Minas Frescal pode oferecer condições de sobrevivência para *Campylobacter*, uma vez que essa matriz alimentar apresenta alto teor de umidade, faixa de pH e teor de cloreto de sódio em níveis suportáveis. Porém, nos queijos produzidos com leite inoculado com as duas cepas, *Campylobacter* só permaneceu viável e cultivável até quatro dias após a fabricação. Além disso, houve decréscimo nos números do micro-organismo em comparação com o primeiro dia de análise, mostrando que não houve multiplicação dos micro-organismos.

É provável que o conjunto de fatores extrínsecos de temperatura, pH, presença de cloretos e bioindicadores, mesmo em níveis considerados suportáveis de forma isolada, quando inter-relacionados sejam limitantes, impedindo a multiplicação e diminuindo de forma gradativa o número de células.

A influência do tempo de armazenamento, que diminui o número e a viabilidade de *Campylobacter*, possui importância para a saúde pública. Particularmente, quando o risco é avaliado para produtos específicos como o queijo Minas Frescal, deve-se levar em conta também os hábitos dos consumidores. Mesmo que o micro-organismo se mantenha viável por curtos períodos, como a preferência do consumidor é por produtos mais frescos, produzidos próximos ao consumo, caso contaminado, haverá mais risco de que cause infecção alimentar.

Também deve-se considerar no risco, que é comum que representantes do gênero *Campylobacter* em condições de estresse ou injúria, degenerem para formas não cultiváveis, que são porém, muitas vezes, viáveis e infectantes

(CHAI SOWWONG et al., 2012). Isso faz com que, mesmo não sendo possível o isolamento do agente nos queijos, não seja possível afirmar que as formas degeneradas não permanecem infectantes e representem riscos. Além disso, ao contrário de outras enterobactérias, *Campylobacter* possui baixa dose infectante, em torno de 500 células (BUTZLER, 2004).

Apesar da legislação brasileira ainda não contemplar a pesquisa de *Campylobacter* spp., o gênero é atualmente o agente mais prevalente da enterite humana na Europa e nos Estados Unidos (HIRSH, 2003; MOORE et al., 2005; EFSA, 2011).

4.4. Produção de Transcritos

Ambas as cepas analisadas, em primeiro repique após a aquisição, imediatamente após a recuperação em meios de cultura, foram capazes de produzir todos os genes estudados.

Não foi possível verificar a produção de transcritos nas cepas recuperadas de todos os queijos já que para a realização da técnica de RT-PCR é necessário um grande número de células, cerca de quatro placas de Petri cheias (MELO, 2013). Após o repique dos isolados recuperados, algumas não apresentaram crescimento suficiente. O mesmo ocorreu no estudo de Moura (2013), que também trabalhou com as mesmas cepas utilizadas neste estudo.

Do total dos 18 isolados de *C. jejuni* NCTC 11351 recuperados dos queijos Minas Frescal, apenas 9/18 (50%) se mantiveram viáveis ou tiveram crescimento em números de células suficientes para serem avaliados para a produção de transcritos. Já para a cepa *C. jejuni* IAL 2383, 14/18 (77,8%) apresentaram crescimento e foram avaliadas. A cepa NCTC se mostrou mais sensível à injúria que a cepa IAL, mas a diferença não foi significativa ($P>0,05$).

Dentre estirpes da cepa NCTC que não foram recuperadas, 2/9 (22,2%) foram isoladas de queijos com um dia de armazenamento e 7/9 (77,8%) foram isolados de queijos armazenados por quatro dias. O número de isolados da cepa IAL que não apresentaram crescimento após o isolamento foi de 1/4 (25%) e 3/4 (75%) espécimes, provenientes de queijos armazenados por um e quatro dias, respectivamente.

Também a produção de transcritos foi observada com maior frequência em isolados de queijos armazenados por um dia quando comparada aos isolados de queijos armazenados por quatro dias, para os quatro genes estudados e para ambas as cepas. Provavelmente, o tempo no qual o micro-organismo permanece em situação de injúria influencia na sua capacidade de transcrever alguns genes aos quais eram capazes em situações favoráveis de temperatura, atmosfera e nutrição.

O gene *ciaB* codifica uma proteína envolvida na invasão celular (RIVERA-AMILL et al., 2001) e é considerado como um dos genes de referencia no estudo dos mecanismos de patogenicidade de *Campylobacter* (HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006). A Tabela 5 mostra o número de isolados de *Campylobacter* recuperados dos queijos e os que foram capazes de produzir transcritos para o gene *ciaB*.

Tabela 5. Produção de transcritos para o gene *ciaB* por *Campylobacter* isolados de queijos Minas Frescal, por período de armazenamento e produção.

		Cepa de <i>C. jejuni</i> inoculada no leite			
		NCTC 11351		IAL 2383	
Amostras		Dia 1	Dia 4	Dia 1	Dia 4
P1	1	+	-	+	+
	2	+		+	+
	3	+	+	+	+
P2	1	+		+	-
	2			+	-
	3	-			
P3	1	-		+	-
	2			+	
	3	-		+	
TOTAL (+/n)		4/7	½	8/8	3/6

(+/n) = no. de isolados capazes de produzir transcritos /no. total de isolados recuperados em cada período de armazenamento. P1, P2 e P3: produções 1, 2 e 3.

Os resultados da Tabela 5 sugerem que a produção de transcritos para o gene *ciaB* em situação de injúria é cepa-dependente, e provavelmente, esta característica interfere na capacidade de causar doença, ou sua gravidade, quando a infecção ocorre via o consumo de queijo Minas Frescal. Enquanto a cepa *C. jejuni* IAL 2383 manteve em 8/8 e 3/6 dos isolados recuperados a capacidade de transcrição do gene *ciaB*, após um e quatro dias de armazenamento, entre isolados da cepa NCTC 11351, somente 4/7 e 1/2 apresentaram a mesma característica. Vários estudos demonstram que a capacidade de expressão de características de virulência como adesão, invasão e produção de toxinas em *C. jejuni* é cepa-

dependente (VAN VLIET; KETLEY, 2001; FERNANDEZ; GARCÍA; VILLANUEVA, 2005).

RIVERA-AMILL et al. (2001) afirmaram que a expressão dos genes que codificam as proteínas *ciaB* está sujeita à regulação ambiental, tal como observado em cultura em células eucarióticas, as quais possuem componentes que induzem essa transcrição.

A produção de transcritos para o gene *dnaJ* pelos isolados recuperados dos genes está demonstrada na Tabela 6 e nas Figuras 7a e 7b. Este gene está associado à termotolerância e também foi percentualmente mais elevado no primeiro dia de análise para ambas as cepas, totalizando em 77,8% (7/9) para NCTC 11351 e 85,7% (12/14) para IAL 2383.

Tabela 6. Produção de transcritos para o gene *dnaJ* por *Campylobacter* isolados de queijos Minas Frescal, por período de armazenamento e produção

Cepa de <i>C. jejuni</i> inoculada no leite					
Amostras		NCTC 11351		IAL 2383	
		Dia 1	Dia 4	Dia 1	Dia 4
P1	1	+	-	+	+
	2	+		+	+
	3	+	+	+	+
P2	1	+		+	-
	2			+	-
	3	-			
P3	1	+		+	+
	2			+	
	3	+		+	
TOTAL (+/n)		6/7	1/2	8/8	4/6

(+/n) = no. de isolados capazes de produzir transcritos /no. total de isolados recuperados em cada período de armazenamento. P1, P2 e P3: produções 1, 2 e 3.

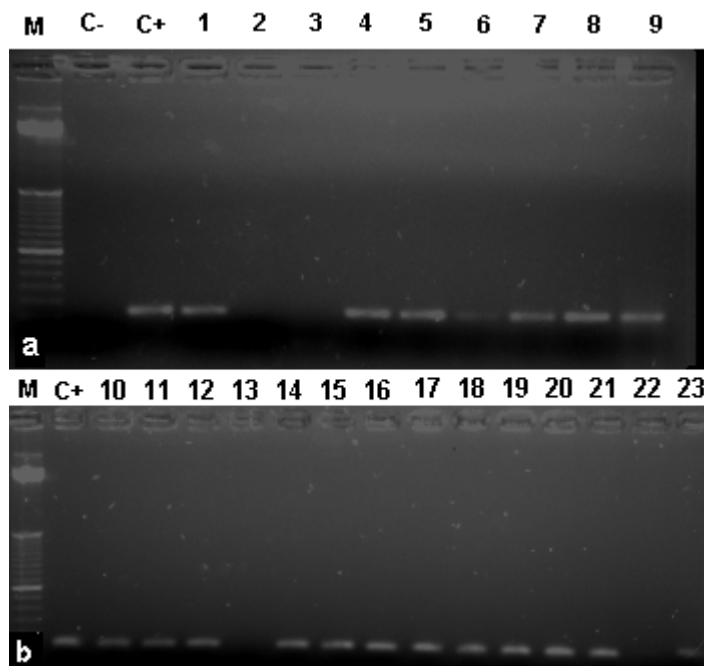


Figura 7. a) o gel de PCR demonstra M (marcador de peso molecular de 50pb); C- (Controle Negativo, composto por água ultrapura em substituição ao DNA alvo); C+ (Controle Positivo: *C. jejuni* NCTC 11351); 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 amostras de *C. jejuni* NCTC 11351 isoladas dos queijos Minas Frescal que transcreveram o gene *dnaJ* e 2 e 3 isoladas que não transcreveram. b) 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 23 são *C. jejuni* IAL 2383 isoladas positivas para transcrição de *dnaJ* e 13 e 22 negativas.

A capacidade de produzir transcritos para o gene *dnaJ* pelos isolados recuperados dos queijos produzidos com as duas cepas foi similar ao observado para a capacidade de produzir transcritos do gene *ciaB*. Os transcritos deste gene são associados à tolerância ao aumento da temperatura no microambiente, situação de injúria a qual os micro-organismos não foram submetidos neste estudo, já que a tecnologia de fabricação do queijo Minas Frescal não inclui o aquecimento da massa a temperatura maior que 36°C (ROSSI, 1997). Assim, é possível que este gene também possa regular a adaptação do micro-organismo ao frio, que foi a situação de injúria a qual as cepas foram submetidas durante o armazenamento.

KONKEL et al. (1998) e REID et al. (2008) ao analisarem proteínas de choque térmico, tais como *clpP* e *dnaJ*, constataram que sua síntese varia com a temperatura de forma que um aumento súbito na temperatura aumenta consideravelmente sua síntese. Já durante o estresse submetido pelo choque frio, os genes de tradução de proteínas de choque térmico reprimem sua expressão (BEALES, 2004).

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,

WHITWORTH 2003). A resposta ao choque térmico está associada ao desempenho na colonização do trato intestinal e à sobrevivência bacteriana a altas temperaturas (KONKEL et al., 1998).

A capacidade de produzir transcritos para o gene *p19* pelos isolados recuperados dos queijos durante o armazenamento estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7. Produção de transcritos para o gene *p19* por *Campylobacter* isolados de queijos Minas Frescal, por período de armazenamento e produção

		Cepa de <i>C. jejuni</i> inoculada no leite			
Amostras		NCTC 11351		IAL 2383	
		Dia 1	Dia 4	Dia 1	Dia 4
P1	1	+	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
P2	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
P3	1	-	-	-	-
	2	-	-	+	-
	3	-	-	+	-
TOTAL (+/n)		1/7	0/2	2/8	0/6

(+/n) = no. de isolados capazes de produzir transcritos /no. total de isolados recuperados em cada período de armazenamento. P1, P2 e P3: produções 1, 2 e 3.

O gene *p19* codifica uma proteína periplasmática ferro-dependente cuja função é o transporte de ferro (PALYADA, 2004), que é um componente com baixa biodisponibilidade no interior do hospedeiro mamífero em relação ao ambiente externo (LITWIN & CALDERWOCK, 1993). O gene *p19* e a regulação desta proteína são formas de *Campylobacter* controlar o nível de ferro intracelular durante o estresse (BIRK, 2012). Alguns autores consideram que os produtos do gene *p19* sejam um sinal chave para os agentes patogênicos, tais como *Campylobacter*, “sentir” que invadiu o hospedeiro e começar a expressar determinantes de virulência (LITWIN & CALDERWOCK, 1993; OTTO et al., 1994; VASIL & OCHSNER, 1999).

Os isolados recuperados dos queijos mostraram baixa capacidade de produzir transcritos do gene *p19* (3/23) e os transcritos só foram observados no primeiro dia de armazenamento refrigerado. O leite e o queijo são alimentos com baixos níveis de ferro (TORREJON et al., 2004). É possível, que em condições de injúria e na falta do componente (sinalização biológica), os micro-organismos tenham utilizado seu aparato genético para a produção de outras enzimas ou substâncias mais importantes no momento para a sua sobrevivência.

A produção de transcritos do gene *sodB* pelas estirpes de *Campylobacter* recuperadas dos queijos estão na Tabela 8.

Tabela 8. Produção de transcritos para o gene *sodB* por *Campylobacter* isolados de queijos Minas Frescal, por período de armazenamento e produção

Cepa de <i>C. jejuni</i> inoculada no leite					
Amostras		NCTC 11351		IAL 2383	
		Dia 1	Dia 4	Dia 1	Dia 4
P1	1	+	-	-	-
	2	-		+	-
	3	-	-	-	-
P2	1	-		-	-
	2			-	-
	3	-			
P3	1	-		-	-
	2			+	
	3	-		+	
TOTAL (+/n)		1/7	0/2	3/8	0/6

(+/n) = no. de isolados capazes de produzir transcritos /no. total de isolados recuperados em cada período de armazenamento. P1, P2 e P3: produções 1, 2 e 3.

Campylobacter recuperados de queijos fabricados com leite contaminados com a cepa IAL 2383 e armazenados por um dia mostraram maior capacidade na produção de transcritos do gene *sodB* que os recuperados dos queijos produzidos com a cepa NCTC 11351 no primeiro dia de armazenamento. Aos quatro dias de armazenamento nenhum dos micro-organismos recuperados foi capaz de transcrever os transcritos para este gene (Tabela 8).

O gene *sodB* participa na resposta ao estresse oxidativo (PESCI; COTTLE; PICKETT, 1994; PURDY et al., 1999). A capacidade de gêneros, espécies ou biótipos serem capazes de possuir respostas fisiológicas às formas tóxicas de oxigênio é uma estratégia à sobrevivência ambiental e está relacionada à produção de enzimas *sod*-superóxido dismutase. Estas enzimas são capazes de metabolizar as formas tóxicas de oxigênio em água, peróxido de hidrogênio e radicais livres. Geralmente, a capacidade de produzir as enzimas *sod* é acompanhada pela produção das enzimas catalase ou peroxidase, que tornam o micro-organismo também capaz de metabolizar as formas tóxicas produzidas pelas enzimas *sod* na reação (HALLIWELL, 2000). *Campylobacter jejuni* é catalase positiva (JAY, 2005).

Considerando a cepa inoculada no leite e o tempo de armazenamento dos queijos, pode-se observar que a produção de transcritos para o gene *sodB* pelos isolados de *Campylobacter* foi similar ao comportamento observado para o gene *p19*. A similaridade na transcrição para estes dois genes foi também observada por

Moura (2013), que estudou o efeito do estresse por congelamento na sobrevivência e produção de transcritos de virulência nestas mesmas cepas de *Campylobacter*.

A correlação na capacidade de produzir transcritos para os genes *sodB* e *p19* já foi discutida por diversos autores. De acordo com Pesci; Cottle; Pickett, (1994) e Purdy e colaboradores (1999), como o gene *sodB* participa na resposta ao estresse oxidativo, há uma evidente ligação entre esta condição e o ferro. Palyada (2004) descreve a ligação entre a captação de ferro e o estresse oxidativo, que pode ser causado pelo frio, e pode gerar participação de ambos os genes nesta condição, ou em uma condição similar.

A Tabela 9 sintetiza a produção de transcritos de todos os genes estudados pelas estirpes recuperadas dos queijos.

Tabela 9. Frequência da produção de transcritos para quatro genes por 23 estirpes de *Campylobacter* recuperadas de queijos Minas Frescal após armazenamento refrigerado.

Gene avaliado	N (N=23)	%
<i>ciaB</i>	16	69,6%
<i>dnaJ</i>	19	82,6%
<i>p19</i>	3	13,0%
<i>sodB</i>	4	17,4%

A Tabela 10 demonstra o número de isolados de cada uma das cepas de *C. jejuni* (NCTC 11351 ou IAL 2383) recuperadas dos queijos e os genes para os quais mantiveram a capacidade de produzir transcritos.

Os resultados demonstram que além da viabilidade, também a capacidade de produzir transcritos para as cepas estudadas diminuiu quando as mesmas foram submetidas a condições adversas como as relacionadas à fabricação dos queijos e armazenamento refrigerado. Estas situações de injúria se acentuaram com o armazenamento, mas por até quatro dias de armazenamento alguns isolados ainda demonstraram a capacidade de transcrever os genes *ciaB* e *dnaJ*. A transcrição dos genes *p19* e *sodB* só foi observada em cepas recuperadas de queijos armazenados por um dia.

Tabela 10. Perfil de transcrição para os genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19* e *sodB* por *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 e IAL 2383, discriminado por isolados recuperados de queijos Minas Frescal após armazenamento refrigerado

Genes transcritos	<i>C. jejuni</i> NCTC 11351	<i>C. jejuni</i> IAL 2383
<i>ciaB, dnaJ, p19, sodB</i>	1	2
<i>ciaB, dnaJ, sodB</i>	0	1
<i>ciaB, dnaJ</i>	4	8
<i>dnaJ</i>	3	0
Nenhum gene	2	2
TOTAL	10	13

Vários autores têm estudado a presença e expressão de genes de virulência, utilizando RT-PCR em estirpes de *Campylobacter* spp mantidas sob uma variedade de condições de crescimento. Os resultados destes estudos indicam que as mudanças nas condições ambientais podem gerar uma variação considerável na capacidade de transcrever os genes (STINZI; WHITWORTH, 2003; PALYADA, 2004; STINZI et al., 2005; MOURIK, 2011). Porém, apesar da injúria, no presente estudo, entre os 23 isolados recuperados, 16 (69,6%) e 19 (82,6%) foram capazes de produzir transcritos para os genes *ciaB* e *dnaJ*, respectivamente. Isto sinaliza que apesar de as condições de beneficiamento e armazenamento dos alimentos terem a capacidade de diminuir a viabilidade e virulência de *Campylobacter*, não é capaz de garantir a segurança de seu consumo.

De forma geral pode-se inferir que *C. jejuni* NCTC 11351, foi ligeiramente mais afetada que a cepa IAL 2383 pelo estresse, tanto na perda de viabilidade quanto na capacidade de produzir transcritos de genes de virulência, mas a diferença não foi significativa ($P>0,05$).

A regulação dos diferentes genes é essencial para a sobrevivência de *Campylobacter*. O comportamento destes micro-organismos frente a diferentes condições de estresse demonstra a capacidade desta espécie em modular o seu potencial de virulência de acordo com o ambiente (MELO et al., 2013). O conhecimento deste processo é de grande importância para estudos mais detalhados sobre epidemiologia e patogenia da campilobacteriose (MARTINEZ et al., 2006), e também para avaliar os riscos relacionados ao consumo de alimentos como o queijo Minas Frescal. Além disso, esse conhecimento permite entender os diferentes comportamentos nas transcrições gênicas, de forma a determinar e explicar as diferenças observadas na patologia pelas diversas estirpes (MOURIK, 2011).

Estudos como os realizados no presente trabalho podem auxiliar na avaliação de análise de perigo relacionado ao consumo de diferentes alimentos, assim como, contribuir na eleição das formas de prevenção.

5.0 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- o armazenamento refrigerado reduz as contagens de *Campylobacter* em queijo Minas Frescal de 2 a 3 ciclos log do primeiro ao quarto dia e a números não detectáveis após sete dias de armazenamento, sendo acompanhado por uma mudança na morfologia da bactéria;
- o decréscimo da umidade e pH e o aumento da acidez durante o armazenamento refrigerado de queijos Minas Frescal apresenta correlação com a diminuição da viabilidade de *Campylobacter* neste alimento;
- *Campylobacter* presentes em queijo Minas Frescal tem sua capacidade de produção de transcritos para os genes *ciaB*, *dnaJ*, *p19* e *sodB* diminuída durante o armazenamento refrigerado, sendo o decréscimo mais acentuado no quarto dia de armazenamento, onde os genes *sodB* e *p19* não foram mais transcritos;
- o consumo de queijo Minas Frescal, se fabricado com leite contaminado com *Campylobacter*, oferece risco ao consumidor quando ingerido até quatro dias após a fabricação.

6.0 REFERÊNCIAS

ACMSF – ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF

FOOD. **Second Report on *Campylobacter***, 2005. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsfcampylobacter.pdf>>. Acesso em: 07 ago. 2012.

ALTERKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human innless in the United States, 1973–1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **Journal of Food Protection**, v.61, p.1405–7, 1998.

ALVES, R.M.V..Embalagens para Produtos de Laticínios.Campinas: **CETEA/ITAL**, 85p, 2004.

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.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; p.1-66, 2009.

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

BAFFONE, W.; CITTERO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; CAMPANA, R.; FALZAWO, L.; DONELLI, G. Retention of virulence in viable but non-culturable halofilic *Vibrio* spp. International **Journal of Food Microbiology**, v.89, p.31-39, 2003.

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.

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

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**, Washington, v. 75, n. 11, p. 3542–3553, 2009.

BHAVSAR, S. & KAPADNIS, B. Virulence factors of *Campylobacter*. **The Internet Journal of Microbiology**, [online] v. 3, n. 2, 2007. Disponível em: http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_microbiology/volume_3_number_2_27/article/virulence_factors_of_campylobacter.html. Acesso em: 28 mar 2011.

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

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

BONITA, R.; Doenças transmissíveis: Epidemiologia, vigilância e resposta. IN: BEAGLEHOLE, R.; KJELLSTRÖM, T. **Epidemiologia básica**, Santos: OMS, p.117-131, 2010.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Portaria 146**, de 07 de março de 1996, Departamento de Inspeção de Produtos Animais, DIPOA, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa nº 68**, de 12 de dezembro de 2006, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa nº 62**, de 29 de dezembro de 2011, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, 2011.

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**, Melbourne, p. 1-2, 2011.

BUSWELL, C.M., HERLIHY, Y.M., LAWRENCE, L.M., MCGUIGGAN, J.T.M., MARSH, P.D., KEEVIL, C.W., LEACH, S.A. Extended Survival and Persistence of

Campylobacter spp. in Water and Aquatic Biofilms and their Detection by Immunofluorescent-Antibody and –rRNA Staining. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, p. 733-741, 1998.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, [online] v. 10, p. 868-876, 2004. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x/full>. Acesso em: 27 de jun de 2012.

BRYAN, F. L. Diseases transmitted by foods: a classification and summary. 2nd ed.. Atlanta: **Centers for Disease Control**, 1982, p. 84-8237.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N. de; MEDEIRO, C. F. Avaliação microbiológica de queijo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 32-36, 2002.

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. **PulseNet Pathogens - *Campylobacter jejuni***, 2011. Disponível em: http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens_pages/campylobacter_jejuni.htm acesso em: 07 de out. 2012.

CEBALLOS-BARÓNA, I.; DUEÑAS-GUTIÉRREZA, C.; ORTIZ-URBINAB, J.; MONTEJOC, M. Fiebre, dolor en hipocondrio derecho y masa hepática con microcalcificaciones en consumidor de lácteos no pasteurizados. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 25, n. 8, p. 551-2, 2007.

CHAI SOWWONG, W.; KUSUMOTO, A.; HASHIMOTO, M.; HARADA, T.; MAKLON, K.; KAWAMOTO, K. Physiological Characterization of *Campylobacter jejuni* under Cold Stresses Conditions: Its Potential for Public Threat. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 1, p. 43–50, 2012.

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

2013.

COLLES, F. M.; JONES, T. A.; MCCARTHY, N. D.; SHEPPARD, S. K.; CODY, A. J.; DINGLE, K. E.; DAWKINS, M. S.; MAIDEN, M. C. *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 2042–2050, 2008.

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

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 set 2012.

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.

DEBRUYNE L, GEVERS D, VANDAMME P. 2008. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. In *Campylobacter*, 3rd ed, ed. I NACHAMKIN, CM; SZYMANSKI, MJ. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C., pp. 3-26, 2008.

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

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.

DORRELL, N.; WREN, B.W. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 2, p. 123–129, 2008.

DOYLE, M. P.; JONES, D. M. Food-borne transmission and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni*. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J.; TOMPKINS, L. S. (Ed.). *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. Washington (DC): **American Society for Microbiology**, p. 45-48, 1992.

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

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 EFSA Journal**. Italy, v. 8, n. 3, p. 1503, 2010.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, **The EFSA Journal**. Italy, pp.223, 2007.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA explains Zoonotic Diseases – *Campylobacter*. 2011 **The European Food Safety Authority**, Italy, Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/doc/factsheetcampylobacter.pdf>> Acesso em: 09 jan 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**, 2011, Rio de Janeiro, 19 (1): 74-81.

FAO, **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**, 2009. Disponível em: < <https://www.fao.org.br/> >. Acesso em: dezembro de 2009.

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

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - Center for Food Safety and Applied Nutrition, USA. ***Campylobacter jejuni* bad bug book**. 2008. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap4.html>>. Acesso em: 02 out. 2012.

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

FRIIS, L. M.; PIN, C.; PEARSON, B. M.; WELLS, J. M. In vitro cell culture methods

for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 61, p. 145–160, 2005.

FURTADO, M. M; Estudo conclusivo a respeito de Queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.208, p.13-16. 1980.

GANAN, M.; CAMPOS, G.; MUÑOZ, R.; CARRASCOSA, A. V.; DE PASCUALTERESA, S.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J. Effect of growth phase on the adherence to and invasion of Caco-2 epithelial cells by *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.140, n.1, 2010.

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

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. . Barueri, SP: Manole, 986p. 2008.

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**, Washington, v.25, n.3, p.209–223, 2005.

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

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.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H.; Hydrogen peroxide in the human body. **American Journal of Medicine**, v.486, p.10-13, 2000

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**, Amsterdam, v.101, n.2, p.75–82, 2004.

HARMON, K. M.; RAMSOM, G. M.; WESLEY, I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 11, n. 3, p. 195-200, 1997.

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

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**, Amsterdam, v. 24, p. 273-281, 1994.

HOFFMANN, F. L. Higiene: Fatores limitantes à proliferação de micro-organismos em alimentos. **Revista Brasil Alimentos**-nº 9, São José do Rio Preto. 2001. Disponível em: <http://www.brasilalimentos.com.br/BA/pdf/09/09%20-%20Higiene.pdf>. Acesso em: 23 nov 2012.

HOPKIN, K. A.; PAPAIZIAN, 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.

HU, L.; KOPECKO, D. J. Cell biology of human host cell entry by *Campylobacter jejuni*. In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.M.; BLASER, M. J. (Eds.), **Campylobacter**. ASM Press, Washington D.C., p.297-313, 2008.

HUNTER, S. M.; BERRANG, M. E.; MEINERSMANN, R. J.; HARRISON, M. A. Genetic diversity of *Campylobacter* on broiler carcasses collected previsceration and postchill in 17 U.S. poultry processing plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n.1, p 49–54, 2009.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacter* as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.117, n.3, p.237–257, 2007.

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

JAWETS, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Vibrio, Campylobacter, Helicobacter* e bactérias associadas. In: **Microbiologia Médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JONES, S. L.; LINDBERG, F. P.; BROWN, E. J. Phagocytosis. In: PAUL, W. E., (ed.). **Fundamental immunology**. 4 th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, p.1011-1015, 1999.

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.

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

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

LANGONI, H. micro-organismos emergentes causadores de mastites: *Campylobacter jejuni*. **Biológico**, v.59, p.55-58. 1997.

LI, Y. P.; INGMER, H.; MADSEN, M.; BANG, D. D. Cytokine responses in primary chicken embryo intestinal cells infected with *Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin and the expression of bacterial virulence-associated genes. **BMC Microbiology**, v. 8, n.107, 2008.

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**, Amsterdam, v. 145, n.1, p.111–115, 2011.

LITWIN, C. M. & CALDERWOCK, S. B.. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clinical Microbiology Reviews**. v.6, p137-149, 1993.

LODGE, K. B. **A Molecular Investigation of Campylobacter jejuni Pathogenesis**. 2007. 345f. Tese de Doutorado - School of Applied Sciences Portfolio of Science,

Engineering and Technology RMIT University, 2007.

LOPES, C. A. M.; OGAMA, M.; MODOLO, J. R.; GOTTSCHALK, A. F. Detection of significant public health bacterial pathogens in raw milk. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 23., 1994, Recife. Anais. Recife: Associações de classe; 1994.

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

MADALOZZO, F.R.; KOETZ, P.R.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B. Campylobacteriose em humanos e o controle de qualidade em produtos de origem aviária. **Higiene Alimentar**, v.21, p.59-63, 2007.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, ECIRJAU, C.; ALONSO, O.R.; FERNANDEZ, A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* and *Nes* in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v.296n, p. 4-48, 2006.

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 leites UHT e Pasteurizado tipo C**. 2011. 26f. Monografia – Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia-MG. 2011.

MORE, N. Å.; CORORAN, D.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; LUEY, B.; MATSUDDA, M.; MCDOWELL, D. A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, B. C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; OROURCE, M. I., B. R.; ROONEY, P. J.; ISSAIS, A; WHYTE, P & *Campylobacter*. **Veterinary Researches**, v.6, n.3, p.351-382, 2005.

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

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

MURAOKA, W. T.; ZHANG, Q. Phenotypic and Genotypic Evidence for L-Fucose Utilization by *Campylobacter jejuni*. **Journal of Bacteriology**, p. 1065–1075, 2011.

NACHAMKIN, I.; ALOOS, B. M.; HO, T. *Campylobacter* species and Guillian-Barre syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 11, n. 3, p. 555-567, 1998.

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**, Larchmont, v.6, n.6, p.669–679, 2009.

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**, Amsterdam, v.141, n.3, p.248–253, 2010.

OTTO BR, Sparrius M, Wors DJ and de Graaf FK (1994) Utilization of haem from the haptoglobin-haemoglobin complex by *Bacteroides fragilis*. **Microbiology Pathology** 17:137-147.

PACHECO, C.R. **Viabilidade e transcrição gênica de *Campylobacter jejuni* em fórmulas lácteas**. 2013. 33f. Monografia. Nutrição Universidade Federal de Uberlândia-MG.2013

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

PARK, S. F. Environmental Regulatory Genes. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). ***Campylobacter***. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p.423-440.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.74, n.3, p.177-188, 2002.

PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; PICKETT, C. L. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. **Infection and**

Immunity, v.62, p.2687–2694, 1994.

PHONGSISAY, V.; PERERA, V. N.; FRY, B. N. Expression of the *htrB* gene is essential for responsiveness of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* to harsh environments. **Microbiology-SGM**, Reading, v.153, n.1., p.254–262, 2007.

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

POPE, J. E.; KRIZOVA, A.; GARG, A. X.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; OUMET, J. A. *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Orlando, v.37, n.1, p.48–55, 2007.

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.

RATH, D.; JAWALI, N. Loss of expression of *cspC*, a cold shock family gene, confers a gain of fitness in *Escherichia coli* K-12 strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.188, n.19, p.6780-6785, 2006.

RABINSTEIN, A. A. Guillan-Barré syndrome. **The Open General and Internal Medicine Journal**, v.1, p.13–22, 2007.

RAMOS, J. M.; BERNAL, E.; ESGUEVILLAS, T.; LOPEZ-GARCIA, P.; GAZTAMBIDE, M. S.; GUTIERREZ, F. Non-imported brucellosis outbreak from unpasteurized raw milk in Moroccan immigrants in Spain. **Epidemiology and Infection**, Inglaterra, v.136, p.1552–1555, 2008.

REID, A.N.; PANDEY, R.; PALLYADA, K.; NAIKARE, H.; STINTZI, A. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.74, n.5, p.1583–1598, 2008.

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**, Oxford, 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**, Chicago, v.183, n.11, p.1607–1616, 2001.

ROSSI, D. A. **Utilização do Coalho Bovino e Coagulantes Microbiano e Genético na Elaboração do Queijo Minas Frescal**. 1997. 68f. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras-MG. 1997.

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

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

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade Microbiológica do Queijo Minas Frescal Comercializado no Município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, 2006.

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.; CARVALHO, A. C. T.; MODENA, C. M.; PINHO, M. M. O., LAGE, A. P. Investigação epidemiológica de um surto de toxinfecção alimentar por *Campylobacter jejuni* em estudantes de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, 6., 1998, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: ABRASCO, p.249, 1998.

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.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 3ª Edição, São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, C. M.; COSTA, S. O.; RAMOS, D. M. B.; MENDONÇA, R. C. S.; SOUZA, N. L. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em queijo tipo “Minas Frescal” comercializados no município de Bocaiúva-MG. Pôster. In. **V ENCONTRO NORTE-MINEIRO DE BIÓLOGOS**, Janaúba, MG, 2008.

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.

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.; MARLOW, D.; PALYADA, K.; NAIKARE, H.; PANCIERA, R.; WHITWORTH, L.; CLARKE, C. Use of genome-wide expression profiling and mutagenesis to study the intestinal lifestyle of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, Washington, v.73, n.3, p.1797-1810, 2005.

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

Torrejon CS, Castillo-Duran C, Hertrampf ED, Ruz M. Zinc and iron nutrition in Chilean children fed fortified milk provided by the **Complementary National Food Program**. **Nutrition**. 2004;20:177–80.

VAN DEUN, K.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; FLAHOUE, B.; VISSENBERG, K.; MARTEL, A.; VAN DEN BROECK, W.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESEBROUCK, F. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, 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.

VARNAM, A.H., SUTHERLAND, J.P. *Leche y productos lácteos*; tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1999. Leche y productos lácteos líquidos. p.63-72. Vasil, M. L. & Ochsner, U. A. *The response of Pseudomonas aeruginosa to iron: genetics, biochemistry and virulence*. **Molecular Microbiology**. 34, 399-413, 1999.

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

WALLIS, M. R. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. **British Journal Of Biomedical Science**, London, v.51, n.1, p.54-64, 1994.

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

WHITEHOUSE, C. A.; BALBO, P. B.; PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; MIRABITO, P. M.; PICKETT, C. L. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. **Infection and immunity**, Washington, v.66, n.5, p.1934-1990, 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Campylobacter**, 2000. Fact Sheet nº 255. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 19 jan. 2012.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Campylobacter**, 2011. Fact Sheet nº 255. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/index.html>>. Acesso em: 09 fev. 2013.

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**, p.19:257–63, 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**, Washington, 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**, Des Moines, v.69, n.4, p.768–774, 2006.

ZIMMER, M., BARNHART, H., IDRIS, U. & LEE, M. D. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. **Avian Disease** v.47, p.101–107, 2003.

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